МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Левофлоксацин гемигидрат** |  | **ФС.2.1.0122** |
| **Левофлоксацин** |  |  |
| **Levofloxacinum hemihydricum** |  | **Взамен ФС.2.1.0122.18** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C18H20FN3O4·1/2H2O | М.м. 370,38 |
| [138199-71-0] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(3*S*)-3-Метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат.

Cодержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % левофлоксацина в пересчёте на безводное и не содержащее остаточных органических растворителей вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** Белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок.

**Растворимость**. Умеренно растворим в воде, растворим в уксусной кислоте, мало растворим в спирте 96 %.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»).Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см–1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру фармакопейного стандартного образца левофлоксацина.

*2. ВЭЖХ.* Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика левофлоксацина на хроматограмме раствора фармакопейного стандартного образца левофлоксацина (раздел «Количественное определение»).

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От –92 до –106 в пересчёте на безводное вещество (0,5 % раствор субстанции в метаноле, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора.** Раствор 0,5 г субстанции в 100 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y5 или GY5. (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**Родственные примеси**

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

Все растворы используют свежеприготовленными и защищают от света.

*Раствор А.* В мерную колбу вместимостью1000 мл помещают 1,32 г *D*-фенилаланина и 0,75 г меди(II) сульфата, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Метанол—раствор А 150:850.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 20 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в 10 мл воды и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, прибавляют 5 мг фармакопейного стандартного образца примеси Е, растворяют в 10 мл воды и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Примечание

Примесь Е: (3*R*)-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [100986-86-5].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 3,5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 0,7 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 294 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 30 мин. |

Хроматографируют стандартный раствор и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Левофлоксацин – 1; примесь Е – около 0,91.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пика примеси Е используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму стандартного раствора.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

- *разрешение (RS)* между пиками примеси 5 и левофлоксацина должно быть не менее 2,0;

- *фактор асимметрии пика (AS)* левофлоксацина должен быть не более 1,5.

*Допустимое содержание примесей*. Содержание примеси Е в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования (ОФС «Хроматография»):

- примесь Е – не более 1,0 %.

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

Все растворы используют свежеприготовленными и защищают от света.

В зависимости от способа получения субстанции левофлоксацина гемигидрата и от предполагаемого наличия примесей, для определения показателя «Родственные примеси» применяют различные подходы. В случае если потенциальной примесью является примесь 3, рекомендуется использовать метод 1. Метод 2 в сочетании с определением энантиомерной чистоты рекомендуется использовать при потенциальном наличии примеси 6.

***Метод 1***

*Раствор А.* В мерную колбу вместимостью1000 мл помещают 8,5 г аммония ацетата, 1,25 г меди(II) сульфата и 1,3 г L-изолейцина, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Метанол—раствор А 300:700.

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

*Раствор стандартного образца левофлоксацина.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают около 20 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси Е, растворяют в растворе стандартного образца левофлоксацина и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца левофлоксацина и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

Примечание

Примесь А: (3*S*)-3-метил-7-оксо-10-(пиперазин-1-ил)-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [117707-40-1].

Примесь В: (3*S*)-3-метил-10-{[2-(метиламино)этил]амино}-7-оксо-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [151250-76-9].

Примесь С: 4-{(3*S*)-6-марбокси-3-метил-7-оксо-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-10-ил}-1-метилпиперазин-1-оксид [117678-38-3].

Примесь D: (3*S*)-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [117620-85-6].

Примесь E: (3*R*)-3-метил-10-(4-метилпиперазин-1-ил)-7-оксо-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [100986-86-5].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 45 °С; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 360 нм; |
| Объём пробы | 25 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное времени удерживания пика левофлоксацина. |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца левофлоксацина и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Левофлоксацин – 1 (около 12 мин); примесь А – около 0,47; примесь В – около 0,52; примесь С – около 0,63; примесь D – около 0,73; примесь E – около 1,21.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пика примеси E используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы. Для идентификации пиков примесей А, В, С и D используют относительное время удерживания соединений.

*Пригодность хроматографической системы*

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

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками левофлоксацина и примеси Е должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора стандартного образца левофлоксацина *фактор асимметрии* *пика* *(AS)* левофлоксацина должен быть не менее 0,5 и не более 1,5;

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания примесей площади пиков следующих примесей умножают на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь В – 1,1; примесь С – 0,9.

*Допустимое содержание примесей.* Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования (ОФС «Хроматография»):

- примесь A – не более 0,3%;

- примесь B – не более 0,3%;

- примесь C – не более 0,3%;

- примесь D – не более 0,3%;

- примесь E – не более 0,8%;

- любая другая примесь – не более 0,1 %;

- сумма примесей – не более 0,5 %, не считая примесь С.

***Метод 2***

*Буферный раствор.* Растворяют 3,08 г аммония ацетата и 8,43 г натрия перхлората в 900 мл воды, доводят значение рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,2, количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 160:840.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—метанол—буферный раствор 300:200:500.

*Растворитель.* Ацетонитрил—вода 1:10.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 40 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в 8 мл ацетонитрила, при необходимости обрабатывают ультразвуком, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца левофлоксацина А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 40 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, растворяют в 8 мл ацетонитрила, при необходимости обрабатывают ультразвуком, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца левофлоксацина Б*. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца левофлоксацина А и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси А, растворяют в растворе аммиака 0,2 % в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси F.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси F, растворяют в метаноле, при необходимости обрабатывают ультразвуком, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 5,0 мл раствора стандартного образца левофлоксацина А, прибавляют 2,0 мл раствора стандартного образца примеси А и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца левофлоксацина Б, прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца примеси F и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл раствора для проверки пригодности хроматографической системы и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание

Примесь A: (3*S*)-3-метил-7-оксо-10-(пиперазин-1-ил)-9-фтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [117707-40-1].

Примесь F: (3*S*)-3-метил-7-оксо-9,10-дифтор-2,3-дигидро-7*H*-пиридо[1,2,3-*de*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота [100986-89-8].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 3,0 мкм; |
| Температура колонки | 38 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |

*Градиентное элюирование*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–5 | 100 | 0 |
| 5–10 | 100 → 82 | 0 → 18 |
| 10–15 | 82 → 40 | 18 → 60 |
| 15–30 | 40 | 60 |
| 30–30,1 | 40 → 100 | 60 → 0 |
| 30,1–38 | 100 | 0 |

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

*Относительное время удерживания соединений.* Левофлоксацин – 1; примесь А – около 0,9; примесь F – около 2,9.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пика примеси А используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы. Для идентификации пика примеси F используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

*Пригодность хроматографической системы*

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

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси А и левофлоксацина должно быть не менее 2,0.

Содержание примеси F в субстанции в процентах ($X$) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙5∙100∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙50∙25∙50}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙125},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика примеси F на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика примеси F на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы; |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска фармакопейного стандартного образца примеси F, мг; |
|  | *P* | – | содержание примеси F в фармакопейном стандартном образце примеси F, %. |

Содержание любой другой примеси в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙100∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙20∙50},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика левофлоксацина на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы; |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, мг; |
|  | *P* | – | содержание левофлоксацина в фармакопейном стандартном образце левофлоксацина, %. |

*Допустимое содержание примесей:*

- примесь А – не более 0,2 %;

- примесь F – не более 0,13 %;

- любая другая примесь – не более 0,1 %;

- сумма примесей – не более 0,5 %.

**Вода.** От 2,0 % до 3,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют 0,5 г (точная навеска) субстанции и, в качестве растворителя, смесь формамид—метанол 1:1.

**Сульфатная зола.** Не более 0,2 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 0,5 г (точная навеска) субстанции и платиновый тигель.

Тяжёлые металлы. Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) в зольном остатке, полученном после сжигания 0,5 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

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

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,5 ЕЭ на 1 мг левофлоксацина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография») в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

*Подвижная фаза (ПФ).* Метанол—буферный раствор 300:700.

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

*Раствор стандартного образца левофлоксацина.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора стандартного образца левофлоксацина *фактор асимметрии пика (AS)* левофлоксацина должен быть не менее 0,5 и не более 1,5;

Содержание левофлоксацина C18H20FN3O4 в субстанции в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество в процентах ($X)$ вычисляют по формуле:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика левофлоксацина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика левофлоксацина на хроматограмме раствора стандартного образца левофлоксацина; |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска фармакопейного стандартного образца левофлоксацина, мг; |
|  | *Р* | − | содержание левофлоксацина в фармакопейном стандартном образце левофлоксацина, %; |
|  | *W* | − | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %. |

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте.