

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIFONAZOLA I KLOTRIMAZOLA U LOSIONIMA BICUTRIN[®] I CANESTEN[®]

MIRA ČAKAR* , GORDANA POPOVIĆ

*Institut za Opštu i neorgansku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija i Crna Gora*

IZVOD

U radu je predložena direktna spektrofotometrijska metoda za određivanje antimikotika bifonazola i klotrimazola u losionima Bicutrín[®], odnosno Canesten[®]. Određivanja su vršena u 0,1 M HCl na talasnoj dužini 257 nm (bifonazol), odnosno 225 nm (klotrimazol). Kalibraciona kriva dobijena je u opsegu koncentracija bifonazola 1,5-15 µg/ml, i klotrimazola 2,5-25 µg/ml, sa koeficientom korelacije 0,9999 za obe krive. Tačnost i reproduktivnost metode proverena je analizom rastvora tri različite koncentracije bifonazola („recovery” 98,7-99,7 %; RSD 0,60-1,55 %) i klotrimazola („recovery” 98,3-99,1 %; RSD 0,96-1,67 %). Dobijeni rezultati ukazuju na tačnost i reproduktivnost predložene spektrofotometrijske metode, kao i na mogućnost direktnog spektrofotometrijskog određivanja bifonazola i klotrimazola u odgovarajućim losionima bez prethodnog izolovanja.

Ključne reči: bifonazol, klotrimazol,
UV spektrofotometrijsko određivanje, losion

UVOD

Bifonazol (1-[(1,1'-bifenil)-4-ilfenilmetil]-1H-imidazol) i klotrimazol (1-(α -hlorotritil)-imidazol) pripadaju grupi antimikotika derivata imidazola, sa širokim spektrom dejstva (1). U poslednje vreme upotreba imidazolskih derivata raste zbog njihove efikasnosti u tretmanu gljivičnih obolenja kod osoba sa smanjenim imunitetom (posle transplatacije, AIDS). Primenjuju se u obliku krema, losiona, pudera ili vaginalnih tableta.

U hemijskom pogledu bifonazol i klotrimazol su baze teško rastvorljive u vodi.

U farmaceutskim preparatima bifonazol je, do sada, određivan: primenom hromatografskih metoda HPLC (2,3), HPTLC (4), GC (5); elektrohemijski (6,7); spektrofotometrijski, bazirano na građenju jonskog para (8) ili primeni derivativne spektrofotometrije (9). Kod obe spektrofotometrijske metode određivanju je predhodila ekstrakcija.

Određivanje klotrimazola u farmaceutskim preparatima vršeno je: hromatografski, HPLC (10-19) i TLC (17,20,21); elektrohemijski (22,23); titrimetrijski (24,25). Takođe je određivan i spektrofotometrijski (26-31), kao i primnom derivativne spektrofotometrije (17, 32-34).

S obzirom da u literaturi ne postoji metode za direktno spektrofotometrijsko određivanje navedenih antimikotika u vodenoj sredini, cilj ovoga rada bio je da se na osnovu poznavanja kiselinsko-baznih ravnoteža bifonazola (35) i klotrimazola (36), predloži jednostavna spektrofotometrijska metoda za njihovo određivanje u losionima Bicutrin[®], odnosno Canesten[®] bez prethodnog izolovanja.

EKSPERIMENTALNI DEO

1. Reagensi i aparati

Radni standardi bifonazola i klotrimazola dobijeni su od fabrika farmaceutskih proizvoda Srbolek d.d. (Beograd, Srbija i Crna Gora), odnosno Zdravlje a.d. (Leskovac, Srbija i Crna Gora). Ostali reagensi (HCl, etanol) bili su analitičkog stepena čistoće (Merck, Germany). U radu je korišćena destilovana voda.

Preparat Bicutrin[®] (Srbolek, Beograd) je deklarisanog sadržaja 1g bifonazola u 100 g losiona, a Canesten[®] (Bayer AG. – Németsország, Budapest, Hungary) 1g klotrimazola u 100 ml losiona.

Spektrofotometrijska merenja vršena su na spektrofotometru GBC Cintra 20 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Dandenog, Australia), sa kvarcnim kivetama od 1 cm.

2. Rastvori standarda za kalibracionu krivu

Serijski standardni rastvori bifonazola

Osnovni rastvor bifonazola koncentracije 1,5 mg/ml dobijen je rastvaranjem bifonazola u etanolu. Razblaživanjem 1,00 ml osnovnog rastvora do 25 ml sa 0,1 M HCl dobijen je rastvor u kome je koncentracija bifonazola iznosila 60 µg/ml. Alikvoti ovog rastvora (0,25 - 2,5 ml) razblaženi su do 10 ml sa 0,1 M HCl, pri čemu je dobijena serija standardnih rastvora u opsegu koncentracija bifonazola 1,5-15 µg/ml. Apsorbancije dobijenih rastvora merene su na 257 nm, uz 0,1 M HCl kao slepu probu. Maksimalni sadržaj etanola u seriji standardnih rastvora iznosio je 1 % (v/v), i praktično nije imao uticaj na određivanje.

Serijski standardni rastvori klotrimazola

Osnovni rastvor klotrimazola koncentracije 3,906 mg/ml dobijen je rastvaranjem klotrimazola u etanolu. Razblaživanjem 2,00 ml osnovnog rastvora do 25 ml sa 0,1 M HCl dobijen je rastvor u kome je koncentracija klotrimazola iznosila 312,5 µg/ml. Alikvoti ovog rastvora (0,2 - 2 ml) razblaživani su do 25 ml sa 0,1 M HCl, pri čemu je dobijena serija standardnih rastvora u opsegu koncentracija 2,5–25 µg/ml. Apsorbancije dobijenih rastvora merene su na 225 nm, uz 0,1 M HCl kao slepu probu. Maksimalni sadržaj etanola u seriji standardnih rastvora iznosio je 0,64 % (v/v).

3. Rastvori uzoraka

Rastvori Bicutrin[®] losiona

Tačno odmerena masa losiona koja sadrži oko 3 mg bifonazola preneti su u odmerni sud od 10 ml, koji je zatim dopunjen sa 0,1 M HCl do crte. Zapremina od 0,50 ml dobijenog rastvora razblažena je do 25 ml

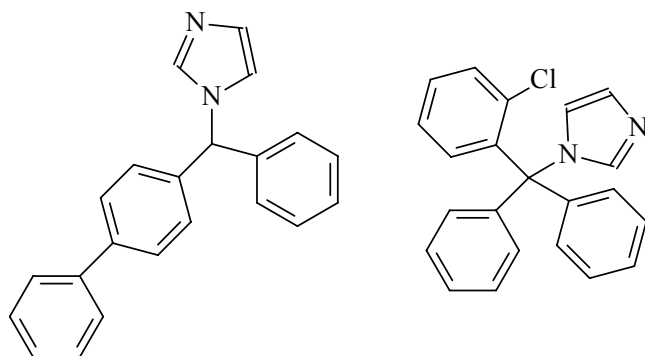
sa 0,1 M HCl, i apsorbancija je merena na 257 nm (u odnosu na 0,1 M HCl kao slepu probu).

Rastvori Canesten® losiona

Zapremina od 0,75 ml losiona preneti je u odmerni sud 10 ml, i dopunjeno sa 0,1 M HCl do crte. Zapremina od 0,50 ml dobijenog rastvora razblažena je do 25 ml sa 0,1 M HCl, i apsorbancija je merena na 225 nm (u odnosu na 0,1 M HCl kao slepu probu).

REZULTATI I DISKUSIJA

Bifonazol i klotrimazol su monofunkcionalne baze, u molekularnom obliku teško rastvorljive u vodi.

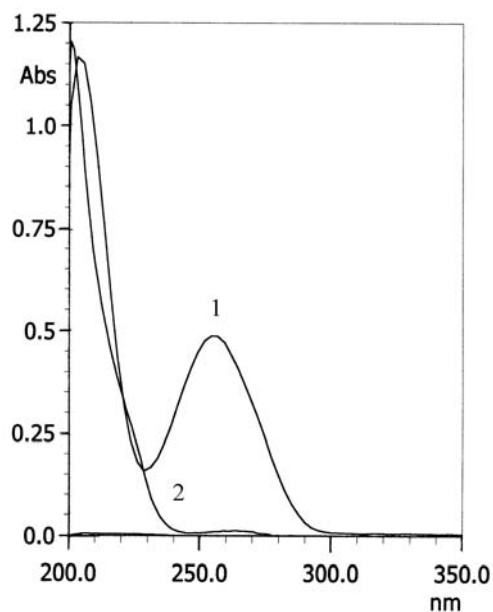


Bifonazol
Bifonazole

Klotrimazol
Clotrimazole

Protonovanje imidazolovog atoma azota u molekulima ovih antimikotika povećava njihovu rastvorljivost. S obzirom da su pK_a vrednosti bifonazola 5,72 (35) i klotrimazola 6,30 (36), pri $pH < 3,5$ nalaze se praktično potpuno u protonovanom obliku. Kao prvi korak za definisanje uslova za određivanje navedenih antimikotika spektrofotometrijski je praćena njihova stabilnost u kiseloj sredini (0,1 M HCl). Utvrđeno je da u periodu od 6 h ne dolazi do promena u

apsorpcionim spektrima. Zbog toga su kao optimalni uslovi za određivanje bifonazola i klotrimazola odabrani 0,1 M HCl i talasna dužina 257 nm (bifonazol) i 225 nm (klotrimazol) (Slika 1).



Slika 1. UV apsorpcioni spektri standarda antimikotika u 0,1 M HCl:
1 – bifonazol (6 µg/ml),
2 - klotrimazol (6 µg/ml).

Figure 1. UV absorption spectra of standard of antimycotics in 0.1 M HCl:
1 – bifonazole (6 µg/ml),
2 - clotrimazole (6 µg/ml).

Talasna dužina 257 nm odgovara apsorpcionom maksimumu protonovanog oblika bifonazola. Apsorpcioni maksimum protonovanog oblika klotrimazola nalazi se na 205 nm. Da bi se izbegle greške u radu na niskim talasnim dužinama, određivanje klotrimazola je vršeno na 225 nm. U Tabeli I dati su podaci regresione analize za kalibracione krive bifonazola i klotrimazola. Dobijeni statistički parametri pokazuju da je postignuta dobra linearnost u ispitivanom opsegu koncentracija kod oba ispitivana antimikotika.

Tabela I Podaci regresione analize za kalibracione krive***Table I** Regression data for the calibration curves*

Parametar Parameter	Bifonazol Bifonazole	Klotrimazol Clotrimazole
koncentracioni opseg (µg/ml) concentration range (µg/ml)	1,5 - 15,0	2,5 – 25,0
broj rastvora number of solutions	7	7
nagib slope	0,0785	0,0394
SD nagiba SD of slope	0,0004	0,0002
odsečak intercept	- 0,0047	- 0,0220
SD odsečka SD of intercept	0,0033	0,0038
kalibraciona kriva calibration curve	$y = 0,0785x - 0,0047$	$y = 0,0394x - 0,0220$
koeficijent korelacije (r) correlation coefficient (r)	0,9999	0,9999

* y, apsorbancija; x, koncentracija (µg/ml); SD, standardna devijacija

* y, absorbance, x, concentration (µg/ml); SD, standard deviation

Tačnost i reproduktivnost metode proverena je analizom standardnih rastvora bifonazola i klotrimazola tri različite koncentracije (Tabela II). „Recovery” u granicama 98,7-99,7 % (bifonazol) i 98,3-99,1 % (klotrimazol), kao i vrednosti za RSD 0,60-1,55 % (bifonazol) i 0,96-1,67 % (klotrimazol), pokazuju da je postignuta dobra tačnost i preciznost metode. Posebno treba istaći postignutu dobru reproduktivnost metode kod određivanja klotrimazola, s obzirom da je određivanje vršeno na talasnoj dužini van apsorpcionog maksimuma.

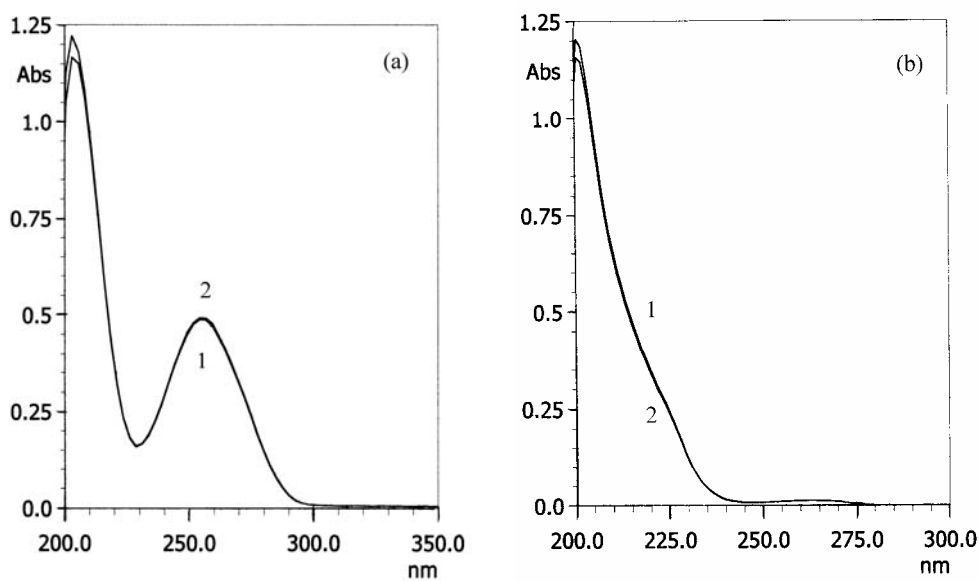
Tabela II Spektrofotometrijsko određivanje bifonazola i klotrimazola
Table II Spectrophotometric determination of bifonazole and clotrimazole

Antimikotik Antimycotic	Uzeto Taken µg/ml	Nađeno* Found* µg/ml	RSD %	Recovery %
Bifonazol	3,00	2,96 ± 0,05	1,55	98,7
Bifonazole	6,00	5,98 ± 0,04	0,71	99,7
	9,00	8,93 ± 0,05	0,60	99,2
Klotrimazol	5,00	4,91 ± 0,05	0,96	98,3
Clotrimazole	15,00	14,86 ± 0,25	1,67	99,1
	25,00	24,78 ± 0,37	1,49	99,1

* srednja vrednost ± standardna devijacija (n=5)

* mean± standard deviation (n=5)

Predložena metoda primenjena je za određivanje bifonazola i klotrimazola u losionima Bicutrin[®], odnosno Canesten[®]. Da bi se ispitao uticaj pratećih supstanci u losionima na tačnost određivanja, snimljeni su apsorpcioni spektri rastvora standarda antimikotika i rastvora odgovarajućih losiona u 0,1 M HCl (Slika 2). Potpuno preklapanje spektara pokazuje da prateće supstance u losionima praktično nemaju uticaja na određivanje. Rezultati određivanja antimikotika u losionima prikazani su u Tabeli III. Dobijene su vrednosti za sadržaj antimikotika, koje iskazane kao procenat od deklarisanog, iznose 100,6% (bifonazol) i 97,1% (klotrimazol), sa RSD 1,64% (bifonazol) i 1,1% (klotrimazol).



Slika 2. UV apsorpcioni spektri standarda antimikotika i losiona u 0,1 M HCl:

- a) 1 – bifonazol (6 $\mu\text{g/ml}$),
2 – losion Bicutrin[®] (6 $\mu\text{g/ml}$ bifonazola, po deklarisanom sadržaju);
- b) 1 - klotrimazol (6 $\mu\text{g/ml}$),
2 – losion Canesten[®] (6 $\mu\text{g/ml}$ klotrimazola, po deklarisanom sadržaju)

Figure 2. UV absorption spectra of standard of antimycotics and lotions in 0.1 M HCl:

- a) 1 – bifonazole (6 $\mu\text{g/ml}$),
2 – lotion Bicutrin[®] (bifonazole 6 $\mu\text{g/ml}$, respect with label claim);
- b) 1 - clotrimazole (6 $\mu\text{g/ml}$),
2 – lotion Canesten[®] (clotrimazole 6 $\mu\text{g/ml}$, respect with label claim).

Tabela III Određivanje bifonazola i klotrimazola u komercijalnim losionima^a

Table III Determination of bifonazole and clotrimazole in commercial lotions^a

Losion Lotion	Uzeto ^b Taken ^b µg/ml	Nađeno Found µg/ml	RSD % (n=5)	Procenat od deklarisanog sadržaja Percentage of label claim
Bicutrin [®]	6,00	6,03	1,64	100,6
Canesten [®]	15,00	14,56	1,10	97,1

^aBicutrin[®] : 1 g bifonazola u 100 g losiona

Canesten[®] : 1 g klotrimazola u 100 ml losiona

^bKoncentracija u radnom rastvoru izračunata u odnosu na deklarisan sadržaj

^aBicutrin[®] : 1 g bifonazole in 100 g lotion;

Canesten[®] : 1 g clotrimazole in 100 ml lotion

^bConcentration in working solution calculated on the basis of the label claim

Metoda predložena u ovom radu je brza i jednostavna. Omogućava direktno spektrofotometrijsko određivanje bifonazola i klotrimazola u losionu bez prethodnog izolovanja i korišćenja skupih tehnika. Jednostavnost i niska cena mogu biti prednost predložene metode.

Rad je finansiran od strane Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije, u okviru projekta broj 1458 (hemija, osnovna istraživanja)

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BIFONAZOLE AND CLOTRIMAZOLE IN LOTIONS BICUTRIN[®] AND CANESTEN[®]

MIRA ČAKAR^{*}, GORDANA POPOVIĆ

*Institute of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Serbia and Montenegro*

Summary

A direct spectrophotometric method for the determination of bifonazole and clotrimazole in commercial lotions Bicutrin[®] and Canesten[®], respectively, has been developed. The determinations were performed in a 0.1 M HCl solution at 257 nm (bifonazole) and 225 nm (clotrimazole). A calibration curves were obtained in the concentration range 1.5 –15.0 µg/ml and 2.5 – 25.0 µg/ml for bifonazole and clotrimazole, respectively, with correlation coefficient is 0.9999 for both curve. The accuracy and reproducibility of the method was checked by analyzing solutions of three different concentrations of bifonazole (recovery 98.7 - 99.7 %; RSD 0.60-1.55 %) and clotrimazole (recovery 98.3 - 99.1 %; RSD 0.96 - 1.67 %). The method proposed in this study is fast, accurate and reproductive. It enables the direct spectrophotometric determination of bifonazole and clotrimazole in lotions without previous isolation. The simplicity and low cost can be advantage of this method.

Key words: bifonazole, clotrimazole,
UV spectrophotometric determination, lotion

Literatura

1. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 29th Edition, London: The Pharmaceutical Press, 1989.
2. Di Pietra AM, Cavrini V, Andrisano V, Gatti R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 1992; 10: 873-9.
3. Guo XJ, Wei ZY, Li FM. Determination of bifonazole in creams by high-performance liquid chromatography. *Sepu* 2001; 19: 279-280.
4. Agbaba D, Vladimirov S, Živanov-Stakić D. HPTLC determination of bifonazole in pharmaceutical formulations. *J Planar Chromatogr* 1991; 4: 164-5.
5. Kublin E, Taniewska T. Determination of antimycotic substances, derivatives of imidazole, by gas-chromatographic method. *Chemia Analityczna (Warsaw)* 1996; 41: 19-25.
6. Karandeeva NI, Tkach VI, Glukhova OI. Quantitative determination of bifonazole with ion-selective electrode. *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev)* 1997; 5: 64-6.
7. Mushik V, Tkach VI, Karandeeva NI, Glukhova OI, Tsyganok LP. Electrochemical and analytical properties of solid-contact ion-selective electrodes reversible to the imidazole derivatives clotrimazole and bifonazole. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii* 1998; 53: 1110-2.
8. Vladimirov S, Brborić J, Agbaba D, Živanov-Stakić D. Spectrophotometric determination of bifonazole in pharmaceutical formulations using bromphenol blue. *Farmaco* 1993; 48: 1007-14.
9. Bonazzi D, Cavrini V, Gatti R, Boselli E, Caboni M. Determination of imidazole antimycotics in creams by supercritical-fluid extraction and derivative UV spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 18: 235-240.
10. Cavrini V, Di Pietra AM, Raggi MA. High-pressure liquid chromatographic (HPLC) analysis of imidazole antifungals in commercial dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* 1982; 10: 119-24.
11. Wang G, Zhang S, Yang H. Determination of econazole and clotrimazole in econazole and clotrimazole solution by HPLC. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi* 1998; 18: 157-8.
12. Abdel-Moety EM, Khattab FI, Kelani KM, AbouAl-Alamein AM. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Farmaco* 2002; 57: 931-8.
13. Zhu J, Coscolluella C. Chromatographic assay of pharmaceutical compounds under column overloading. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* 2000; 741: 55-65.
14. Di Pietra AM, Cavrini V, Andrisano V, Gatti R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 1992; 10: 873-9.

15. Hoogerheide JG, Strusiak SH., Taddei CR, Townley ER.; Wyka, BE. High-performance liquid chromatographic determination of clotrimazole in pharmaceutical formulations. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 1981; 64: 864-9.
16. Solich P, Hajkova R, Pospisilova M, Sicha J. Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC. *Chromatographia* 2002; 56: S181-S184.
17. Abdel-Moety EM, Kelani KO, Al-Alamein AM. Simultaneous determination of clotrimazole and betamethasone dipropionate by coupled TLC-densitometry, HPLC and derivative UV-spectrophotometry. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2002; 10: 44-53.
18. Wang G, Shen X, Zhang S, Zhang L. Determination of clotrimazole and dyclonine hydrochloride in compound clotrimazole cream by HPLC. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi* 1996; 16: 66-67.
19. Stuber B, Mueller KH. High performance liquid chromatography of combined clotrimazole-containing hydrocreams and hydrocream pastes. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 1984; 59: 210-2.
20. Indrayanto G, Aditama L, Tanudjaja W, Widjaja S. Simultaneous densitometric determination of betamethasone valerate and clotrimazole in cream, and its validation. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 1998; 11: 201-4.
21. Roychowdhury U, Das SK Rapid identification and quantitation of clotrimazole, miconazole, and ketokonazole in pharmaceutical creams and ointments by thin-layer chromatography-densitometry. *Journal of AOAC International* 1996; 79: 656-9.
22. Pereira FC, Zanoni MVB, Guaratini CCI., Fogg AG. Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE-3B *J Pharm Biomed Anal* 2002; 27: 201-8.
23. Shamsipur M, Jalali F. Preparation of a clotrimazole ion-selective electrode and its application to pharmaceutical analysis. *Analytical Letters* 2002; 35: 53-64.
24. Massaccesi M. Two-phase titration of some imidazole derivatives in pharmaceutical preparations. *Analyst* 1986; 111: 987-92.
25. Volkman D. Two-phase titrations with the phototitrator DK18 Mettler. 3. Titration with picric acid. *GIT Fachzeitschrift fuer das Laboratorium*.1983; 27: 524-6.
26. Szabolcs M. Determination of the active principle in preparations based on miconazole and clotrimazole. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 1976; 46: 43-8.
27. Chainani ML, Rao LS, Chavda SJ. A colorimetric method for the estimation of clotrimazole in pharmaceutical preparations. *Indian Drugs* 1981; 18: 405-7.
28. Shingbal DM, Kudchadkar H S. A colorimetric method for the estimation of clotrimazole. *Indian Drugs* 1987; 24: 408-10.

29. Rao PSNH, Rao TS, Prasad UV, Sastry CSP. Extractive spectrophotometric determinations of clotrimazole in formulations Asian Journal of Chemistry 2002; 14: 190-196.
30. Khashaba PY, El-Shabouri SR, Emara KM, Mohamed AM. Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. J Pharm Biomed Anal 2000; 22: 363-76
31. Abdelmageed OH, Khashaba PY. Spectrophotometric determination of clotrimazole in bulk drug and dosage forms. Talanta 1993; 40: 1289-94.
32. Dol I, Altesor C. Determination of clotrimazole by second order derivative UV spectrophotometry. SAFYBI 1988; 28: 2660-6.
33. Prasad CVN, Parihar C, Sunil K, Parimoo P. Simultaneous determination of tinidazole-clotrimazole and tinidazole-norfloxacin in combined tablet preparations by derivative spectroscopy. Pharmaceutical Sciences 1997; 3: 337-341.
34. Bedair MM, Korany MA, Elsayed MAEH, Fahmy OT. Derivative spectrophotometric determination of clotrimazole in single formulations and in combination with other drugs. Journal Association of Official Analytical Chemists 1989; 72: 432-5.
35. Popović G, Čakar M. *Determination of acidity constant and solubility of bifonazole*, In Abstracts book of the Drug Analysis 2002 symposium, Bruges (Belgium); 21-25 April 2002: p. 85.
36. Beggs WH. Direct lethal action of clotrimazole. Current Therapeutic Research 1991; 50: 45-9.