



Microbiological Assay and HPLC Method for the Determination of Fluconazole in Pharmaceutical Injectable Formulations

Felipe K. HURTADO, Marinês J. SOUZA, Janine de MELO & Clarice M.B. ROLIM *

Department of Industrial Pharmacy, Health Science Center,
Federal University of Santa Maria,
97.105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

SUMMARY. Fluconazole is a synthetic triazole antifungal agent used in the treatment of candidiasis and other fungal infections. A high performance liquid chromatographic method and a microbiological assay have been developed for the determination of fluconazole in injectable solutions. A Phenomenex Synergi Fusion RP-80 C₁₈ (150 x 4.60 mm, 4 μ m) column was used for fluconazole separation, using isocratic elution with water: methanol (55:45, v/v) and UV detection at 260 nm. Microbiological assay (bioassay) was performed using the agar diffusion method, using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1600 as the test microorganism and antibiotic medium 19 for agar layer. The two methods were validated and applied for quantitative determination of fluconazole and have demonstrated good linearity, precision and accuracy. The assays were linear in the concentration range of 25-200 μ g ml⁻¹, for HPLC, and 25-400 μ g ml⁻¹ for microbiological method. The precision of the methods was determined by repeatability (RSD 0.18%, for HPLC, and 3.0% for bioassay) and intermediate precision (RSD 0.32%, for HPLC, and 4.73% for bioassay). The accuracy was determined and the mean recovery was found to be 99.25%, for HPLC, and 98.89% for bioassay. The two proposed methods have been successfully validated and may be considered for routine analysis of fluconazole in pharmaceutical injectable preparations.

RESUMEN. "Ensayo Microbiológico y Método por HPLC para la Determinación de Fluconazol en Formulaciones Farmacéuticas Inyectables". Fluconazol es un agente antifúngico triazólico sintético empleado en el tratamiento de la candidiasis y de otras infecciones fúngicas. Un método por cromatografía líquida de gran eficacia y un ensayo microbiológico fueron desarrollados para la determinación de fluconazol en soluciones inyectables. Una columna Phenomenex Synergi Fusion RP-80 C₁₈ (150 x 4.60 mm, 4 μ m) fue usada para la separación, utilizando elución isocrática con agua: metanol (55:45, v/v) y detección por ultravioleta a 260 nm. El ensayo microbiológico (bioensayo) fue realizado utilizando el método por difusión en agar, empleando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1600 como microorganismo test y medio antibiótico 19 como medio de cultivo. Los dos métodos resultaron válidos y fueron aplicados para la determinación cuantitativa de fluconazol, demostrando buena linealidad, precisión y exactitud. Los ensayos fueron lineales en la franja de concentración de 25-200 μ g ml⁻¹, para el método por HPLC y 25-400 μ g ml⁻¹, para el método microbiológico. La precisión de los métodos fue determinada como repetibilidad (DPR 0,18%, por HPLC y 3,0% por el bioensayo) y precisión intermedia (DPR 0,32%, por HPLC y 4,73% por el bioensayo). La exactitud fue determinada y la recuperación media encontrada fue 99,25%, por HPLC y 98,89% por el bioensayo. Los dos métodos propuestos resultaron válidos y pueden ser empleados para el análisis de rutina de fluconazol en preparaciones farmacéuticas inyectables.

KEY WORDS: Fluconazole; Injectable solutions; HPLC; Microbiological assay

PALABRAS CLAVE: Fluconazol; Soluciones inyectables; HPLC; Ensayo microbiológico

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: crolim@smail.ufsm.br