

ACTUALITĂȚI ÎN DEZVOLTAREA, PREPARAREA/ PRODUCEREA, ANALIZA ȘI CONTROLUL MEDICAMENTELOR

ARTICOLE IN EXTENSO

CZU: 615.254.1.014.4

DETERMINAREA STABILITĂȚII SPIRONOLACTONEI LA INFLUENȚA FACTORILOR DE STRES

DETERMINATION OF SPIRONOLACTON STABILITY UNDER THE INFLUENCE OF STRESS FACTORS

Ecaterina MAZUR^{1*}, Cristina COJOCARI², Eugen DIUG³, Sergiu PARIU¹,
Vladimir VALICA^{1,2}, Livia UNCU^{1,2}

¹Centrul de Dezvoltare a Medicamentului, ²Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică,
³Catedra de tehnologie a medicamentelor, Universitatea de Medicină și Farmacie „Nicolae
Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent*: ecaterina.mazur@usmf.md

Rezumat: Acest articol explorează stabilitatea spironolactonei într-o formulare farmaceutică combinată sub influența diferiților factori de stres, inclusiv aciditatea, alcalinitatea, oxidarea, lumina și temperatura ridicată. Testele au fost efectuate conform Farmacopeei Europene și au inclus expunerea probei la condiții de degradare forțată pentru a analiza procesele de degradare și pentru a identifica produsele de degradare. Metoda spectrofotometrică a fost utilizată pentru analiza probelor, iar parametrii de validare, cum ar fi liniaritatea, precizia și specificitatea, au asigurat acuratețea rezultatelor. Studiul a demonstrat că spironolactona este susceptibilă la degradare în condiții de stres acid și bazic, oxidare intensă și temperaturi ridicate, observându-se creșterea concentrației aparentă a substanței datorită formării de produse de degradare absorbante la aceleași lungimi de undă. Cele mai semnificative modificări s-au produs în mediul soluțiilor 1M de NaOH și 3% de H₂O₂, unde spironolactona a suferit degradare completă după 3 ore. De asemenea, expunerea la temperatură ridicată și la radiații UV a dus la creșteri moderate ale concentrației, iar lumina naturală a avut un impact mai redus. Rezultatele sugerează necesitatea unor condiții stricte de depozitare pentru menținerea stabilității spironolactonei și subliniază importanța evaluării stabilității în cadrul dezvoltării și autorizării farmaceutice.

Cuvinte-cheie: degradare, stabilitate, factori de stress, spironolactona

Summary: This article explores the stability of spironolactone in a combined pharmaceutical formulation under the influence of various stress factors, including acidity, alkalinity, oxidation, light, and high temperature. The tests were conducted according to the European Pharmacopoeia and included exposing the sample to forced degradation conditions to analyse degradation processes and identify degradation products. A spectrophotometric method was used for sample analysis, with validation parameters such as linearity, precision, and specificity ensuring the accuracy of results. The study demonstrated that spironolactone is susceptible to degradation under acidic and basic stress conditions, intense oxidation, and high temperatures, with an apparent increase in concentration observed due to the formation of degradation products that

absorb at the same wavelengths. The most significant changes occurred in 1M NaOH and 3% H₂O₂ solutions, where spironolactone underwent complete degradation after 3 hours. Additionally, exposure to high temperature and UV radiation led to moderate increases in concentration, while natural light had a lesser impact. The results suggest the necessity of strict storage conditions to maintain spironolactone stability and highlight the importance of stability evaluation during pharmaceutical development and authorization.

Key words: degradation, stability, stress factors, spironolactone

INTRODUCERE

Determinarea stabilității unui medicament este o etapă esențială în procesul de dezvoltare și autorizare a acestuia. Această etapă asigură că produsul farmaceutic își menține siguranța, eficacitatea și calitatea pe întreaga perioadă de valabilitate, atunci când este depozitat și utilizat în condiții corespunzătoare. Stabilitatea medicamentului este influențată de mai mulți factori, inclusiv proprietățile fizico-chimice ale substanței active, formularea produsului, condițiile de depozitare și tipul de ambalaj utilizat.

În cadrul Centrului de Dezvoltare a Medicamentului a USMF „Nicolae Testemițanu” se petrec studii de elaborare a unui nou produs combinat cu conținut de spironolactonă. S-a efectuat testarea stabilității acestuia la acțiunea factorilor de stres, în conformitate cu rigorile Farmacopeei Europene ed. X. (*forced degradation testing*). Aceasta metodă presupune expunerea intenționată a produsului la condiții extrem de stresante – cum ar fi acizi, baze, agenți oxidativi și reducători, temperaturi înalte, expunerea la lumină naturală și la radiații ultraviolete – pentru a accelera procesele de degradare ale substanțelor active și ale excipienților. Scopul acestei testări este identificarea produselor de degradare și evaluarea stabilității substanței active sub influența diferiților factori de mediu.

Pentru analiza produselor de degradare generate în urma acțiunii acestor factori, s-a utilizat metoda spectrofotometrică, cunoscută pentru rapiditatea, precizia și repetabilitatea înaltă a rezultatelor, precum și pentru caracterul său nedistructiv. Metoda de analiză a spironolactonei din pulberea combinată a fost elaborată și validată prin parametri esențiali, cum ar fi liniaritatea, precizia, exactitatea, limita de detecție (LOD), limita de cuantificare (LOQ) și specificitatea, asigurând o evaluare robustă și de încredere a stabilității acestei substanțe farmaceutice.

SCOPUL LUCRĂRII

Evaluarea stabilității spironolactonei în forma farmaceutică combinată la acțiunea factorilor de stres.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru evaluarea stabilității spironolactonei (Spir) din pulberile combinate, a fost utilizată metoda spectrofotometrică, cu ajutorul unui spectrofotometru Agilent 8543 (SUA) și cuve de cuarț de 10 mm. Absorbanța a fost măsurată la lungimea de undă maximă (λ_{max}) de 240 ± 2 nm, utilizând metanolul (CentroChem, Polonia) ca soluție de referință.

În acest studiu, au fost utilizate următoarele materiale:

- Standard de spironolactonă (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, Strasbourg);
- Reagenți de puritate analitică: soluții de HCl 0,1 M și 1 M (ChemLab, Belgia), soluții de NaOH 0,1 M și 1 M (Riedel-deHaen, Germania), soluții de H₂O₂ 0,1%, 1% și 3% (CentroChem, Polonia);
- Cameră cu lampă ultravioletă (UV) pentru expunere la radiații de 254 nm și 365 nm;
- Termostat setat la $60 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Baie cu ultrasunete (Sapfir, Sankt-Petersburg).

Prepararea soluțiilor standard și a probelor

Prepararea soluției standard de spironolactonă. Circa 0,0025 g de spironolactonă (masă exactă) sunt introduse într-un balon cotat de 25 ml, dizolvate în 15 ml de metanol (MeOH) și menținute în baie de apă timp de 30 de secunde, cu amestecare periodică. După răcire la temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, volumul este adus la cotă cu același solvent, iar soluția se omogenizează. O alicotă de 1 ml din această soluție (soluția A) este diluată într-un balon cotat de 10 ml, completând volumul cu metanol. Absorbanța soluției finale este măsurată spectrofotometric în cuva de 10 mm, cu metanol ca soluție de referință.

Prepararea soluției probă. Aproximativ 0,21 g de probă (masă exactă de formă farmaceutică) sunt introduse într-un balon cotat de 25 ml și dizolvate în 15 ml de metanol, apoi soluția este menținută în baie de apă timp de 30 de secunde, cu amestecare periodică. După răcirea la $20 \pm 1^\circ\text{C}$, soluția este filtrată prin hârtie de filtru pentru a obține soluția B. O alicotă de 1 ml din soluția B este diluată într-un balon cotat de 10 ml și se adaugă 1 ml de soluție de stres corespunzătoare (0,1 M HCl, 1 M HCl, 0,1 M NaOH, 1 M NaOH, sau H_2O_2 0,1%, 1%, respectiv 3%), completând volumul la cotă cu metanol. Absorbanța fiecărui amestec este măsurată spectrofotometric la intervale de timp de 0 minute, 3 ore și 24 ore, fiecare determinare fiind repetată de cinci ori pentru acuratețe. Spectrul UV-Vis este înregistrat în intervalul 210 – 320 nm, cu $\lambda_{\text{max}} = 239 \pm 2$ nm, iar metanolul servește ca soluție de referință.

Pentru testarea stabilității la factorii de stres fizici, au fost pregătite soluții conform metodei descrise și expuse la radiații ultraviolete (în camera UV), la lumina naturală și la temperatură ridicată (60°C în termostat). Absorbanța acestor probe a fost măsurată la $\lambda = 239 \pm 2$ nm la aceleași intervale de timp (0 minute, 3 ore și 24 ore), pentru a evalua variațiile stabilității spironolactonei sub acțiunea acestor factori de stres.

REZULTATE

Probele de pulberi au fost supuse stresului hidrolitic acid (0,1M, 1M HCl) și bazic (0,1M, 1M NaOH), termic (temperatura de 60°C), fotolitic (lumina zilei și UV) și oxidativ (soluții 0,1%-, 1%- și 3% H_2O_2). Evaluarea gradului de influență a factorilor de stres asupra Spir s-a efectuat la intervale de timp: 0 minute, 3 ore și 24 ore de la acțiunea factorilor de stres. Rezultatele obținute semnalează procese de degradare cu mărirea concentrației datorită formării produselor de descompunere și absorbție în același diapazon al spectrului: pentru Spir cu 38,84% în mediu acid 0,1M HCl (0 min – 59,21%, 3 ore – 101,15%, 24 ore – 105,31%) (Fig. 1) și cu 11,35% în mediu acid 1M HCl (0 min – 86,70%, 3 ore – 101,84%, 24 ore – 103,67%) (Fig. 2).

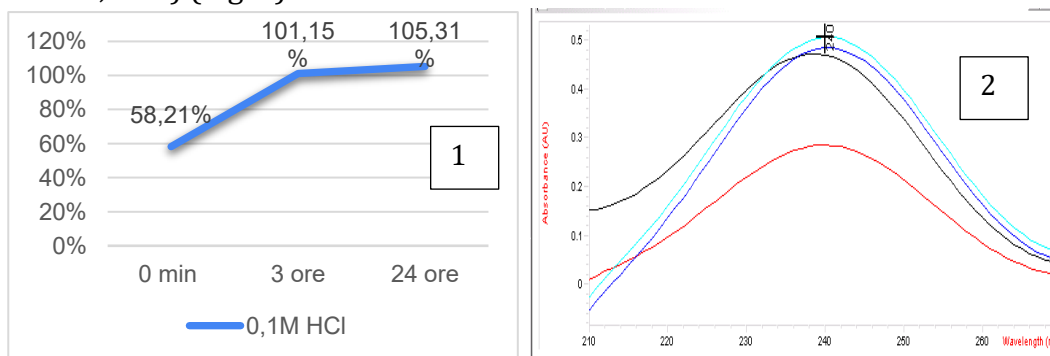


Figura 1. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului hidrolitic acid: soluție 0,1 M HCl

La hidroliză bazică în mediul 0,1M NaOH – 15,1% (0 min – 82,99%, 3h – 65,38%, 24h – 128,09%) (Fig. 3), iar în mediu bazic 1M NaOH la 0 min am avut o concentrație de 139,47%(Fig. 4), după care a avut loc degradarea completă a spironolactonei. Aceleași procese au loc la acțiunea luminii solare cu 4,64% (0 min – 98,55%, 3h – 98,26%, 24h –

103,19%) (Fig. 5), și iradiere UV cu 2,14% (0 min – 97,35%, 3h – 98,46%, 24h – 99,49%) (Fig. 6). Probele supuse stresului termic de 60°C au arătat o schimbare de 23,75% (0 min – 97,60%, 3h – 97,61%, 24h – 121,35%) (Fig. 7).

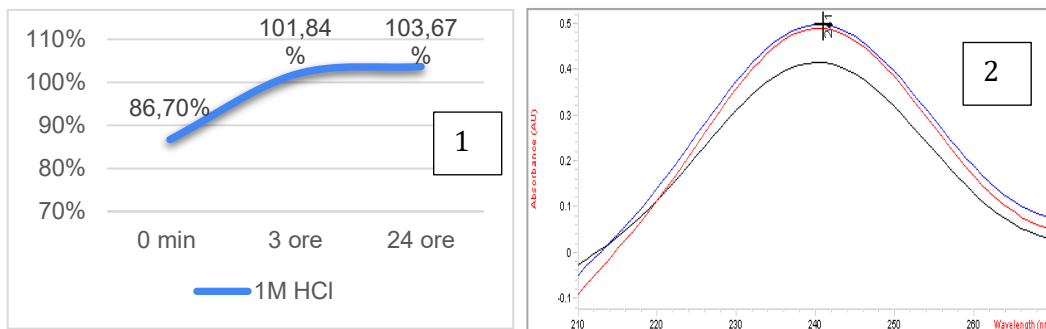


Figura 2. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului hidrolitic acid: soluție 1 M HCl

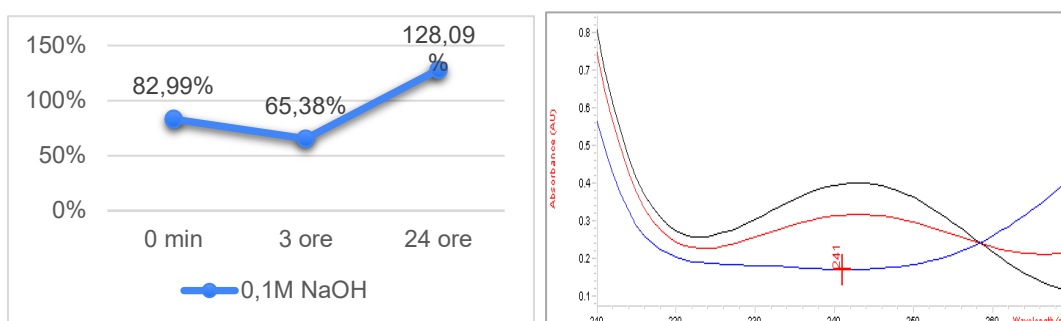


Figura 3. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului hidrolitic bazic: soluție 0,1M NaOH

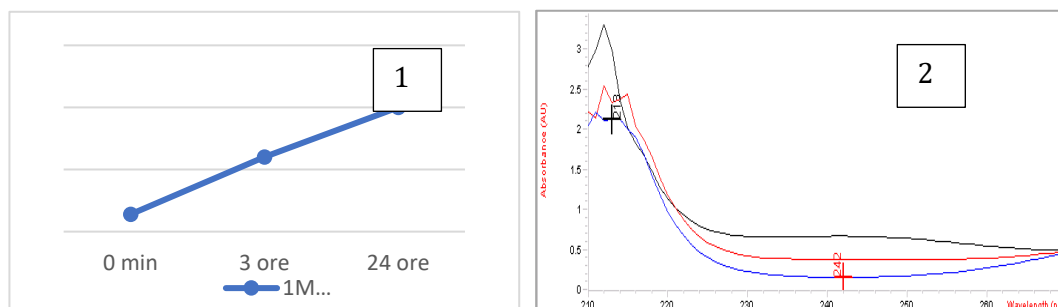


Figura 4. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului hidrolitic bazic: soluție 1M NaOH

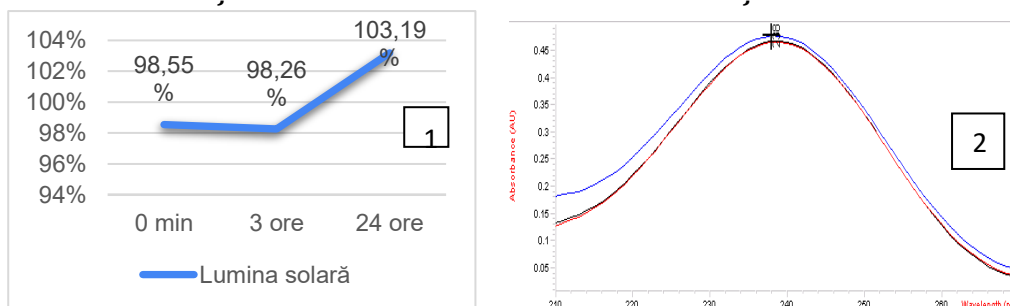


Figura 5. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului fotolitic: lumină solară

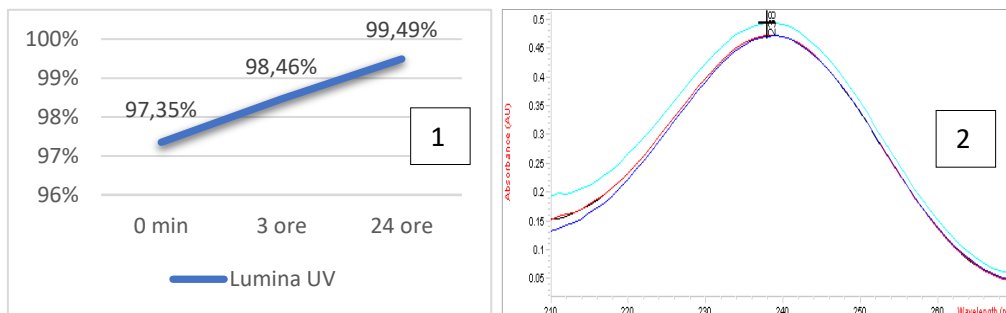


Figura 6. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului fotolitic: iradiere UV

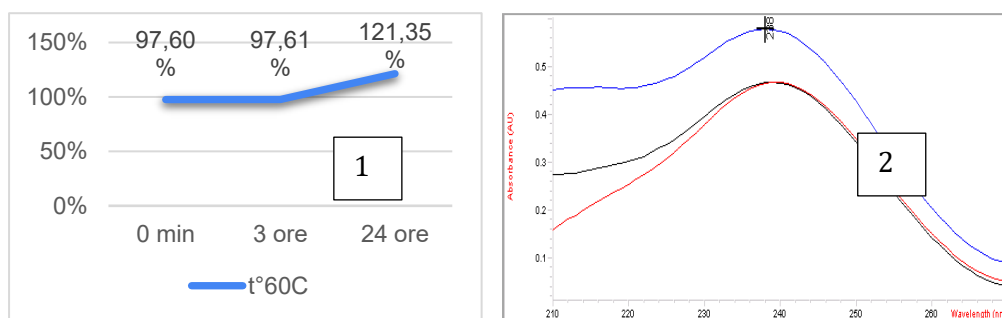


Figura 7. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului termic

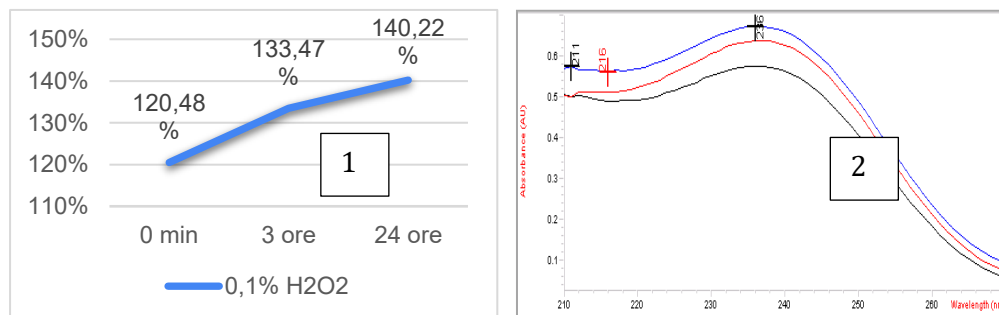


Figura 8. Cinetica degradării (1) și spectrele de absorbție ale Spironolactonei (2) la acțiunea stresului oxidativ: soluție 0,1% H2O2

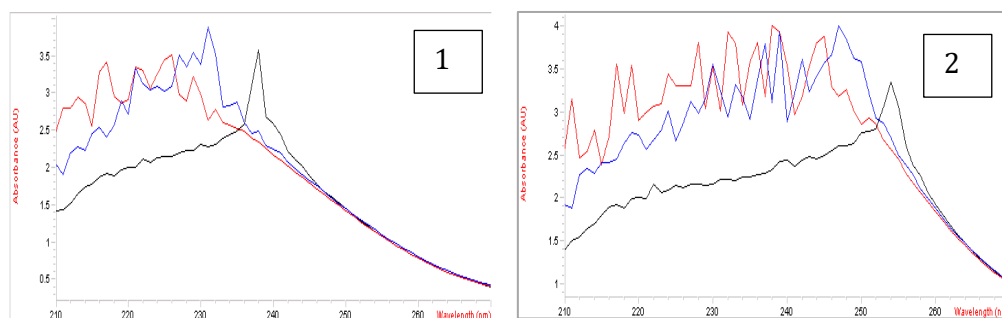


Figura 9. Spectrele de absorbție ale Spironolactonei la acțiunea stresului oxidativ: (1) soluție 1% H2O2; (2) soluție 3% H2O2

La acțiunea stresului oxidativ s-au obținut următoarele Rezultate. 0,1% H₂O₂ – o degradare de 22,43% (0 min – 120,48%, 3h – 133,47%, 24h – 140,22%) (Fig. 8), în mediul de 1,0% H₂O₂ la 0 min am avut o concentrație de 674,55%, apoi o degradare totală, precum și la acțiunea 3,0% H₂O₂ (Fig. 9). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Modificarea concentrațiilor spironolactonei la acțiunea factorilor de stres

	t, min	Ax_1	Ax_2	Ax_3	Ax_4	Ax_5	AxMed	C, %	C, g
0,1M HCL	0 min	0.285	0.284	0.283	0.283		0.284	59.21	0.0142
	3 ore	0.484	0.487	0.485	0.484	0.484	0.485	101.15	0.0243
	24 ore	0.506	0.505	0.504	0.505	0.504	0.505	105.31	0.0253
1M HCL	0 min	0.414	0.416	0.415	0.416	0.416	0.416	86.70	0.0208
	3 ore	0.488	0.489	0.488	0.488	0.489	0.488	101.84	0.0244
	24 ore	0.496	0.497	0.497	0.498	0.498	0.497	103.67	0.0249
0,1M NaOH	0 min	0.402	0.397	0.396	0.399	0.396	0.398	82.99	0.0199
	3 ore	0.317	0.313	0.315	0.310	0.312	0.313	65.38	0.0157
	24 ore	0.607	0.610	0.617	0.616	0.620	0.614	128.09	0.0307
1M NaOH	0 min	0.666	0.672	0.668	0.668	0.669	0.669	139.47	0.0335
	3 ore	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	834.445	0.200
	24 ore	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	834.445	0.200
0,1% H ₂ O ₂	0 min	0.576	0.577	0.578	0.578	0.578	0.578	120.48	0.0289
	3 ore	0.639	0.640	0.640	0.640	0.641	0.640	133.47	0.0320
	24 ore	0.671	0.671	0.674	0.671	0.671	0.672	140.22	0.0337
UV	0 min	0.467	0.466	0.466	0.467	0.467	0.467	97.35	0.0234
	3 ore	0.465	0.469	0.477	0.475	0.474	0.472	98.46	0.0236
	24 ore	0.476	0.477	0.477	0.477	0.477	0.477	99.49	0.0239
Lumina	0 min	0.472	0.473	0.473	0.472	0.472	0.472	98.55	0.0237
	3 ore	0.470	0.471	0.471	0.471	0.472	0.471	98.26	0.0236
	24 ore	0.493	0.495	0.496	0.495	0.495	0.495	103.19	0.0248
t=60C	0 min	0.467	0.468	0.468	0.469	0.468	0.468	878.25	0.2108
	3 ore	0.467	0.469	0.465	0.469	0.470	0.468	97.61	0.0234
	24 ore	0.578	0.579	0.580	0.580	0.591	0.582	121.35	0.0291

CONCLUZII

Rezultatele obținute indică un profil de stabilitate variabil al spironolactonei în funcție de factorii de stres aplicat, evidențiind sensibilitatea sa în special în medii acide și oxidative.

Spironolactona a demonstrat un grad de degradare semnificativ în mediul acid, cu o creștere a concentrației aparentă în 0,1M HCl (de la 59,21% inițial la 105,31% după 24 de ore) și în 1M HCl (de la 86,70% la 103,67%). Acest comportament se poate datora apariției produselor de degradare ce prezintă absorbții similare în spectrul spironolactonei, ceea ce sugerează o instabilitate accentuată în mediu acid. Creșterea observată poate fi explicată prin formarea unor metaboliți care au capacitatea de a absorbi în același diapazon, ducând la o supraestimare a concentrației inițiale.

În mediu bazic (0,1M NaOH), s-a observat o degradare progresivă pe termen scurt (scădere la 65,38% după 3 ore), urmată de o concentrație mărită (128,09%) după 24 de ore. În schimb, în 1M NaOH, spironolactona a suferit o creștere rapidă a concentrației la 139,47%, urmată de degradare completă după 3 ore. Această instabilitate sugerează că spironolactona este susceptibilă la medii alcaline, unde reacțiile de hidroliză pot conduce la produse instabile.

Sub influența luminii solare, degradarea spironolactonei a fost redusă, având o creștere ușoară de la 98,55% la 103,19% după 24 de ore. Similar, expunerea la radiații UV a produs o schimbare nesemnificativă, de la 97,35% la 99,49% în același interval. Aceste rezultate indică o rezistență relativă a spironolactonei la lumina solară și UV, sugerând că factorii fotolitici nu influențează semnificativ stabilitatea moleculei pe termen scurt și mediu.

La expunerea la o temperatură de 60°C, spironolactona a prezentat o stabilitate inițială până la 3 ore, dar a suferit o degradare semnificativă după 24 de ore, cu o creștere de la 97,60% la 121,35%. Această creștere poate indica procese de degradare termică și formarea produselor secundare care absorb în spectrul analizat. Este evident că la temperaturi crescute, spironolactona devine instabilă, generând un profil de descompunere accelerat.

Expunerea la concentrații crescânde de peroxid de hidrogen a dus la degradarea rapidă și completă a spironolactonei. La concentrații de 0,1% H₂O₂, s-a observat o creștere a concentrației la 140,22% după 24 de ore, ceea ce sugerează formarea unor produse de oxidare. În prezența concentrațiilor mai mari (1% și 3% H₂O₂), s-a constatat o degradare completă a spironolactonei imediat după aplicare. Acest lucru confirmă sensibilitatea ridicată a spironolactonei la stresul oxidativ, indicând că această substanță trebuie protejată de agenți oxidanți puternici pentru a menține stabilitatea sa.

Studiul evidențiază că spironolactona este instabilă în medii acide puternice și alcaline, la temperaturi ridicate și în prezența agenților oxidanți. Totodată, moleculele de spironolactonă se comportă stabil în medii fotolitice, sub influența luminii naturale și UV, însă expunerea prelungită la temperaturi înalte și agenți de oxidare accelerează procesele de degradare, fapt ce necesită condiții stricte de depozitare pentru a evita alterarea structurii și eficacității sale.

DECLARAȚIA DE CONFLICT DE INTERESE. Autorii declară lipsa conflictului de interese.

BIBLIOGRAFIE.

1. ICH, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1b adopted in 1996, in Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, 2005.
2. ICH Topic Q 1A (R2), Stability Testing of new Drug Substances and Products. European Medicines Agency. 2003; CPMP/ICH/2736/99.
3. MAZUR, Ecaterina. Determinarea spironolactonei în amestec mecanic cu orotat de potasiu, aspartat de potasiu și magneziu prin spectrofotometrie UV-VIS. In: *Congresul Național de Farmacie*. Ediția a XVIII-a, 15-17 septembrie 2021, Oradea. Oradea-Chișinău : Editura Universității din Oradea, 2021, p. 32. ISBN 978-606-10-2144-4. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/155320
4. Dinc E, Ustundag O. Spectrophotometric Quantitative Resolution of Hydrochlorothiazide and Spironolactone in Tablets by Chemometric Analysis Methods, *Farmaco*, 2003; 58; 1151-61.
5. Parimoo P, Bharathi A and Padma K. Simultaneous Determination of Spironolactone with Hydroflumethiazide and Spironolactone with Frusemide in Combination formulations by UV-Absorption Method, *Indian J. Pharm. Sci.*, 1995; 57(3);126-29
6. FORNEA, Daniela, CERENIUC, Alina, MAZUR, Ecaterina, UNCU, Livia. Evaluarea stabilității extractului de păducel în forme farmaceutice combinate. In: *Importanța consilierii pacientului în utilizarea rațională a medicamentelor*. Ediția a 12-a, 28 octombrie 2023, Chișinău. Chișinău: SRL „Foxtrot”, 2023, pp. 96-99. ISBN 978-9975-89-295-7. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/196050
7. MAZUR, Ecaterina, GANDACOV, Vladilena, UNCU, Livia. Stabilitatea unei forme farmaceutice ototopice combinate în condiții de degradare accelerată. In: *Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. 18-20 octombrie 2023, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: 2023, p. 655. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/195210
8. COJOCARI, Cristina, MAZUR, Ecaterina, DIUG, Eugen, GRITCAN, Ana, UNCU, Livia. Evaluarea gradului de influență a factorilor de stres asupra degradării pulberii combinate. In: *Revista Farmaceutică a Moldovei* . 2024, vol. 53, supl. nr. Supl., pp. 69-70. ISSN 1812-5077. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/213737

MULȚUMIRI. Lucrarea a fost realizată cu suportul Departamentului Cercetare, Centrul de Dezvoltare a Medicamentului al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

ORCID-ul autorilor

Ecaterina Mazur <https://orcid.org/0000-0003-0725-8410>
Cristina Cojocari <https://orcid.org/0009-0004-5272-9132>
Eugen Diug <https://orcid.org/0000-0003-1963-9026>
Sergiu Parii <https://orcid.org/0000-0003-2229-4444>
Vladimir Valica <https://orcid.org/0000-0002-1068-5504>
Livia Uncu <https://orcid.org/0000-0003-3453-2243>