

М. К. Седова, М. С. Сергеева, М. Е. Дуденкова, Л. М. Гаевая,  
Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин

## АНАЛИЗ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУБСТАНЦИИ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА

ФГБУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова" РАМН, Москва, Россия

Разработана методика анализа и стандартизации субстанции левофлоксацина, синтезированной по оригинальному способу. Изучены физико-химические свойства серийных образцов субстанции левофлоксацина, сняты ИК-, УФ-спектры для ее идентификации, определено содержание посторонних примесей и R-офлоксацина в субстанции методом ВЭЖХ, а также содержание остаточных растворителей методом ГЖХ. Проведено количественное определение образцов субстанции с помощью ВЭЖХ. Определен срок годности и установлены нормы качества субстанции левофлоксацина, на основании полученных результатов оформлен проект фармакопейной статьи предприятия на субстанцию левофлоксацина.

**Ключевые слова:** левофлоксацин; субстанция; анализ; стандартизация; высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ; посторонние примеси; R-офлоксацин; остаточные растворители; газо-жидкостная хроматография, ГЖХ.

Левофлоксацин (I), антибактериальное средство из группы фторхинолонов, представляет собой левовращающий изомер рацемической смеси офлоксацина — (S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*]-1,4-бензоксазин-6-карбоновой кислоты гемигидрат (рис. 1).

И обладает широким спектром действия с бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, препарат показал высокую эффективность и безопасность в клинических исследованиях [1, 2].

В Институте органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения РАН был разработан новый, оригинальный способ синтеза I, ключевым соединением которого является 7,8-дифтор-2,3-дигидро-3-метил-4Н-1,4-бензоксазин [3].

Целью настоящего исследования являлась разработка методик анализа и стандартизация субстанции I, синтезированной по оригинальному способу.

### Экспериментальная часть

Исследование проведено на 5 серийных образцах субстанции I.

При разработке методик анализа использовали свидетели вероятных технологических примесей I: (S)-9-фтор-3-метил-10-(пиперазин-1-ил)-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота (примесь А); (S)-9,10-дифтор-3-метил-7-ок-

со-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*][1,4]бензоксазин-6-карбоновая кислота (примесь В) и этиловый эфир (S)-9,10-дифтор-3-метил-7-оксо-2,3-дигидро-7Н-пиридо[1,2,3-*d,e*][1,4]бензоксазин-6-карбоновой кислоты (эфир примеси В). Свидетели технологических примесей субстанции I были предоставлены Институтом органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения РАН.

Количественное определение I в субстанции методом ВЭЖХ проводили с применением стандартного образца (СО) I (Levofloxacin, USP Reference standard Cat. No 1362103).

ИК-спектры субстанции сняты в таблетках калия бромида на ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия), УФ-спектры сняты на УФ-спектрофотометре UV-1700 ("Shimadzu", Япония) в 0,1М растворе хлоридоводородной кислоты.

Хроматографический анализ субстанции методом ВЭЖХ проведен на жидкостных хроматографах LC-10AT (Shimadzu, Япония) со спектрофотометрическим детектором UV-VIS SPD-10A с переменной длиной волны и Golden System (Beckman Coulter, Inc, США) с градиентным насосом (модель 127) и спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (модель 166), программное обеспечение — пакет "Мультихром 1.5" (ЗАО Амперсенд, Россия).

Определение остаточных органических растворителей в субстанции I проведено методом ГЖХ на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Chrom 5 ("Лабораторные приборы", ЧССР), программное обеспечение — "Экохром" ("ООО Прибор", Россия).

При разработке методик анализа субстанции I с помощью ВЭЖХ были использованы материалы монографии на субстанцию I, находящейся на рассмотрении для включения в фармакопею США (pending monograph) [4].

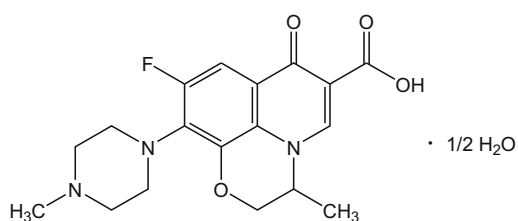


Рис. 1. Структурная формула I.

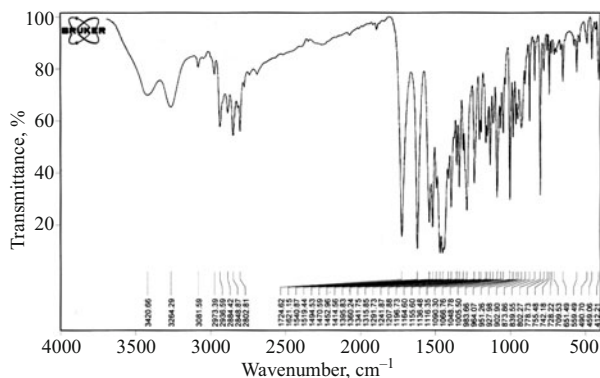


Рис. 2. ИК-спектр субстанции I (KBr).

### Результаты и их обсуждение

По внешнему виду образцы субстанции представляли собой мелкокристаллический порошок от почти белого до светло-желтого цвета, умеренно или мало растворимый в воде, мало растворимый в этиловом спирте 95 %, растворимый или умеренно растворимый в 0,1 М хлористоводородной кислоте, легко растворимый в ледяной уксусной кислоте.

Потеря в массе при высушивании, определенная при температуре 105 °С, составляла от 2,3 до 2,7 %, при расчетном содержании кристаллизационной воды в субстанции около 2,4 %. Содержание в образцах воды, определенное по методу К. Фишера, составляло 2,5 %.

Плавление образцов I наблюдалось в интервале от 205 до 255 °С и происходило с разложением, характерной температуры плавления субстанции не имеет.

Удельное вращение растворов образцов субстанции I в метаноле (концентрация 5 мг/мл) составляло от –96,6 до –101,6°.

Для подготовки пробы при снятии ИК-спектра субстанцию I растирали с тщательно измельченным и высушенным калия бромидом (1,2 мг I в 200 мг калия бромида), смесь тщательно перетирали и прессовали диск.

В ИК-спектрах I наблюдаются следующие характеристические полосы (см<sup>-1</sup>): 3420, 3264 — валентные колебания связи O–H воды и карбоксильной группы, 1724, 1621 — валентные колебания карбонильных групп, серия полос в области 1540 – 1450 принадлежат колебаниям C=C связей, при 1414 и 1360 — колебаниям N–CH<sub>3</sub> и C–CH<sub>3</sub> групп, валентные колебания C–O и C–F наблюдаются при 1090 и 1005 (рис. 2).

Для получения УФ-спектров растворов I испытуемые растворы готовили следующим образом: около 0,06 г субстанции I переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 70 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, встряхивали до растворения, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки 0,1 М раствором

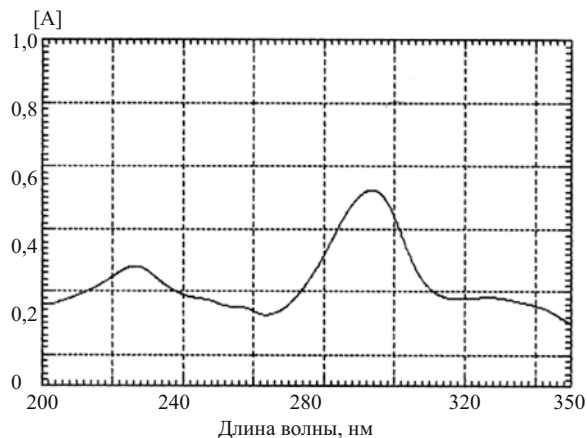


Рис. 3. УФ-спектр 0,0006 % раствора субстанции I в 0,1 М хлористоводородной кислоте.

хлористоводородной кислоты, перемешивали (концентрация раствора 0,006 мг/мл (0,0006 %)).

В УФ-спектрах растворов I в 0,1 М хлористоводородной кислоте с концентрацией I 0,006 мг/мл (0,0006 %) в диапазоне длин волн от 200 до 350 нм присутствуют 2 четких максимума поглощения: при  $227 \pm 2$  и  $294 \pm 2$  нм (рис. 3).

Хроматографическое разделение I и примесей методом ВЭЖХ проводили в следующих условиях: колонка Luna C18(2), 5 мкм, 250 × 4,6 мм (Phenomenex), температура колонки 38 °С, скорость потока подвижной фазы — 1,5 мл/мин, аналитическая длина волны 280 нм, объем пробы — 20 мкл. Режим элюирования градиентный (табл. 1).

Для приготовления раствора А смешивали 840 мл буферного раствора и 160 мл ацетонитрила, фильтровали через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм, дегазировали.

Для приготовления раствора Б смешивали 500 мл буферного раствора, 300 мл ацетонитрила и 200 мл метанола, фильтровали через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм, дегазировали.

Для приготовления буферного раствора 3,08 г аммония ацетата и 8,43 г натрия перхлората моногидрата помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 990 мл воды очищенной, доводили рН раствора до 2,2 фосфорной кислотой, доводили объем

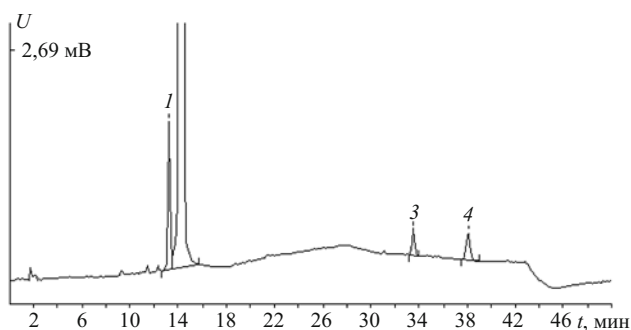


Рис. 4. Хроматограмма модельной смеси I и примесей (1 — примесь А, 3 — эфир примеси В, 4 — примесь В).

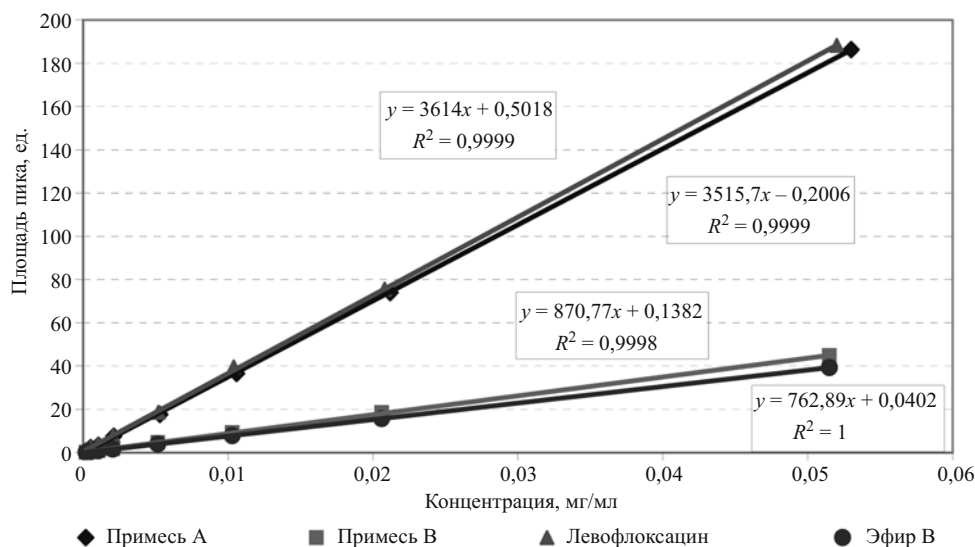


Рис. 5. Зависимость площадей пиков I и примесей от концентрации их растворов.

раствора до метки водой, перемешивали, фильтровали.

В указанных условиях относительные времена удерживания вероятных технологических примесей (относительно I) составляли  $0,95 \pm 0,01$  (примесь А),  $2,52 \pm 0,02$  (примесь В),  $2,14 \pm 0,01$  (эфир примеси В). На рис. 4 представлена хроматограмма модельного раствора I в концентрации 0,4 мг/мл и технологических примесей в концентрации около 0,0004 мг/мл (1 % от концентрации I).

Линейная зависимость площадей пиков примесей I и технологических примесей была подтверждена в пределах интервала от 0,0002 до 0,05 мг/мл (см. рис. 5). Коэффициенты корреляции составляли не менее 0,999.

Пределы обнаружения I и примесей определены экспериментально, и для примеси В и ее эфира составляли около 0,003 мкг, для I и примеси А — около 0,0006 мкг.

Поскольку отклик детектора для растворов I значительно отличался от отклика детектора для примеси В и ее эфира, нами было принято решение проводить определение примеси В и ее эфира по раствору РСО

примеси В, а определение примеси А — по раствору СО I.

В указанных выше условиях проведен анализ серийных образцов субстанции I.

Для приготовления **испытуемого раствора** около 0,01 г I (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 2 мл ацетонитрила, доводили объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10) и перемешивали (испытуемый раствор).

Для приготовления **раствора СО I и примеси В** около 0,01 г СО I (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 2 мл ацетонитрила, доводили объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10), перемешивали (раствор В).

Затем около 0,01 г свидетеля примеси В левофлоксацина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в ацетонитриле, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали (раствор Г).

По 1 мл растворов В и Г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10) и перемешивали (раствор РСО).

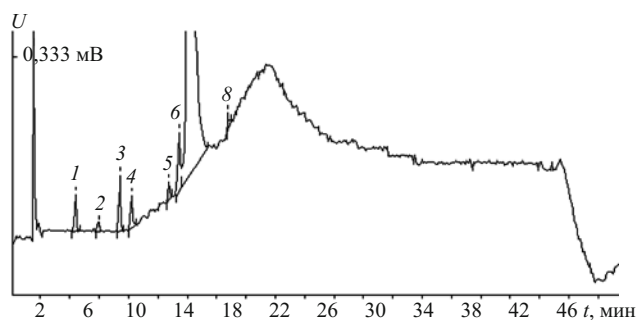


Рис. 6. Типичная хроматограмма субстанции I (пики 1, 2, 3, 4, 5 и 8 — неидентифицированные примеси с относительными временами удерживания около 0,36, 0,48, 0,61, 0,68, 0,89 и 1,22 соответственно; пик 6 принадлежит примеси А).

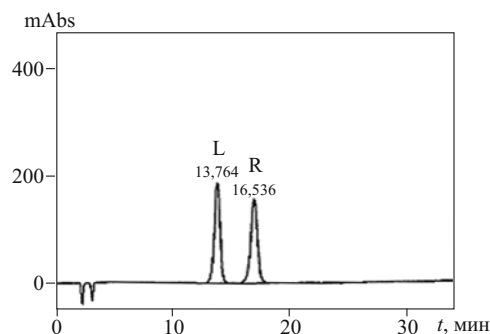


Рис. 7. Хроматограмма раствора офлоксацина (0,01 мг/мл): L — левовращающий, а R — правовращающий изомеры.

Для приготовления раствора для проверки пригодности хроматографической системы около 0,005 г свидетеля примеси А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 5 мл 0,2 % раствора аммония гидроксида в метаноле, довели объем раствора смесью ацетонитрил — вода (1:10) до метки, перемешивали (раствор Д).

Затем 1 мл раствора В (I) и 2 мл раствора Д (примесь А) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, довели объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10) и перемешивали (раствор для проверки пригодности хроматографической системы).

Содержание примеси В и ее эфира рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_{\text{исп}} \cdot m_{\text{стВ}} \cdot 25 \cdot 1}{S_{\text{стВ}} \cdot m_{\text{исп}} \cdot 25 \cdot 100} \cdot 100 = \frac{S_{\text{исп}} \cdot m_{\text{стВ}}}{S_{\text{стВ}} \cdot m_{\text{исп}}},$$

где  $S_{\text{исп}}$  — площадь примеси В (или ее эфира) на хроматограмме испытуемого раствора;  $m_{\text{исп}}$  — масса навески субстанции I (г);  $S_{\text{стВ}}$  — площадь примеси В на хроматограмме раствора РСО примеси В;  $m_{\text{стВ}}$  — масса навески РСО примеси В (г).

Содержание любой другой примеси рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_{\text{исп}} \cdot m_{\text{стЛ}} \cdot 25 \cdot 1}{S_{\text{стЛ}} \cdot m_{\text{исп}} \cdot 25 \cdot 100} \cdot 100 = \frac{S_{\text{исп}} \cdot m_{\text{стЛ}}}{S_{\text{стЛ}} \cdot m_{\text{исп}}},$$

где  $S_{\text{исп}}$  — площадь примеси на хроматограмме испытуемого раствора;  $m_{\text{исп}}$  — масса навески I (г);  $S_{\text{стЛ}}$  — площадь I на хроматограмме раствора СО;  $m_{\text{стЛ}}$  — масса навески СО I (г).

Хроматографическая система считается пригодной, если: относительное время удерживания примеси А в растворе для проверки пригодности хроматографической системы не превышает 0,95; относительное стан-

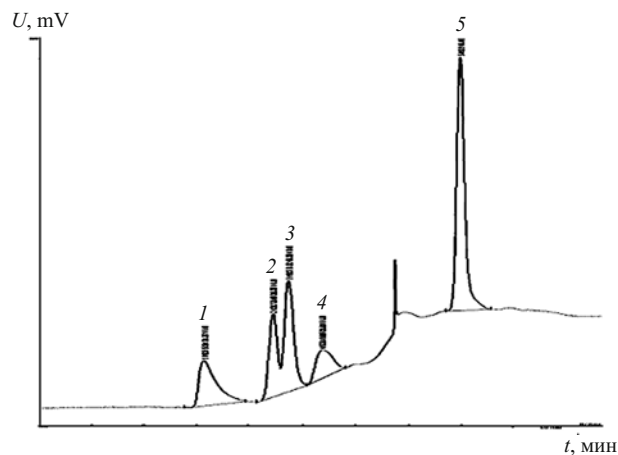


Рис. 8. Хроматограмма модельного раствора ацетона (1), изопропилового спирта (2), этилацетата (3), этилового спирта 95 % (4) и n-бутанола (5) в воде.

дартное отклонение величин площадей пика I не превышает 2 %.

Результаты определения посторонних примесей в субстанции I представлены в табл. 2.

Как показано в табл. 2, из вероятных технологических примесей в образцах субстанции была обнаружена только примесь А в содержании от 0,05 до 0,12 %. Примесь В и ее эфир в образцах не обнаружены. Содержание индивидуальной примеси во всех образцах не превышало 0,15 %, сумма примесей была не более 0,40 %.

Типичная хроматограмма субстанции I представлена на рис. 6.

Поскольку ни примеси В, ни ее эфира ни в одном из образцов субстанции I не обнаружено, нами было принято решение исключить из методики приготовления раствора РСО примеси В.

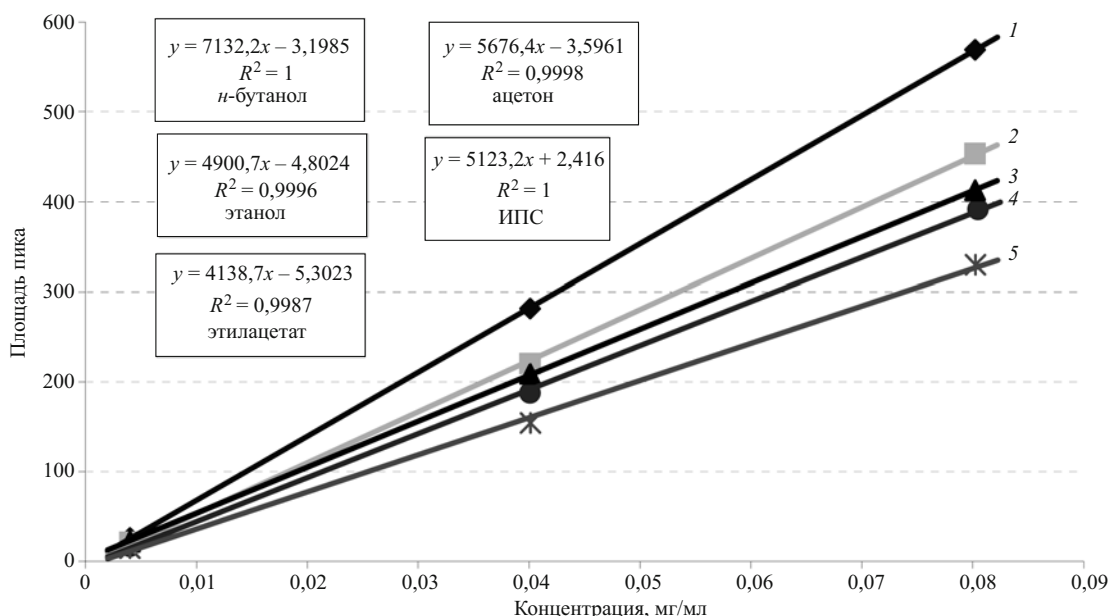


Рис. 9. Зависимости площадей пиков от концентрации растворов: n-бутанола (1), ацетона (2), изопропилового спирта (ИПС) (3), этанола (4) и этилацетата (5).



Определение примеси R-офлоксацина проведено методом ВЭЖХ на хроматографической колонке Luna C18(2), 5 мкм, 250 × 4,6 мм (Phenomenex), температура колонки комнатная, скорость потока подвижной фазы — 1,2 мл/мин, аналитическая длина волны 293 нм, объем пробы — 20 мкл, режим элюирования изократический.

В качестве подвижной фазы использована смесь метанола и буферного раствора, представляющего собой раствор 1,32 г L-фенилаланина и 0,75 г меди сульфата в 1000 мл воды (150:850).

В указанных условиях относительное время удерживания R-офлоксацина (относительно I) составляло  $1,20 \pm 0,02$ . Хроматограмма рацемической смеси R- и L-изомеров (офлоксацина) представлена на рис. 7.

Линейная зависимость площади пика от концентрации растворов I в условиях хроматографирования подтверждена в пределах от 0,0008 до 0,1 мг/мл, коэффициент корреляции 0,999. В качестве рабочей выбрана концентрация I 0,08 мг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора около 0,02 г субстанции I (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 30 мл воды, доводили объем раствора до метки водой и перемешивали. Затем 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили раствор до метки водой и перемешивали (испытуемый раствор, концентрация 0,08 мг/мл).

Для приготовления раствора для проверки пригодности хроматографической системы около 0,01 г офлоксацина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили раствор до метки водой и перемешивали.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора для проверки пригодности хроматографической системы хроматографировали в указанных выше условиях, получая не менее 5 хроматограмм каждого раствора.

Содержание R-офлоксацина рассчитывали по следующей формуле:

$$W = S_{\text{пр}} \cdot 100 / S_{\text{общ}}$$

Таблица 1  
Профиль градиента при определении посторонних примесей в субстанции I

Время, мин	Раствор А	Раствор Б
0	100	0
0 – 5	100	0
5 – 10	100 → 82	0 → 18
10 – 15	82 → 40	18 → 60
15 – 35	40	60
35 – 37	40 → 100	60 → 0
37 – 45	100	0

где  $S_{\text{пр}}$  — площадь пика, по относительному времени удерживания совпадающего с пиком R-офлоксацина;  $S_{\text{общ}}$  — сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Хроматографическая система считается пригодной, если: относительное время удерживания R-офлоксацина (относительно I) в растворе для проверки пригодности хроматографической системы не менее 1,18; относительное стандартное отклонение величин площадей пика I на хроматограммах испытуемого раствора не превышает 2 %.

С помощью указанной методики проведен анализ всех образцов субстанции I. Содержание R-офлоксацина в образцах составляло от 0 до 0,1 %.

Определение остаточных органических растворителей в субстанции I проведено на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором на колонке длиной 2,4 м и внутренним диаметром 3 мм, заполненной сорбентом 15 % Carbowax 1500 на Chromatop W-AW-DMCS (0,200 – 0,250 мм), газ-носитель — азот, скорость подачи газа-носителя — 40 мл/мин, скорость потока водорода — 40 мл/мин, скорость потока воздуха — 400 мл/мин. Температура испарителя — 250 °С, температура детектора — 170 °С, температура термостата программируемая: 70 °С в течение 4 мин, подъем до 120 °С со скоростью 20 °С/мин, 120 °С в течение 6 мин. Объем пробы 1 мкл.

Описанные условия позволяют разделить ацетон, изопропиловый спирт, этилацетат, этиловый спирт 95 % и *n*-бутанол в случае их присутствия в субстанции I.

Время удерживания ацетона составляло около 3,2 мин, изопропилового спирта — около 4,5 мин, этилацетата — около 4,85 мин, этилового спирта — около 5,5 мин и бутанола — около 8,2 мин (см. рис. 8). Относительное время удерживания *n*-бутанола — 1,0; ацетон —  $0,38 \pm 0,02$ ; изопропиловый спирт —  $0,53 \pm 0,03$ ; этилацетат —  $0,56 \pm 0,03$ ; этиловый спирт —  $0,65 \pm 0,04$ .

В водных растворах линейная зависимость отклика детектора от концентрации всех указанных растворителей подтверждена в диапазоне концентраций от 0,004 до 0,08 мг/мл, при коэффициентах корреляции более 0,998 (см. рис. 9).

Пределы обнаружения определены экспериментально по соотношению сигнал/шум и составили для *n*-бутанола — 0,0015 мг/мл (0,0015 мкг), для этанола и этилацетата — 0,003 мг/мл (0,003 мкг), для изопропилового спирта и ацетона — 0,002 мг/мл (0,002 мкг).

В образцах субстанции I в качестве остаточного растворителя может присутствовать этанол.

Определение содержания этанола в субстанции I проводили с применением метода внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали *n*-бутанол.

Для приготовления испытуемого раствора около 0,1 г (точная навеска) субстанции I помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в раство-

Содержание посторонних примесей в образцах субстанции I в %

Относительное время удерживания	Номер серии									
	003.03.10	004.03.10	005.03.10	006.03.10	007.03.10	008.04.10	009.04.10	010.04.10	011.04.10	012.04.10
0,36	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03
0,48	0,005	0,10	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	—	0,01
0,61	0,05	0,08	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
0,68	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,06	0,08	0,04	0,06
0,83	—	0,02	—	0,01	—	—	0,01	0,02	—	—
0,89	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,04	0,03	0,04	0,02	0,03
0,95 (примесь А)	0,06	0,08	0,05	0,07	0,05	0,11	0,10	0,11	0,09	0,12
1,22	0,02	—	—	—	—	0,01	—	—	0,01	0,01
2,14 (эфир В)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,52 (примесь В)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Сумма примесей	0,20	0,37	0,16	0,19	0,14	0,28	0,28	0,34	0,23	0,32

ре внутреннего стандарта, доводили до метки тем же растворителем, тщательно перемешивали.

Для приготовления раствора внутреннего стандарта около 0,5 г (точная навеска) *n*-бутанола (х.ч., для хроматографии) помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и доводили объем колбы водой очищенной до метки, перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем колбы водой очищенной до метки, перемешивали (концентрация около 0,05 мг/мл).

Для приготовления калибровочного раствора *n*-бутанола и этанола по 0,5 г (точные навески) *n*-бутанола (х.ч., для хроматографии) и этанола 95 % помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и доводили объем колбы водой очищенной до метки, перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем колбы водой очищенной до метки, перемешивали (калибровочный раствор, концентрация около 0,05 мг/мл каждого соединения).

Поправочный коэффициент для расчета содержания этилового спирта рассчитывали по результатам хроматографирования калибровочного раствора по следующей формуле:

$$K_x = \frac{S_{ст} \cdot C_x}{S_x \cdot C_{ст}}$$

где  $C_x$ ,  $C_{ст}$  — концентрации определяемого вещества и стандарта (*n*-бутанола) в г/мл;  $S_x$ ,  $S_{ст}$  — площади пиков определяемого вещества и стандарта (*n*-бутанола) в единицах интегратора.

Содержание этилового спирта в образцах субстанции рассчитывали по результатам хроматографирования испытуемого раствора по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot C_{ст} \cdot K_x \cdot 100}{S_{ст} \cdot C_{пр}}$$

где  $C_{ст}$  — концентрация *n*-бутанола в растворе внутреннего стандарта, %;  $C_{пр}$  — концентрация препарата в испытуемом растворе, %;  $K_x$  — поправочный коэф-

фициент чувствительности детектора к этиловому спирту относительно внутреннего стандарта (*n*-бутанола);  $S_x$  — площадь пика этилового спирта;  $S_{ст}$  — площадь пика *n*-бутанола.

Хроматографическая система считается пригодной, если в результате пятикратного хроматографирования калибровочного раствора *n*-бутанола и этанола относительные стандартные отклонения результатов отдельных измерений времен площадей пиков не превышают 5 %; относительное время удерживания этилового спирта составляет  $0,65 \pm 0,05$  (относительно времени удерживания *n*-бутанола); эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику *n*-бутанола, составляет не менее 10000 теоретических тарелок; фактор асимметрии пика *n*-бутанола не превышает 2.

Содержание этанола в серийных образцах субстанции левофлоксацина не превышало 0,5 % и фактически составляло не более 0,02 %.

Показатели “Сульфатная зола” и “Тяжелые металлы” определены в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XII издания, результаты анализа субстанции по этим показателям не превышали 0,1 и 0,001 % соответственно.

Количественное определение субстанции I проведено методом ВЭЖХ в тех же условиях, что и определение посторонних примесей, за исключением профиля градиента (табл. 3). Измененный профиль градиента ускоряет анализ при сохранении специфичности методики: на разделение присутствующих в субстанции

Таблица 3  
Профиль градиента при количественном определении субстанции I

Время, мин	Раствор А	Раствор Б
0	100	0
0 – 5	100	0
5 – 10	100 → 82	0 → 18
10 – 15	82 → 40	18 → 60
15 – 18	40 → 100	60 → 0
18 – 28	100	0

## Результаты количественного определения субстанции I методом ВЭЖХ

Показатель	Номер серии				
	008.04.10	009.04.10	010.04.10	011.04.10	012.04.10
Содержание, %	$\bar{X} = 100,63$	$\bar{X} = 100,38$	$\bar{X} = 101,37$	$\bar{X} = 99,52$	$\bar{X} = 101,19$
Метрологические характеристики ( $P = 95\%$ , $n = 5$ )	$S = 0,85$ $S_{\bar{x}} = 0,38$ $\Delta\bar{x} = 1,06$	$S = 0,55$ $S_{\bar{x}} = 0,25$ $\Delta\bar{x} = 0,68$	$S = 0,71$ $S_{\bar{x}} = 0,32$ $\Delta\bar{x} = 0,88$	$S = 1,17$ $S_{\bar{x}} = 0,53$ $\Delta\bar{x} = 1,47$	$S = 1,16$ $S_{\bar{x}} = 0,52$ $\Delta\bar{x} = 1,44$

примесей и I изменение условий не оказывает значительного влияния.

Для приготовления испытуемого раствора около 0,02 г препарата (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 2 мл ацетонитрила, доводили объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10) и перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора до метки смесью ацетонитрил — вода (1:10) и перемешивали (концентрация испытуемого раствора 0,02 мг/мл).

Для количественного определения I в испытуемом растворе готовили раствор СО I с концентрацией 0,02 мг/мл.

Содержание I в субстанции рассчитывали с учетом чистоты СО I и потери в массе при высушивании образца субстанции I. Результаты представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, содержание I в субстанции составляло от 99,5 до 101,4 %. Исходя из полученных результатов, установлены нормы количественного определения I в субстанции: от 98 до 102 % в пересчете на сухое вещество.

Определение срока годности субстанции I проведено методом “ускоренного старения” при температуре 40 °С. В течение срока, эквивалентного 2 годам хранения в естественных условиях, качество субстанции не изменилось.

Таким образом, для идентификации субстанции предложено применять методы ИК- и УФ-спектроско-

пии. Поскольку субстанция I оптически активна, в перечень контролируемых показателей качества был включен показатель “удельное вращение”, который нормируется в пределах от – 95 до – 103°.

Потеря в массе при высушивании должна составлять от 2 до 3 %.

Содержание посторонних примесей и R-офлоксацина мы предложили определять методом ВЭЖХ. Содержание единичной примеси в субстанции не должно превышать 0,2 %, суммарное содержание примесей — 0,5 %, содержание примеси R-офлоксацина должно составлять не более 0,2 %. Содержание этанола, определенное методом газожидкостной хроматографии, не должно превышать 0,5 %.

Количественное определение субстанции I (метод ВЭЖХ) нормируется в пределах от 98,0 до 102,0 %.

Установлен срок годности субстанции — 2 года.

На основании проведенных исследований оформлен проект фармакопейной статьи предприятия на субстанцию левофлоксацина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Архипов, В. К. Прозорова, *Фарматека*, № 7, 23 – 28 (2004).
2. В. А. Кречиков, *Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.*, 6(3), 282 – 285 (2004).
3. В. Н. Чарушин, Е. Б. Горбунов, Г. Л. Русинов и др., *Способ получения 7,8-дифтор-2,3-дигидро-3-метил-4Н-1,4-бензоксазина*, Патент РФ № 2434005, *Бюл. изобрет.*, № 32 (2011).
4. <http://www.usp.org/sites/default/files/usp/pdf/EN/USPNF/pendingStandards/levofloxacin.pdf>.

Поступила 21.04.13

## ANALYSIS AND STANDARDIZATION OF LEVOFLOXACIN SUBSTANCE

M. K. Sedova, M. S. Sergeeva, M. E. Dudenkova, L. M. Gaevaya, L. N. Grushevskaya, N. I. Avdyunina, B. M. Pyatin

Zakusov State Foundation Institute of Pharmacology RAMS (SF IPh RAMS), Moscow, Russia

The objective of this study was to develop the analytical techniques and standardize the levofloxacin substance, synthesized by a novel method. The physicochemical properties of levofloxacin substance have been investigated, UV-, IR-spectra for the identification of levofloxacin were obtained. The content of related substances and R-ofloxacin has been estimated by HPLC, the content of residual solvents has been determined by GC. The quantitative determination was carried out by HPLC. Stability during storage has been studied and quality norms for levofloxacin substance were developed.

**Keywords:** levofloxacin; substance; analysis; standardization; high-performance liquid chromatography, HPLC; related substances; R-ofloxacin; residual solvents; gas chromatography, GC.