

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICAMENTOS (INAME)

FARMACOPEA ARGENTINA

AV. CASEROS 2161

1264 BUENOS AIRES
REPUBLICA ARGENTINA

FAX 5411-4340-0853

LEVOFLOXACINA

Sustancia de Referencia para Ensayos Físico-Químicos

(Control N° 124072)

Ácido (3S)-9-Fluoro-3-metil-10-(4-metilpiperazin-1-il)-7-oxo-2,3-dihidro-7H-pirido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxílico, hemihidrato.

$C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot 1/2H_2O$

P. Mol.: 370,38

Descripción: polvo fino ligeramente amarillo.

Espectro de absorción infrarrojo:

Sustancia tal cual.

Equipo: espectrómetro IR Brucker Alpha-T N° 103687.

Disco de KBr.

(Ver espectro adjunto).

Contenido de agua: 2,58 % (determinaciones efectuadas: 11; desviación estándar: 0,10).

Determinado por coulombimetría.

Equipo: coulombímetro Metrohm, modelo Titrand 851.

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{20}^{\circ}C$, $D = -102,3^{\circ}$ (determinaciones efectuadas: 7, desviación estándar: 0,34).

Concentración de la solución: 5 mg/ml.

Disolvente: metanol.

Equipo: Polarímetro Anton Paar, modelo MCP 300.

Espectro de absorción ultravioleta:

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Concentración de la solución: 0,01 mg/ml.

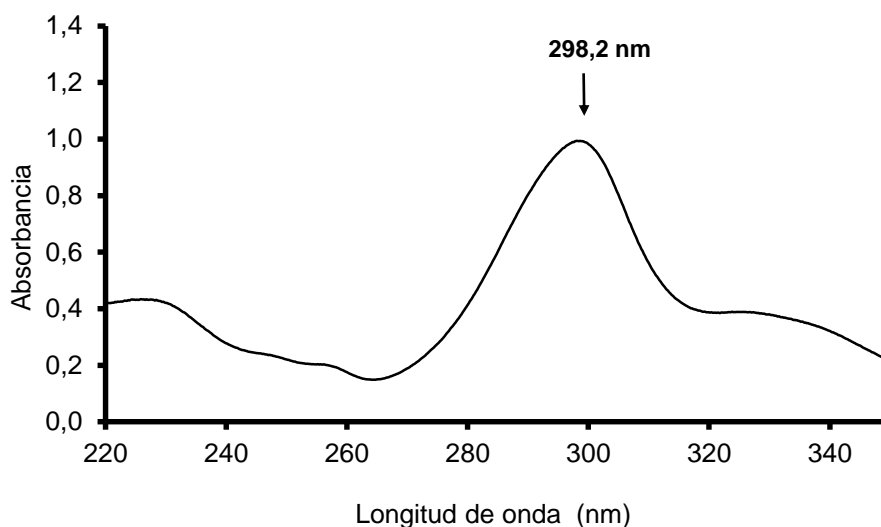
Disolvente: metanol.

Cubetas de 1 cm de paso óptico.

Slit: 0,5.

Barrido UV entre 220 y 350 nm, efectuado con velocidad lenta.

Equipo: espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV 2700.

**Absorbancia:**

Concentración de la solución, disolvente, cubetas, slit, equipo y precauciones: ídem "Espectro de absorción ultravioleta".

λ : 298,2 nm.

$A = 0,969$ (determinaciones efectuadas: 6; desviación estándar: 0,006).

Nota: la lectura de cada solución se realizó entre los 5 y 10 minutos de su preparación.

Límite de *D*-ofloxacina por cromatografía líquida de alta eficacia:

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Equipo: cromatógrafo líquido de alta eficacia Agilent 1260.

Columna: Phenomenex Gemini C18; longitud: 15 cm; diámetro interno: 4,6 mm; diámetro de partícula: 5,0 μm .

Longitud de onda: 294 nm.

Temperatura: 40 °C.

Fase móvil: solución A y metanol (85:15).

Solución A: pesar aproximadamente 1,32 g de *D*-fenilalanina y 0,75 g de sulfato cúprico pentahidratado, disolver en 1000 ml de agua y homogeneizar.

Disolvente y blanco: agua.

Flujo: 0,7 ml/minuto.

Muestra: Levofloxacina.

Concentración: ~ 0,08 mg/ml.

Preparación: pesar exactamente alrededor de 40 mg de Levofloxacina, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver en agua, completar a volumen con el mismo disolvente y homogeneizar. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Testigo:

- *D*-ofloxacina USP Reference Standard Lote R14840.

Solución de adecuación: *D*-ofloxacin + levofloxacin.

Concentración: 0,01 mg/ml de cada uno de los componentes.

Preparación: pesar exactamente alrededor de 5 mg de ofloxacin y 5 mg de levofloxacin, transferir a un matraz de 50 ml, disolver con agua, completar a volumen y homogeneizar. Transferir 1 ml de esta solución a un matraz de 10 ml, completar a volumen con agua y homogeneizar

Volumen inyectado de cada una de las soluciones: 10 µl.

Cantidad de muestras independientes inyectadas: 6.

Resultado: 0,22 % de *D*-ofloxacin.

Estimación de impurezas presentes por cromatografía líquida de alta eficacia:

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Equipo: cromatógrafo líquido de alta eficacia Agilent 1260.

Columna: Phenomenex Luna C18; longitud: 15 cm; diámetro interno: 4,6 mm; diámetro de partícula: 5,0 µm.

Longitud de onda: 280 nm.

Temperatura: 38 °C.

Fase móvil: mezclas variables de solución A y de solución B.

Solución A: acetonitrilo y solución de pH 2,2.

Solución B: acetonitrilo, metanol y solución de pH 2,2.

Solución de pH 2,2: disolver 3,08 g de acetato de amonio y 8,43 g de perclorato de sodio monohidrato en 800 ml de agua y agitar hasta disolución. Ajustar a pH 2,2 con ácido fosfórico, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Condición de la corrida: gradiente.

Programa de gradiente en función del tiempo.

Tiempo (min)	% Solución A	% Solución B
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

Disolvente y blanco: acetonitrilo y agua (1:10).

Flujo: 1,0 ml/minuto.

Muestra: Levofloxacin.

Concentración de la muestra: ~ 0,4 mg/ml.

Preparación: pesar exactamente alrededor de 40 mg de Levofloxacin, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver con 8 ml de acetonitrilo. Sonicar hasta disolución, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Testigos:

- Impureza A Reference Standard Lote R12290: ácido (S)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-7-oxo-10-(piperazin-1-il)-7*H*-pirido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxílico.
- Impureza B Reference Standard Lote R088A0: ácido (S)-9,10-difluoro-2,3-dihidro-3-metil-7-oxo-7*H*-pirido[1,2,3-de][1,4]benzoxazin-6-carboxílico.

Solución de adecuación: impureza A + levofloxacin.

Concentración: 0,1 mg/ml de levofloxacin + 0,005 mg/ml de impureza A.

Preparación de solución de levofloxacin: pesar exactamente alrededor de 4 mg de Levofloxacin, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver con 800 µl de acetonitrilo, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Preparación de solución de impureza A: pesar exactamente alrededor de 2,5 mg de impureza A, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver con hidróxido de sodio 0,2 % en metanol, completar a volumen con el mismo solvente y homogeneizar.

Preparación de la solución de adecuación: transferir 2,5 ml de solución de Levofloxacin y 1 ml de solución de impureza A a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Solución de referencia: solución diluida de levofloxacin y de impureza B.

Concentración: 0,0004 mg/ml de levofloxacin y 0,0008 mg/ml de impureza B.

Preparación de solución diluida de levofloxacin: pesar exactamente alrededor de 4 mg de Levofloxacin, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver con 800 µl de acetonitrilo, completar a volumen con agua y homogeneizar. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz de 100 ml, diluir y completar a volumen con una mezcla de agua y acetonitrilo (10:1) y homogeneizar.

Preparación de solución de impureza B: pesar exactamente alrededor de 2,0 mg de impureza B, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver con metanol, completar a volumen con el mismo solvente y homogeneizar. Transferir 2 ml de esta solución a un matraz de 10 ml, diluir, completar a volumen con metanol y homogeneizar.

Preparación de la solución de referencia: transferir 2,5 ml de solución diluida de Levofloxacin y 1 ml de solución de impureza B a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con agua y homogeneizar.

Volumen de inyección de todas las soluciones: 10 µl.

Cantidad de soluciones de muestras independientes inyectadas: 6.

Cantidad de soluciones de referencia independientes inyectadas: 4.

Resultado: se detecta la presencia de siete impurezas.

	Tiempo de retención aproximado (minutos)	% de área respecto de los picos correspondientes en la solución de referencia
Impureza desconocida	4,4	0,023
Impureza desconocida	7,8	0,028
Impureza A	9,1	0,044
Levofloxacin	9,8	pico principal
Impureza desconocida	12,7	0,019
Impureza desconocida	20,2	0,041
Impureza B	25,6	0,064
Impureza desconocida	29,9	0,022

Impurezas totales estimadas: 0,24 %.

Análisis térmico: la pureza estimada por Calorimetría Diferencial de Barrido, sobre sustancia tal cual, fue de 99,80 moles % (determinaciones efectuadas: 6; coeficiente de variación: 0,04 %).

Equipo: termoanalizador Mettler Toledo, modelo DSC 821e.

Se emplearon crisoles de aluminio de 40 µl cerrados, con tapa perforada y con atmósfera de nitrógeno (caudal: 155 ml/min).

Temperatura inicial: 210 °C.

Velocidad de calentamiento: 3 °C/minuto.

Temperatura de fusión de los últimos cristales: 222,9 °C.

Valoración: 99,6 %; calculado sobre la sustancia anhidra (determinaciones efectuadas: 11; coeficiente de variación: 0,17 %).

Método: titulación potenciométrica en medio no acuoso con solución de ácido perclórico 0,05 N.

Patrón primario: biftalato de potasio.

Disolvente del patrón primario y de la muestra: 50 ml de ácido acético glacial.

Equipo: titulador automático Metrohm, modelo Titrando 904, software Tiamo 2.3.

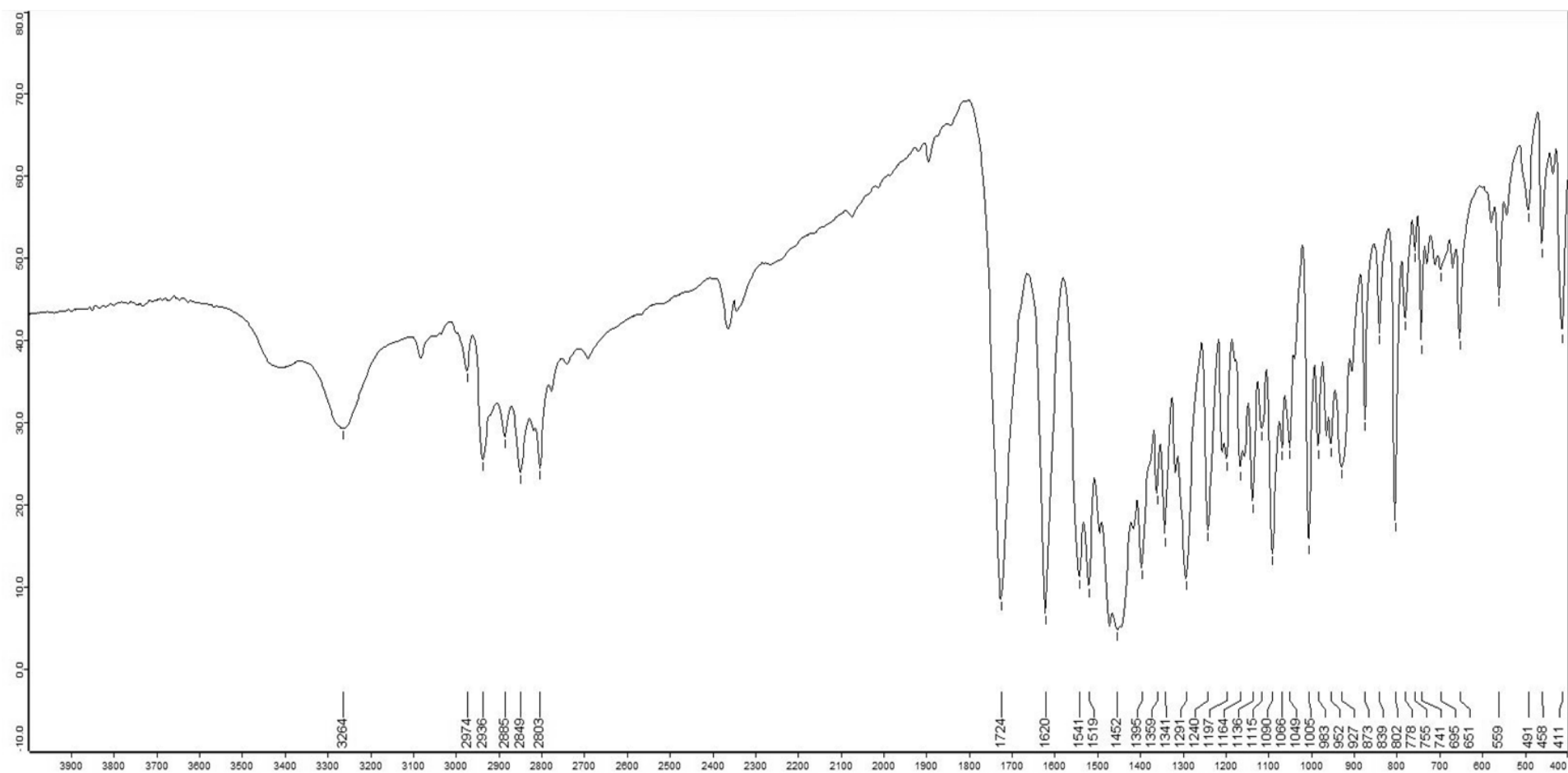
Electrodo combinado: solvotrode, Metrohm 6.0229.100.

Tiempo de agitación: 2 minutos.

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Conservación: esta Sustancia de Referencia debe conservarse al abrigo de la luz, en envase herméticamente cerrado, a $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ y en ambiente de baja humedad.

Uso: la Sustancia de Referencia Levofloxaciná está destinada exclusivamente a ser usada en ensayos físico-químicos y no debe ser utilizada para consumo humano o animal. El riesgo y las eventuales consecuencias de su uso con propósitos diferentes al previsto será exclusiva responsabilidad del usuario.



Levofloxacin – Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina