**Тенофовира дизопроксила фумарат ФС**

**Тенофовир**

**Tenofoviri disoproxili fumaras Вводится впервые**

Бис({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)[({[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфоната] (2*E*)-бут-2-ендиоат (1:1)



|  |  |
| --- | --- |
| C19H30N5O10P·C4H4O4 | М.м. 635,5 |

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % тенофовира дизопроксила фумарата C19H30N5O10P·C4H4O4 в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

**Описание**. Белый или почти белый кристаллический порошок.

**Растворимость**. Легко растворим в диметилформамиде, легко растворим или растворим в метаноле, мало растворим или очень мало растворим в воде.

**Подлинность**. *1. ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца тенофовира дизопроксила фумарата.

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания пика основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика тенофовира дизопроксила на хроматограмме раствора стандартного образца (испытание «Количественное определение»).

**Температура плавления**. От 114 до 118 °C (ОФС «Температура плавления»).

**Энантиомерная чистота**. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы содержащие тенофовира дизопроксил и его примеси используют свежеприготовленными.

*Буферный раствор*. Около 7,7 г ацетата аммония растворяют в 800 мл воды, доводят pH раствора до 6,8±0,05 5 % раствором аммиака и разбавляют водой до объёма 1 л.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Метанол—буферный раствор 15:85.

*Испытуемый раствор*. Около 25,0 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца (А)*. Около 50,0 мг стандартного образца тенофовира дизопроксила фумарата помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца (Б)*. 5,0 мл раствора стандартного образца (А) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. Около 5,0 мг стандартного образца примеси A тенофовира дизопроксила фумарата помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл. 1,0 мл полученного раствора и 10 мл раствора стандартного образца (А) переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. 0,5 мл раствора стандартного образца (Б) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора ПФ до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание:

примесь А: бис({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)[([(2*S*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфоната] (2*E*)-бут-2-ендиоат (1:1); CAS 1432630-26-6.

*Хроматографические условия*.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 15,0×0,4 см, силикагель модифицированный α1-кислотным гликопротеином для хиральной хроматографии, 5 мкм |
| Температура колонки | 15 °С |
| Температура образца | 4–8 °С |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин |
| Детектор | спектрофотометрический, 260 нм |
| Объём пробы | 10 мкл |
| Время хроматографирования | 30 мин |

Хроматографируют испытуемый раствор, раствор стандартного образца (Б), растворы для проверки пригодности и чувствительности хроматографической системы.

*Относительное время удерживания соединений*. Тенофовира дизопроксил – 1,0 (около 7 мин); примесь A – 1,4.

*Пригодность хроматографической системы*:

на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы *разрешение (R)* между пиками тенофовира дизопроксила и примеси A должно быть не менее 1,5;

на хроматограмме раствора стандартного образца (Б):

– *фактор асимметрии* пика (*AS*) тенофовира дизопроксила должен быть не более 2,5;

– *стандартное отклонение* отношений площади пика тенофовира дизопроксила должно быть не более 5,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику тенофовира дизопроксила, должна составлять не менее 1000 теоретических тарелок;

на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика тенофовира дизопроксила должно быть не менее 10.

Содержание примеси A в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{A}∙100}{\sum\_{}^{}S\_{i}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *SA* | − | площадь пика примеси A на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | Σ*Si* | − | сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемогораствора. |

*Допустимое содержание примеси A* – не более 1,0 %.

**Родственные примеси**. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы содержащие тенофовира дизопроксил и его примеси используют свежеприготовленными.

*Буферный раствор*. Около 1,41 г безводного динатрия гидрофосфата растворяют в 800 мл воды, доводят pH раствора до 5,5±0,05 концентрированной фосфорной кислотой и разбавляют водой до объёма 1 л.

*Подвижная фаза А (ПФА)*. 2-Метил-2-пропанол—метанол—буферный раствор 25:275:700.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. 2-Метил-2-пропанол—метанол—буферный раствор 25:675:300.

*Испытуемый раствор*. Около 25,0 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения*. Около 5,0 мг фумаровой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца*. Около 10,0 мг (точная навеска) стандартного образца тенофовира дизопроксила фумарата помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем ПФА до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. Около 7,5 мг тенофовира (примесь 1) и около 7,5 мг аденина (примесь 2) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. 5,0 мл раствора стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора ПФА до метки.

Примечание:

примесь 1: ({[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфоновая кислота, CAS 147127-20-6;

примесь 2: 9*H*-пурин-6-амин, CAS 73-24-5;

примесь 3: ({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)({[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфонат), CAS 211364-69-1;

примесь 4: ({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил){[(этоксикарбонил)окси]метил}[({[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфонат], CAS 1422284-16-9;

примесь 5: (пропан-2-ил)({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)[({[(2*R*)-1-(6-амино-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфонат], CAS 1246812-40-7;

примесь 6: бис({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)[({[(2*R*)-1-(6-{[(пропан-2-илокси)карбонил]амино}-9*H*-пурин-9-ил)пропан-2-ил]окси}метил)фосфонат], CAS 1244022-54-5;

примесь 7: тетракис({[(пропан-2-илокси)карбонил]окси}метил)метиленбис[азандиил-9*H*-пурин-6,9-диил(2*R*)-1,2-пропандиилоксиметилен]бис(фосфонат), CAS 1093279-76-5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 25,0×0,46 см, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 35 °С; |
| Температура образца | 4–8 °С |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 260 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % | Режим |
| 0–2 | 100 | 0 | Изократический |
| 2–30 | 100→0 | 0→100 | Линейный градиент |
| 30–45 | 0 | 100 | Изократический |
| 45–50 | 0→100 | 100→0 | Линейный градиент |
| 50–60 | 100 | 0 |  Изократический |

Хроматографируют испытуемый раствор, раствор сравнения, раствор стандартного образца и растворы для проверки пригодности и чувствительности хроматографической системы.

*Идентификация примесей*. Для идентификации пика фумаровой кислоты используют хроматограмма раствора сравнения.

*Относительное время удерживания соединений*. Тенофовира дизопроксил – 1 (около 21 мин); фумаровая кислота – около 0,10; примесь 1 – около 0,12; примесь 2 – около 0,14; примесь 3 – около 0,22; примесь 4 – около 0,78; примесь 5 – около 0,80; примесь 6 – около 1,38; примесь 7 – около 1,76.

*Пригодность хроматографической системы*:

на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы *разрешение (R)* между пиками примесей 1 и 2 должно быть не менее 1,5;

на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика тенофовира дизопроксила должно быть не менее 10;

на хроматограмме раствора стандартного образца:

– *фактор асимметрии* пика (*AS*) тенофовира дизопроксила должен быть не более 2;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика тенофовира дизопроксила должно быть не более 5,0 % (5 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику тенофовира дизопроксила, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

*Поправочные коэффициенты*. Для расчёта содержания площади пиков следующих примесей умножаются на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь 1 – 0,47; примесь 2 – 0,23; примесь 3 – 0,68; примесь 4 – 1,39; примесь 6 – 1,37.

Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах (*Хi*) вычисляют по формуле:

$$X\_{i}=\frac{S\_{i}∙a\_{0}∙50∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙20∙100∙10∙(100-W)}=\frac{S\_{i}∙a\_{0}∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)∙4}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Si* | − | площадь пика каждой из примесей на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика тенофовира дизопроксила на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца тенофовира дизопроксила фумарата, мг; |
|  | *a*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *P* | − | содержание действующего вещества в стандартном образце тенофовира дизопроксила фумарата, %; |
|  | *W* | – | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей. |

*Допустимое содержание примесей:*

примесь 3 – не более 1,0 %;

примесь 5 – не более 0,3 %;

примеси 1, 2, 4, 6 и 7 –не более 0,15 % каждая;

любая другая примесь – не более 0,10 % каждая;

суммарное содержание всех примесей – не более 2,0 %.

Не учитывают пики с относительным временем удерживания менее 0,1 от времени удерживания пика тенофовира дизопроксила, пик фумаровой кислоты и пики, площадь которых меньше площади пика тенофовира дизопроксила на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,05 %).

**Хлорметилизопропилкарбонат**. Определение проводят методом ГХ (анализ равновесного пара, ОФС «Газовая хроматография»).

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в флакон для парофазного анализа, прибавляют 5,0 мл бензилового спирта, закрывают и перемешивают до получения раствора.

*Раствор сравнения*. Около 0,2 г (точная навеска) хлорметилизопропилкарбоната помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в бензиловом спирте и доводят объём тем же растворителем до метки. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём тем же растворителем до метки. 5,0 мл полученного раствора помещают в флакон для парофазного анализа.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 2,0 мл раствора сравнения переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём бензиловым спиртом до метки.

Холостой раствор. Бензиловый спирт

Хроматографические условия.

Параметры газового хроматографа:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | длина 30 м; внутренний диаметр 0,53 мм ID, покрытая 3 мкм пленкой поли[(цианопропил)(фенил)][диметил]силоксана |
| Газ-носитель | азот |
| Деление потока | 1:5 |
| Температура инжектора | 180 °С |
| Температура детектора | 260 °С |
| Температура колонки | 75 °С в течение 5 мин;нагрев до 150 °С со скоростью 10 °С/мин;нагрев до 230 °С со скоростью 40 °С/мин;230 °С в течение 5 мин |
| Детектор | пламенно-ионизационный |

Условия для парофазного хроматографирования:

|  |  |
| --- | --- |
| Объём флакона | 20 мл |
| Температура инкубации | 90 °С |
| Время инкубации | 20 мин |
| Скорость перемешивания | 600 об/мин |
| Температура шприца | 105 °С |
| Время продувки | 2 мин |
| Время хроматографирования | 19,5 мин |
| Растворитель (холостой раствор) | бензиловый спирт |

Хроматографируют испытуемый раствор, раствор сравнения и раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы:

– на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы отношение сигнал/шум по пику хлорметилизопропилкарбоната должно составлять не менее 10;

– на хроматограмме раствора сравнения относительное стандартное отклонение площадей пика хлорметилизопропилкарбоната, рассчитанное по хроматограммам стандартного раствора не более 15 % (5 определений).

Содержание хлорметилизопропилкарбоната (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S∙a\_{0}∙5∙5∙100}{S\_{0}∙a∙100∙50}=\frac{S∙a\_{0}}{S\_{0}∙a∙2}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S* | − | площадь пика хлорметилизопропилкарбоната на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика хлорметилизопропилкарбоната на хроматограмме раствора сравнения; |
|  | *a* | − | навеска хлорметилизопропилкарбонатав испытуемом растворе, г; |
|  | *a*0 | − | навеска субстанции в растворе сравнения, г; |

Допустимое содержаниехлорметилизопропилкарбоната не более 0,15 %.

**Вода**. Не более 1,0 % (ОФС «Определение воды», способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 0,2 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 2.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**Микробиологическая чистота**. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**.

*1. Фумаровая кислота*. Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,25 г (точная навеска) субстанции растворяют в 50 мл воды и титруют 0,1 Мрастворомгидроксида натрия*.* Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 Мраствора гидроксида натрия соответствует 5,804 мг фумаровой кислоты C4H4O4.

Содержит не менее 17,5 % и не более 19,0 % фумаровой кислоты в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

*2. Тенофовира дизопроксила фумарат*. Определение проводят методом ВЭЖХ. Все растворы содержащие тенофовира дизопроксил и его примеси используют свежеприготовленными.

*Буферный раствор*. 1,0 мл триэтиламина растворяют в 500 мл воды, доводят pH раствора до 6,0±0,02 концентрированной фосфорной кислотой и разбавляют водой до объёма 1 л.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Ацетонитрил—буферный раствор 450:550.

*Растворитель*. Ацетонитрил—вода 5:95.

*Испытуемый раствор*. Около 25,0 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворителе и доводят объём растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца*. Около 25,0 мг (точная навеска) стандартного образца тенофовира дизопроксила фумарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворителе и доводят объём растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Температура образца | 4–8 °С |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 260 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования  | 20 мин |

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца.

Содержание тенофовира дизопроксила фумарата C19H30N5O10P·C4H4O4 в субстанции в процентах (*X*) в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙50∙10∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙50∙10∙(100-W)}-\frac{S∙a\_{0}∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика тенофовира дизопроксила на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика тенофовира дизопроксила на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска стандартного образца тенофовира дизопроксила, мг; |
|  | *P* | – | содержание тенофовира дизопроксила мезилата в стандартном образце тенофовира дизопроксила фумарата, %; |
|  | *W* | – | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %. |

**Хранение.** В плотно закрытой упаковке, в защищённом от света месте, при температуре от 2 до 8 °С.