

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»

Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

Допущено до захисту  
Протокол засідання  
кафедри  
№ \_\_\_\_\_ від  
“ \_\_\_\_\_ ” 2023р.

Завідувачка кафедри  
Аналітичної, фізичної та  
колоїдної хімії

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АЦИКЛОВІРУ**  
**У ТВЕРДИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ**

**Виконала:** студентка 5-го курсу, групи  
8803 фармацевтичного факультету

**Шинкарьова Валентина Ігорівна**

**Науковий керівник:**

Доцент кафедри аналітичної,  
фізичної та колоїдної хімії, кандидат  
педагогічних наук,

**Чхало Оксана Миколаївна**

**Київ – 2024**

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Ацикловір, методи визначення.	8
1.1. Застосування ацикловіру.	8
1.2. Фізико-хімічні властивості ацикловіру.	8
1.3. Механізм дії та метаболізм ацикловіру.	10
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	10
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення ацикловіру.	11
Розділ 2. Експериментальна частина.	12
2.1. Матеріали та методи.	12
2.1.1. Мета дослідження.	12
2.1.2. Об'єкти дослідження.	13
2.1.3. Посуд та обладнання.	15
2.1.4. Реактиви.	15
2.2. Приготування розчинів.	15
2.2.1. Приготування розчину 0,1 М HCl.	15
2.2.2. Приготування розчину 0,1М NaOH.	15
2.2.3. Приготування стандартного розчину ацикловіру.	15
2.2.4. Приготування аналізованого розчину.	15
2.3. Методика спектрофотометричного визначення ацикловіру у твердій лікарській формі.	16
2.4. Розрахунок вмісту ацикловіру у твердій лікарській формі.	16
Розділ 3. Результати та обговорення.	17
3.1. Визначення лінійної залежності (побудова калібрувального графіка).	19
3.2. Визначення стабільності розчинів ацикловіру у часі.	22
3.3. Кількісне визначення ацикловіру у твердій лікарській формі.	24

3.4. Часткова валідація методики.	24
3.4.1. Перевірка специфічності запропонованої методики.	24
3.4.2. Перевірка лінійності запропонованої методики.	24
3.4.3. Перевірка робастності запропонованої методики.	25
3.4.4. Оцінка правильності методики.	27
3.5. Аналіз методик кількісного визначення субстанції ацикловір.	27
Висновки.	28
Список використаних джерел.	29
Додатки.	30
Анотація (Summary).	

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія

ДФУ - державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ, УФ спектр – інфрачервоний, ультрафіолетовий спектр поглинання

мкг – мікрограм

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

С<sup>0</sup> – градуси Цельсія

## ВСТУП

Гуанін (Рис.1) є гетероциклічною органічною сполукою, відноситься до класу азотистих основ, вважається похідним пурину, входить до складу ДНК[1]:

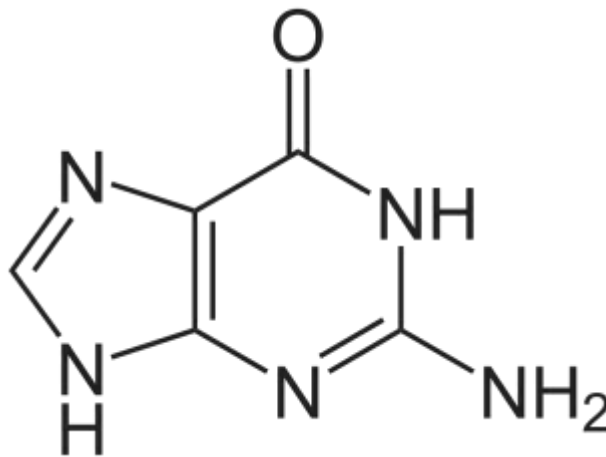


Рис 1. Формула гуаніну.

У медицині та фармації широко використовують похідні гуаніну, наприклад ациклічний нуклеозід ацикловір.

Ацикловір відносять до групи противірусних препаратів оскільки він активний проти родини герпесвірусів (інгібує реплікацію вірусів). Вперше препарат ацикловір був синтезований у 1988 р. Гертрудою Еліон, яка була відмічена за це відкриття Нобелівською премією[2].

Герпесвірус є розповсюдженою інфекцією, зазвичай передається тактильним шляхом «шкіра до шкіри». Викликає больові пухирці та виразки, зуд, неконфортний стан.

Класифікують дві групи простого герпесу. Вірус першого типу передається при оральному контакті і цим вірусом інфіковано більшість населення планети [3].

Вірус другого типу передається при сексуальному контакті і визиває генетальний герпес. На жаль, лікарські засоби можуть лише покращувати симптоматику, позбавитися назавжди інфекції не можна. Згідно з різними оцінками 3,7 млрд людей на планеті Земля (майже 70 %) інфіковані вірусом першого типу, 491 млн (майже 13%) – вірусом другого типу[3].

**Актуальність теми:** Пошук нових альтернативних методик кількісного визначення лікарських засобів (ЛЗ), до складу яких входять похідні пурину, наприклад ацикловір.

**Мета:** розробити альтернативну методику кількісного визначення діючої речовини ацикловір у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

**Завдання:**

1. Провести бібліосемантичний аналіз щодо застосування ацикловіру, його фізико-хімічних та фармакологічних властивостей, механізм дії та метаболізм ацикловіру.
2. Проаналізувати методики ідентифікації та кількісного визначення ацикловіру.
3. На основі проведених досліджень розробити альтернативну методику кількісного визначення ацикловіру у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.
4. Провести часткову валідацію запропонованої методики кількісного визначення ацикловіру у твердих лікарських формах за ДФУ.

**Методи дослідження:** Бібліосемантичний метод, спектрофотометрія.

**Новизна та значення одержаних результатів:** розроблена нова чутлива методика кількісного визначення ацикловіру у ТЛФ.

**Апробація результатів дослідження.** Результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023.

**Структура роботи.** Робота представлена на 41 сторінках, додатків -4, рисунків- 5, таблиць- 4.

## ОСНОВНА ЧАСТИНА

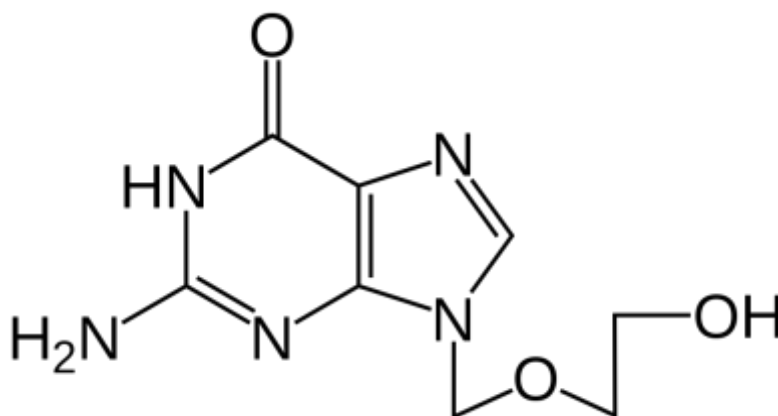
### Розділ 1. Ацикловір, методи визначення.

#### 1.1 Застосування ацикловіру.

Ацикловір застосовують при лікуванні слизових оболонок, профілактики загострень рецидивів інфекції, у тому числі і у пацієнтів з імунодефіцитом.

Ацикловір відносять до фармакологічної групи D06BB03, J05AB01 (протівірусні препарати)[4].

#### 1.2. Фізико-хімічні властивості ацикловіру.



За IUPAC хімічна сполука має наступну назву: 2-аміно-9-[(2-гідрокси)етоксиметил]-1,9-дигідро-6Н-пурин-6-он.

Міжнародна назва Aciclovirum.

Молекулярна формула:  $C_8H_{11}N_5O_3$

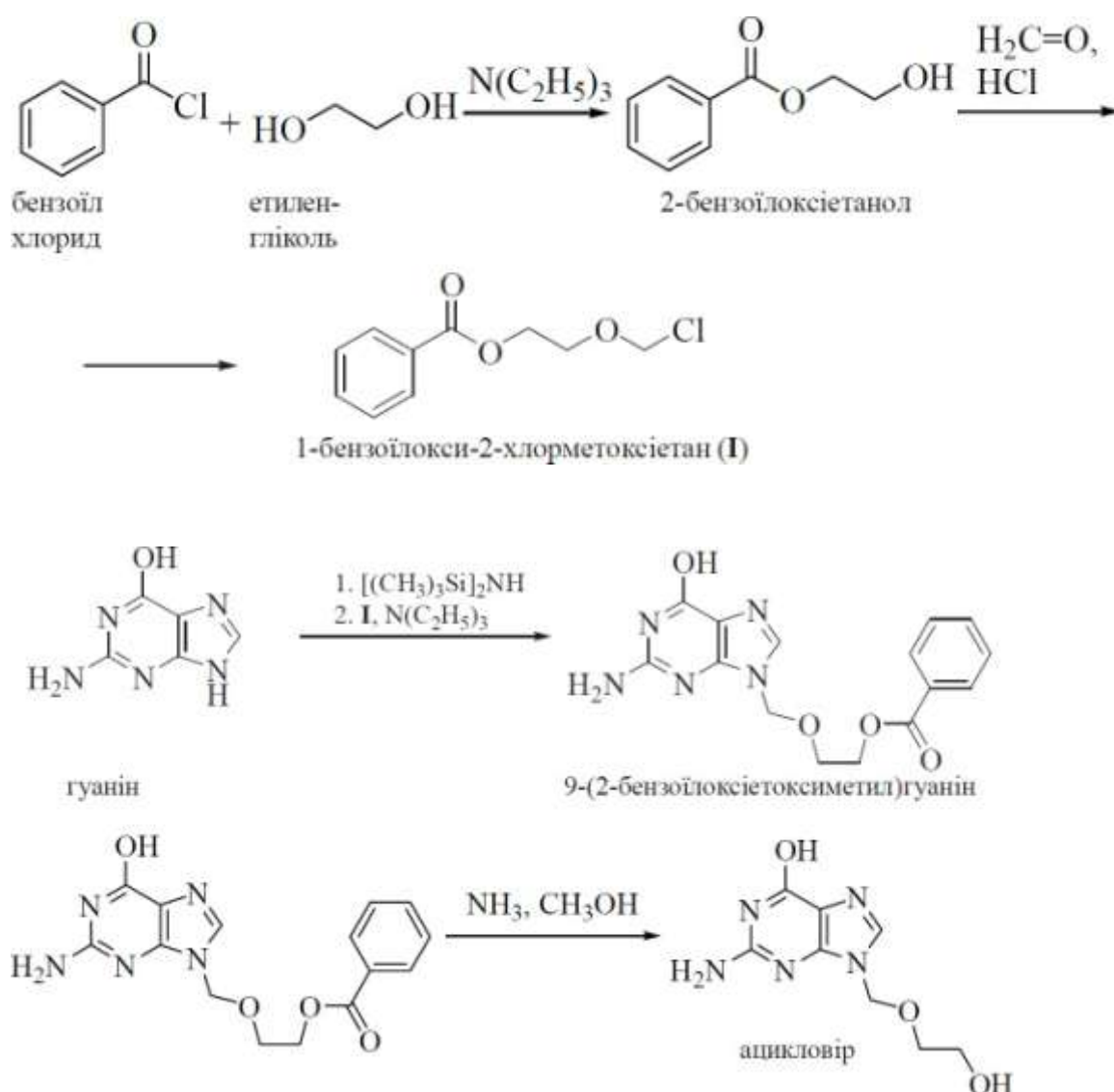
Молекулярна маса становить 225,21г/моль[2].

Ацикловір є препаратом синтетичного походження. Це кристалічний білий порошок, погано розчинений у воді, малорозчинний у спирті, легко розчиняється у мінеральних кислотах, лугах, легкокорозинний у диметилсульфоксиді. Рекомендується зберігання у герметично закритій тарі.



Синтез ацикловіру проходить через стадію утворення 1-бензоїлокси-2-хлорметоксіетану. На бензоїлхлорид діють етиленгліколем у середовищі триетилдіаміну, потім метаналем у присутності хлоридної кислоти. Отримують 1-бензоїлокси-2-хлорметоксіетан[1].

На другій стадії гуанін обробляють одержаним продуктом у присутності триетиламіну або димеркаптометиламіном. Одержують 9-(2-бензоїлоксіетоксиметил)гуанін. Після обробки останнього амонійним розчином метанолу виділяють ацикловір[1]:



### **1.3. Механізм дії та метаболізм ацикловіру.**

Ацикловір відноситься до противірусних препаратів, чинить високоселективну дію на віруси герпесу. Ацикловір при герпесних інфекціях запобігає утворенню нових висипів, зменшує вісцеральні ускладнення, прискорює утворення епідермісу та має протибольову дію. Кратко механізм дії ацикловіру можна описати так: усередині інфікованих клітин відбуваються ланцюгові реакції перетворення ацикловіру в моно-, ди- та трифосфат ацикловіру. Останній вбудовується в ланцюг вірусної ДНК і блокує її синтез завдяки гальмуванню. Метаболізм відбувається у печінці з утворенням 9-карбоксиметоксиметил гуаніну, який не є фармакологічно активною сполукою[5-6].

### **1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.**

Біологічна доступність препарату досягає 30 відсотків. Ацикловір добре проникає у тканини та органи і максимальна концентрація його складає 0,7 мкг/мл у плазмі після призначення пацієнту внутрішньо 200 мг 5 разів на добу. Час досягнення максимальної концентрації складає 120 хвилин. Період напіввиведення у дорослих приблизно 2,5 години, нирковий кліренс становить 80 % від загального плазматичного. Через кишечник виводиться 2% препарату [7-13].

Як правило, препарат добре переноситься, але, можливі і побічні ефекти:

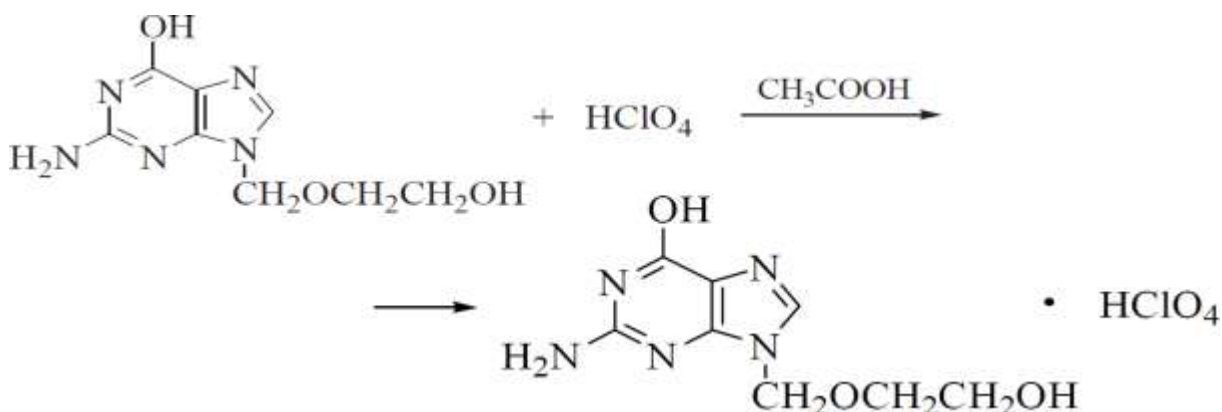
- З боку шлунково-кишкового тракту біль, діарея, блювання;
- З боку центральної нервової системи головний біль, тремор, галюцинації, загальна слабкість;
- Можливі небажані алергічні прояви.

Препарат з обережністю призначають пацієнтам з хронічними захворюваннями нирок та печінки.

Одночасне застосування з нефротоксичними лікарськими засобами необхідно контролювати функцію нирок. Заборонено приймати препарат з пробенецидом.

### 1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення ацикловіру.

Ацикловір ідентифікують фізико-хімічними методами [14,15], найчастіше за ІЧ-спектром поглинання. Кількісно ацикловір визначають титруванням субстанції безводною перхлоратною кислотою. Точку еквівалентності визначають потенціометрично (Додаток 1,2):



Крім того, якісно та кількісно ацикловір можна вивчати спектральними та імунологічними методами, а також хроматографією [16, Додаток 1,2].

### 1.6. Метод спектрофотометричного аналізу.

У фармацевтичній та медичній практиці часто використовують оптичні методи дослідження (рефрактометрію, фотометрію тощо). Одним з найбільш розповсюджених інструментальних оптичних методів вважають спектрофотометрію [17]. Спектрофотометрія заснована на вивченні спектрів поглинання (електромагнітних випромінювань) речовини (хімічної сполуки) в ультрафіолетовій, інфрачервоній та видимій області спектра. Оптичні методи можна проводити варіативно (за допомогою калібрувального графіка або за допомогою стандартів та методом добавок), але перед кількісними визначеннями дослідник аналізує залежність між оптичною густиною  $A$  та

довжиною хвилі  $\lambda$  – спектр поглинання. Подальші вимірювання дослідник виконує при сталому значенні  $\lambda$  – максимумі на спектрі [18].

Метод зручний у використанні, сучасний, помилка у визначенні не перевищує 2,0 %.

## **Розділ 2. Експериментальна частина.**

Випускна кваліфікаційна випускна робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

### **2.1. Матеріали та методи.**

#### **2.1.1. Мета дослідження.**

Після проведення бібліосемантичного аналізу методик кількісного визначення ацикловіру у субстанції та лікарських засобах ми вирішали розробити альтернативну методику спектрофотометричного визначення діючої речовини ацикловір у твердих лікарських формах оскільки згодні з авторами [16] та вважаємо, що метод спектрофотометрії є найбільш доступним та простим у виконанні.

#### **2.1.2. Об'єкти дослідження.**

Об'єктами дослідження (Рис. 2.) ми обрали таблетовані форми Ацикловір-Дарниця (Зразок 1), Ацикловір – Лекхім (Зразок 2) та Ацикловір-Астрафарм (Зразок 3). ТЛФ реалізуються аптечними мережами та мають склад:

1) Зразок 1.

діюча речовина: aciclovir, 1 таблетка містить ацикловіру 200 мг;

допоміжні речовини:

- крохмаль картопляний;
- повідон;
- натрію кроскармелоза;
- кальцію стеарат.

2) Зразок 2.

діюча речовина: aciclovir; 1 таблетка містить ацикловіру 200 мг;

допоміжні речовини:

- лактози моногідрат;
- крохмаль кукурудзяний;

- магнію стеарат;
- натрію кроскармелоза.

### 3) Зразок 3.

діюча речовина: aciclovir; 1 таблетка містить ацикловіру 200 мг;

допоміжні речовини:

- лактози моногідрат;
- целюлоза мікрокристалічна;
- натрію крохмальгліколят (тип А);
- повідон;
- магнію стеарат.

Наявність у складі твердих лікарських форм діючої речовини ацикловір зазначена в інструкціях для медичного застосування.

Зразок 1



Зразок 2



Зразок 3

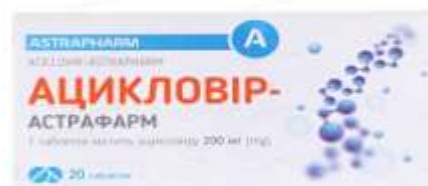


Рис.2. Об'єкти дослідження, які були використані у дослідженні.

### **2.1.3. Посуд та обладнання.**

1. Мірні колби і піпетки класу точності А.
2. Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204.
3. Спектрофотометр Jenway 6305 (Додаток 3).

### **2.1.4. Реактиви.**

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Ацикловір (**Aciclovir**) каталожний номер **A0003** реєстраційний номер **59277-89-3**.
2. Вода дистильована.
3. Кислота хлоридна, 0,1М.
4. Натрій гідроксид, 0,1 М.

## **2.2. Приготування розчинів.**

### **2.2.1. Приготування 0,1 М розчину HCl.**

Розчин готували з фіксаналу (стандарт – титр 0,1 М. HCl), капсулу розбивали, вміст капсули переносили у мірну колбу на 1 л, доводили водою до риси, ретельно перемішували.

### **2.2.2. Приготування 0,1 М розчину NaOH.**

Зважували точну масу натрій гідроксиду (4,0000 г ) і поміщали у мірну колбу на 1 л, додавали 20 мл дистильованої води, струшували, доводили розчин водою до риси.

### **2.2.3. Приготування стандартного розчину ацикловіру.**

0,02 г стандартного фармакопейного зразка зважували та переносили у мірну колбу на 100 мл, додавали 20 мл приготованого розчину NaOH, перемішували, доводили розчин до риси приготованим NaOH.

### **2.2.4. Приготування аналізованого розчину.**

У парцеляновій ступці розтирали 1 таблетку кожного зразка окремо і розчиняли у мірній колбі на 100 мл розчином 0,1 М. NaOH.

Фільтрували. Вважали, що концентрація ацикловіру у досліджуваному розчині становить 2 мг/мл. Для подальших спектрофотометричних визначень розчин розводили. Для цього відбирали піпеткою 2,5 мл приготованого розчину і переносили аліквоту у мірну колбу на 100 мл, ретельно перемішували. Концентрація приготованого розчину становила 50 мкг/мл.

### **2.3. Методика спектрофотометричного визначення ацикловіру у твердій лікарській формі.**

Оптичну густину досліджуваного розчину вимірювали при довжині хвилі 265 нм та проводили кількісне визначення ацикловіру за методом стандарту. В якості розчину порівняння використовували стандартний розчин ацикловіру з концентрацією 50 мкг/мл, в якості компенсаційного розчину використовували розчин NaOH. Вимірювання проводили за допомогою кювет, товщина яких 10 мм.

### **2.4. Розрахунок вмісту ацикловіру у твердій лікарській формі.**

Розрахунок результатів кількісного визначення ацикловіру здійснювали за стандартними формулами:

$$\% = A_x \cdot C_c / A_c$$

$A_x$ ,  $A_c$  – оптична густина розчину, який визначають та оптична густина розчину, з яким порівнюють;

$C_c$  - концентрація стандартного розчину.



### Розділ 3. Результати та їх обговорення.

При приготуванні розчинів ми враховували низьку розчинність ацикловіру у воді і високу розчинність у мінеральних кислотах та лугах [2], тому, перед апробацією методики, ми провели вивчення спектрів поглинання у кислому середовищі (0,1 М HCl) та у лужному середовищі (0,1М NaOH) діючої речовини ацикловір, так, як описано у роботі[16]. Для отримання спектрів поглинання ацикловіру у кислому та лужному середовищі ми готували розчин ацикловіру у HCl та NaOH концентрації діючої речовини  $2,5 \cdot 10^{-5}$  г/мл.

Спектр поглинання ацикловіру у кислому середовищі характеризується однією смугою поглинання при  $\lambda = 256$  нм, у лужному середовищі можна ідентифікувати багатохромний зсув максимуму поглинання і при рН = 12,0 відмічаємо максимум поглинання при  $\lambda = 265$  нм, що дає можливість обрати в якості розчинника натрій гідроксид. На Рис. 3 та 4. наведено спектр поглинання ацикловіру у кислому та лужному середовищі.

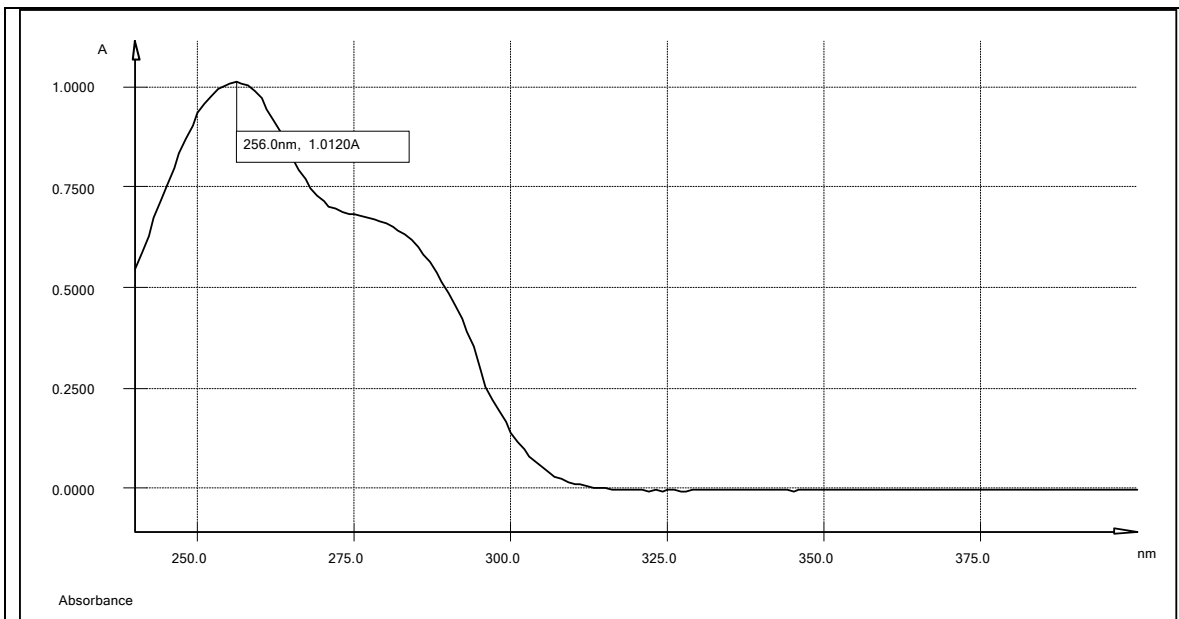


Рис.3. Спектр поглинання ацикловіру у кислому середовищі.

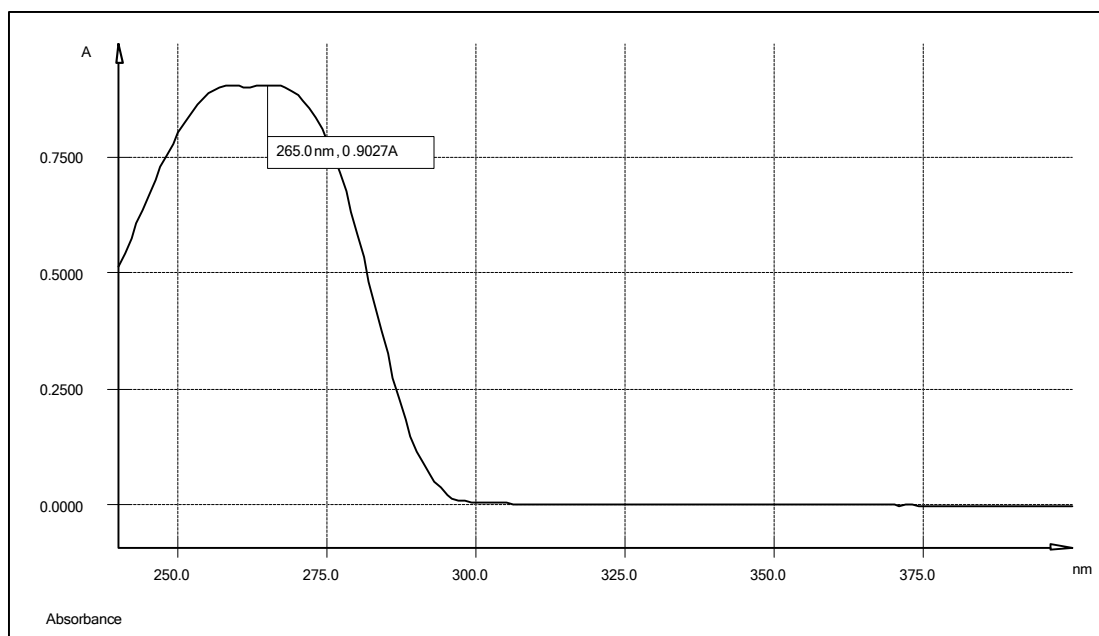


Рис. 4. Спектр поглинання ацикловіру у лужному середовищі.

### 3.1. Визначення лінійної залежності (побудова калібрувального графіка).

Для побудови калібрувального графіка ми готували розведені стандартні розчини з розчину, який готували згідно п. 2.2.3.

Серію з п'яти розчинів з концентраціями 10,0; 12,5; 25,0; 50,0 та 75,0 мкг/мл готували розведенням стандартного розчину за стандартними методиками згідно ДФУ:

- 2,5 мл стандартного розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, доводили до ризи розчином 0,1М NaOH;
- 3,5 мл стандартного розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, доводили до ризи розчином 0,1М NaOH;
- 5,0 мл стандартного розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, доводили до ризи розчином 0,1М NaOH;
- 12,5 мл стандартного розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, доводили до ризи розчином 0,1М NaOH;
- 20,0 мл стандартного розчину переносять у мірну колбу на 50 мл, доводили до ризи розчином 0,1М NaOH.

Вимірювали оптичну густину розчину А при довжині хвилі  $\lambda = 265$  нм і будували графічну залежність величини оптичної густини А від концентрації розведених стандартних розчинів (Рис.5):

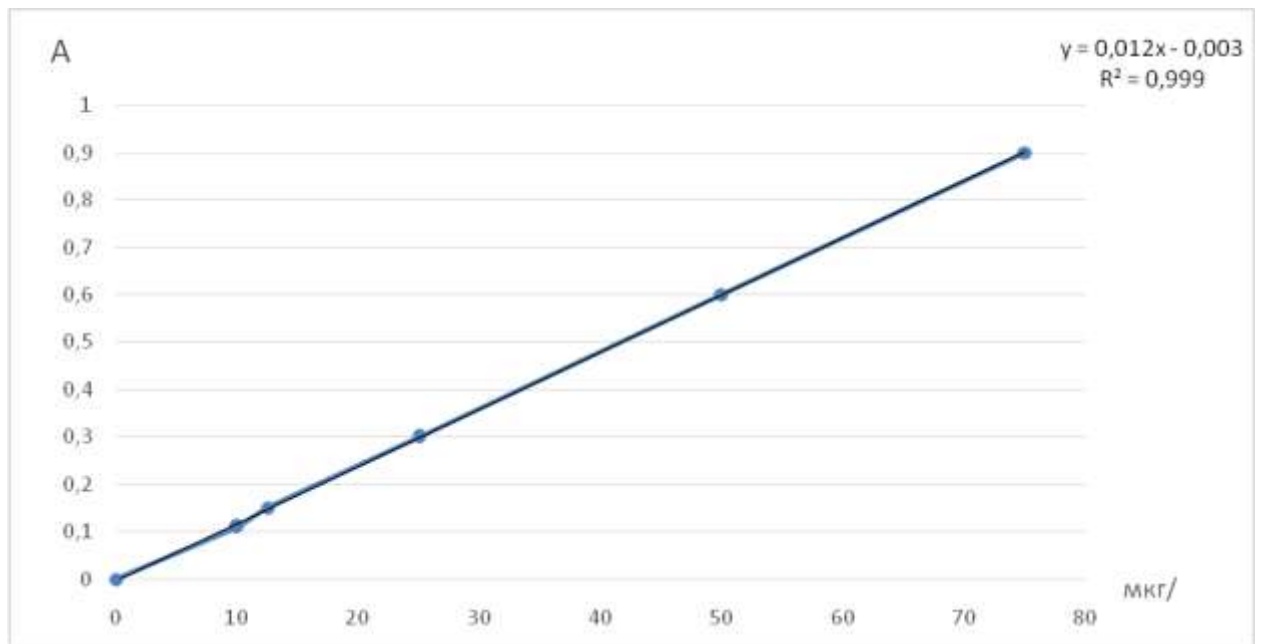


Рис.5. Калібрувальний графік.

*Статистична оцінка параметрів лінійної залежності.*

Розрахунок величини залишкової дисперсії розраховували за рівнянням:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2 - a \cdot \sum_{i=1}^n y_i - b \cdot \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i}{v}, v = n - 2.$$

$$s_0^2 = 7,4766 \cdot 10^{-5}$$

Дисперсії констант  $a$  і  $b$  розраховували за стандартними рівняннями:

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2},$$

$$s_b^2 = 1,8475 \cdot 10^{-8}$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2.$$

$$s_a^2 = 2,7732 \cdot 10^{-5}$$

Стандартні відхилення  $s_b$  і  $s_a$  величини  $\Delta_b$  і  $\Delta_a$  (напівширини довірчих інтервалів), необхідні для оцінки довірчих інтервалів констант, розраховували за рівняннями:

$$s_b = \sqrt{s_b^2},$$

$$s_b = 0,000135922$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2},$$

$$s_a = 0,005266$$

$$\Delta_b = t(P, v) \cdot s_b, v = n - 2,$$

$$t(0.95, 4) = 2.78$$

$$\Delta_b = 0.0003779$$

$$\Delta_a = t(P, v) \cdot s_a, v = n - 2.$$

$$\Delta_a = 0,01464$$

Відповідно, довірчі інтервали для констант  $a$  і  $b$  розраховували за рівняннями:

$$a \pm s_a \cdot t(P, v),$$

$$b \pm s_b \cdot t(P, v),$$

Довірчий інтервал для коефіцієнта  $a$ :  $0,0121 \pm 0,0146$ .

Довірчий інтервал для коефіцієнта  $b$ :  $0,006 \pm 0,0004$ .

### 3.2. Визначення стабільності розчинів ацикловіру у часі.

Стабільність розчину ацикловіру у лужному середовищі в залежності від часу вивчали для стандартного розчину з концентрацією діючої речовини 25 мкг/мл. Нижче зазначено величину оптичної густини як функція від часу:

Оптична густина А					RSD,%	Δt,%
0 хв.	15хв.	30хв.	45хв.	60хв.		
0,3051	0,3101	0,3098	0,3091	0,3103	0,7%	4,672*10 <sup>-6</sup>

Розрахунки статистичних величин:

1) середнє значення:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n},$$

де  $n$  – обсяг вибірки,

$$\bar{x} = 0,3089.$$

2) RSD – відносне стандартне відхилення у відсотках:

$$RSD = s_r \cdot 100\%,$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}, \text{ s – стандартне відхилення}$$

$$s = 0,002161$$

$$s_r = 0,006998 \approx 0,007$$

$$RSD = 0,7\%$$

3) дисперсія:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{v},$$

або

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{v},$$

де  $\nu$  – число ступенів свободи,  $n$  – обсяг вибірки,  $\bar{x}$  – середнє значення,  $x_i$  – усі значення вибірки.

$$s^2 = 4,672 \cdot 10^{-6}$$

4) довірчий інтервал:

$$\bar{x} \pm t_{P,\nu} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}},$$

де  $\bar{x}$  – середнє значення вибірки,  $s$  – стандартне відхилення,  $n$  – обсяг вибірки,  $t_{P,\nu}$  – коефіцієнт Стюдента або  $t$ -критерій,  $\Delta_{\bar{x}}$  – напівширина довірчого інтервалу;

коефіцієнт Стюдента при  $P=0,95$  та числі ступенів свободи 4 – 2,7764

$$\Delta_{\bar{x}} = 0,002684$$

$$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}} = 0,3089 \pm 0,002684$$

5) відносна похибка середнього значення:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

$$\bar{\varepsilon} = 0,87\%$$

За результатами досліджень можна стверджувати, що розчин ацикловіру у лужному середовищі є стабільним протягом 1 години.

### 3.3. Кількісне визначення ацикловіру у твердій лікарській формі.

Кількісне визначення ацикловіру у Зразках 1,2,3 (Об'єктах дослідження) згідно з методикою, наведеною у п. 2.3. , представлено у Таблиці 1.

Таблиця 1. Кількісне визначення ацикловіру в об'єктах дослідження спектрофотометричним методом.

№ проби	Вміст діючої речовини у ТЛФ (враховуючи розведення), мг		
	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
1	198,9	197,4	198,7
2	198,6	200,2	198,3
3	197,7	201,1	199,1
4	197,5	198,6	200,4

Кількість визначень  $n=4$ , концентрація діючої речовини ацикловір згідно з інструкціями для медичного застосування 200 мг.

### 3.4. Часткова валідація методики.

#### 3.4.1. Перевірка специфічності запропонованої методики.

Враховуючи те, що апробацію методики ми проводили безпосередньо на твердих лікарських формах і вплив допоміжних речовин на визначення кількісного вмісту ацикловіру не виявлено (Таблиця 1), методику можна вважати специфічною оскільки специфічністю вважають здатність визначати аналізовану (діючу) речовину у присутності інших молекул, іонів, функціональних груп тощо [19-21].

#### 3.4.2. Перевірка лінійності запропонованої методики.

При проведенні спектрофотометричного аналізу однією з характеристик валідності є лінійність[19-21], тобто демонстрація прямої



залежності між оптичною густиною досліджуваного розчину та концентрацією досліджуваного розчину. Лінійність та статистичні характеристики, яке це підтверджують, була продемонстрована у п. 3.1.

### 3.4.3. Перевірка робасності запропонованої методики.

При апробуванні методики в аналітичній практиці часто ставиться задача перевірити спроможність аналітичних дій у різних лабораторних умовах[19-21]. Це дозволяє оцінити ризик систематичних помилок у роботі. При оцінці валідаційної характеристики «робасність» ми використовували різні розчини натрій гідроксиду, який готували згідно п.2.2.2.

Результати кількісного визначення ацикловіру в об'єктах дослідження наведено у Таблицях 2,3,4:

Таблиця 2 Порівняння кількісного визначення діючої речовини ацикловір (Зразок 1) у розчинах, лужне середовище яких було створено NaOH з різних лабораторних партій.

	NaOH, № 1	NaOH, № 2	Різниця значень, %
	Вміст діючої речовини, мг		
1	198,9	200,1	Не більше 2,0
2	198,6	199,7	Не більше 2,0
3	197,7	198,9	Не більше 2,0
4	197,5	198,8	Не більше 2,0

Таблиця 3 Порівняння кількісного визначення діючої речовини ацикловір (Зразок 2) у розчинах, лужне середовище яких було створено NaOH з різних лабораторних партій.

	NaOH, № 1	NaOH, № 2	Різниця значень, %
	Вміст діючої речовини, мг		
1	197,4	197,7	Не більше 2,0
2	200,2	198,5	Не більше 2,0
3	201,1	198,9	Не більше 2,0
4	198,6	197,3	Не більше 2,0

Таблиця 4 Порівняння кількісного визначення діючої речовини ацикловір (Зразок 3) у розчинах, лужне середовище яких було створено NaOH з різних лабораторних партій.

	NaOH, № 1	NaOH, № 2	Різниця значень, %
	Вміст діючої речовини, мг		
1	198,7	198,1	Не більше 2,0
2	198,3	199,8	Не більше 2,0
3	199,1	198,2	Не більше 2,0
4	200,4	198,9	Не більше 2,0

#### **3.4.4. Оцінка правильності методики.**

Отримані результати корелюють із концентрацією діючої речовини, яка зазначена в інструкціях для медичного застосування. Враховуючи вищезазначене, альтернативну методику кількісного визначення ацикловіру в об'єктах дослідження можна вважати правильною.

#### **3.5. Аналіз методик кількісного визначення субстанції ацикловір.**

Спираючись на нормативні документи Державної фармакопеї України та Європейської фармакопеї[14,15] ми проаналізували методики кількісного визначення субстанції ацикловір і дійшли висновку, що кількісно зазначена речовина може бути визначена методом неводного титрування та методом рідинної хроматографії. Безумовно, метод рідинної хроматографії є найбільш точним і сучасним методом, але, з нашої точки зору, достатньо дорогорватісним. Крім того, виконати аналіз може тільки компетентний спеціаліст. Метод неводного титрування широко використовується у фармацевтичній та аналітичній практиці, але за точністю виконання поступається іншим методам, є токсичним, малочутливим та трудомістким. Спектрофотометричний метод не має вищезазначених недоліків і може бути використаний не тільки у випадку визначення концентрації субстанції а і, що на нашу думку є найважливішим, бути перспективним при моделюванні нових альтернативних методик кількісного визначення діючої речовини у різноманітних лікарських формах з мінімальною похибкою.

## ВИСНОВКИ

1. Результатом проведення бібліосемантичного аналізу було визначено фізико-хімічні та фармакологічні властивості ацикловіру, механізм дії та метаболізм.

2. Проаналізовано методики ідентифікації та кількісного визначення діючої речовини ацикловір, розроблена та апробована альтернативна нова методика кількісного визначення діючої речовини ацикловір у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

3. Виконано часткову валідацію методики кількісного визначення діючої речовини у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
2. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2944/aciklovir>
3. Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / Видання 3-е.перероблене і доповнене / [Широбоков В.П. Климнюк С.І., Понятовський В.А. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2021. – 920 с.
4. Компендиум 2015 — лекарственные препараты / Под. ред. В.Н. Коваленко, – К., 2015;
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. — М., 2000. — Т.2; От субстанции к лекарству / Под ред. В.П. Черных. — Х., 2005;
6. Clarke's isolation and identification of drugs / Ed. A.C. Moffat. — London, 1986;
7. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К,юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.-К.ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
8. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М.,Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
9. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В, Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запорізький державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
10. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.

11. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rx index Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
12. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
13. [www.pharma-center.com.ua](http://www.pharma-center.com.ua). веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
14. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.
15. European Pharmacopoeia. 7.0.– P. 2297 – 2299.
16. Levachkova Yu. V., Yarnykh T. G., Litvinova O. M., Chushenko V. M. Spectrophotometric determination of acyclovir in the suppository / Der Pharma 9 Chemica. 2016. № 8(2). P. 356-360.
17. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
  18. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). *Кількісна аналітична хімія*. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.
  19. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
  20. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
  21. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton. 2013-2014. P. 3–90.

## ДОДАТКИ

### Додаток 1 Витяг з ДФУ.

#### Ацикловір

у червоне або оранжеве при додаванні 0,7 мл 0,01 М розчину хлористоводневої кислоти і 0,05 мл метилового червоного розчину Р.

**Відносна густина** (2.2.5). Від 0,790 до 0,793.

**Відновні речовини**. До 30 мл субстанції додають 0,1 мл 0,02 М розчину калію перманганату та витримують у темному місці протягом 2 год; суміш не має повністю знебарвитися.

**Супровідні домішки**. Газова хроматографія (2.2.28).

**Випробовуваний розчин**. Випробовувана субстанція.

**Розчин порівняння (а)**. До 0,5 мл метанолу Р додають 0,5 мл 2-пропанолу Р і доводять об'єм розчину випробовуваним розчином до 100,0 мл. 1,0 мл одержаного розчину доводять випробовуваним розчином до об'єму 10,0 мл.

**Розчин порівняння (б)**. 100 мкл бензолу Р доводять випробовуваним розчином до 100,0 мл. 0,20 мл одержаного розчину доводять випробовуваним розчином до 100,0 мл.

**Колонка**:

- матеріал: кварц,
- розмір: 50 м × 0,3 мм,
- нерухома фаза: макрогол 20000 Р (товщина шару 1 мкм).

**Газ-носії**: гелій для хроматографії Р.

**Линійна швидкість газу-носія**: 21 см/с.

**Поділ потоку**: 1:50.

**Температура**:

	Час (хв)	Температура (°С)
Колонка	0 - 11 11 - 20	45 → 100 100
Блок вводу проб		150
Детектор		250

**Детектор**: полуменевіо-іонізаційний.

**Інжекції**: 1 мкл.

**Час утримування**: домішки С — близько 7,5 хв.

**Придатність хроматографічної системи**:

- ступінь розділення: не менше 5,0 між піками домішки А (2<sup>а</sup> пік) і домішки В (3<sup>а</sup> пік) на хроматограмі розчину порівняння (а),
- відношення сигнал/шум: не менше 5 для піка домішки С на хроматограмі розчину порівняння (б).

**Нормування**:

- домішки А, В: площа піка кожної домішки не має перевищувати різницю між площею відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) і площею відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину (0,05 % (об/об)),
- домішка С: площа піка не має перевищувати різницю між площею піка домішки С на хроматограмі розчину порівняння (б) і площею відповідного

піка на хроматограмі випробовуваного розчину (2 ррт (об/об)),

- будь-яка інша домішка: площа піка кожної домішки не має перевищувати різницю між площею піка домішки А на хроматограмі розчину порівняння (а) і площею відповідного піка на хроматограмі випробовуваного розчину (0,05 % (об/об)).

**Речовини, не розчинні у воді**. 1,0 мл субстанції доводять водою Р до об'єму 20 мл. Одержаний розчин має бути прозорим (2.2.1).

**Сухий залишок**. Не більше 50 ррт (0,005 %).

20,0 г субстанції упарюють насухо на водяній бані та сушать при температурі від 100 °С до 105 °С. Маса сухого залишку не має перевищувати 1 мг.

**Вода** (2.5.12). Не більше 3 г/л. Визначення проводять із 10,0 мл субстанції, використовуючи 20 мл п'єдиду безводного Р як розчинник.

#### ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

#### ДОМІШКИ

**Специфіковані домішки: А, В, С.**

А. С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-ОН: метанол,

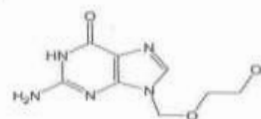
В. С<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-СНОН-СН<sub>3</sub>: пропан-2-ол (ізопропанол),

С. С<sub>6</sub>H<sub>6</sub>: бензол.

#### АЦИКЛОВІР

#### Aciclovirum

#### ACICLOVIR



C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
[59277-89-3]

М.м. 225,2

2-Аміно-9-[(2-гідроксиетокси)метил]-1,9-дигідро-6H-пурін-6-он.

**Вміст:** не менше 98.5 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

**Опис.** Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

**Розчинність.** Мало розчинний у воді *P*, дуже мало розчинний в етанолі (96 %) *P*, практично не розчинний у гептані *P*.

Розчиняється у розведених розчинах мінеральних кислот і гідроксидів лужних металів.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

**Відповідність:** спектру ФСЗ ацикловіру.

## ВИПРОБОВУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 0.25 г субстанції розчиняють у розчині 4 г/л натрію гідроксиду *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Забарвлення розчину, приготованого для випробовування «Прозорість розчину», має бути не інтенсивнішим за еталон  $Y_7$ .

**Супровідні домішки.** Рідинна хроматографія (2.2.29). Розчини готують безпосередньо перед використанням.

**Суміш розчинників:** диметилсульфоксид *P* - вода *P* (20:80).

**Фосфатний буферний розчин рН 2.5.** 3.48 г дикалію гідрофосфату *P* розчиняють у 1000 мл води *P* і доводять рН до 2.5 фосфорною кислотою *P*.

**Фосфатний буферний розчин рН 3.1.** 3.48 г дикалію гідрофосфату *P* розчиняють у 1000 мл води *P* і доводять рН до 3.1 фосфорною кислотою *P*.

**Випробовуваний розчин.** 25 мг субстанції розчиняють у 5.0 мл диметилсульфоксиду *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 25.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** 5 мг ФСЗ ацикловіру для перевірки придатності хроматографічної системи (містить домішки А, В, J, К, N, О і Р) розчиняють в 1 мл диметилсульфоксиду *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 5.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 1.0 мл випробовуваного розчину доводять сумішню розчинників до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять сумішню розчинників до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (с).** Вміст віали ФСЗ ацикловіру для ідентифікації піка 1 (містить домішки С та І) розчиняють у 200 мкл диметилсульфоксиду *P* і доводять об'єм розчину водою *P* до 1.0 мл.

**Розчин порівняння (d).** Вміст віали ФСЗ ацикловіру для ідентифікації піка 2 (містить домішки F і G) розчиняють в 1.0 мл розчину порівняння (а).

**Колонка:**

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октадецилсилільний, ендкепований *P* (5 мкм).

**Рухома фаза:**

— рухома фаза А: ацетонітрил *P* - фосфатний буферний розчин рН 3.1 (1:99);

— рухома фаза В: ацетонітрил *P* - фосфатний буферний розчин рН 2.5 (50:50);

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 - 5	100	0
5 - 27	100 → 80	0 → 20
27 - 40	80	20

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 254 нм.

**Інжекції:** 10 мкл. Вводять випробовуваний розчин та розчини порівняння (b), (с) і (d).

**Ідентифікація домішок:** використовують хроматограму, що надається до ФСЗ ацикловіру для ідентифікації піка 1, і хроматограму розчину порівняння (с) для ідентифікації піків домішок С та І; використовують хроматограму, що надається до ФСЗ ацикловіру для ідентифікації піка 2, та хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації піків домішок А, В, F, G, J, K, N, O і Р.

**Відносні утримування до ацикловіру (час утримування ацикловіру близько 13 хв):** домішки В — близько 0.4; домішки Р — близько 0.7; домішки С — близько 0.9; домішки N — близько 1.37; домішок О та Q — близько 1.42; домішки І — близько 1.57; домішки J — близько 1.62; домішки F — близько 1.7; домішки А — 1.8; домішок К і R — близько 2.5; домішки G — 2.6.

**Придатність хроматографічної системи:**

— ступінь розділення: не менше 1.5 між піками домішки С та ацикловіру на хроматограмі розчину порівняння (с); не менше 1.5 між піками домішок F та А та не менше 1.5 між піками домішок К і G на хроматограмі розчину порівняння (d).

**Нормування:**

— поправковий коефіцієнт: для розрахунку вмісту множать площу піка домішки І на 1.5;

— домішка В: площа піка не має перевищувати 7 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.7 %);



- *сума домішок О та Q*: сума площ піків не має перевищувати 3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.3 %);
- *сума домішок K і R*: сума площ піків не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.2 %);
- *домішки A, G, J, K, N, P*: площа піка кожної домішки не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.2 %);
- *домішки C, F, I*: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.1 %);
- *неспецифіковані домішки*: площа піка кожної домішки не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.05 %);
- *сума домішок*: сума площ піків не має перевищувати 15 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (1.5 %);
- *не враховують*: піки, площа яких становить менше 0.3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (b) (0.03 %).

**Вода (2.5.12).** Не більше 6.0 %. Визначення проводять із 0.500 г субстанції.

**Сульфатна зола (2.4.14).** Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

**Бактеріальні ендотоксини (2.6.14, метод D).** Менше 0.50 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.150 г субстанції, розчиняють у 60 мл *оцтової кислоти безводної P* і титрують 0.1 М розчином *хлорної кислоти* потенціометрично (2.2.20).

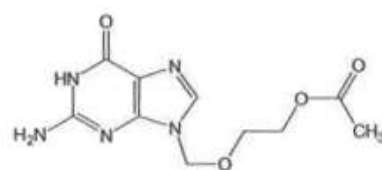
Паралельно проводять контрольний дослід.

1 мл 0.1 М розчину *хлорної кислоти* відповідає 22.52 мг  $C_8H_{11}N_5O_3$ .

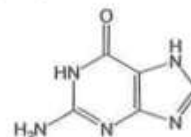
#### ДОМІШКИ

*Специфіковані домішки: A, B, C, F, G, I, J, K, N, O, P, Q, R.*

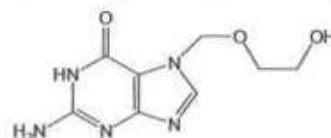
*Інші домішки, що виявляються* (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначатися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також 5.10. «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): L, M.



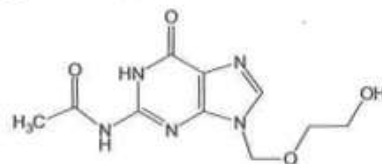
A. 2-[(2-аміно-6-оксо-1,6-дигідро-9H-пурін-9-іл)метокси]етилацетат,



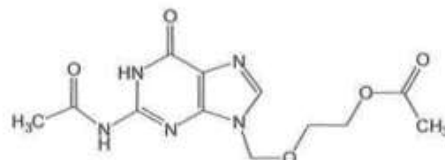
B. 2-аміно-1,7-дигідро-6H-пурін-6-он (гуанін),



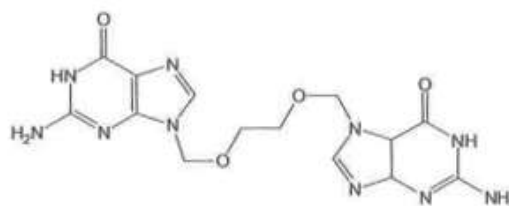
C. 2-аміно-7-[(2-гідроксіетокси)метил]-1,7-дигідро-6H-пурін-6-он,



F. N-[9-[(2-гідроксіетокси)метил]-6-оксо-6,9-дигідро-1H-пурін-2-іл]ацетамід,



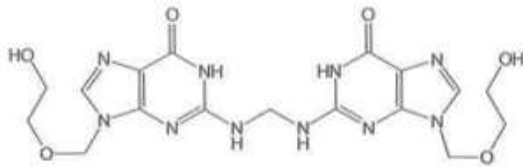
G. 2-[[2-(2-ацетиламіно)-6-оксо-1,6-дигідро-9H-пурін-9-іл]метокси]етилацетат,



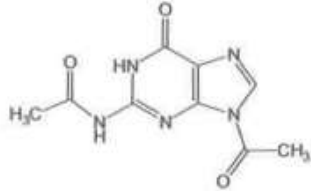
I. 2-аміно-7-[[2-[(2-аміно-6-оксо-1,6-дигідро-9H-пурін-9-іл)метокси]етокси]метил]-1,7-дигідро-6H-пурін-6-он,



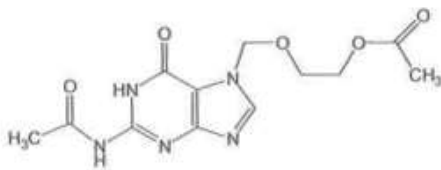
J. 9,9'-[етиленбіс(оксиметилен)]біс(2-аміно-1,9-дигідро-6H-пурін-6-он,



К. 2,2'-[метилендііміно]біс[9-[(2-гідроксіетокси)метил]-1,9-дигідро-6*H*-пурін-6-он],



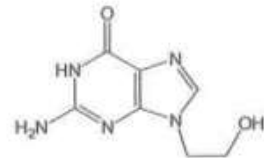
Л. *N*-(9-ацетил-6-оксо-6,9-дигідро-1*H*-пурін-2-іл) ацетамід (*N*<sup>2</sup>,9-діацетилгуанін),



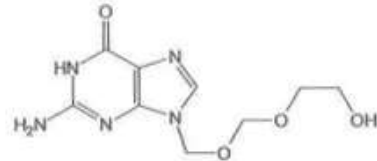
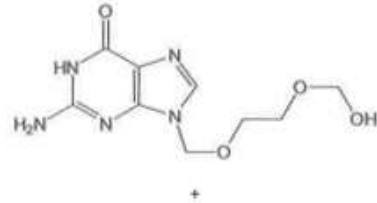
М. 2-[[2-(ацетиламіно)-6-оксо-1,6-дигідро-7*H*-пурін-7-іл]метокси]етилацетат,

Н. невідома структура,

О. невідома структура,



Р. 2-аміно-9-(2-гідроксіетил)-1,9-дигідро-6*H*-пурін-6-он,



Q. суміш 2-аміно-9-[[2-гідроксиметокси]етокси]метил]-1,9-дигідро-6*H*-пурін-6-ону та 2-аміно-9-[[2-гідроксіетокси]метокси]метил]-1,9-дигідро-6*H*-пурін-6-ону,



Р. 9,9'-[метиленбіс(оксіетиленоксиметилен)]біс(2-аміно-1,9-дигідро-6*H*-пурін-6-он).

## Додаток 2.

### Витяг з Європейської фармакопеї

#### Aciclovir

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

**Bacterial endotoxins** (2.6.14): less than 25 IU/g, if intended for use in the manufacture of parenteral preparations without a further appropriate procedure for the removal of bacterial endotoxins.

#### ASSAY

Dissolve 0.180 g in 50 mL of *carbon dioxide-free water R*. Titrate with 0.1 M *sodium hydroxide*, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

1 mL of 0.1 M *sodium hydroxide* is equivalent to 22.32 mg of C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>.

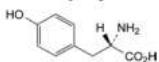
#### STORAGE

Protected from light. If the substance is sterile, store in a sterile, airtight, tamper-proof container.

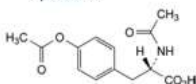
#### IMPURITIES

*Specified impurities: A.*

*Other detectable impurities* (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): B.



A. (2S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid (tyrosine).

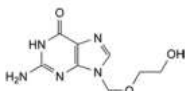


B. (2S)-2-(acetilylamino)-3-[4-(acetoxymethyl)phenyl]propanoic acid (diacetyltyrosine).

01/2014:0968

### ACICLOVIR

#### Aciclovirum



C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
[59277-89-3]

M<sub>r</sub> 225.2

#### DEFINITION

2-Amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one.

*Content*: 98.5 per cent to 101.0 per cent (anhydrous substance).

#### CHARACTERS

*Appearance*: white or almost white, crystalline powder.

*Solubility*: slightly soluble in water, very slightly soluble in ethanol (96 per cent), practically insoluble in heptane. It dissolves in dilute solutions of mineral acids and alkali hydroxides.

#### IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

*Comparison*: aciclovir CRS.

#### TESTS

**Appearance of solution.** The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y<sub>7</sub> (2.2.2, *Method II*).

Dissolve 0.25 g in a 4 g/L solution of *sodium hydroxide R* and dilute to 25 mL with the same solvent.

**Related substances.** Liquid chromatography (2.2.29). *Prepare the solutions immediately before use.*

*Solvent mixture*: dimethyl sulfoxide R, water R (20:80 V/V).

*Phosphate buffer solution pH 2.5.* Dissolve 3.48 g of dipotassium hydrogen phosphate R in 1000 mL of water R and adjust to pH 2.5 with phosphoric acid R.

*Phosphate buffer solution pH 3.1.* Dissolve 3.48 g of dipotassium hydrogen phosphate R in 1000 mL of water R and adjust to pH 3.1 with phosphoric acid R.

*Test solution.* Dissolve 25 mg of the substance to be examined in 5.0 mL of dimethyl sulfoxide R and dilute to 25.0 mL with water R.

*Reference solution (a).* Dissolve 5 mg of aciclovir for system suitability CRS (containing impurities A, B, J, K, N, O and P) in 1 mL of dimethyl sulfoxide R and dilute to 5.0 mL with water R.

*Reference solution (b).* Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the solvent mixture.

*Reference solution (c).* Dissolve the contents of a vial of aciclovir for peak identification 1 CRS (containing impurities C and I) in 200 µL of dimethyl sulfoxide R and dilute to 1.0 mL with water R.

*Reference solution (d).* Dissolve the contents of a vial of aciclovir for peak identification 2 CRS (containing impurities F and G) in 1.0 mL of reference solution (a).

*Column*:

– size: l = 0.25 m, Ø = 4.6 mm;

– stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm).

*Mobile phase*:

– mobile phase A: acetonitrile R, phosphate buffer solution pH 3.1 (1:99 V/V);

– mobile phase B: acetonitrile R, phosphate buffer solution pH 2.5 (50:50 V/V);

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 5	100	0
5 - 27	100 → 80	0 → 20
27 - 40	80	20

*Flow rate*: 1.0 mL/min.

*Detection*: spectrophotometer at 254 nm.

*Injection*: 10 µL of the test solution and reference solutions (b), (c) and (d).

*Identification of impurities*: use the chromatogram supplied with aciclovir for peak identification 1 CRS and the chromatogram obtained with reference solution (c) to identify the peaks due to impurities C and I; use the chromatogram supplied with aciclovir for peak identification 2 CRS and the chromatogram obtained with reference solution (d) to identify the peaks due to impurities A, B, F, G, J, K, N, O and P.

*Relative retention* with reference to aciclovir (retention time = about 13 min): impurity B = about 0.4; impurity P = about 0.7; impurity C = about 0.9; impurity N = about 1.37; impurities O and Q = about 1.42;

impurity I = about 1.57; impurity J = about 1.62;  
impurity F = about 1.7; impurity A = about 1.8; impurities K  
and R = about 2.5; impurity G = about 2.6.

**System suitability:**

- **resolution:** minimum 1.5 between the peaks due to impurity C and aciclovir in the chromatogram obtained with reference solution (c); minimum 1.5 between the peaks due to impurities F and A and minimum 1.5 between the peaks due to impurities K and G in the chromatogram obtained with reference solution (d).

**Limits:**

- **correction factor:** for the calculation of content, multiply the peak area of impurity I by 1.5;
- **impurity B:** not more than 7 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.7 per cent);
- **sum of impurities O and Q:** not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.3 per cent);
- **sum of impurities K and R:** not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.2 per cent);
- **impurities A, G, J, N, P:** for each impurity, not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.2 per cent);
- **impurities C, F, I:** for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent);
- **unspecified impurities:** for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent);
- **total:** not more than 15 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (1.5 per cent);
- **disregard limit:** 0.3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.03 per cent).

**Water** (2.5.12): maximum 6.0 per cent, determined on 0.500 g.

**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

**Bacterial endotoxins** (2.6.14, *Method D*): less than 0.50 IU/mg, if intended for use in the manufacture of parenteral preparations without a further appropriate procedure for the removal of bacterial endotoxins.

#### ASSAY

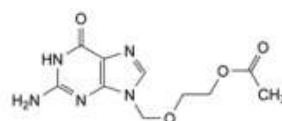
Dissolve 0.150 g in 60 mL of *anhydrous acetic acid R*. Titrate with 0.1 M *perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (2.2.20). Carry out a blank titration.

1 mL of 0.1 M *perchloric acid* is equivalent to 22.52 mg of  $C_8H_{11}N_5O_3$ .

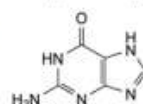
#### IMPURITIES

**Specified impurities:** A, B, C, F, G, I, J, K, N, O, P, Q, R.

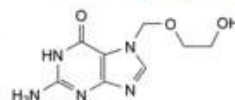
**Other detectable impurities** (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): L, M.



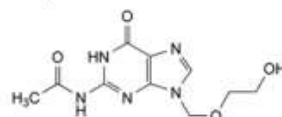
A. 2-[(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)methoxy]ethyl acetate,



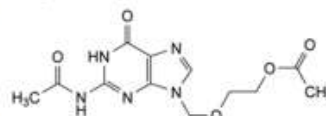
B. 2-amino-1,7-dihydro-6H-purin-6-one (guanine),



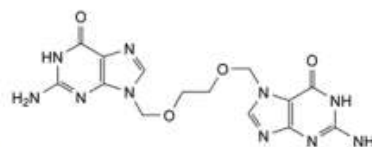
C. 2-amino-7-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,7-dihydro-6H-purin-6-one,



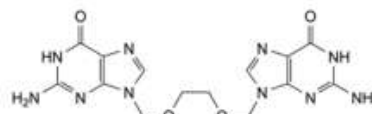
E. N-[9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl]acetamide,



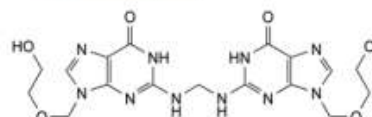
G. 2-[[2-(acetamino)-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl]methoxy]ethyl acetate,



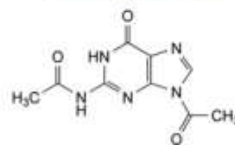
I. 2-amino-7-[[2-[(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)methoxy]ethoxy]methyl]-1,7-dihydro-6H-purin-6-one,



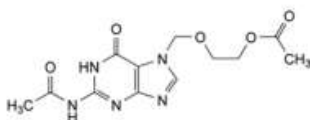
J. 9,9'-[ethylenebis(oxyethylene)]bis(2-amino-1,9-dihydro-6H-purin-6-one),



K. 2,2'-(methylene diimino)bis[9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one],



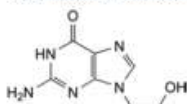
L. N-(9-acetyl-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl)acetamide ( $N^2,9$ -diacetylguanine),



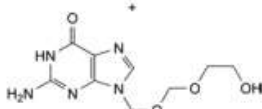
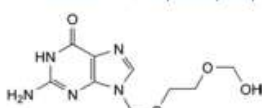
M. 2-[[2-(acetylamino)-6-oxo-1,6-dihydro-7H-purin-7-yl]methoxy]ethyl acetate,

N. unknown structure,

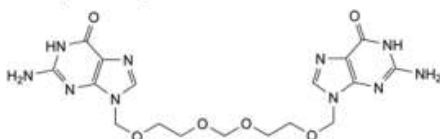
O. unknown structure,



P. 2-amino-9-(2-hydroxyethyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one,



Q. mixture of 2-amino-9-[[2-(hydroxymethoxy)ethoxy]methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one and 2-amino-9-[[2-(hydroxyethoxy)methoxy]methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one,



R. 9,9'-[methylenebis(oxyethyleneoxymethylene)]bis(2-amino-1,9-dihydro-6H-purin-6-one).

Carry out all operations as rapidly as possible and avoid exposure to actinic light; use freshly prepared solutions.

**IDENTIFICATION**

First identification: B.

Second identification: A, C.

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

*Test solution.* Dissolve 15.0 mg in 10 mL of tetrahydrofuran R and dilute immediately to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 2.5 mL of this solution to 100.0 mL with tetrahydrofuran R.

*Spectral range:* 300-400 nm.

*Absorption maximum:* at 358 nm.

*Specific absorbance at the absorption maximum:* 1350 to 1475.

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

*Preparation:* discs.

*Comparison:* acitretin CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, dissolve the substance to be examined and the reference substance separately in 2-propanol R heating under reflux, filter, evaporate to dryness and record new spectra using the residues.

C. Examine the chromatograms obtained in the assay.

*Results:* the principal peak in the chromatogram obtained with test solution (b) is similar in retention time to the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a).

**TESTS**

**Related substances.** Liquid chromatography (2.2.29).

*Maintain the sampler at 4 °C.*

*Test solution (a).* Dissolve 25.0 mg of the substance to be examined in 5 mL of tetrahydrofuran R and dilute immediately to 100.0 mL with anhydrous ethanol R.

*Test solution (b).* Dilute 10.0 mL of test solution (a) to 25.0 mL with anhydrous ethanol R.

*Reference solution (a).* Dissolve 25.0 mg of acitretin CRS in 5 mL of tetrahydrofuran R and dilute immediately to 100.0 mL with anhydrous ethanol R. Dilute 10.0 mL of this solution to 25.0 mL with anhydrous ethanol R.

*Reference solution (b).* Dissolve 1.0 mg of tretinoin CRS in anhydrous ethanol R and dilute to 20.0 mL with the same solvent. Mix 5.0 mL of this solution with 2.5 mL of reference solution (a) and dilute to 100.0 mL with anhydrous ethanol R.

*Reference solution (c).* Dilute 2.5 mL of reference solution (a) to 50.0 mL with anhydrous ethanol R. Dilute 3.0 mL of this solution to 20.0 mL with anhydrous ethanol R.

*Column:*

– size  $l = 0.25$  m,  $\varnothing = 4$  mm;

– stationary phase: microparticulate octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5  $\mu$ m) with a specific surface area of 200 m<sup>2</sup>/g, a pore size of 15 nm and a carbon loading of 20 per cent;

– temperature: 25 °C.

*Mobile phase:* a 0.3 per cent V/V solution of glacial acetic acid R in a mixture of 8 volumes of water R and 92 volumes of anhydrous ethanol R.

*Flow rate:* 0.6 mL/min.

*Detection:* spectrophotometer at 360 nm.

*Injection:* 10  $\mu$ L of test solution (a) and reference solutions (b) and (c).

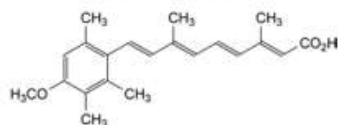
*Run time:* 2.5 times the retention time of acitretin.

*Retention time:* impurity A = about 4.8 min; tretinoin = about 5.2 min; acitretin = about 6.2 min; impurity B = about 10.2 min.

07/2010:1385  
corrected 7.0

**ACITRETIN**

Acitretinum



C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>  
[55079-83-9]

M, 326.4

**DEFINITION**

(all-*E*)-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethylnona-2,4,6,8-tetraenoic acid.

*Content:* 98.0 per cent to 102.0 per cent (dried substance).

**CHARACTERS**

*Appearance:* yellow or greenish-yellow, crystalline powder.

*Solubility:* practically insoluble in water, sparingly soluble in tetrahydrofuran, slightly soluble in acetone and in ethanol (96 per cent), very slightly soluble in cyclohexane.

It is sensitive to air, heat and light, especially in solution.

It shows polymorphism.

### Додаток 3

Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	$\pm 2$ нм
Спектральна смуга пропускання	8 нм, 6 нм в діапазоні УФ
Коефіцієнт пропускання	від 0 до 199,9%
Поглинання	-0,300 до 1,999А

Точність	$\pm 1\% T$ , $\pm 0,01Abs$ при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% T, 0,001A
Стабільність	1% / год після 20-хвилинного нагрівання
Діапазон концентрацій	-300 до 1999
Дозвіл концентрації	1 / 0,1
Одиниці вимірювання	мг/м <sup>3</sup> , мг/л, г/л, моль/л, ед.
Потужність	<50 Вт
Розмір (Ш x Д x В)	365 x 272 x 160 мм
Вага	6 кг

## Додаток 4

### АНОТАЦІЯ (SUMMARY).

The search for alternative and express methods for the quantitative determination of purine derivatives in various medicinal products is one of the most urgent and important tasks of analytical chemistry. The active substance acyclovir (an analog of purine nucleoside deoxyguanosine) is part of the dosage forms that belong to the group of antiviral drugs, especially its activity is manifested against the family of herpesviruses. The purpose and objectives of the research. To analyze the existing methods of quantitative determination of acyclovir in substance and dosage forms, to develop and test a new method of quantitative spectrophotometric determination of acyclovir in solid dosage forms, and to carry out partial validation of the methodology according to the DFU. The solutions that were used in the work were prepared by well-known methods, the optical density was measured at a wavelength of 265 nm on a Jenway 6305 spectrophotometer. Each tablet form of sample 1, 2 and 3 (the concentration of the active substance acyclovir is 200 mg according to the instructions for medical use) was dissolved in a volume of 0,1 l of NaOH 0,1 M. For further spectrophotometric studies, the solution was diluted by well-known methods to a concentration of the active substance of 50 mkg/ml. Calculation of the results of quantitative determination of acyclovir was carried out according to standard formulas of spectrophotometric determination. The concentration of acyclovir found in TLF corresponds to the concentration specified in the instructions for medical use.