

# 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  
Кандидат хімічних наук, доцент  
Зайцева Г.М.

## ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**Кількісне визначення флуконазолу у твердих лікарських формах  
спектрофотометричним методом**

**Виконала:** студентка 5-го курсу, групи  
Ф1А фармацевтичного факультету  
**Руденко Юлія Сергіївна**

**Науковий керівник:**

Професор кафедри аналітичної,  
фізичної та колоїдної хімії, доктор  
педагогічних наук,

**Рева Тетяна Дмитрівна**

**Київ – 2024**

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Флуконазол, методи визначення.	7
1.1. Застосування флуконазолу.	7
1.2. Фізико-хімічні властивості флуконазолу.	7
1.3. Механізм дії та метаболізм флуконазолу.	8
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.	8
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення флуконазолу.	10
1.6. Спектрофотометрія.	10
Розділ 2. Експериментальна частина.	12
2.1. Матеріали та методи.	12
2.1.1. Мета дослідження.	12
2.1.2. Об'єкти дослідження.	12
2.1.3. Посуд та обладнання.	13
2.1.4. Реактиви.	14
2.1.5. Приготування розчинів.	14
2.1.5.1. Приготування розчину досліджуваного зразка.	14
2.1.5.2. Приготування 4% розчину барвника бромтимолового синього (ББТС).	14
2.1.5.3. Приготування стандартного розчину флуконазолу та серії стандартних розчинів.	15
2.1.6. Методика та умови спектрофотометричного визначення.	16
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	17
3.1. Вплив температури.	17
3.2. Визначення оптимальної довжини хвилі спектрофотометричного поглинання (побудова спектру	17

поглинання).	
3.3. Побудова калібрувальної залежності оптичної густини А від концентрації флуконазолу та визначення лінійності.	19
3.4. Визначення флуконазолу у твердих лікарських формах та оцінювання валідаційних характеристик.	21
3.4.1. Специфічність методики.	21
3.4.2. Прецизійність методики.	23
3.4.3.Робасність методики.	23
3.4.4. Правильність методики.	25
3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення флуконазолу.	26
Висновки.	27
Список використаних джерел.	28
Додатки.	30
Анотація (Summary).	

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

ВЕРХ –високоефективна рідинна хроматографія

РХ – рідинна хроматографія

ДФУ –державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

GLP– належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO– міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

МЛФ – м'яка лікарська форма

ББТС - барвник бромтимоловий синій.

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С<sup>0</sup> – градуси Цельсія

## ВСТУП

Тверді та м'які лікарські форми (ТЛФ, МЛФ), які мають у своєму хімічному складі тріазольний цикл, активно розповсюджені у медичній та фармацевтичній практиці завдяки проявам противірусного, ранозагоючого та протигрибкового ефектам [1].

Флуконазол відноситься до групи протимікозних (протигрибкових) препаратів, який призначається лікарем при системних мікозах та кандидомікозах. На жаль, мікоз є широко розповсюдженим захворюванням і за даними світових експертів [1] страждають на це захворювання майже 40 відсотків населення планети.

Причиною виникнення мікозу є контакт шкіри здорової людини зі збудником. Активність впливу збудника мікозу на шкіру є індивідуальним процесом, залежить від певних умов та чинників, наприклад, ступеня пошкодження поверхневого шару шкіри (епідермісу), імунітету людини, хронічних захворювань шлунково-кишкового тракту тощо. Після потрапляння спорів грибів у сприятливе середовище починається процес розмноження. На інкубаційний період впливає природа збудника, температура, ступінь вологості, локалізація тощо.

За міжнародною класифікацією розрізняють мікози двох груп: системні та поверхневі. Флуконазол призначають для лікування мікозів як першої так і другої групи.

**Актуальність:** Пошук нових методик кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах.

**Мета:** Розробити методику кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

**Завдання:**

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування флуконазолу, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм флуконазолу.

2. Проаналізувати методики кількісного визначення флуконазолу.

3. На основі проведених досліджень розробити методику кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

4. Провести часткову валідацію методики кількісного визначення флуконазолу спектрофотометричним методом.

**Методи дослідження:** спектрофотометрія як метод для кількісного визначення діючої речовини у ТЛФ.

**Новизна та значення одержаних результатів:** полягає у розробці нової сучасної альтернативної методики кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах.

**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.

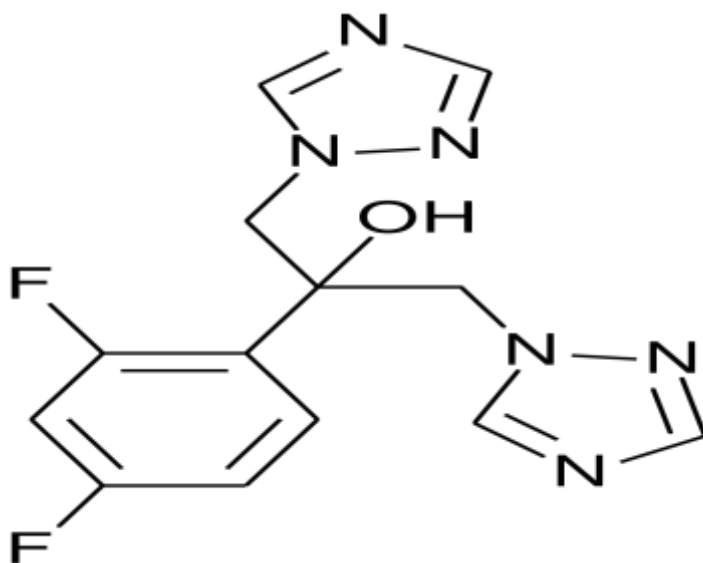
**Структура роботи.** Робота представлена на 42 сторінках, додатків -4, рисунків- 3, таблиць- 8.

## Розділ 1. Флуконазол, методи визначення.

### 1.1 Застосування флуконазолу.

Флуконазол відносять до фармакологічної групи J02A C01[2]. Флуконазол (дифлюкан) - препарат широкого спектру дії, проявляє високу ефективність проти дріжджових грибів криптококів, трихофітонів, гістоплазм та інш. Флуконазол у різних формах (ТЛФ та РЛФ) призначають при лікуванні мікозів (поверхневих та внутрішніх), при атрофічному кандидозі порожнини рота, при лікуванні орофарингеального кандидозу у хворих зі СНІД [2].

### 1.2. Фізико-хімічні властивості флуконазолу.



За IUPAC хімічна речовина сечовина має наступну назву: 2-(2,4-difluorophenyl)- 1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol. [3]

Бруто формула:  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ .

Молярна маса становить 306,271 г/моль [3].

Флуконазол є синтетичним препаратом і уперше був синтезований у лабораторіях американської фармацевтичної фірми Pfizer. Це білі кристали, майже нерозчинні у воді, але добре розчиняються в органічних розчинниках.

Форма збереження – темне скло, без доступу повітря.

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

Флуконазол порушує утворення ергостерину у клітинах грибів, інгібуючи домінуючі ферментативні речовини біосинтезу ергостерину і тому, відповідно, проявляє фунгіцидний та фунгістатичний ефекти [4-6].

Флуконазол блокує дію речовини 14-деметилаза і гальмує перетворення ланостерину в 14-диметилланостерин.

Препарати з флуконазолом призначають для пригнічування патогенних дій збудників *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton*, *Blastomyces dermatitides*, *Histoplasma capsulatum*. Не пригнічуються препаратом збудники роду *Aspergillus* [4-6].

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

Лікарські засоби (ЛЗ) з діючою речовиною флуконазол призначають хворим з нижчезазначеними патологіями:

Різні види кандидозу;

Різні види мікозу;

Кріптококовий менінгіт.

Призначають препарати з флуконазолом при профілактиці у дорослих, наприклад, рецидивах криптококового менінгіту, кандидозах ротоглотки та стравоходу, вагінальних кандидозах тощо.

Важно відмітити, що флуконазол використовують і у педіатричній практиці при лікуванні та при проведенні підтримуючої терапії.

Препарати хворі приймають перорально оскільки флуконазол добре всмоктується шлунково-кишковим трактом, та парентерально. Флуконазол має здатність накопичуватись у роговому шарі шкіри, проникає через гематоенцефалічний та плацентарний бар'єр, метабілізується та виділяється з



організму людини в незмінному вигляді з сечею. За літературними джерелами з'ясовано, що період напівведення становить 30 годин, максимальна концентрація в крові досягається протягом 90 хвилин.

Побічні ефекти при прийомі флуконазолу проявляються не рідко. Це діарея, блювання, нудота, головний біль, алергічні висипання та алергічний дерматит, анемія, зниження апетиту, порушення смакових якостей, тремор, вертиго, запор, метеоризм, сухість у ротовій порожнині, холестаза, жовтяниця, набряки, астенія тощо.

Флуконазол не призначають при вагітності та годування груддю, одночасний прийом забороняється з терфенадином, цизапридом, хінідином та еритроміцином.

Передозування препаратом флуконазол призводить до галюцинацій, параноїдальної поведінки [4-6].

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

Похідні тріазолу ідентифікують за температурою плавлення ( від 147<sup>0</sup>С до 152<sup>0</sup> С), кількісно визначають ацидиметрією у неводному середовищі [7].

За ДФУ[8, Додаток 1] та Європейською фармакопеею [9, Додаток 2] субстанцію флуконазол ідентифікують:

- Абсорбційною спектрофотометрією в інфрачервоній області;
- Для кількісного визначення флуконазолу субстанцію титрують розчином перхлоратної кислоти (безводне ацидометричне титрування) у середовищі льодяної етанатної кислоти. Кінець реакції фіксують потенціометрично (Додаток 1):

Наважку флуконазолу 0,125 г розчиняють у 60 мл етанатної кислоти, перемішують та титрують стандартним розчином  $\text{HClO}_4$  концентрації 0,1М.

### 1.6. Спектрофотометрія.

Спектрофотометрія відноситься до оптичних методів дослідження [15-16]. Це фізико-хімічний метод аналізу розчинів та твердих речовин, який заснований на вивченні спектрів поглинання в УФ-, видимій та ІЧ-областях спектра (Додаток 3). Оптичні методи засновані на визначенні оптичних властивостей хімічних речовин, які мають місце при взаємодії електромагнітного випромінювання з хімічною сполукою. При проведенні кількісних визначень дуже часто дослідник має справу з безбарвними речовинами, тому у таких випадках попередньо проводять реакцію щодо перетворення безбарвної хімічної сполуки у забарвлену (фотометрична реакція).

У фармацевтичних методах дослідження вивчають та використовують залежність між оптичним поглинанням розчину та довжиною хвилі світла (спектр поглинання). Дослідник визначає цю залежність та фіксує максимум-довжину хвилі  $\lambda$ , при якій потім проводить усі подальші вимірювання.

Визначення концентрації при спектрофотометрії встановлюють за допомогою калібрувального (градуювального) графіка, оскільки залежність оптичної густини розчину прямо пропорційна концентрації розчиненої речовини (Закон Бугера-Ламберта – Бера), методом добавок або методом порівняння.

Відносна помилка у спектрофотометричних визначеннях хімічних сполук не перевищує 2 %.

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

Випускна кваліфікаційна робота була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії.

### **2.1. Матеріали та методи.**

#### **2.1.1. Мета дослідження.**

Після ознайомлення та опрацювання різноманітних методик кількісного визначення флуконазолу у лікарських засобах або субстанції [10-14, 17] нами була поставлена задача розробити та валідувати методику кількісного визначення флуконазолу спектрофотометричним методом у твердих лікарських формах (капсулах).

#### **2.1.2. Об'єкти дослідження.**

Для розробки методики ми обрали капсульні препарати Флуконазол та Флуконазол-Тева. Зазначені тверді лікарські форми реалізуються аптечними мережами та фармацевтичними закладами та мають склад, який наведено в інструкціях для медичного застосування:

*Капсули Флуконазол (Зразок 1).*

Діюча речовина – флуконазол, 100 мг;

Допоміжні речовини:

- Лактоза;
- Моногідрат;
- Крохмаль картопляний;
- Магнію стеарат;
- Кремнію діоксид колоїдний безводний.

Склад оболонки капсули:

- Желатин;
- Титану діоксид (Е 171);
- Індигокармін блакитний (Е 132).

*Капсули Флуконазол-Тева (Зразок 2).*

Діюча речовина – флуконазол, 100 мг;

Допоміжні речовини:

- Лактози моногідрат;
- Крохмаль кукурудзяний;
- Кремнію діоксид колоїдний безводний;
- Натрію лаурілсульфат;
- Магнію стеарат.

Склад оболонки капсули:

- Титану діоксид (E 171);
- Діамантовий синій FCF (E 133);
- Желатин.

Флуконазол, зразок 1

Флуконазол –Тева, зразок 2



Рис. 1. Тверді лікарські форми, які були використані у дослідженні.

### **2.1.3. Посуд та обладнання.**

1. Мірні піпетки і колби класу точності А
2. Ваги лабораторні Mettler Toledo XS204.
3. Спектрофотометр Jenway 6305 (Додаток 4).

### **2.1.4. Реактиви.**

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Флуконазол (**Fluconazole**), каталожний номер **F0161**, реєстраційний номер **86386-73-4**.

2. Хлороформ.
3. Барвник бромтимоловий синій (ББТС) кваліфікація ЧДА.
4. Вода дистильована.

### **2.1.5. Приготування розчинів.**

#### **2.1.5.1. Приготування розчину досліджуваного зразка.**

Капсулу (кожного зразка окремо) розкривають, переносять її зміст у контактну колбу на 10 мл, розчиняють у невеликій кількості хлороформу (приблизно у 5 мл), 1 хвилину перемішують та доводять до риси органічним розчинником. При необхідності фільтрують. В одному мілілітрі досліджуваного зразка міститься 10 мг флуконазолу.

#### **2.1.5.2. Приготування 4% розчину барвника бромтимолового синього (ББТС).**

Спираючись на літературні джерела, було з'ясовано, що ББТС, вступаючи в реакцію з флуконазолом, проявляє себе як донор протонів, тому результатом цієї хімічної взаємодії буде утворення комплексу жовтого кольору з переносом заряду та максимумом світлопоглинання при 422 нм [18]. Концентрація ББТС по відношенню до флуконазолу повинна бути приблизно у 10 разів більшою [18].

Враховуючи вищезазначене, готують розчин барвника з концентрацією 4%. Для цього зважують на лабораторних терезах Mettler Toledo XS204 4 г

ББТС, наважку переносять у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у 25 мл розчину хлороформу, струшують 10 хвилин. Доводять хлороформом до риси.

### 2.1.5.3. Приготування стандартного розчину флуконазолу та серії стандартних розчинів.

Для побудови калібрувального графіка готують стандартний розчин флуконазолу.

100 мг фармакопейного стандартного зразка ДФУ Флуконазол зважують на аналітичних терезах та переміщують у контактну колбу на 10 мл. Додають до позначки хлороформ, струшують, при необхідності фільтрують. Один мілілітр стандартного розчину містить 10 мг флуконазолу.

Серед органічних розчинників, згідно аналізу літературних джерел[18] та на наш погляд, найдоцільнішим є хлороформ, оскільки, наприклад, у діоксані реакція утворення забарвленої сполуки з ББТС не відбувається, а в етанолі, ацетоні та воді чутливість реакції значно знижується [18]. З приготованого розчину готують серію розведених стандартних розчинів за номерами №1-11 та з концентраціями 2,5мг- 5,0 мг:

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
С, мг	2,50	2,75	3,0	3,25	3,5	3,75	4,0	4,25	4,50	4,75	5,0
Оптична густина, А	0,53	0,55	0,61	0,66	0,71	0,75	0,85				

Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за типовою формулою [16].

### **2.1.6. Методика та умови спектрофотометричного визначення.**

У мірну колбу на 10 мл додають 3,5 мл досліджуваного розчину (1 мл досліджуваного розчину містить 10 мг флуконазолу), додають 1 мл приготованого ББТС та доводять до позначки хлороформом. Вимірюють оптичну густину розчину А при довжині хвилі  $\lambda = 420$  нм. Розчином порівняння беруть розчинник хлороформ. Кювети стандартні.



### Розділ 3. Результати та їх обговорення.

#### 3.1. Вплив температури.

Реакція відбувається кількісно при сталій кімнатній температурі повітря, тому корекція температурного режиму не передбачалася.

#### 3.2. Визначення оптимальної довжини хвилі спектрофотометричного поглинання (побудова спектру поглинання).

Для визначення оптимального значення довжини хвилі спектрофотометричного поглинання, яке у подальшому використовували у кількісних визначеннях, використовували приготований стандартний розчин № 5 з концентрацією флуконазолу 3,5 мг та вимірювали його оптичну густина. За максимумом на кривій спектру поглинання з'ясовували оптимальну довжину хвилі спектрофотометричного визначення  $\lambda$ . Для наочності результати наведено у Таблиці 1 та Рис.2:

Таблиця 1.

Довжина хвилі $\lambda$	360	380	400	405	410	415	<b>420</b>	425	430	435	440
Оптична густина А	0.055	0.06	0.068	0.073	0.077	0.078	<b>0.083</b>	0.080	0.056	0.042	0.041

Аналізуючи дані Таблиці 1 та Рис.2. можна стверджувати, що максимум світлопоглинання спостерігається при  $\lambda = 420$  нм.

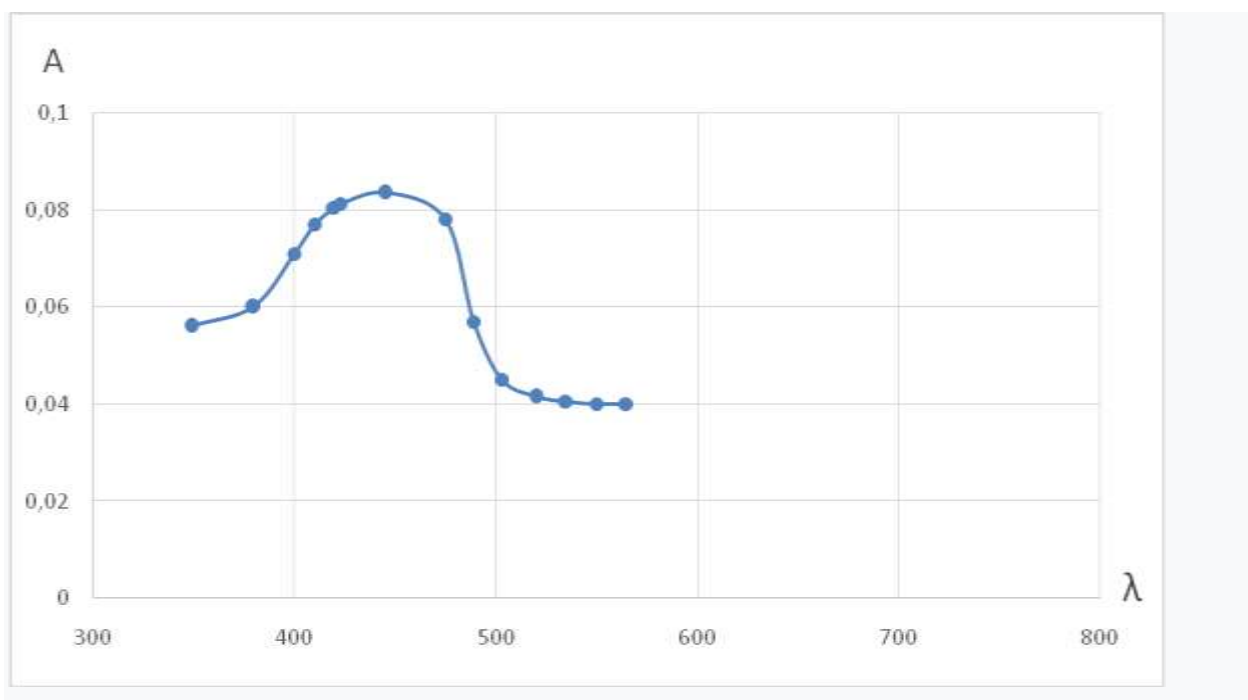


Рис.2. Спектр поглинання продуктів реакції флуконазолу з БТС (графічна залежність оптичної густини від довжини хвилі  $\lambda$ , нм).

### 3.3. Побудова калібрувальної залежності оптичної густини А від концентрації флуконазолу та визначення лінійності.

Для визначення залежності оптичної густини А від концентрації флуконазолу С вимірювали величину абсорбції А (оптичну густину) стандартних розчинів № 1-11 так, як описано у п. 2.1.6. Після вимірювання будували графічну залежність оптичної густини А від концентрації стандартних розчинів С. Для наочності результати представлено у Таблиці 2 та на Рис. 3:

Таблиця 2. Залежність оптичної густини А від концентрації С, мг.

№ розчину	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
С, мг	2,50	2,75	3,0	3,25	3,5	3,75	4,0	4,25	4,50	4,75	5,0
Оптична густина, А	0,0494	0,05525	0,0613	0,06725	0,073	0,07863	0,0843	0,0898	0,0955	0,1008	0,1065

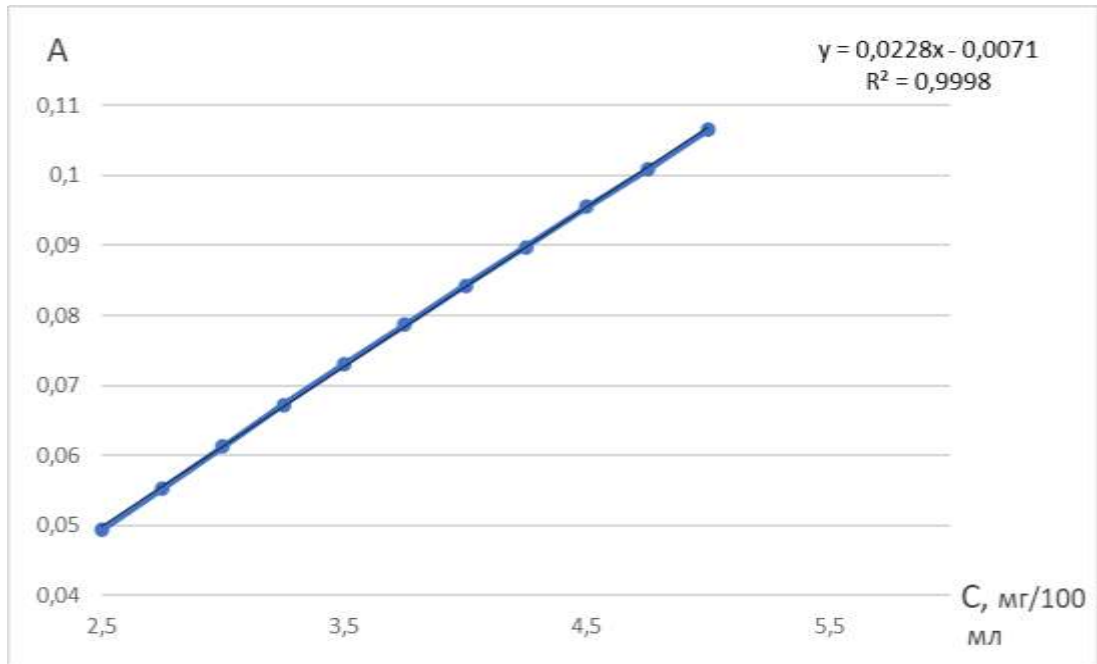


Рис.3. Залежність величини оптичної густини (абсорбції) від концентрації стандартних розчинів у нормалізованій системі координат.

Враховуючи вищезазначене, маємо висновки:

1. Перевірка результату на промахи.

Оскільки кількість експериментальних вимірювань більше 10, перевірку на промахи виконуємо за допомогою 3s-критерію:

$$|d_i| \leq 3 \cdot s,$$

$$d_i = x_i - \bar{x},$$

Чи є промахом найменше значення:

$$0,0783 - 0,0494 \leq 3 \cdot 0,189?$$

Чи є промахом найбільше значення:

$$0,10655 - 0,0783 \leq 3 \cdot 0,189?$$

Найменше та найбільше значення не є промахами, тому й інші результати теж не є промахами.

2. Однорідність дисперсій.

Дисперсії однорідні, оскільки  $f = 3,566 \cdot 10^{-12}$ , що менше за критичне значення  $f_{2,0859}$ .

3. Залишкова сума квадратів лінійної функції становить 6,875.
4. Коефіцієнт варіації становить 0,000325.
5. Практична незначущість вільного члена = 2,70
6. Лінійна функція описується рівнянням  $y = 0,0228x - 0.0071$ .
7. Коефіцієнт кореляції  $R^2 = 0,9998$ .

Лінійність методики визначають в інтервалі концентрацій, в якому спостерігається підпорядкування основному Закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера . Таким чином, запропонована методика задовольняє всім критеріям та є лінійною у досліджуваному інтервалі концентрацій.

### **3.4. Визначення флуконазолу у твердих лікарських формах та оцінювання валідаційних характеристик.**

Валідацією називають експертну оцінку, аргументи і доказову базу або експериментальні дані (які відповідають принципам GMP, GLP та ISO ), які підтверджують, що запропоновані методики, прилади, продукція, дії або системи відповідають власному призначенню і встановленим вимогам [19-22].

#### **3.4.1. Специфічність методики.**

Оскільки методику спектрофотометричного визначення флуконазолу було опрацьовано безпосередньо на твердих лікарських формах, аналізуючи результати дослідження можна стверджувати, що допоміжний склад ТЛФ зразку 1 та зразку 2 (див. Розділ 2) майже не впливає на результати кількісного визначення діючої речовини флуконазол [18]. Дослідженнями, які були виконані раніше [18] встановлено, що сіль сильної основи (кальцію стеарат) здатна впливати на результати спектрофотометричних визначень. У разі присутності солі слабкої основи (магній стеарат) досліджуваний розчин після розчинення змісту капсульної маси у хлороформі обов'язково фільтрують щоб позбутися впливу допоміжних речовин.

Результати кількісного визначення у зразках наведено у таблицях 4 та 5.

Таблиця 4. Результати ( враховуючи розведення) кількісного визначення флуконазолу у Зразку 1:

№	Введено*,мг	Знайдено,мг
1	100	98,14
2	100	98,77
3	100	99,22

\* - зазначено в інструкції для медичного застосування.

Таблиця 5. Результати ( враховуючи розведення) кількісного визначення флуконазолу у Зразку 2:

№	Введено*,мг	Знайдено,мг
1	100	98,60
2	100	98,36
3	100	98,18

\* - зазначено в інструкції для медичного застосування.

### 3.4.2. Прецизійність методики.

Прецизійністю називають ступінь схожості результатів серії вимірювань. Прецизійність вивчається на аутентичних зразках або модельних сумішах, кількісно характеризується дисперсією, стандартним відхиленням або відносним стандартним відхиленням.

Прецизійність вивчали для кожного зразку на рівні збіжності. За запропонованою методикою кількісного спектрофотометричного визначення проводили дев'ять паралельних визначень (три наважки, три повтори), потім розраховували метрологічні характеристики (Таблиця 6):

Таблиця 6. Збіжність результатів визначення флуконазолу у ТЛФ.

ТЛФ	C, мг	S	RSD	$\Delta$	$\Delta$ , %
Зразок 1	98,71	0,0003	1,2	1,58	3,2
Зразок 2	98,38	0,0003	1,3	2,06	3,2

Було встановлено, що одnobічний довірчий інтервал  $\Delta$  не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, тому методика є точною на рівні збіжності.

### 3.4.3. Робасність методики.

Визначення робасності проводили на стадії розробки методики кількісного визначення флуконазолу. Було встановлено, що оптична густина А (величина абсорбції) стандартних розчинів залишається незмінною принаймні три години.

Крім того, робасність була опрацьована на зразках 1 та 2 у різні дні (Таблиці 7,8), різниця у кількісних визначеннях не перебільшує 2,5%:

Таблиця 7. Кількісне визначення флуконазолу у ТЛФ (зразок 1).

	День 1	День 2
	Вміст діючої речовини*(враховуючи розведення), мг	
1	98,14	97,94
2	98,77	97,18
3	99,22	98,45

Таблиця 7. Кількісне визначення флуконазолу у ТЛФ (зразок 2).

	День 1	День 2
	Вміст діючої речовини*(враховуючи розведення), мг	
1	98,60	99,12
2	98,36	98,54
3	98,18	97,13



#### **3.4.4. Правильність методики.**

При перевірці валідаційних характеристик виникає питання щодо правильності методики.

Правильністю аналітичної методики називають дефініцію, яка характеризує ступінь відповідності отриманих даних відомим значенням. У нашому дослідженні отримані дані щодо кількісного вмісту флуконазолу у ТЛФ спектрофотометрією ми порівнювали з масою діючої речовини, яка зазначена в інструкції для медичного застосування.

Висновок про правильність методики оцінюється після встановлення прецизійності, лінійності, робастності та специфічності[19-22].

Враховуючи вищенаведені результати, методику спектрофотометричного кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах можна вважати правильною.

### **3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення флуконазолу.**

Аналізуючи літературні джерела [10-14] можна стверджувати, що станом на сьогодні методи кількісного визначення флуконазолу не є багатокількісними. Найчастіше флуконазол визначають методом ВЕРХ, комбінованими методами РХ та мас-спектроскопії. Безумовно, вищезазначені методи є високочутливими та селективними, але, нажаль, мають один з суттєвих недоліків - високу собівартість аналізу та пробопідготовку. Визначення флуконазолу спектрофотометрією є конкуруючим методом, оскільки він економічний, селективний, та, так саме як ВЕРХ і РХ, має достатньо високій поріг чутливості[10-14].

## ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела щодо хімічних, фізико-хімічних та фармакологічних властивостей флуконазолу, метаболізм флуконазолу та побічні дії.
- На основі проведених систематичних досліджень була розроблена методика кількісного визначення флуконазолу у твердих лікарських формах.
- Проведено часткову валідацію розробленої методики спектрофотометричного кількісного визначення флуконазолу у ТЛФ за специфічністю, лінійністю, робастністю та правильністю. Встановлено, що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності згідно ДФУ, що свідчить про те, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення флуконазолу у ТЛФ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Всесвітня організація охорони здоров'я <http://www.who.int/en>.
2. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
3. <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%BB>
4. [Державний реєстр лікарських засобів України \(drlz.com.ua\)](http://drlz.com.ua/)
5. [http://esparma.com.ua/uploads/Bals\\_NMiF\\_062013.pdf](http://esparma.com.ua/uploads/Bals_NMiF_062013.pdf)
6. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загоря, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. – Киев: Морион, 2001. – 472 с.
7. Фармацевтичний аналіз / [П.О. Безуглий, В.О. Грудько, С.Г. Леоновата ін.; за заг. ред. П. О. Безуглого]. - Харків: Вид-во НФАУ, Золоті сторінки, 2001. - 240 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.
9. European Pharmacopoeia. 8.0. – P. 3003.
10. Abdel-Moety E.M., Khattab F.I., Kelani K.M., AbouAl-Alamein A.M. // Farmaco. - 2002. - Vol. 57, No. 11. P. 931-938.
11. Ayub A.C., Vianna-Soares C.D., Ferreira L.A. // J. Chromatogr. Sci. - 2007. - Vol. 45, 5. P. 286-290.
12. Kim S.S., Im H.T, Kang I.M. et al. // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. - 2007. - Vol. 852, No. 1-2. P. 174-179.
13. Wattananat 71, Akarawut W. // Biomed. Chromatogr. - 2006. - Vol. 20, No. 1. - P. 1-3.
14. Zhang S., Mada S. R., Torch M. et al. // Ther. Drug Monit. - 2008. - Vol. 30, No. 3. - P. 314—319.

15. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). Кількісна аналітична хімія. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.
16. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свечнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
17. Бурлака, Ю., Тарханова, О., Васюк, С., & Кейтлін, І. (2014). Спектрофотометричне визначення флуконазолу у капсулах. *Фармацевтичний часопис*, (2). <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2010.2.2808>.
18. Burlaka, J., Tarkhanova, O., Vasjuk, S., & Keytlin, I. (2019). Визначення флуконазолу в лікарських формах за реакцією з бромтимоловим синім. *Фармацевтичний журнал*, (3), 69-75.
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.
- 22.** Гончарова А.А., Баранова І.І., Блажеєвський М.Є. Ідентифікація та кількісне визначення сечовини в кремі для застосування при синдромі діабетичної стопи. *Актуальні проблеми фармації та фармакотерапії* с. 147-153.

## ДОДАТКИ

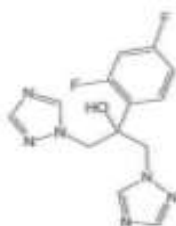
## Додаток 1. Витяг з ДФУ.

Флуконазол

## ФЛУКОНАЗОЛ

## Fluconazolium

## FLUCONAZOLE



$C_{19}H_{12}F_2N_4O$   
[86386-73-4]

М.м. 306.3

2-(2,4-Дифторфеніл)-1,3-біс(1H-1,2,4-триазол-1-іл)пропан-2-ол.

Вміст: не менше 99.0 % і не більше 101.0 %, у перерахунку на суху речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

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

**Розчинність.** Мало розчинний у воді *P*, легко розчинний у метанолі *P*, розчинний в ацетоні *P*.

Виявляє поліморфізм (5.9).

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектрофотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ флуконазолу.

У разі різниці одержаних спектрів речовин у твердому стані окремо розчиняють субстанцію та ФСЗ флуконазолу в мінімальному об'ємі метиленхлориду *P*, упарюють насухо та повторно записують спектри одержаних залишків.

## ВИПРОБУВАННЯ

**Прозорість розчину (2.2.1).** 1.0 г субстанції розчиняють у метанолі *P* доводить об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл. Одержаний розчин має бути прозорим.

**Кальороність розчину (2.2.2, метод II).** Розчин, приготований для випробування «Прозорість розчину», має бути безбарним.

**Супровідні домішки.** Ріднина хроматографії (2.2.29).

**Випробовуваний розчин.** 0.100 г субстанції розчиняють у рухомій фазі, якщо необхідно в ультразвуковій бані, та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** 5.0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 10.0 мл.

**Розчин порівняння (b).** 5 мг ФСЗ флуконазолу для ідентифікації піка (містить домішку А) розчиняють у рухомій фазі, якщо необхідно в ультразвуковій бані, та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10 мл.

**Розчин порівняння (с).** 3.0 мг ФСЗ флуконазолу домішки В розчиняють у рухомій фазі, якщо необхідно в ультразвуковій бані, та доводять об'єм розчину тією самою рухомою фазою до 100.0 мл.

**Розчин порівняння (d).** 2.0 мг ФСЗ флуконазолу домішки С розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 20.0 мл. До 1.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл випробовуваного розчину та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 10.0 мл.

## Колонка:

- розмір: 0.15 м × 4.6 мм;
- нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октадецилсилільний *P*1 (5 мкм);
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:** ацетонітрил *P* - розчин 0.63 г/л амонію форміату *P* (14:86).

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

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 260 нм.

**Інжекції:** 20 мкл.

**Час хроматографування:** у 3.5 рази більший часу утримування флуконазолу.

**Ідентифікація домішок:** використовують хроматограму, що додається до ФСЗ флуконазолу для ідентифікації піка, та хроматограму розчину порівняння (b) для ідентифікації піка домішки А; використовують хроматограму розчину порівняння (с) для ідентифікації піка домішки В і хроматограму розчину порівняння (d) для ідентифікації піка домішки С.

**Відносні утримування до флуконазолу (час утримування флуконазолу близько 11 хв):** домішки В — близько 0.4; домішки А — близько 0.5; домішки С — близько 0.8.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (d):

- ступінь розділення: не менше 3.0 між піками домішки С і флуконазолу.

## Нормування:

- домішка А: площа піка не має перевищувати 0.8 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.4 %);

## Фармакологія

- домішка В: площа піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (с) (0.3 %);
- домішка С: площа піка має не перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (d) (0.1 %);
- неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати 0.2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.10 %);
- сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 1.2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.6 %);
- не втрачено: піки, площа яких становить менше 0.1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.05 %).

**Важкі метали (2.4.8, метод В).** Не більше 0.001 % (10 ppm).

2.0 г субстанції розчиняють у суміші води Р – метанолу Р (15:85) і доводять об'єм розчину тією самою сумішню розчинників до 20.0 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням свинцю еталонного розчину (1 ppm Рb) Р.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 0.5 %. 1.000 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

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

### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.125 г субстанції розчиняють у 60 мл оцтової кислоти безводної Р і титрують 0.1 М розчином хлорної кислоти (2.2.20).

1 мл 0.1 М розчину хлорної кислоти відповідає 15.32 мг  $C_{17}H_{17}F_2N_4O$ .

### ЗБЕРІГАННЯ

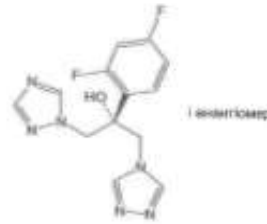
У повітронепроникному контейнері.

### ДОМІШКИ

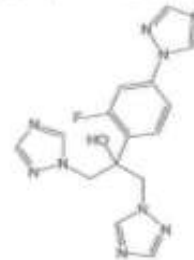
**Специфіковані домішки: А, В, С.**

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

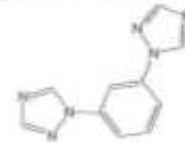
**«Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»:** D, E, F, G, H, I.



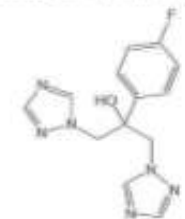
A. (2RS)-2-(2,4-дифторфеніл)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-іл)-3-(4H-1,2,4-триазол-4-іл)пропан-2-ол.



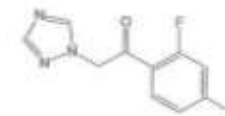
B. 2-[2-фтор-4-(1H-1,2,4-триазол-1-іл)феніл]-1,3-біс(1H-1,2,4-триазол-1-іл)пропан-2-ол.



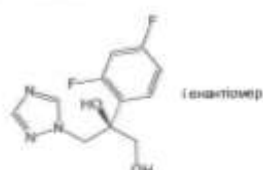
C. 1,1'-(1,3-фенілен)ди-1H-1,2,4-триазол.



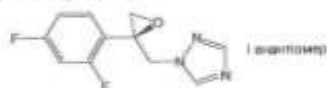
D. 2-(4-фторфеніл)-1,3-біс(1H-1,2,4-триазол-1-іл)пропан-2-ол.



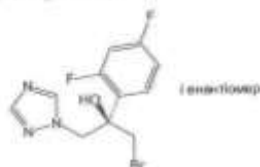
E. 1-(2,4-дифторфеніл)-2-(1H-1,2,4-триазол-1-іл)етанол.



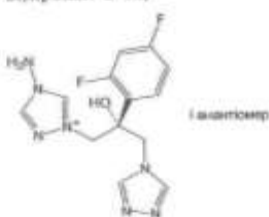
**F.** (2*RS*)-2-(2,4-дифторфеніл)-3-(1*H*-1,2,4-триазол-1-іл)пропан-1,2-діол,



**G.** 1-[[*(2RS)*-2-(2,4-дифторфеніл)оксиран-2-іл]метил]-1*H*-1,2,4-триазол,



**H.** (2*RS*)-1-бром-2-(2,4-дифторфеніл)-3-(1*H*-1,2,4-триазол-1-іл)пропан-2-ол,

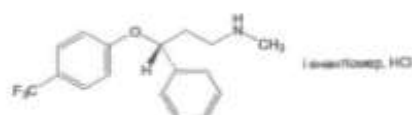


**I.** 4-аміно-1-[[*(2RS)*-2-(2,4-дифторфеніл)-2-гідрокси-3-(1*H*-1,2,4-триазол-1-іл)пропіл]-4*H*-1,2,4-триазоліум.

## ФЛУОКСЕТИНУ ГІДРОХЛОРИД

### Fluoxetini hydrochloridum

#### FLUOXETINE HYDROCHLORIDE



$C_{17}H_{19}ClF_3NO$   
[56296-78-7]

М.м. 345,8

(3*RS*)-*N*-Метил-3-феніл-3-[4-(трифторметил)феноксипропан-1-аміну гідрохлорид.

*Вивіт:* не менше 98,0 % і не більше 102,0 %, у перерахунку на безводну речовину.

#### ВЛАСТИВОСТІ

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

*Розчинність:* Помірно розчинний у воді *P*, легко розчинний у метанолі *P*, помірно розчинний у метилхлориді *P*.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**A.** Абсорбційна спектроскопометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ флуоксетину гідрохлориду.

**B.** Субстанція дає реакцію (а) на хлориди (2.3.1).

#### ВИПРОБУВАННЯ

**Розчин S.** 2,0 г субстанції розчиняють у суміші води *P* - метанолі *P* (15:85) і доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 100,0 мл.

**Прозорість розчину (2.2.1).** Розчин S має бути прозорим.

**Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).** Розчин S має бути безбарвним.

**pH (2.2.3).** Від 4,5 до 6,5.

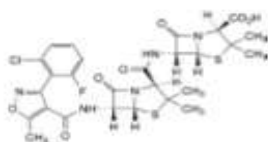
0,20 г субстанції розчиняють у воді, *вільній від вуглецю діоксиду*, *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20 мл.



## Додаток 2. Витяг з Європейської Фармакопеї.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

Fluconazole

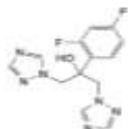


E. (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[3-(2-chloro-6-fluorophenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]carbonylamino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-yl]carbonylamino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid.

01/2008:2287  
corrected 7.6

## FLUCONAZOLE

## Fluconazololum



$C_{23}H_{12}F_2N_6O$   
[86386-73-4]

$M_r$  306.3

## DEFINITION

2-(2,4-Difluorophenyl)-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

## CHARACTERS

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

Solubility: slightly soluble in water, freely soluble in methanol, soluble in acetone.

It shows polymorphism (5.9).

## IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: fluconazole CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, dissolve the substance to be examined and the reference substance separately in the minimum volume of *methylene chloride R*, evaporate to dryness on a water-bath and record new spectra using the residues.

## TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, *Method II*).

Dissolve 1.0 g in *methanol R* and dilute to 20 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 0.100 g of the substance to be examined in the mobile phase, sonicate if necessary, and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 5.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 5 mg of *fluconazole for peak identification CRS* (containing impurity A) in the mobile phase, sonicate if necessary, and dilute to 10 mL with the mobile phase.

Reference solution (c). Dissolve 3.0 mg of *fluconazole impurity B CRS* in the mobile phase, sonicate if necessary, and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (d). Dissolve 2.0 mg of *fluconazole impurity C CRS* in the mobile phase and dilute to 20.0 mL with the mobile phase. To 1.0 mL of this solution add 1.0 mL of the test solution and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

## Column:

- size:  $l$  – 0.15 m,  $\varnothing$  – 4.6 mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R1 (5  $\mu$ m);
- temperature: 40 °C.

Mobile phase: acetonitrile R, 0.63 g/L solution of ammonium formate R (14.86 V/V).

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 260 nm.

Injection: 20  $\mu$ L.

Run time: 3.5 times the retention time of fluconazole.

Identification of impurities: use the chromatogram supplied with *fluconazole for peak identification CRS* and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peak due to impurity A; use the chromatogram obtained with reference solution (c) to identify the peak due to impurity B and the chromatogram obtained with reference solution (d) to identify the peak due to impurity C.

Relative retention with reference to fluconazole (retention time = about 11 min): impurity B = about 0.4; impurity A = about 0.5; impurity C = about 0.8.

System suitability: reference solution (d):

- resolution: minimum 3.0 between the peaks due to impurity C and fluconazole.

## Limits:

- impurity A: not more than 0.8 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.4 per cent);
- impurity B: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.3 per cent);
- impurity C: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (d) (0.1 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than 0.2 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.10 per cent);
- total: not more than 1.2 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.6 per cent);
- disregard limit: 0.1 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Heavy metals (2.4.8): maximum 10 ppm.

Dissolve 2.0 g in a mixture of 15 volumes of *water R* and 85 volumes of *methanol R* and dilute to 20.0 mL with the same mixture of solvents. 12 mL of the solution complies with test B. Prepare the reference solution using *lead standard solution (1 ppm Pb) R*.

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.

## ASSAY

Dissolve 0.125 g in 60 mL of *anhydrous acetic acid R*. Titrate with 0.1 M *perchloric acid*, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

1 mL of 0.1 M *perchloric acid* is equivalent to 15.32 mg of  $C_{23}H_{12}F_2N_6O$ .

General Notices (1) apply to all monographs and other texts

2245

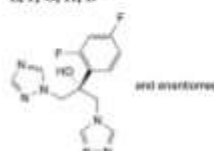
## STORAGE

In an airtight container.

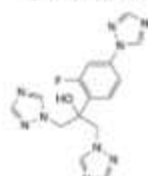
## IMPURITIES

Specified impurities: A, B, C.

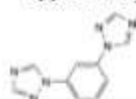
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical 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*): D, E, F, G, H, I.



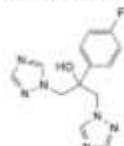
A. (2*R*)-2-(2,4-difluorophenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-4-yl)propan-2-ol.



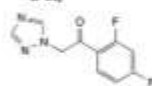
B. 2-[2-fluoro-4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl]-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.



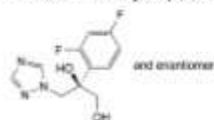
C. 1,1'-(1,3-phenylene)di-1*H*-1,2,4-triazole.



D. 2-(4-fluorophenyl)-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.



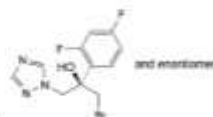
E. 1-(2,4-difluorophenyl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)ethanone.



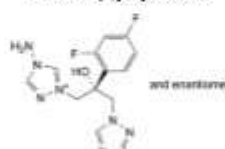
F. (2*R*)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propane-1,2-diol.



G. 1-[(2*R*)-2-(2,4-difluorophenyl)oxiran-2-yl]methyl-1*H*-1,2,4-triazole.



H. (2*R*)-1-bromo-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol.



I. 4-amino-1-[(2*R*)-2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4*H*-1,2,4-triazolium.

01/2011:0766

## FLUCYTOSINE

## Flucytosinum



$C_4H_4FN_2O$   
[2022-85-7]

$M_r$  129.1

## DEFINITION

4-Amino-5-fluoropyrimidin-2(1*H*)-one.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

## CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

Solubility: sparingly soluble in water, slightly soluble in ethanol (96 per cent).

## IDENTIFICATION

First identification: A.

Second identification: B, C, D.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: flucytosine CRS.

B. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Solvent mixture: water R, methanol R (10:15 V/V).

Test solution. Dissolve 10 mg of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 10 mL with the solvent mixture.

Reference solution. Dissolve 10 mg of flucytosine CRS in the solvent mixture and dilute to 10 mL with the solvent mixture.

Plate: TLC silica gel  $F_{254}$  plate R.

Mobile phase: anhydrous formic acid R, water R, methanol R, ethyl acetate R (1:15:25:60 V/V/V/V).

Application: 10  $\mu$ L.

## Додаток 3 Витяг з Європейської фармакопеї «Абсорбція. Спектрофотометрія».

### 2.2.24. Absorption spectrophotometry, infrared

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0

Prepare the solution of the substance to be examined (test solution) as prescribed in the monograph. Prepare not fewer than 3 reference solutions of the element to be determined, the concentrations of which span the expected value in the test solution. For assay purposes, optimal calibration levels are between 0.7 and 1.3 times the expected content of the element to be determined or the limit prescribed in the monograph. For purity determination, calibration levels are the limit of detection and 1.2 times the limit specified for the element to be determined. Any reagents used in the preparation of the test solution are added to the reference and blank solutions at the same concentration.

Introduce each of the solutions into the instrument using the same number of replicates for each of the solutions to obtain a steady reading.

**Calculation.** Prepare a calibration curve from the means of the readings obtained with the reference solutions by plotting the means as a function of concentration. Determine the concentration of the element in the test solution from the curve obtained.

#### METHOD B – STANDARD ADDITIONS

Add to at least 3 similar volumetric flasks equal volumes of the solution of the substance to be examined (test solution) prepared as prescribed. Add to all but 1 of the flasks progressively larger volumes of a reference solution containing a known concentration of the element to be determined to produce a series of solutions containing steadily increasing concentrations of that element known to give responses in the linear part of the curve, if possible. Dilute the contents of each flask to volume with solvent.

Introduce each of the solutions into the instrument, using the same number of replicates for each of the solutions, to obtain a steady reading.

**Calculation.** Calculate the linear equation of the graph using a least-squares fit and derive from it the concentration of the element to be determined in the test solution.

#### VALIDATION OF THE METHOD

Satisfactory performance of methods prescribed in monographs is verified at suitable time intervals.

#### LINEARITY

Prepare and analyse not fewer than 4 reference solutions over the calibration range and a blank solution. Perform not fewer than 5 replicates.

The calibration curve is calculated by least-square regression from all measured data. The regression curve, the means, the measured data and the confidence interval of the calibration curve are plotted. The operating method is valid when:

- the correlation coefficient is at least 0.99;
- the residuals of each calibration level are randomly distributed around the calibration curve.

Calculate the mean and relative standard deviation for the lowest and highest calibration level.

When the ratio of the estimated standard deviation of the lowest and the highest calibration level is less than 0.5 or greater than 2.0, a more precise estimation of the calibration curve may be obtained using weighted linear regression. Both linear and quadratic weighting functions are applied to the data to find the most appropriate weighting function to be employed. If the means compared to the calibration curve show a deviation from linearity, two-dimensional linear regression is used.

#### ACCURACY

Verify the accuracy preferably by using a certified reference material (CRM). Where this is not possible, perform a test for recovery.

**Recovery.** For assay determinations a recovery of 90 per cent to 110 per cent is to be obtained. For other determinations, for example, for trace element determination the test is not valid if recovery is outside of the range 80 per cent to 120 per

cent of the theoretical value. Recovery may be determined on a suitable reference solution (matrix solution) which is spiked with a known quantity of analyte (stable concentration of the calibration range).

#### REPEATABILITY

The repeatability is not greater than 3 per cent for an assay and not greater than 5 per cent for an impurity test.

#### LIMIT OF QUANTIFICATION

Verify that the limit of quantification (for example, determined using the 10  $\sigma$  approach) is below the value to be measured.

01/2008:20224

### 2.2.24. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, INFRARED

Infrared spectrophotometers are used for recording spectra in the region of 4000–650  $\text{cm}^{-1}$  (2.5–15.4  $\mu\text{m}$ ) or in some cases down to 200  $\text{cm}^{-1}$  (50  $\mu\text{m}$ ).

#### APPARATUS

Spectrophotometers for recording spectra consist of a suitable light source, monochromator or interferometer and detector.

Fourier transform spectrophotometers use polychromatic radiation and calculate the spectrum in the frequency domain from the original data by Fourier transformation. Spectrophotometers fitted with an optical system capable of producing monochromatic radiation in the measurement region may also be used. Normally the spectrum is given as a function of transmittance, the quotient of the intensity of the transmitted radiation and the incident radiation. It may also be given in absorbance.

The absorbance ( $A$ ) is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance ( $T$ ):

$$A = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \lg_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$I_0$  = intensity of incident radiation,

$I$  = intensity of transmitted radiation.

#### PREPARATION OF THE SAMPLE

##### FLUOR RECORDING BY TRANSMISSION OR ABSORPTION

Prepare the substance by one of the following methods.

**Liquids.** Examine a liquid either in the form of a film between 2 plates transparent to infrared radiation, or in a cell of suitable path length, also transparent to infrared radiation.

**Liquids or solids in solution.** Prepare a solution in a suitable solvent. Choose a concentration and a path length of the cell which give a satisfactory spectrum. Generally, good results are obtained with concentrations of 20–100  $\mu\text{g/l}$  for a path length of 0.5–0.1 mm. Absorption due to the solvent is compensated by placing in the reference beam a similar cell containing the solvent used. If an FT-IR instrument is used, the absorption is compensated by recording the spectra for the solvent and the sample successively. The solvent absorbance, corrected by a compensation factor, is subtracted using calculation software.

**Solids.** Examine solids dispersed in a suitable liquid (mull) or in a solid (halide disc), as appropriate. If prescribed in the monograph, make a film of a molten mass between 2 plates transparent to infrared radiation.

#### A. Mull

Triturate a small quantity of the substance to be examined with the minimum quantity of liquid paraffin  $R$  or other suitable liquid; 5–10 mg of the substance to be examined is

usually sufficient to make an adequate mill using one drop of liquid paraffin *R*. Compress the mill between 2 plates transparent to infrared radiation.

#### B. Disc

Triturate 1–2 mg of the substance to be examined with 300–400 mg, unless otherwise specified, of finely powdered and dried potassium bromide *R* or potassium chloride *R*. These quantities are usually sufficient to give a disc of 10–15 mm diameter and a spectrum of suitable intensity. If the substance is a hydrochloride, it is recommended to use potassium chloride *R*. Carefully grind the mixture, spread it uniformly in a suitable die, and submit it to a pressure of about 800 MPa (8 kbar<sup>-1</sup>). For substances that are unstable under normal atmospheric conditions or are hygroscopic, the die is pressed *in vacuo*. Several factors may cause the formation of faulty discs, such as insufficient or excessive grinding, unevenly or other impurities in the dispersion medium or an insufficient reduction of particle size. A disc is rejected if visual examination shows lack of uniform transparency or when transmittance at about 2000 cm<sup>-1</sup> (5 µm) in the absence of a specific absorption band is less than 60 per cent without compensation, unless otherwise prescribed.

**Gases.** Evacuate gases in a cell transparent to infrared radiation and having an optical path length of about 300 µm. Evacuate the cell and fill to the desired pressure through a stopcock or needle valve using a suitable gas transfer line between the cell and the container of the gas to be examined.

If necessary adjust the pressure in the cell to atmospheric pressure using a gas transparent to infrared radiation (for example nitrogen *R* and oxygen *R*). To avoid absorption interferences due to water, carbon dioxide or other atmospheric gases, place in the reference beam, if possible, an identical cell that is either evacuated or filled with the gas transparent to infrared radiation.

#### FOR RECORDING BY DIFFUSE REFLECTANCE

**Solids.** Triturate a mixture of the substance to be examined with finely powdered and dried potassium bromide *R* or potassium chloride *R*. Use a mixture containing approximately 5 per cent of the substance, unless otherwise specified. Grind the mixture, place it in a sample cup and examine the reflectance spectrum.

The spectrum of the sample in absorbance mode may be obtained after mathematical treatment of the spectra by the Kubelka-Munk function.

#### FOR RECORDING BY ATTENUATED TOTAL REFLECTION

Attenuated total reflection (including multiple reflection) involves light being reflected internally by a transmitting medium, typically for a number of reflections. However, several accessories exist where only one reflection occurs.

Prepare the substance as follows. Place the substance to be examined in close contact with an internal reflection element (IRE) such as diamond, germanium, zinc selenide, thallium bromide-thallium iodide (KRS-5) or another suitable material of high refractive index. Ensure close and uniform contact between the substance and the whole crystal surface of the internal reflection element, either by applying pressure or by dissolving the substance in an appropriate solvent, then covering the IRE with the obtained solution and evaporating to dryness. Examine the attenuated total reflectance (ATR) spectrum.

#### IDENTIFICATION USING REFERENCE SUBSTANCES

Prepare the substance to be examined and the reference substance by the same procedure and record the spectra between 4000–650 cm<sup>-1</sup> (2.5–15.4 µm) under the same operational conditions. The transmission minima (absorption maxima) in the spectrum obtained with the substance to be examined correspond in position and relative size to those in the spectrum obtained with the reference substance (CRS).

When the spectra recorded in the solid state show differences in the positions of the transmission minima (absorption maxima), treat the substance to be examined and the reference substance in the same manner so that they crystalline or are produced in the same form, or proceed as prescribed in the monograph, then record the spectra.

#### IDENTIFICATION USING REFERENCE SPECTRA

**Control of resolution performance.** For instruments having a monochromator, record the spectrum of a polystyrene film approximately 35 µm in thickness. The difference  $x$  (see Figure 2.2.24-1) between the percentage transmittance at the transmission maximum *A* at 2970 cm<sup>-1</sup> (3.36 µm) and that at the transmission minimum *B* at 2849.5 cm<sup>-1</sup> (3.51 µm) must be greater than 18. The difference  $y$  between the percentage transmittance at the transmission maximum *C* at 1599 cm<sup>-1</sup> (6.29 µm) and that at the transmission minimum *D* at 1583 cm<sup>-1</sup> (6.32 µm) must be greater than 10.

For Fourier-transform instruments, use suitable instrument resolution with the appropriate apodisation prescribed by the manufacturer. The resolution is checked by suitable means, for example by recording the spectrum of a polystyrene film approximately 35 µm in thickness. The difference between the absorbances at the absorption minimum at 2970 cm<sup>-1</sup> and the absorption maximum at 2849.5 cm<sup>-1</sup> is greater than 0.33. The difference between the absorbances at the absorption minimum at 1589 cm<sup>-1</sup> and the absorption maximum at 1583 cm<sup>-1</sup> is greater than 0.08.

**Verification of the wavenumber scale.** The wavenumber scale may be verified using a polystyrene film, which has transmission minima (absorption maxima) at the wavenumbers (in cm<sup>-1</sup>) shown in Table 2.2.24-1.

Table 2.2.24-1. – Transmission minima and acceptable tolerances of a polystyrene film

Transmission minima (cm <sup>-1</sup> )	Acceptable tolerance (cm <sup>-1</sup> )	
	Monochromator instruments	Fourier-transform instruments
3060	+ 15	+ 10
3045	+ 10	+ 10
3025	+ 15	+ 10
1601.2	+ 10	+ 10
1583.8	+ 10	+ 10
1174.5	+ 10	+ 10
938.2	+ 10	+ 10

**Method.** Prepare the substance to be examined according to the instructions accompanying the reference spectrum/reference substance. Using the operating conditions that were used to obtain the reference spectrum, which will usually be the same as those for verifying the resolution performance, record the spectrum of the substance to be examined.

The positions and the relative sizes of the bands in the spectrum of the substance to be examined and the reference spectrum are concordant in the 2 spectra.

#### Compensation for water vapour and atmospheric carbon dioxide

For Fourier-transform instruments, spectral interferences from water vapour and carbon dioxide is compensated using suitable algorithms according to the manufacturer's instructions. Alternatively, spectra can be

acquired using suitable purged instruments or ensuring that sample and background single beam spectra are acquired under exactly the same conditions.

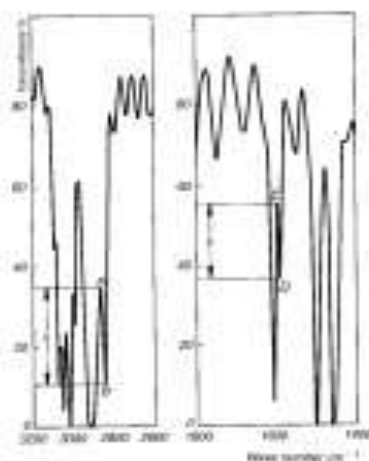


Figure 2.2.24-1. – Typical spectra of polystyrene used to verify the radiation performance

#### IMPURITIES IN GASES

For the analysis of impurities, use a cell transparent to infrared radiation and of suitable optical path length (for example, 120 cm). Fill the cell as prescribed under Gases. For detection and quantification of the impurities, proceed as prescribed in the monograph.

01/2008:20225

### 2.2.25. ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY, ULTRAVIOLET AND VISIBLE

**Determination of absorbance.** The absorbance ( $A$ ) of a solution is defined as the logarithm to base 10 of the reciprocal of the transmittance ( $T$ ) for monochromatic radiation:

$$A = \lg_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = \lg_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

$T$  = intensity of transmitted monochromatic radiation;

$I_0$  = intensity of incident monochromatic radiation;

$I$  = intensity of transmitted monochromatic radiation.

In the absence of other physico-chemical factors, the absorbance ( $A$ ) is proportional to the path length ( $b$ ) through which the radiation passes and to the concentration ( $c$ ) of the substance in solution in accordance with the equation:

$$A = \epsilon cb$$

$\epsilon$  = molar absorptivity, if  $b$  is expressed in centimetres and  $c$  in moles per litre.

The expression,  $A_{1\%}^{1\text{cm}}$  representing the specific absorbance of a dissolved substance refers to the absorbance of a 10 g/l solution in a 1 cm cell and measured at a defined wavelength as that:

$$A_{1\%}^{1\text{cm}} = \frac{10}{M}$$

Unless otherwise prescribed, measure the absorbance at the prescribed wavelength using a path length of 1 cm. Unless otherwise prescribed, the measurements are carried out with reference to the same solvent or the same mixture of solvents. The absorbance of the solvent measured against air and at the prescribed wavelength shall not exceed 0.4 and is preferably less than 0.2. Plot the absorption spectrum with absorbance or fraction of absorbance as ordinate against wavelength or fraction of wavelength as abscissa.

Where a monograph gives a single value for the position of an absorption maximum, it is understood that the value obtained may differ by not more than  $\pm 2$  nm.

**Apparatus.** Spectrophotometers suitable for measuring in the ultraviolet and visible range of the spectrum consist of an optical system capable of producing monochromatic radiation in the range of 200–800 nm and a device suitable for measuring the absorbance.

**Control of wavelengths.** Verify the wavelength scale using the absorption maxima of hydrogen perchlorate solution *R*, the line of a hydrogen or deuterium discharge lamp or the lines of a mercury vapour arc shown in Table 2.2.25-1. The permitted tolerance is  $\pm 1$  nm for the ultraviolet range and  $\pm 2$  nm for the visible range. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25-1. – Absorption maxima for control of wavelength scale

201.15 nm (H <sub>2</sub> )	201.48 nm (Hg)
252.7 nm (Hg)	253.43 nm (Hg)
287.12 nm (H <sub>2</sub> )	288.0 nm (Hg)
302.25 nm (Hg)	308.1 nm (Hg)
313.16 nm (Hg)	328.3 nm (H <sub>2</sub> )
334.15 nm (Hg)	344.07 nm (Hg)
365.5 nm (H <sub>2</sub> )	379.66 nm (Hg)
395.48 nm (Hg)	379.07 nm (Hg)

**Control of absorbance.** Check the absorbance using suitable filters or a solution of potassium dichromate *R* at the wavelengths indicated in Table 2.2.25-2, which gives for each wavelength the exact value and the permitted limits of the specific absorbance. The table is based on a tolerance for the absorbance of  $\pm 0.01$ .

For the control of absorbance, use solutions of potassium dichromate *R* that has been previously dried to constant mass at 130 °C. For the control of absorbance at 235 nm, 257 nm, 313 nm and 350 nm, dissolve 57.0431 mg of potassium dichromate *R* in 0.005 M sulfuric acid and dilute to 1000.0 mL with the same acid. For the control of absorbance at 430 nm, dissolve 57.0431 mg of potassium dichromate *R* in 0.005 M sulfuric acid and dilute to 100.0 mL with the same acid. Suitable certified reference materials may also be used.

Table 2.2.25-2

Wavelength (nm)	Specific absorbance $A_{1\%}^{1\text{cm}}$	Minimum tolerance
232	134.5	123.0 to 146.2
257	161.5	143.9 to 186.2
313	48.4	47.0 to 50.2
358	107.9	105.4 to 109.8
638	15.9	15.7 to 16.1

**Limit of stray light.** Stray light may be detected at a given wavelength with suitable filters or solutions; for example, the absorbance of a 12 g/L solution of potassium chloride *K* in a 1 cm cell increases steeply between 220 nm and 200 nm and is greater than 2.0 at 198 nm when compared with water as compensating liquid. Suitable certified reference materials may also be used.

**Resolution** (for qualitative analysis). When prescribed in a monograph, measure the resolution of the apparatus as follows: record the spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of indane *I* in hexane *H*. The minimum ratio of the absorbance at the maximum at 289 nm to that at the minimum at 286 nm is stated in the monograph. Suitable certified reference materials may also be used.

**Spectral slit-width** (for quantitative analysis). To avoid errors due to spectral slit-width, when using an instrument on which the slit-width is variable at the selected wavelength, the slit-width must be small compared with the half-width of the absorption band but it must be as large as possible to obtain a high value of  $A_{\lambda}$ . Therefore, a slit-width is chosen such that further reduction does not result in a change in absorbance reading.

**Cells.** The tolerance on the path length of the cells used is  $\pm 0.005$  cm. When filled with the same solvent, the cells intended to contain the solution to be examined and the compensating liquid must have the same transmittance. If this is not the case, an appropriate correction must be applied. The cells must be cleaned and handled with care.

#### DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

Derivative spectrophotometry involves the transformation of absorption spectra (zero-order into first, second- or higher-order-derivative spectra).

A *first-order-derivative spectrum* is a plot of the gradient of the absorption curve (rate of change of the absorbance with wavelength,  $dA/d\lambda$ ) against wavelength.

A *second-order-derivative spectrum* is a plot of the curvature of the absorption spectrum against wavelength ( $d^2A/d\lambda^2$ ). The second-order-derivative spectrum at any wavelength  $\lambda$  is related to concentration by the following equation:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{\lambda}}{d\lambda^2} \times \frac{c \cdot b}{10} = \frac{d^2A_{\lambda}}{d\lambda^2} \times \frac{cb}{10}$$

$c$  = concentration of the absorbing solute, in grams per litre.

**Apparatus.** Use a spectrophotometer complying with the requirements prescribed above and equipped with an analogue resistance-capacitance differentiation module or a digital differentiator or other means of producing derivative spectra. Some methods of producing second-order-derivative spectra produce a wavelength shift relative to the zero-order spectrum and this is to be taken into account where applicable.

**Resolution power.** When prescribed in a monograph, record the second-order-derivative spectrum of a 0.02 per cent V/V solution of indane *I* in methanol *M*, using methanol *M* as the compensating liquid. The spectrum shows a small negative extremum located between 2 large negative extrema at 281 nm

and 298 nm, respectively, as shown in Figure 2.2.25-1. Unless otherwise prescribed in the monograph, the ratio  $A/B$  (see Figure 2.2.25-1) is not less than 0.2.

**Procedure.** Prepare the solution of the substance to be examined, adjust the various instrument settings according to the manufacturer's instructions, and calculate the amount of the substance to be determined as prescribed in the monograph.

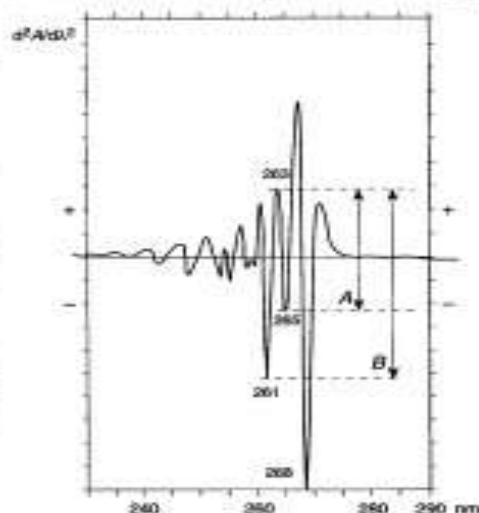


Figure 2.2.25-1

01/2008:20226

## 2.2.26. PAPER CHROMATOGRAPHY

### ASCENDING PAPER CHROMATOGRAPHY

**Apparatus.** The apparatus consists of a glass tank of suitable size for the chromatographic paper used, ground at the top, to take a closely fitting lid. In the top of the tank is a device which suspends the chromatographic paper and is capable of being lowered without opening the chamber. In the bottom of the tank is a dish to contain the mobile phase into which the paper may be lowered. The chromatographic paper consists of suitable filter paper, cut into strips of sufficient length and not less than 2.5 cm wide; the paper is cut so that the mobile phase runs in the direction of the grain of the paper.

**Method.** Place in the dish a layer 2.5 cm deep of the mobile phase prescribed in the monograph. If prescribed in the monograph, pour the stationary phase between the walls of the tank and the dish. Close the tank and allow to stand for 24 h at 20 °C to 25 °C. Maintain the tank at this temperature throughout the subsequent procedure. Draw a fine pencil line horizontally across the paper 3 cm from one end. Using a micro-pipette, apply to a spot on the pencil line the volume of the solution prescribed in the monograph. If the total volume to be applied would produce a spot more than 10 mm in diameter, apply the solution in portions allowing each to dry before the next application. When more than one chromatogram is to be run on the same strip of paper, space the solutions along the pencil line at points not less than 5 cm apart. Insert the paper into the tank, close the lid and allow to stand for 1 h 30 min. Lower the paper into the mobile phase and allow elution to

Додаток 4.  
Спектрофотометр Jenway 6305 (Велика Британія).



Діапазон довжин хвиль	від 198 до 1000 нм
Дозвіл довжини хвилі	1 нм
Точність довжини хвилі	± 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	± 1% Т, ± 0,01Abs при 1000 поглинання
Роздільна здатність	0,1% Т, 0,001А
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

### АНОТАЦІЯ (Summary).

Fluconazole is a synthetic drug, a derivative of triazole, which is used in the treatment and prevention of various candidiasis.

According to the DFU and the European Pharmacopoeia, fluconazole is quantitatively determined by titration with perchloric acid in a non-aqueous medium. In addition to the titrimetric method of determination, other methods can be found in the literature, but they are not multiquantitative. We share the point of view of our colleagues that spectrophotometry is one of the most optimal methods for the determination of fluconazole in terms of cost, accuracy and speed.

The aim of the study. Develop and test quantitative spectrophotometric determination of fluconazole on solid dosage forms (capsules).

The results. To develop and test the technique, we used medicinal products in the form of capsules, the active substance of which is 100 mg of fluconazole (sample 1 and sample 2). Analyzed solutions were prepared as indicated below:

The capsule was opened and the contents were transferred to a 10 ml test tube. First, it was dissolved in 5 ml of chloroform, then it was brought up to 10 ml with a solvent. The concentration of the active substance was 10 mg/ml. Solutions of more diluted concentrations were prepared according to standard well-known dilution techniques.

Diluted standard solutions prepared from the standard pharmacopoeia were used to construct a calibration schedule (checking the linearity of the technique, determining the stability of solutions over time, etc.):

100 mg of DFU Fluconazole was weighed on an analytical balance and dissolved in 10 ml of chloroform.

Methodology of spectrophotometric determination. Optical density was measured on a Jenway 6305 spectrophotometer at a wavelength of 420 nm, bromothymol blue was chosen as a photometric reagent, and chloroform was used as a solvent.



The results of quantitative determination of fluconazole in medicinal products (sample 1 and sample 2) correlate with its content indicated in the instructions for medical use of these drugs.

Conclusions. As a result of the experimental studies, a method for the quantitative determination of fluconazole in solid dosage forms was developed and a partial validation of the method was carried out.