



## Совершенствование методик определения примесей в антимикробных лекарственных средствах хроматографическими методами на примере анализа ципрофлоксацина

С. И. Кулешова\*, В. С. Удалов, Е. П. Симонова, И. А. Денисова, Д. В. Мишкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Необходимость сокращения времени анализа при мониторинге содержания примесей в лекарственных средствах является актуальной проблемой. **Цель работы:** выбор условий хроматографирования, позволяющих значительно ускорить и упростить определение примесей в лекарственных средствах на примере анализа ципрофлоксацина. **Методы:** для достижения поставленной цели были использованы хроматографические колонки Chromolith® Performance RP-18e 100 × 4,6 мм и Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм 100 × 2,1 мм. Исследования проводились на хроматографе «Agilent 1290 Infinity» с диодно-матричным детектором. **Результаты:** разработаны режимы градиентного элюирования примесей ципрофлоксацина со временем хроматографирования 15 минут для варианта быстрой высокоэффективной жидкостной хроматографии и 12 минут для варианта ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии. Идентификация примесей проведена с использованием относительных времен удерживания их пиков и при сравнении с эталонной хроматограммой. **Выводы:** показана возможность замены метода тонкослойной хроматографии для определения фторхинолоновой кислоты (примеси А ципрофлоксацина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Предложенные условия анализа позволяют идентифицировать примеси ципрофлоксацина, нормируемые ведущими фармакопеями и нормативными документами. На основе полученных данных возможна дальнейшая разработка экспрессных методик определения примесей ципрофлоксацина в лекарственных средствах.

**Ключевые слова:** быстрая высокоэффективная жидкостная хроматография; ультравысокоэффективная жидкостная хроматография; примеси ципрофлоксацина; фторхинолоновая кислота; идентификация примесей

**Для цитирования:** Кулешова СИ, Удалов ВС, Симонова ЕП, Денисова ИА, Мишкин ДВ. Совершенствование методик определения примесей в антимикробных лекарственных средствах хроматографическими методами. *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(4):262–270. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-4-262-270>

\***Контактное лицо:** Кулешова Светлана Ивановна; [Kuleshova@expmed.ru](mailto:Kuleshova@expmed.ru)

## Improvement of Tests for the Control of Impurities in Antimicrobial Medicinal Products by Chromatographic Methods: Ciprofloxacin Case Study

S. I. Kuleshova\*, V. S. Udalov, E. P. Simonova, I. A. Denisova, D. V. Mishkin

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The need to reduce analysis time when controlling impurities in medicinal products remains an urgent challenge. **The aim of the study** was to use the example of ciprofloxacin in order to select chromatographic conditions that will significantly accelerate and simplify determination of impurities in medicinal products. **Methods:** the study was performed using the Chromolith® Performance RP-18e 100 × 4.6 mm and Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm, 100 × 2.1 mm columns and the Agilent 1290 Infinity chromatography system with a diode array detector. **Results:** the authors of the study worked out gradient elution modes for determination of ciprofloxacin impurities that involved 15 min run time for fast high-performance liquid chromatography and 12 min run time for ultra-performance liquid chromatography. The identification of impurities was performed based on relative retention times of impurity peaks and their comparison with the reference standard chromatogram. **Conclusions:** the study demonstrated the possibility of replacing the thin-layer chromatography method used for determination of fluoroquinolonic acid (ciprofloxacin impurity A) with high-performance liquid chromatography. The proposed test conditions allow for identification of ciprofloxacin impurities specified in well-established pharmacopoeias and manufacturers' product specification files. The obtained data may be used for further development of rapid methods of ciprofloxacin impurities determination in medicinal products.

**Key words:** fast high-performance liquid chromatography; ultra-performance liquid chromatography; ciprofloxacin impurities; fluoroquinolonic acid; impurity identification

**For citation:** Kuleshova SI, Udalov VS, Simonova EP, Denisova IA, Mishkin DV. Improvement of tests for the control of impurities in antimicrobial medicinal products by chromatographic methods: ciprofloxacin case study. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(4):262–270. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-4-262-270>

\***Corresponding author:** Svetlana I. Kuleshova; [Kuleshova@expmed.ru](mailto:Kuleshova@expmed.ru)

Мониторинг содержания органических примесей в лекарственных средствах является необходимым как на этапе производства, так и при оценке качества готового продукта<sup>1,2,3</sup>. В настоящее время основной метод для определения технологических примесей и продуктов деградации действующего вещества — это метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)<sup>4,5,6</sup>. Данный метод обладает высокой селективностью и дает возможность изменения условий разделения посредством выбора сочетаний определенных свойств стационарной и подвижной фаз [1]. При этом условия испытания должны быть подобраны таким образом, чтобы обеспечить разделение всех возможных гомологов действующего вещества или его примесей [2]. В последние годы получила развитие быстрая и ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ), которая позволяет не только сокращать время проведения испытания в несколько раз, но и увеличивает селективность и чувствительность, что расширяет возможности использования хроматографических методик в контроле качества лекарственных средств [3, 4]. В литературе описаны примеры использования как быстрой ВЭЖХ, так и УВЭЖХ для анализа антибиотиков фторхинолонового ряда [5, 6]. Определение примесей ципрофлоксацина, который признан одним из наиболее эффективных фторхинолонов второго поколения, представляется актуальной задачей. Препараты ципрофлоксацина широко используются в клинической практике и представлены на фармацевтическом рынке Российской Федерации в различных лекарственных формах (твердые лекарственные формы для приема внутрь, глазные капли, растворы для инфузий).

Цель работы — выбор условий хроматографирования, позволяющих значительно ускорить и упростить определение примесей в лекарственных средствах на примере анализа ципрофлоксацина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны следующие стандартные образцы ципрофлоксацина (1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-7-(пиперазин-1-ил)-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты) и его примесей:

- ципрофлоксацина гидрохлорид для идентификации пиков (Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification) EP CRS;
- фторхинолоновая кислота (примесь А) (Ciprofloxacin impurity A) EP CRS;
- этилендиаминовый аналог ципрофлоксацина (примесь С) USP RS.

В монографии Европейской фармакопеи на субстанцию ципрофлоксацина для определения фторхинолоновой кислоты (7-хлор-1-циклопропил-6-

фтор-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты) предусмотрен метод тонкослойной хроматографии, другие примеси определяются методом ВЭЖХ. Последовательность элюирования идентифицированных примесей устанавливается по хроматограмме стандартного образца ципрофлоксацина для идентификации пиков CRS, что позволяет оценить не только основной продукт деградации ципрофлоксацина — его этилендиаминовый аналог, примесь С (7-[(2-аминоэтил)амино]-1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновая кислота), — но и примеси В (1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-7-(пиперазин-1-ил)-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновая кислота), D (7-хлор-1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-6-(пиперазин-1-ил)-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновая кислота) и E (1-циклопропил-6-фтор-7-(пиперазин-1-ил)хинолин-4(1H)-один). Химические названия примесей и их буквенные обозначения даны по Европейской фармакопее. В монографии Фармакопеи США для всех примесей, включая фторхинолоновую кислоту, предусмотрен метод ВЭЖХ.

Работа проводилась с использованием хроматографа Agilent 1290 Infinity с диодно-матричным детектором («Agilent Technologies», США). Были изучены два варианта проведения испытания, оба в градиентном режиме элюирования. Градиентный режим был выбран по аналогии с монографией Фармакопеи США для идентификации примеси А одновременно с другими примесями в ципрофлоксацине. В первом варианте (быстрая ВЭЖХ, метод 1) для разделения примесей использовали хроматографическую колонку Chromolith® Performance RP-18e 100 × 4,6 мм. Под маркой Chromolith® выпускаются колонки, содержащие высокопористые монолитные стержни силикагеля с комбинацией макропор (2 мкм) и мезопор (13 нм), что позволяет при низком давлении обеспечивать высокую степень разделения [7]. Анализ проводился при температуре колонки 30 °С, скорости потока 1,5 мл/мин с детектированием при длине волны 278 нм, объем вводимой пробы 10 мкл. Состав подвижной фазы (ПФ): ПФ А — 0,025 М раствор фосфорной кислоты, доведенный триэтиламино до pH 3,0 ± 0,1; ПФ В — ацетонитрил в режиме градиентного элюирования. Программа градиента приведена в таблице 1. Время хроматографирования 15 минут.

Во втором варианте (УВЭЖХ, метод 2) для разделения примесей использовали колонку Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм 100 × 2,1 мм. Температура колонки 40 °С, скорость потока 0,5 мл/мин, детектирование при длине волны 278 нм, объем вводимой пробы 10 мкл. Состав подвижной фазы, как и для метода 1, состоял из двух компонентов. ПФ Ai — 0,025 М раствор фосфорной кислоты, доведенный

<sup>1</sup> ICH, Q3B(R) Impurities in Drug Products (Nov. 2003).

<sup>2</sup> FDA, Guidance for Industry — ANDAs: Impurities in Drug Substances (Rockville, MD, Jan. 2005).

<sup>3</sup> ICH, Q3A(R) Impurities in New Drug Substances (Feb. 2003).

<sup>4</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. М.; 2015.

<sup>5</sup> European Pharmacopoeia. 9.0th ed.

<sup>6</sup> United States Pharmacopoeia. USP 41-NF36.

Таблица 1. Программа градиента для метода 1

Время, мин	ПФ А (об/об, %)	ПФ В (об/об, %)
0,0	88	12
4,0	88	12
8,5	50	50
12,0	50	50
12,5	88	12
15,0	88	12

Таблица 2. Программа градиента для метода 2

Время, мин	ПФ Ai (об/об, %)	ПФ Vi (об/об, %)
0,0	100	0
3,0	100	0
5,5	65	35
9	65	35
9,1	100	0
12	100	0

триэтиламином до pH  $3,0 \pm 0,1$  с ацетонитрилом в соотношении 87:13 (данная ПФ рекомендована Европейской фармакопеей для определения примесей ципрофлоксацина). ПФ Vi — ацетонитрил,

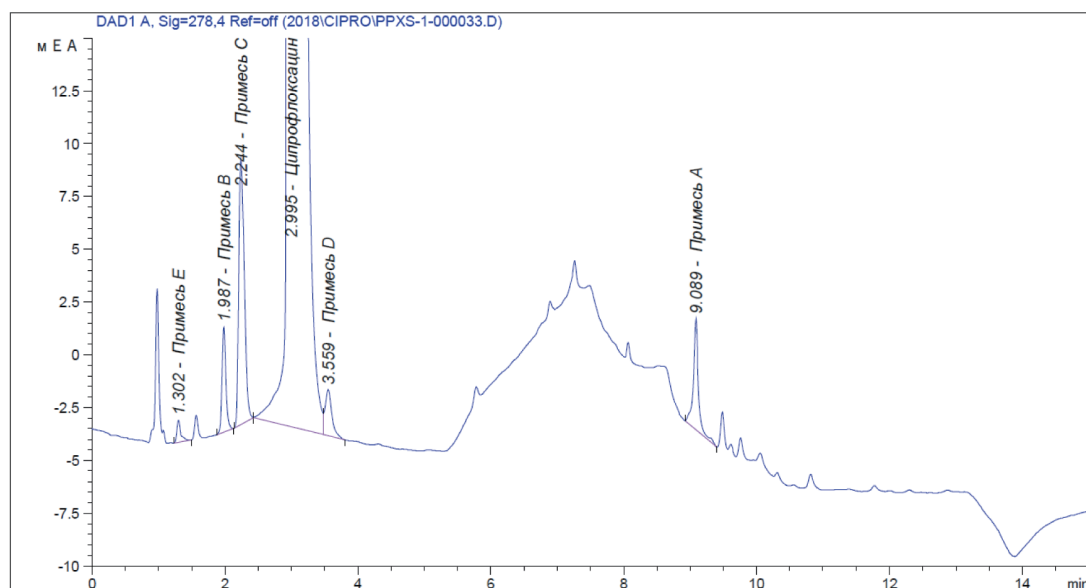
добавление которого необходимо для элюирования фторхинолоновой кислоты. Программа градиента представлена в таблице 2. Время хроматографирования 12 минут.

Испытуемые растворы для обоих вариантов метода готовили с использованием в качестве растворителя ПФ Ai. Исходные растворы стандартных образцов примеси А и примеси С разводили до концентрации 1 мг/мл. Для приготовления испытуемого раствора 10 мг стандартного образца ципрофлоксацина для идентификации пиков растворяли в мерной колбе вместимостью 50 мл, добавляли 1 мл раствора примеси А, доводили объем раствора ПФAi до метки и перемешивали. Для идентификации пиков примесей А и С готовили растворы примесей в той же концентрации, что и примеси А в испытуемом растворе — 0,02 мг/мл разведением исходных растворов стандартных образцов этих примесей.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранное соотношение компонентов подвижной фазы и использование хроматографической колонки марки Chromolith® («Merck», Германия) позволило сократить время анализа на 5 мин по сравнению со временем хроматографирования, которое затрачивается при выполнении методики, приведенной в монографии Фармакопеи США на ципрофлоксацин.

Хроматограммы испытуемого раствора приведены на рисунках 1 и 2. В условиях анализа по ме-



RetTime [мин]	k'	Площадь [мЕА*s]	Высота [мЕА]	Симм.	Ширина [мин]	Тарелки	Разре- шение	Селектив- ность
1.302	-	4.41594	1.04752	0.56	0.0550	3109	-	-
1.987	-	19.61435	4.99385	0.81	0.0593	6229	7.04	1.53
2.244	-	71.34546	12.57355	0.59	0.0911	3357	2.01	1.13
2.995	-	1.20553e4	1560.23792	0.43	0.1185	3539	4.21	1.33
3.559	-	15.34337	2.19052	0.80	0.1133	5455	2.85	1.19
9.089	-	28.24831	5.25643	0.93	0.0667	102986	36.10	2.55

Рис. 1. Хроматограмма испытуемого раствора, полученная по методу 1 (быстрая ВЭЖХ)

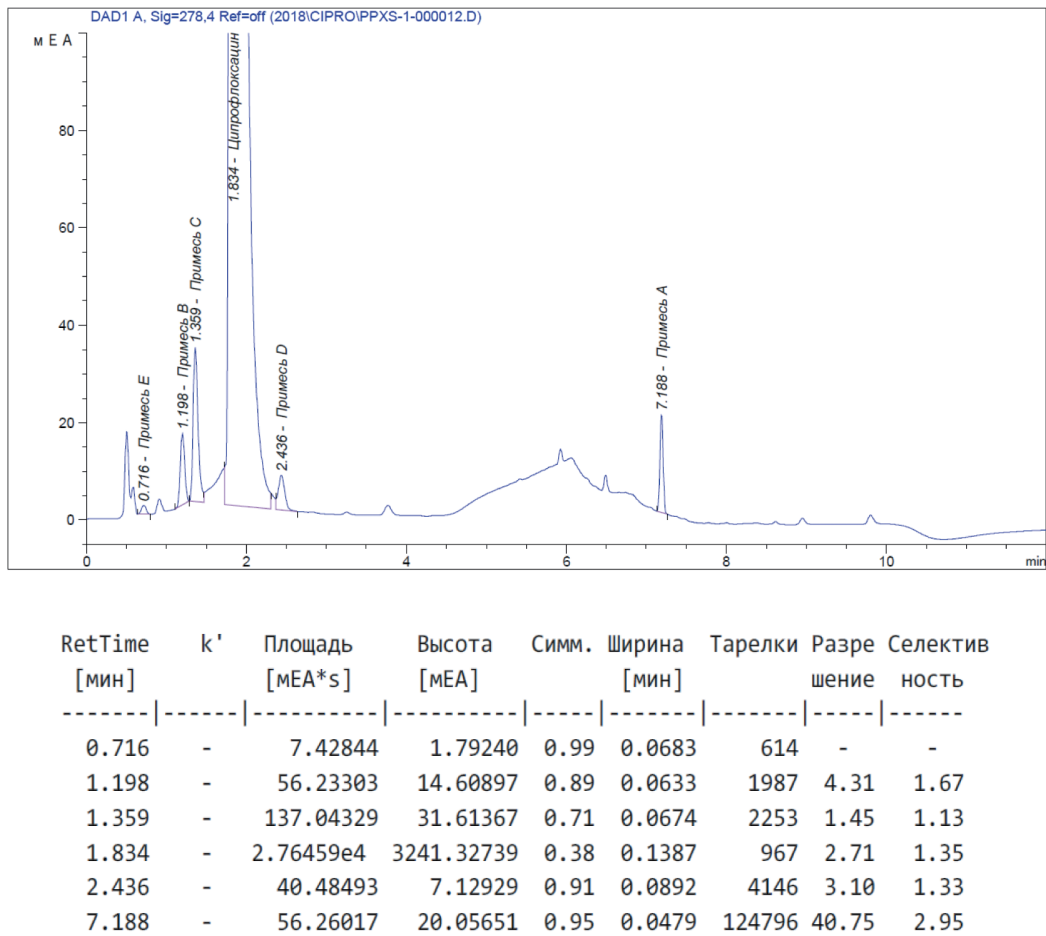


Рис. 2. Хроматограмма испытуемого раствора, полученная по методу 2 (УВЭЖХ)

Annex 1:

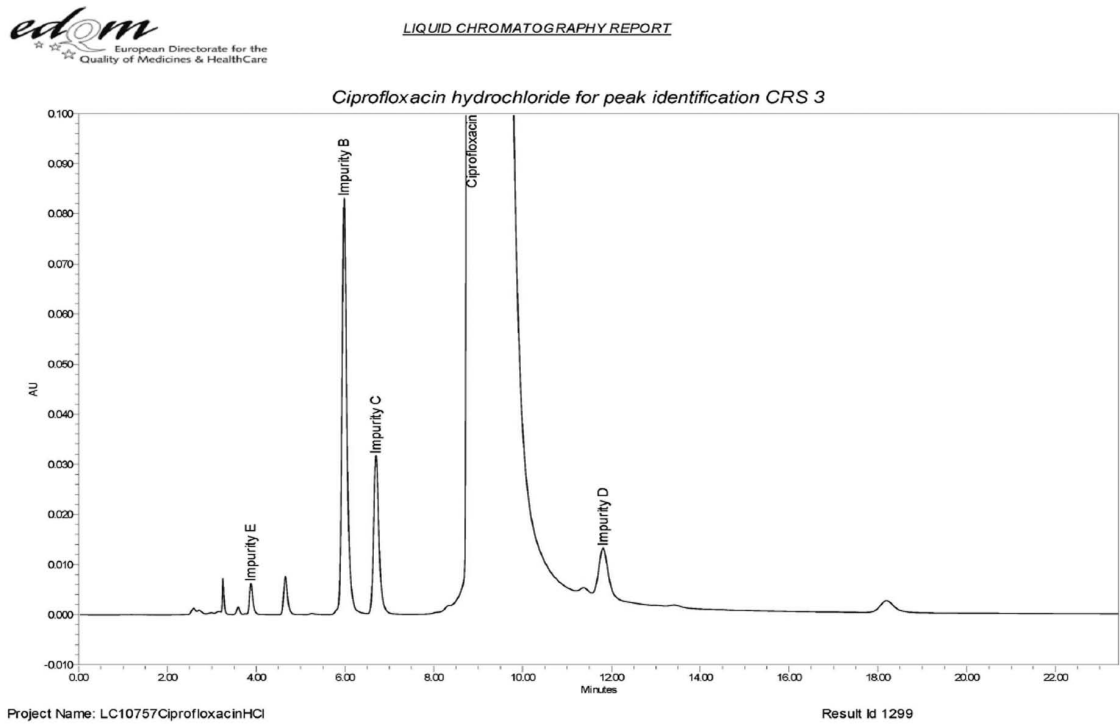


Рис. 3. Хроматограмма стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида для идентификации пиков EP CRS



тоту 1 и по методу 2 на хроматограммах пик примеси А (фторхинолоновая кислота) элюируется после пика ципрофлоксацина. Время удерживания примеси А около 9 мин (метод 1) и около 7 мин (метод 2) соответственно было определено по совпадению со временем удерживания основного пика раствора, содержащего примесь А, что позволило точно идентифицировать пик фторхинолоновой кислоты. Положение пика примеси С определяли по хроматограмме раствора этой примеси. Профиль хроматограммы испытуемого раствора до 4 минут хроматографирования (рис. 1) близок по порядку выхода пиков к профилю хроматограммы, прилагаемой к стандартному образцу ципрофлоксацина гидрохлорида для идентификации пиков EP CRS (рис. 3). Относительное время удерживания (RRT) примеси С составило 0,75, по Европейской фармакопее — около 0,7.

На хроматограммах испытуемого раствора, полученных по методу 2, также наблюдается порядок выхода пиков, соответствующий их последовательности до 2,5 минут на хроматограмме стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида для идентификации пиков EP CRS, при этом относительное время удерживания для примеси С также близко к RRT, указанному в монографии Европейской фармакопеи, и равно 0,74. Полученные аналогичные RRT для этилендиаминового аналога ципрофлоксацина позволили предположить, что и остальные примеси, заявленные в составе стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида для идентификации пиков, в частности примеси Е, В и D, также можно идентифицировать по относительным временам удерживания. Согласно Европейской фармакопее, RRT примеси Е составляет около 0,4; примеси В — около 0,6 и примеси D — около 1,2. На хроматограммах, полученных по методу 1, RRT примеси Е составило 0,4; примеси В — 0,7 и примеси D — 1,2. При использовании метода 2 RRT примеси Е также составило 0,4; примеси В — 0,7, а примеси D — 1,3. Проведенные расчеты подтвердили возможность идентифицировать пики примесей по их относительным временам удерживания. Все пики идентифицированных примесей симметричны, хорошо разделены, разрешение между близлежащими пиками на хроматограмме испытуемого раствора по методу 1 не менее 2,0, по методу 2 — не менее 1,5.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований подобраны условия для унифицированного определения идентифицированных примесей ципрофлоксацина, содержание которых регламентируется ведущими фармакопеями и нормативными документами на субстанции лекарственных препараты ципрофлоксацина, зарегистрированные в Российской

Федерации. Применение быстрой ВЭЖХ и УЭВЖХ позволяет значительно сократить время анализа, исключить метод тонкослойной хроматографии, уменьшить расход дорогостоящих реагентов. Полученные данные могут служить основанием для разработки методик определения примесей в субстанции и препаратах ципрофлоксацина.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Control of organic impurities in medicinal products is essential both at the production stage, and during evaluation of the final product's quality<sup>1,2,3</sup>. At present the main method used for determination of process-related impurities and active ingredient degradation products is high-performance liquid chromatography (HPLC)<sup>4,5,6</sup>. This is a highly selective method which allows for adjustment of chromatographic separation conditions by choosing a combination of specific characteristics of stationary and mobile phases [1]. The test conditions should be selected to ensure separation of all possible active ingredient homologues or respective impurities [2]. In recent years fast HPLC and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) have grown in popularity, since they help to reduce several times the duration of analysis and at the same time have greater selectivity and sensitivity, which taken all together enhance opportunities to use chromatographic methods for medicinal products evaluation [3, 4]. Literature sources describe the use of both fast HPLC and UPLC for the analysis of fluoroquinolone antibiotics [5, 6]. Determination of ciprofloxacin impurities is an important priority, since ciprofloxacin is one of the most efficacious of all second-generation fluoroquinolones. Ciprofloxacin drugs are widely used in Russian clinical practice in different dosage forms (solid oral dosage forms, eye drops, solutions for infusion).

The aim of the study was to use the example of ciprofloxacin in order to select chromatographic conditions that will significantly accelerate and simplify determination of impurities in medicinal products.

### MATERIALS AND METHODS

The study covered the following reference standards of ciprofloxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid) and its impurities:

- ciprofloxacin hydrochloride for peak identification, EP CRS;
- fluoroquinolonic acid (Ciprofloxacin impurity A), EP CRS;

<sup>1</sup> ICH, Q3B(R) Impurities in Drug Products (Nov. 2003).

<sup>2</sup> FDA, Guidance for Industry — ANDAs: Impurities in Drug Substances (Rockville, MD, Jan. 2005).

<sup>3</sup> ICH, Q3A(R) Impurities in New Drug Substances (Feb. 2003).

<sup>4</sup> State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. Moscow; 2015.

<sup>5</sup> European Pharmacopoeia. 9.0<sup>th</sup> ed.

<sup>6</sup> United States Pharmacopoeia. USP 41-NF36.

- ciprofloxacin ethylenediamine analog (impurity C) USP RS.

The European Pharmacopoeia monograph on ciprofloxacin active ingredient includes a thin-layer chromatography method for determination of fluoroquinolonic acid (7-chloro-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid), and the other impurities are determined by HPLC. The elution order of identified impurities is determined using the chromatogram of Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS. This makes it possible to assess not only the main ciprofloxacin degradation product — ciprofloxacin ethylenediamine analog, impurity C (7-[(2-aminoethyl)amino]-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid), but also impurity B (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid), impurity D (7-chloro-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-6-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid), and impurity E (1-cyclopropyl-6-fluoro-7-(piperazin-1-yl)quinolin-4(1H)-one). The chemical names and letter symbols of impurities are given according to the European Pharmacopoeia. The United States Pharmacopoeia (USP) includes the HPLC method for all impurities, including fluoroquinolonic acid.

The Agilent 1290 Infinity chromatography system with a diode array detector was used in the study («Agilent Technologies», USA). Two variants of the test were analysed, both of them in gradient elution mode. The gradient elution was chosen by analogy with the USP monograph in order to perform determination of impurity A simultaneously with the other ciprofloxacin impurities. The first variant (fast HPLC, method 1) used the Chromolith® Performance RP-18e 100 × 4.6 mm chromatographic column for separation of impurities. Chromolith® columns consist of highly porous monolithic rods of silica with a bimodal pore structure of macro- (2 µm) and mesopores (13 nm), which makes it possible to ensure high separation power at low pressure [7]. The operating conditions used for the test were: column temperature of 30 °C, flow rate of 1.5 ml/min, detection at 278 nm, injection volume of 10 µl. The mobile phase (MP) composition: MP A — 0.025 M phosphoric acid adjusted with triethylamine to a pH of 3.0 ± 0.1; MP B — acetonitrile in gradient elution mode. The gradient programme is given in table 1. The run time was 15 minutes.

The second variant (UPLC, method 2) used the Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 100 × 2.1 mm column for separation of impurities. The operating con-

ditions used for the test were: column temperature of 40 °C, flow rate of 0.5 ml/min, detection at 278 nm, injection volume of 10 µl. The mobile phase consisted of two components (as in method 1): MP Ai — 0.025 M phosphoric acid adjusted with triethylamine to a pH of 3.0 ± 0.1 and acetonitrile at the ratio of 87:13 (this MP is recommended by the European Pharmacopoeia for ciprofloxacin impurities detection). MP Bi — acetonitrile which is needed for fluoroquinolonic acid elution. The gradient programme is given in table 2. The run time was 12 minutes.

The test solutions for both methods were prepared using MP Ai as a solvent. The standard stock solutions of impurity A and impurity C were diluted to achieve the concentration of 1 mg/ml. The test solution was prepared by transferring 10 mg of Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS to a 50-mL volumetric flask, adding 1 ml of impurity A solution, diluting the mixture with MP Ai to volume and mixing. To identify the peaks due to impurities A and C, the impurity solutions were prepared with the same concentration as that of impurity A in the test solution (i.e. 0.02 mg/ml) by diluting the standard stock solutions of these impurities.

RESULTS AND DISCUSSION

The chosen proportion of mobile phase components and the use of Chromolith® («Merck», Germany) column made it possible to reduce the analysis time by 5 minutes as compared to the run time needed to perform the test described in the USP monograph for ciprofloxacin.

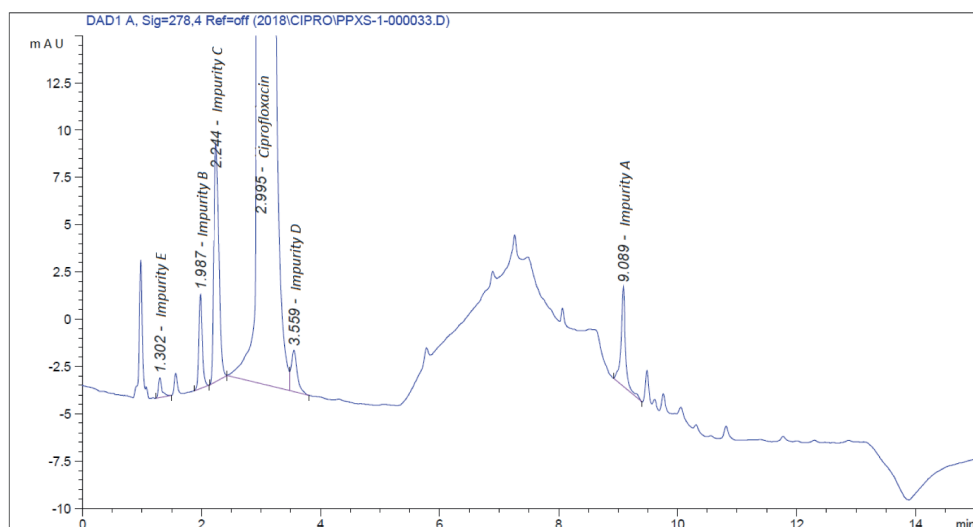
The test solution chromatograms are given in figures 1 and 2. When using test conditions described in method 1 and method 2, the chromatograms were obtained on which impurity A (fluoroquinolonic acid) peak eluted after the ciprofloxacin peak. The retention times of impurity A — about 9 min for method 1 and about 7 min for method 2 — were determined by assessing the coincidence with the retention time of the main peak in the chromatogram of the solution containing impurity A, which allowed for accurate identification of fluoroquinolonic acid peak. The impurity C peak position was determined by analysing the chromatogram of the solution containing impurity C. The chromatographic profile in figure 1 demonstrates similarity during the first 4 min of run time to that of Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS in terms of peak elution order (fig.3). The relative retention time of impurity C was 0.75, while the European Pharmacopoeia cites the relative retention time of about 0.7.

Table 1. The gradient programme for method 1

Time, min	MP A (v/v, %)	MP B (v/v, %)
0,0	88	12
4,0	88	12
8,5	50	50
12,0	50	50
12,5	88	12
15,0	88	12

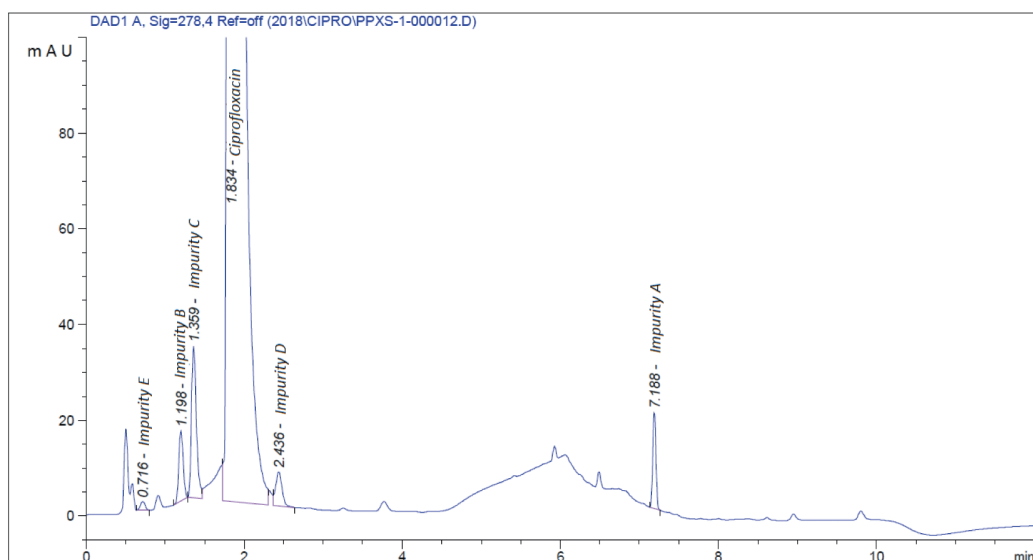
Table 1. The gradient programme for method 2

Time, min	MP Ai (v/v, %)	MP Bi (v/v, %)
0,0	100	0
3,0	100	0
5,5	65	35
9	65	35
9,1	100	0
12	100	0



RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Reso- lution	Selec- tivity
1.302	-	4.41594	1.04752	0.56	0.0550	3109	-	-
1.987	-	19.61435	4.99385	0.81	0.0593	6229	7.04	1.53
2.244	-	71.34546	12.57355	0.59	0.0911	3357	2.01	1.13
2.995	-	1.20553e4	1560.23792	0.43	0.1185	3539	4.21	1.33
3.559	-	15.34337	2.19052	0.80	0.1133	5455	2.85	1.19
9.089	-	28.24831	5.25643	0.93	0.0667	102986	36.10	2.55

Fig. 1. The test solution chromatogram obtained using method 1 (fast HPLC)



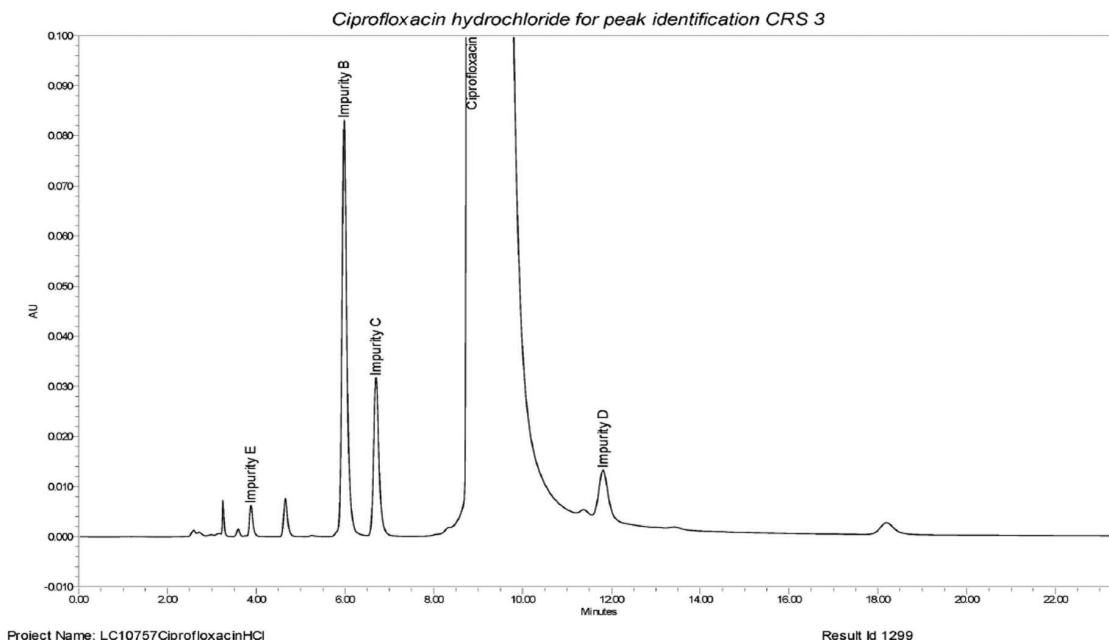
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Reso- lution	Selec- tivity
0.716	-	7.42844	1.79240	0.99	0.0683	614	-	-
1.198	-	56.23303	14.60897	0.89	0.0633	1987	4.31	1.67
1.359	-	137.04329	31.61367	0.71	0.0674	2253	1.45	1.13
1.834	-	2.76459e4	3241.32739	0.38	0.1387	967	2.71	1.35
2.436	-	40.48493	7.12929	0.91	0.0892	4146	3.10	1.33
7.188	-	56.26017	20.05651	0.95	0.0479	124796	40.75	2.95

Fig. 2. The test solution chromatogram obtained using method 2 (UPLC)

Annex 1:



# LIQUID CHROMATOGRAPHY REPORT



**Fig. 3.** The chromatogram of Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification, EP CRS

The test solution chromatograms obtained using method 2 also show peak elution order similar to that observed in the chromatogram of Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS during the first 2.5 min of run time. The impurity C relative retention time (RRT) was also close to the RRT indicated in the European Pharmacopoeia, and was equal to 0.74. The similar RRTs obtained for ciprofloxacin ethylenediamine analog suggest that the other impurities present in the Ciprofloxacin hydrochloride for peak identification CRS, in particular, impurities E, B, and D, may also be identified by their relative retention times. According to the European Pharmacopoeia the RRT of impurity E is about 0.4, impurity B — about 0.6, and impurity D — about 1.2. The chromatograms obtained using method 1 showed the RRT of impurity E — 0.4, impurity B — 0.7, and impurity D — 1.2. The results obtained using method 2 demonstrated the RRT of impurity E — 0.4, impurity B — 0.7, and impurity D — 1.3. The performed calculations proved that impurity peaks could be identified by their relative retention times. All the peaks of the identified impurities were symmetrical and well-separated, the resolution between adjacent peaks in the test solution chromatogram obtained using method 1 was minimum 2.0, and in the chromatogram obtained using method 2 — minimum 1.5.

## CONCLUSION

The study helped to select standardised conditions for determination of ciprofloxacin identified impurities which are controlled by well-established pharmacopoeias and by product specification files for ciprofloxacin

APIs authorised in the Russian Federation. The use of fast HPLC and UPLC helps to significantly reduce the analysis time, avoid the thin-layer chromatography method, and cut expenses on costly reagents. The obtained data may be used for development of methods for determination of impurities in ciprofloxacin API and ciprofloxacin drugs.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Георгиевский ВП, ред. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Т. 2. Харьков: НТМТ; 2011. [Georgievsky VP, ed. *Analytical Chemistry in the Creation, Standardization and Quality Control of Medicines*. V. 2. Kharkov: NTMT; 2011 (In Russ.)]
2. Осипов АС, Попова ОА, Милкина СЕ, Грецкая ТН, Сулименкова АИ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(1):56–60. [Osipov AS, Popova OA, Milkina SE, Gretskaia TN, Sulimenkova AI. The use of a chromatographic column packed with amide sorbent for the analysis of parabens. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(1):56–60 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-1-56-60>
3. Исупова НЮ. Быстрая хроматография. От сокращения времени анализа к новым областям применения. Фармацевтические технологии и упаковка. 2013;(3):70–2. [Isupova NYu. Fast chromatography. From reducing analysis times to new applications. *Farmat-*



- sevticheskie tekhnologii i upakovka = Pharmaceutical Technology and Packaging*. 2013;(3):70–2 (In Russ.)]
4. Яшин ЯИ, Яшин АЯ. Современные тенденции в хроматографических методах и приборостроении. В кн.: *Материалы Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез»*. Краснодар; 2013. [Yashin YaI, Yashin AY. Current trends in chromatographic methods and instrumentation. In: *Materials of the All-Russian Conference «Analytical Chromatography and Capillary Electrophoresis»*. Krasnodar; 2013 (In Russ.)]
  5. Pena A, Chmielova D, Lino CM, Solich P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *J Sep Sci*. 2007;30(17):2924–8. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700363>
  6. Hubicka U, Zmudzki P, Zuromska-Witek B, Zajdel P, Krzek J. Determination and characterization of selected fluorquinolones oxidation products under potassium permanganate treatment. *Acta Poloniae Pharmaceutica — Drug Research*. 2015;72(6):1101–14.
  7. Pous-Torres S, Torres-Lapasio JR, Garcia-Alvarez-Coque MC. Comparison of the performance of Chromolith® Performance RP-18e, 1.8-mm Zorbax Eclipse XDB-C18 and XTerra MSC18, based on modelling approaches. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(7):2219–31. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6448-y>

## ОБ АВТОРАХ

**Кулешова Светлана Ивановна**, канд. биол. наук, начальник лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

**Удалов Владимир Сергеевич**, главный эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

**Симонова Елена Павловна**, ведущий эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

**Денисова Ирина Анатольевна**, ведущий эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

**Мишкин Дмитрий Викторович**, инженер-лаборант лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

## AUTHORS

**Svetlana I. Kuleshova**, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

**Vladimir S. Udalov**, Chief Expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

**Elena P. Simonova**, Leading Expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

**Irina A. Denisova**, Leading Expert of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

**Dmitry V. Mishkin**, Laboratory Technician of the Laboratory of Antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Статья поступила 27.07.2018

После доработки 19.10.2018

Принята к печати 19.11.2018

Article was received 27 July 2018

Revised 19 October 2018

Accepted for publication 19 November 2018