

СТАНДАРТ ФЛУКОНАЗОЛЫГ ХЯТ-НЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЙН АРГААР ТОДОРХОЙЛЖ БАТАЛГААЖУУЛАХ НЬ

Д.Гэрэлтуяа¹, Э. Сарнайзул¹, С.Золжаргал², Ц.Номин-Эрдэнэ³

¹АШУУИС, Эм Зүй-Био Анагаахын Сургууль, ²United family, Интермед эмнэлэг, ³Улсын хоёрдугаар төв эмнэлэг
e-mail: gereltuya.dorj@mnum.s.edu.mn

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF QUANTIFICATION OF FLUCONAZOLE REFERENCE

Gereltuya Dorj¹, Sarнайзул Erdenebaatar¹, Zoljargal Sambuu², Nomin-Erdene Tsolmon³

¹ School of Pharmacy and Biomedicine, MNUMS, ² United family, Intermed hospital, ³ National second hospital

Abstract

Introduction: A UV-spectrophotometric method has been developed for the quantitative estimation of fluconazole. The present study describes development and validation of UV-spectroscopic method for estimation of fluconazole reference substance and validation of detection method.

Method: During development of analytical method HCl: water (6 different concentrations). The detection length (cmax) was found to be 260nm. Calibration curves were prepared. The proposed method obeys Beer's law in the range of 5-50mg/ml. Absorption maxima was determined with 10 mg/ml by scanning in the range of 200-400nm.

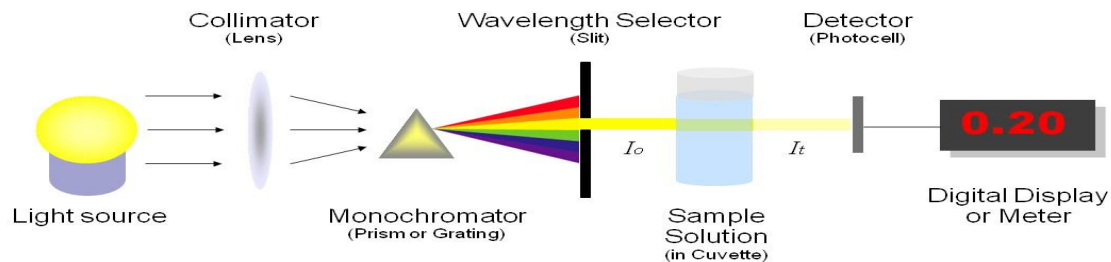
Results: Percent recovery studies are in the range of 95,12%-101.89%. The method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, range, precision, repeatability, robustness, stability of analytical solution. Results of analysis were validated statistically and by specificity studies. From that it was observed that there is no interference of blank, excipients during the estimation of reference substance in formulation.

Conclusion: This shows the adaptability of the method for routine estimation of fluconazole reference. **Keywords:** Fluconazole, method development, validation, spectrophotometry

Оршил:

Флуконазол нь химийн 2- (2, 4-дифлуоропенил)-1, 3-бис (1H-1, 2, 4-триазол-1-ҮЛ) -2-пропанол, нийлэг триазол бүтэцтэй, уух ба тарилгаар хэрэглэдэг, хэсгийн болон системийн мөөгөнцөрийн эсрэг үйлдэлтэй эм.¹ Анх 1930-аад онд цэргийн хуаранд цэргүүдийг хүнсээр хангах явцад эрдэмтэд, витамин А-ийн агуулгыг судалж байх үед А витамин дээр хэт ягаан туяаны (ХЯТ) гэрлийн шингээлтийн үзэгдэл явагдаж байхыг олж илрүүлжээ. Судалгааны эцэст буюу 1940-өөд оны эхээр ХЯТ-спектрофотометрийн аргыг санаачлан, 1941 онд “Beckman Instruments Inc” компани дэлхийн анхны спектрофотометр болох DU UV-Vis Spectrophotometer-ийг зохион бүтээсэн. Тухайн үед энэ спектрофотометр дээр хэмжилт хийхэд бүтэн өдөр зарцуулдаг

байсан бол өнөө үед спектрофотометр нарийвчлал сайтай, илүү тогтвортой, хугацаа бага зарцуулдаг зэрэг олон давуу талтай болсон. Спектрофотометрийн шинжилгээний арга нь шинжилж буй уусмалын дундуур гэрэл нэвтрүүлэхэд тухайн бодисын хичнээн хэмжээний гэрлийн эрчмийг өөртөө шингээж буйг хэмждэг арга бөгөөд гэрэл шингээлтийн үндсэн хууль болох Бугер-Ламберт-Берийн хуулиар² тодорхойлогдоно. Спектрофотометрийн аргаар гэрэл шингээлтийг тодорхой нэг долгионы урттай нм-ээр буюу миллимикронор (10^{-9}) хэмждэг. Үндсэн зарчим нь тухайн бодис нь гэрлийг шингээж, эсвэл долгионы уртын тодорхой хүрээнд гэрэл дамжуулахад оршино (Зураг 1).



Зураг 1. Спектрофотометрийн аргаар гэрэл шингээлтийг илрүүлэх зарчим

Спектрофотометр нь хими, физик, биохими, материал болон химийн инженер, эмнэлзүйн салбарт тоон шинжилгээ хийхэд хамгийн ашигтай, үр дүнтэй төхөөрөмж билээ. Шинжилж буй урвалж бодисоос хамааран спектрофотометрын кювет нь хуванцар, шил, пааландсан металл, шаазан болон бусад материалаар хийгдсэн байж болно.

Спектрофотометрийн шинжилгээний баталгаажуулалтын арга гэж өвөрмөц байдал (specificity), нарийвчлал (precision), үнэн зөв (robustness), тогтвортой байдал (stability) зэргийг онцлон шинжилж баталгаажуулах үйл ажиллагааг хэлнэ.³ Өвөрмөц байдал нь шинжлэх бодист гадны хольц байгаа эсэхийг лавлах материалтай харьцуулан таньж тодорхойлохоос гадна нарийвчлалтай болон тогтвортой байдлыг шалгахад мөн лавлах материалтай харьцуулан санамсаргүй алдаа буюу туршилтын нөхцөл, багаж тоног төхөөрөмж, шинжээчийн механик алдааг аль болох бага гаргахын тулд дунджаар 9 сорьц авч түүнээс хамгийн багадаа 5-6 сорьц нь агууламж хэвийн хэмжээнд байвал сайн байна гэж үзнэ. Мөн баталгаажуулалтын нэг чухал арга болох жиших муруй (Linearity) буюу эмийн бодисын гэрэл шингээлт, концентраци хоорондын хамаарлыг шинжлэх бодисын стандарт уусмалаас сулруулан бэлтгэж муруйг байгуулна. Спектрофотометрийн аргыг судалгаанд ашиглахад маш хурдан, хялбар, нарийвчлалтай, эдийн засгийн хувьд хэмнэлттэй учир лабораторийн судалгаа, хүнсний бүтээгдэхүүн, аж үйлдвэр, шүүх дүн шинжилгээ, эрдэм шинжилгээний судалгаа, анагаах ухаан зэрэг олон салбарт ашиглаж байна. Харин спектрофотометр тоос шороо, болон гадны гэрэл, доргио зэрэг хүчин зүйлээс хамаарч төхөөрөмжийн гүйцэтгэл буурна. Мөн бодис болгоныг хэмжиж шинжлэх боломжгүй

байдаг нь энэхүү аргын сул тал юм.

Стандарт флуконазолын концентрацийг тодорхойлж баталгаажуулсан судалгааны талаар бусад орнуудад хийсэн ажлын тухай мэргэжлийн сэтгүүлүүдэд нилээдгүй бичсэн байна.⁴ Харин манай орны хувьд спектрофотометрийн шинжилгээний баталгаажуулалтын ажил төдийлөн хангалттай хийгдээгүй нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл болж өглөө.

Зорилго:

1. Стандарт флуконазол бодисыг спектрофотометрийн аргаар шинжлэх, шинжилгээний аргыг баталгаажуулах

Зорилт:

1. Флуконазолын стандарт бодисыг International Conference on Harmonisation (ICH)⁵-ийн удирдамжийн дагуу тодорхойлж шалгах
2. Ашиглагдаж буй спектрофотометрын нарийвчлалтай хэмжилтийг баталгаажуулах

Материал ба арга зүй:

Судалгаанд ашиглагдсан тоног төхөөрөмж, материал болон арга зүй:

А. Энэхүү судалгааг АШУУИС-ийн Эм Зүй-Биоанагаахын сургуулийн эмийн химийн шинжилгээний лабораторид явуулсан. “Гедеон Рихтер” компанийн K83010N цувралын дугаартай, аналитик химийн шинжилгээнд зориулан өндөр зэрэглэлээр цэвэршүүлсэн 200 мг стандарт флуконазолоос 10 мг-ийг нарийвчлалтай жинлэн авч 100 мл-ийн хэмжээст колбонд хийж шинээр бэлтгэн баталгаажуулсан 0.1M HCl-ийн уусмалд уусган хэмжээс хүртэл дүүргэж холив. Хамгийн анхны стандарт уусмал 1000 мкг/

мл концентрацитай бөгөөд 50, 100, 200, 300, 400 мкг/мл хүртэл 0.1M HCl-оор сулруулсан уусмалуудыг бэлтгэж “PD-303UV” маркийн спектрофотометр дээр 260 нм долгионы уртад хэмжилтүүдийг хийсэн.

Б. Судалгааны ажилд хэрэглэгдсэн 0.1M HCl-ийг тусгайлан шинээр бэлтгэсэн ба Европын фармакопейн удирдамж⁶-ийн бэлтгэв. Үүнд: эхлээд 25.75 г нунтаг HCl-ийг нарийвчлалтай жинлэн авч 250 мл шинээр бэлтгэсэн нэрмэл усанд уусган 1M HCl-ийг бэлтгэж Европын фармакопейн удирдамжийн дагуу 1M HCl-уусмалын тооны тодорхойлолтыг хийж чанарыг баталгаажуулсан. Тооны

тодорхойлолтонд 1gNaCO_3 -ийн нунтагийг

нарийвчлалтай жинлэн аваад 50 мл нэрмэл усанд уусган 0.1 мл метилийн улбар шар индикатор нэмж улаавтар туяатай улбар шар өнгөтэй болтол нь 1M HCl-ийн уусмалаар титрлэсэн. Үүний дараа 2 минутын турш буцалгахад эргээд шар өнгөтэй болсон. Уг уусмалыг хөргөсний дараа 1M HCl-оор дахин титрлэв. Титрлэлтэнд нийтдээ 19 мл 1M HCl зарцуулагдсан ба тооцож үзэхэд тооны тодорхойлолт тохирсон нь бидний найруулсан 1M HCl нь чанарын шаардлага хангаж байгааг харуулж байна. Уг 1M HCl-оос 100 мл-ийг авч 1000 мл нэрмэл усанд уусгаж 0.1M HCl-ийг бэлтгэн судалгаанд ашигласан.

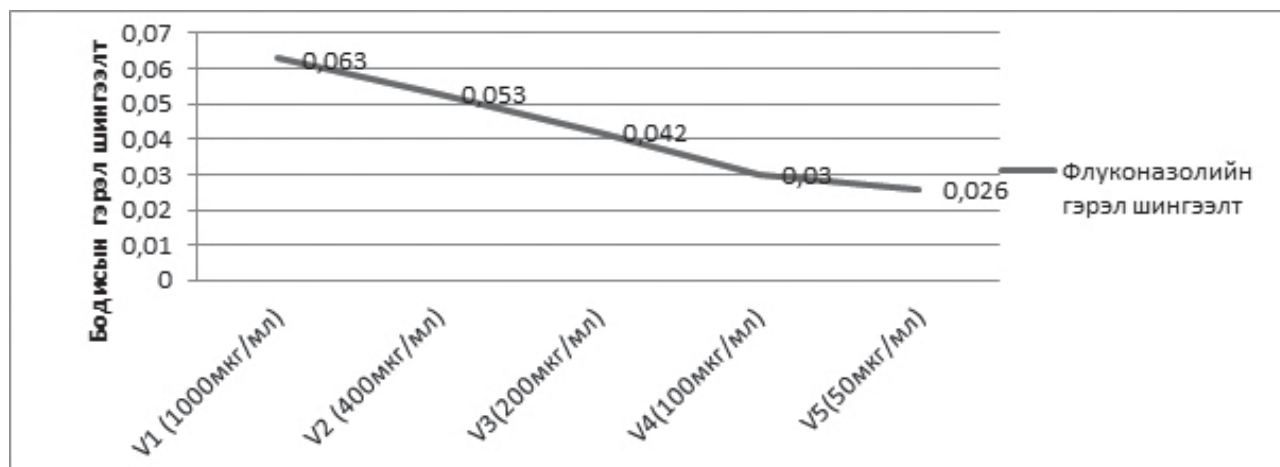
В. Тооны тодорхойлолт хийхэд хэрэглэсэн метилийн улбар шар индикаторыг шинээр найруулан бэлтгэсэн: Европын фармакопейн удирдамжийн дагуу 0.1г метил ийн улбар шар нунтагийг нарийвчлалтай жинлэн авч 80 мл нэрмэл усанд уусгаад, 100 мл хэмжээст колбоны хэмжээс хүртэл спирт нэмж бэлтгэсэн.⁶

Судалгааны ажлыг дахин баталгаажуулах зорилгоор энэхүү бэлтгэсэн стандарт флуконазолын өөр өөр төрлийн концентрацитай уусмалуудыг өөр байгууллагын “UV mini-1240” маркийн спектрофотометр дээр дахин шинжилж үр

дүнг бататгаажуулав.

Үр дүн

Флуконазолын стандарт бодисыг 0.1M-ийн HCl-оор сулруулан таван өөр концентрацитайгаар бэлтгэн ХЯТ-спектрофотометрт хамгийн мэдрэг долгионы уртад (260 нм) 5 удаа шинжилж гарсан утгуудын дунджаар гэрэл шингээлт болон концентраци хамаарлын муруйг байгуулсан (Зураг 3). Судалгааны үр дүнгээс харахад эмийн бодисын концентраци болон гэрэл шингээлт урвуу хамааралтай буюу концентраци ихсэх тусам гэрэл шингээлтийн утга хасагдаж байна.



Зураг 3. Стандарт флуконазолын жиших муруй (x-бодисын концентраци, y- бодисын гэрэл шингээлт)

Стандарт флуконазолыг лабораторийн ижил нөхцөлд, ижил бодис ашиглан нэг шинжээчийн гардан хийсэн үйл ажиллагааны дүнд адил концентрацитай 5 өөр уусмалыг 3 дараалласан өдөр (72 цаг) тасалгааны температурт шинжлэхэд эхний өдөр 0.067 гарсан ба 2 дахь болон 3 дахь өдрүүдэд бодисын гэрэл шингээлт буурсан үр дүн гарсан. Үүний зэрэгцээ Recovery буюу бодисын агууламжийг дахин хэмжихэд 2 дахь өдөр 4,48-ийн өөрчлөлттэй, 3 дахь өдөр 4,69-өөр өөрчлөгдсөн нь бодисын агууламжийн хэлбэлзэл тус тус 10%-иас хэтрэхгүй байгааг харуулж байна (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1.

Спектрофотометрын аргын нарийвчлалтай байдал

Концентраци (мкг/мл)	1 дэх өдөр	Recovery	Өөрчлөлт	2 дахь өдөр	Recovery	Өөрчлөлт	3 дахь өдөр	Recovery	Өөрчлөлт
V ₁ (200) ^a	0.067	100%	---	0.064	95,52%	4,48	0.061	95,31%	4,69
V ₂ (200) ^b	0,053	100%	---	0.054	101.89 %	1,89	0.052	96,29%	3,71
V ₃ (200) ^b	0,042	100%	---	0.041	97,61%	2,39	0.039	95,12%	4,88
V ₄ (200) ^г	0,033	100%	---	0.032	96,96%	3,04	0.031	96,87%	3,13
V ₅ (200) ^a	0,029	100%	---	0.028	96,55%	3,45	0.027	96,43%	3,57

^aV₁- Стандарт флуконазолын уусмал 50 мкг/мл ^bV₂- 100 мкг/мл ^bV₃-200 мкг/мл ^гV₄-300 мкг/мл ^aV₅- 400 мкг/мл

Хэлцэмж

Флуконазолын стандарт уусмалаас 200 мкг/мл концентраци бүхий 5 өөр уусмалын тогтвортой байдал болон шинжилгээнд ашиглагдаж буй спектрофотометрын мэдрэг чанар болон хэмжилтийн нарийвчлалтай байдлыг нэг шинжээч ижил нөхцөлд, шинжилгээний ижил аргаар нэг нэг өдрийн зайтай гурван өөр өдөр 260 нм долгионы уртад судалгааг хийж гүйцэтгэлээ. Шинжилгээний явцад флуконазолын гэрэл шингээлтийн утгууд харьцангуй тогтвортой байгаа нь спектрофотометрийн хэмжилт нарийвчлал хангалттай сайн байгааг илэрхийлж байна. Олон улсын эрдэм шинжилгээний сэтгүүд нийтлэгдсэн болон ICH (The International Conference on Harmonisation)⁵ удирдамжийн

дагуу флуконазолыг хамгийн мэдрэг 260 нм долгионы уртад нь 2-10 мкг / мл-ийн агууламжтай стандарт флуконазолыг 5 өөр концентрацитайгаар бэлтгэж гэрэл шингээлтийг хэмжин Бугер-Ламберт-Берийн хуулиар² тооцоолоход шугаман хамааралтай байсан нь бидний судалгаатай ойролцоо утгатай байсан бөгөөд спектрофотометр болон эмийн химийн шинжилгээнд ашиглагдаж буй стандарт бодисын чанарыг баталгаажуулж байна.

Дүгнэлт

Судалгааны үр дүнгээс харахад спектрофотометрийн чанарын баталгаажилтын аргыг стандарт флуконазол бодисын эмийн шинжилгээнд хэрэглэх нь хялбар бөгөөд хямд арга байв. Түүнээс гадна

зөвхөн стандарт флуконазол бодис бус Монгол улсад бүртгэгдсэн капсул, бүрхүүлгүй шахмал зэрэг бусад эмийн хэлбэрүүдийн хувьд нарийн шинжилгээ хийхэд бүрэн боломжтой. Монгол улсын эмийн зах зээлд хэрэглэгдэж буй бусад эмүүдийн чанар аюулгүй байдлыг хангах зорилгоор бидний хийж гүйцэтгэсэн энэхүү аргыг нэвтрүүлж зөвхөн эмийн химийн шинжилгээ бус шинжилгээнд ашиглагдаж буй тоног төхөөрөмж, урвалж бодисын чанарын баталгаажилтыг олон улсын стандартын дагуу мэргэжлийн өндөр түвшинд хийх бүрэн бололцоотой хэмээн дүгнэж байна.

Ном зүй

1. Göger NG, Aboul-Enein HY. Quantitative determination of fluconazole in capsules and IV solutions by UV spectrophotometric methods. *Analytical letters*. 2001; 34(12):2089-2098. Available
2. Gorog S. Ultraviolet-visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis: Application of UV-VIS Spectroscopy in Pharmaceutical. CRC; 1995.
3. Adams AI, Steppe M, Frehlich PE, Bergold AM. Comparison of microbiological and UV-spectrophotometric assays for determination of voriconazole in tablets. *Journal of AOAC international*. 2006; 89(4):960-965. Available
4. Corrêa JCR, Reichman C, Salgado HRN, Vianna-Soares CD. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bio-assay for fluconazole determination in capsules. *Química Nova*. 2012; 35(3):530-534. Available
5. Vozeh S. The international conference on harmonisation. *European journal of clinical pharmacology*. 1995; 48(3):173-175. Available
6. Pharmacopoeia CotEoaE. *European Pharmacopoeia: Supplement*. Council of Europe; 1998.