**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Левосимендан** |  | **ФС.2.1.0442** |
| **Левосимендан** |  |  |
| **Levosimendanum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C14H12N6O | М.м. 280,28 |
| [141505-33-1] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

*N*-{4-[(4*R*)-4-Метил-6-оксо-1,4,5,6-тетрагидропиридазин-3-ил]фенил}карбоногидразоноилдицианид.

Cодержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % левосимендана C14H12N6O в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** От жёлтого или жёлтого с зеленоватым, или жёлтого с оранжевым оттенком цвета до тёмно-жёлтого с коричневатым оттенком цвета аморфный порошок.

**Растворимость.** Легко растворим в диметилформамиде, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см–1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру фармакопейного стандартного образца левосимендана.

*2. Спектрофотометрия* (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 12 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в этаноле и доводят объём раствора до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл и доводят объём раствора этанолом до метки.

Спектр поглощения испытуемого раствора в области длин волн от 200 до 450 нм должен иметь максимумы при 383 нм и 289 нм, и минимум при 318 нм.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От –596 до –632 в пересчёте на сухое вещество (0,1 % раствор субстанции в диметилформамиде, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора**. Раствор 0,05 г субстанции в 20 мл этанола должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Оптическая плотность.** Оптическая плотность раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», измеренная при длине волны 600 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, не должна превышать 0,3 (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

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

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Растворяют 2,0 г натрия дигидрофосфата дигидрата в 900 мл воды, доводят значение рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,10, количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил.

*Растворитель.* Метанол—ПФА 200:800.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20,0 мг субстанции, растворяют в 10 мл диметилсульфоксида, прибавляют 10 мл этанола и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мл раствора сравнения и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание

Примесь 1:(2*Z*)-({4-[(4*R*)-4-метил-6-оксо-1,4,5,6-тетрагидропиридазин-3-ил]фенил}гидразинилиден)-2-цианоацетамид [274263-65-9].

Примесь 2: этил[(2*Z*)-({4-[(4*R*)-4-Метил-6-оксо-1,4,5,6-тетрагидропиридазин-3-ил]фенил}гидразинилиден)-2-цианоацетат] [58782509].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный, для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки | 25 °C; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 380 нм; |
| Объём пробы | 30 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–5 | 80 → 70 | 20 → 30 |
| 5–15 | 70 | 30 |
| 15–30 | 70 → 10 | 30 → 90 |

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

*Относительное время удерживания соединений.* Левосимендан – 1 (около 14 мин); примесь 1 – около 0,4; примесь 2 – около 1,1.

*\*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика левосимендана должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора сравнения:

*- фактор асимметрии пика (AS)* левосимендана должен быть не более 2,0;

*- относительное стандартное отклонение* площади пика левосимендана должно быть не более 5,0 % (6 введений).

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика каждой из примесей 1 и 2 не должна более чем в 1,5 раза превышать площадь пика левосимендана на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,15 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать площадь пика левосимендана на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать пятикратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее площади основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,05 %).

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

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Буферный раствор.* Растворяют 2,3 г аммония дигидрофосфата в 900 мл воды, доводят значение рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до 3,50, количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Метанол—буферный раствор 75:925.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20,0 мг субстанции, растворяют в 10 мл диметилсульфоксида и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора метанолом до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 24 мг симендана, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и доводят объём раствора метанолом до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и 20 мг фармакопейного стандартного образца левосимендана, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и доводят объём раствора метанолом до метки.

Примечание

Декстросимендан: *N*-{4-[(4*S*)-4-метил-6-оксо-1,4,5,6-тетрагидропиридазин-3-ил]фенил}карбоногидразоноилдицианид [144238-75-5].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель модифицированный овомукоидом для хиральной хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °C; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 380 нм; |
| Объём пробы | 5 мкл; |
| Время хроматографирования | 20 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Левосимендан – 1 (около 10 мин); декстросимендан – около 1,2.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками левосимендана и декстросимендана должно быть не менее 1,25.

На хроматограмме раствора сравнения:

*- отношение сигнал/шум (S/N)* для пика левосимендана должно быть не менее 20;

*-* *фактор асимметрии пика (AS)* левосимендана должен быть не более 2,5;

*-* *относительное стандартное отклонение* площади пика левосимендана должно быть не более 5,0 % (6 введений).

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика декстросимендана не должна превышать площадь пика левосимендана на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,6 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

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

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,001 % (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 3Б).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 16 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции  концентрацией 1 мг левосимендана в 1 мл этилового спирта 96 %, нагревают не выше 70 °С и перемешивают до полного растворения субстанции.

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

Растворы используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза (ПФ).* ПФБ—ПФА 400:600.

*Растворитель.* Диметилсульфоксид—этанол 10:10.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца левосимендана.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца левосимендана, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 15 мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца левосимендана и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора стандартного образца левосимендана:

*- фактор асимметрии пика (AS)* левосимендана должен быть не более 2,0;

*- относительное стандартное отклонение* площади пика левосимендана должно быть не более 2,0 % (6 введений).

Содержание левосимендана C14H12N6O в субстанции в процентах в пересчёте на сухое вещество (*X*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P ·50·2·100∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙50·2·100·(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика левосимендана на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика левосимендана на хроматограмме раствора стандартного образца левосимендана; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска фармакопейного стандартного образца левосимендана, мг; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | – | содержание левосимендана в фармакопейном стандартном образце левосимендана, %. |

ХРАНЕНИЕ

В плотно укупоренной упаковке.

\*Перед проведением испытания должна быть проверена разделительная способность хроматографической системы.