

# ELABORAREA TEHNICII SPECTROFOTOMETRICE UV-VIS DE DOZARE A AZITROMICINEI

<sup>1</sup> Livia Uncu, <sup>1</sup> Mihail Anton, <sup>2</sup> Olga Suvorchina, <sup>1</sup> Elena Bobrov,  
<sup>2</sup> Liviu Movilă, <sup>1</sup> Artiom Osipov

<sup>1</sup>Catedra Chimie Farmaceutică și Toxicologică USMF „N. Testemițanu”

<sup>2</sup>Laboratorul Analiză, standardizare și controlul medicamentelor al CȘDM

## Summary

### *The development of a UV-VIS Spectrophotometric Azithromycin Assay*

The aims of research were to develop a new spectrophotometric Azithromycin assay in pure substance and in capsules, which would be corresponding to all requirements assigned to the instrumental methods of analysis. There were researched the factors which could influence over the assay: solubility, volume, reagent, the stability of coloring compound in time. The technique were been estimated statistically and validated in accordance with linearity, repeatability, sensibility and accuracy. The elaborated technique could be included as alternative assay method in NAD for Azithromycin in capsules.

## Rezumat

În scopul elaborării unei noi tehnici spectrofotometrice de dozare a Azitromicinei-substanță și în capsule, care ar corespunde tuturor exigențelor atribuite metodelor instrumentale de analiză, au fost studiați factorii ce pot influența determinarea: solubilitatea, volumul reagentului, stabilitatea în timp a compusului colorat. Tehnica elaborată, care poate fi inclusă în calitate de metodă alternativă în proiectul DAN pentru capsule operculate cu Azitromicină la capitolul „Dozare”, a fost evaluată statistic și validată după criteriile de liniaritate, repetabilitate, reproductibilitate și exactitate.

## Actualitatea temei

Azitromicina este un reprezentant din grupul azalidelor, subclasă a antibioticelor macrolide. Prezintă un derivat al eritromicinei, de care se deosebește prin prezența în inelul lactonic a unui atom de azot metil substituit (fig. 1), fapt ce conferă preparatului o rezistență sporită față de mediul acid, făcând posibilă administrarea lui perorală fără vreo măsură specială de protecție antiacidă.

Activitatea pronunțată, spectrul larg de acțiune și capacitatea de a realiza concentrații sporite în țesuturi au determinat indicarea Azitromicinei în diverse maladii bacteriene: infecții ale căilor respiratorii superioare și inferioare, infecții ale aparatului excretor, boli venerice, precum și în profilaxia infectării bacteriene la nou-născuți și persoanele imun-deficitar.

Aceste considerente, precum și faptul că Azitromicina posedă cele mai reduse efecte adverse dintre toate macrolidele au făcut ca preparatul dat să fie unul dintre cele mai solicitate antibiotice de pe piața farmaceutică.

Popularitatea crescândă a Azitromicinei necesită implicit metode precise și accesibile de control a calității preparatului, în special a determinării lui cantitative în formele farmaceutice. Luînd în considerație faptul că metoda farmacopeică de dozare este metoda biologică (care necesită condiții și aparataj auxiliar și, respectiv, cheltuieli financiare impunătoare), ne-am propus inițierea cercetărilor în vederea elaborării metodelor alternative.

Una dintre aceste metode este spectrofotometria UV-VIS. Metoda dată, inclusă în proiectul DAN pentru capsule cu Azitromicină RNP la capitolul „Dizolvare”, s-a dovedit a fi inacceptabilă pentru efectuarea determinărilor cantitative a Azitromicinei *en gross* și în forme

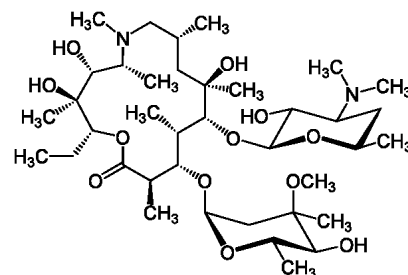


Fig. 1 Formula de structură a Azitromicinei

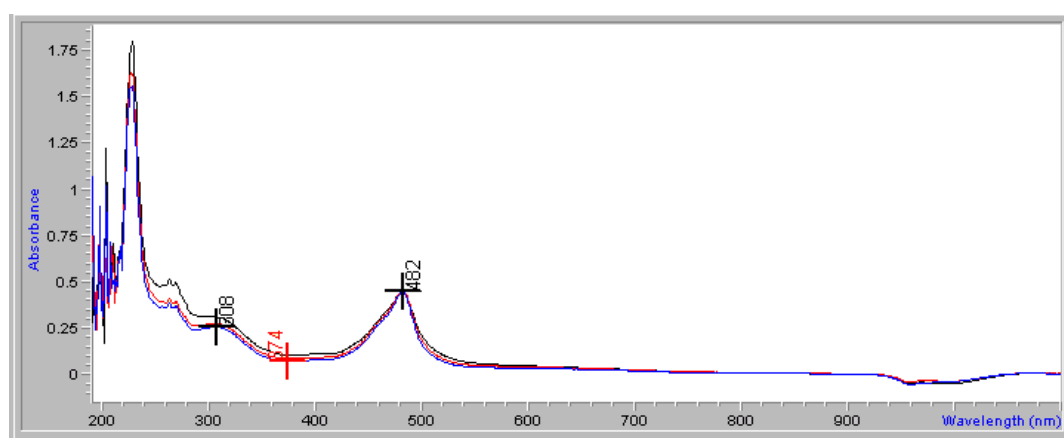
farmaceutice, deoarece la elaborarea ei nu au fost cercetați toți factorii care se implică în întreg procesul de determinare cantitativă și care influențează rezultatul final. De aceea, ne-am propus elaborarea unei noi tehnici spectrofotometrice de dozare a Azitromicinei, care ar fi mai accesibilă decât metoda biologică și care, fiind supusă validării, ar corespunde tuturor exigențelor atribuite metodelor instrumentale de analiză.

### **Materialle și metode**

Metoda elaborată se bazează pe proprietatea Azitromiciei de a reacționa cu acidul sulfuric concentrat, formînd un compus colorat galben-oranj, ce absoarbe radiația electromagnetică în domeniul ultraviolet-vizibil. Ca solvenți am ales soluții tampon fosfat ajustate la diferite valori ale pH-ului; reactivul principal este acidul sulfuric concentrat chimic pur 94%, iar măsurările absorbantei au fost efectuate la spectrofotometrul UV-VIS Agilent – 8453.

### **Rezultate și discuții**

A fost cercetată solubilitatea Azitromicinei. Aceasta s-a dovedit a fi practic insolubilă în apă, precum și în alți solvenți apoși, însă solubilă în soluție de tampon fosfat. Am determinat, că odată cu creșterea valorii pH-ului, solubilitatea Azitromicinei în soluția tampon fosfat scade, de aceea în calitate de solvent pentru întreg procesul de cercetare a fost aleasă soluția tampon fosfat cu valoarea pH-ului ajustată la 7,0. A fost înregistrat spectrul de absorbție al compusului complex Azitromicină-acid sulfuric concentrat în intervalul de lungimi de undă de la 200 la 900 nm (fig.2).



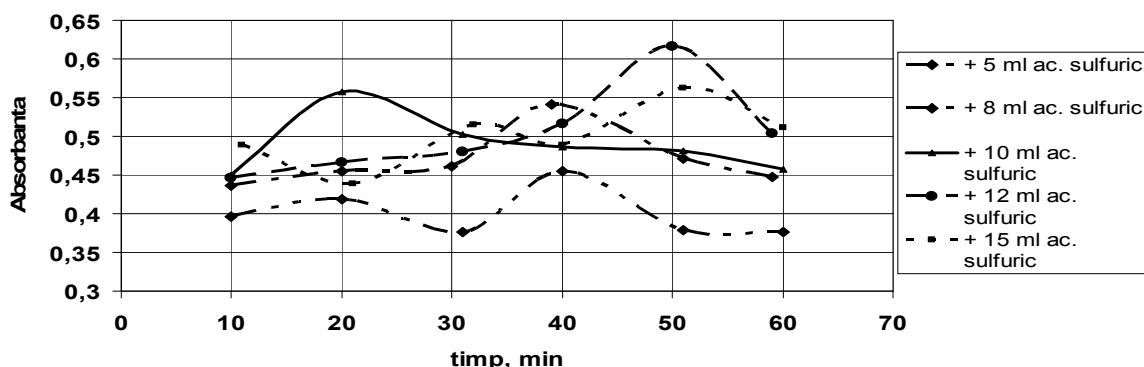
**Fig. 2. Spectrul de absorbție al compusului colorat Azitromicină – acid sulfuric concentrat**

În acest interval se atestă 2 maxime: cel de la 235 nm, care este un domeniu UV apropiat, de aceea nu poate servi drept bază pentru cercetarea absorbției unui compus colorat și un maxim bine conturat la 482 nm, ce aparține compusului cercetat, care și a fost selectat drept lungime de undă analitică pentru toate determinările ulterioare.

A fost cercetată stabilitatea în timp a compusului colorat, în dependență de volumul reagentului și pH-ul mediului reactant. S-a determinat variația concentrației în funcție de timp, precum și în dependență de volumul reagentului adăugat. Valori maxime au fost obținute la adăugarea a 10 ml de acid sulfuric concentrat. Cantitățile mai mici nu asigurau formarea compusului, iar excesul de reagent mărește timpul de interacțiune. Totodată, în procesul cercetărilor s-a determinat, că odată cu mărirea volumului de acid sulfuric concentrat, pH-ul mediului reactant se deplasează spre cel acid: valoarea lui scade direct proporțional cu volumul reagentului. Astfel, s-a determinat că valorile maxime ale concentrației Azitromicinei în compusul complex se obțin la Ph 1,0, ceea ce corespunde volumului optim stabilit de 10,0 ml de acid sulfuric concentrat. Fluctuațiile absorbantei compusului complex se micșorează peste circa

20 min după adăugarea reagentului, iar peste 30 min se obțin valori constante (fig. 3, curba 3 - linia neîntreruptă).

Fig. 3 Stabilitatea în timp a compusului colorat în funcție de volumul reagentului



Pentru determinarea intervalului de concentrații în domeniul căruia se respectă legea absorbantei a fost construită dependența absorbantei de concentrația Azitromicinei pentru o serie de soluții standard (fig. 4).

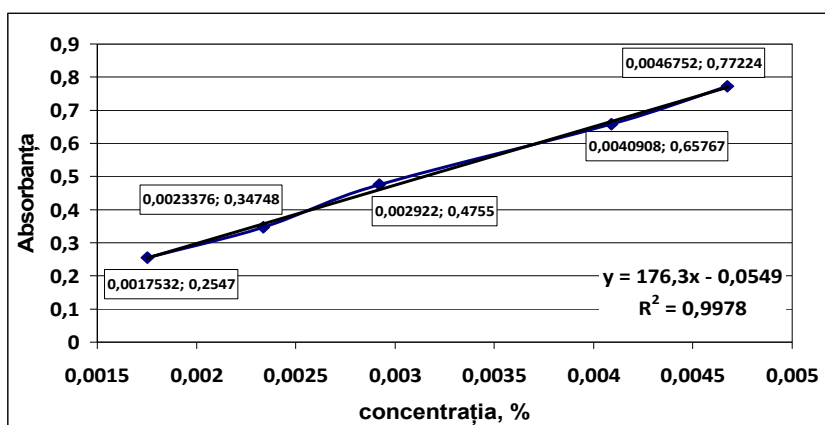


Fig. 4 Curba de etalonare a compusului colorat Azitromicină – acid sulfuric conc.

S-a stabilit, că domeniul de liniaritate este cuprins în intervalul de concentrații de la 15  $\mu\text{g/ml}$  până la 50  $\mu\text{g/ml}$ . Pe baza curbei de etalonare a fost calculată valoarea absorbantei specifice a compusului complex  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 155$ .

Ținând cont de factorii elucidați, a fost elaborată tehnica de dozare spectrofotometrică în VIS a Azitromicinei: 0,03 g (masă exactă) de Azitromicină se aduce într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă în aproximativ 70 ml de soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,0 și se completează până la cotă cu același solvent (soluția A). 2,5 ml din soluția A se aduc într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă 10 ml (volum exact) de acid sulfuric concentrat și se aduce până la cotă cu soluție tampon fosfat cu pH 7,0 (soluția B). După 30 minute se măsoară absorbanta soluției B la spectrofotometru, la lungimea de undă de 482 nm, în cuva cu grosimea de 10 mm, folosind în calitate de soluție de compensare amestecul acid sulfuric concentrat - soluție tampon fosfat pH 7,0 în raport de 1:1,5. Paralel se măsoară absorbanta soluției standard de concentrația 30  $\mu\text{g/ml}$ , care a fost supusă aceleiași reacții.

Conținutul Azitromicinei în substanță se calculează conform formulei:

$$X(\%) = \frac{A_x \times m_{st} \times 100 \times 25 \times 2,5}{A_{st} \times m_x \times 2,5 \times 100 \times 25} \times 100\%$$

în care:

$A_x$  - absorbanța soluției probă de analizat;

$A_o$  – absorbanța soluției etalon de Azitromicină;

$m_o$  – masa probei de Azitromicină utilizată la prepararea soluției etalon, g;

$m_x$  – masa probei de analizat, g;

A fost efectuată evaluarea statistică a rezultatelor dozării Azitromicină în substanță pentru un prag de siguranță de 95% (Tabelul 1), care ne-a permis determinarea erorii relative a măsurărilor:  $\Delta_x = 2,253\%$ .

A fost efectuată validarea tehnicii spectrofotometrice elaborate după criteriile de repetabilitate și reproductibilitate. A fost determinată valoarea mediei globale – 98,39%; abaterea tip relativă a repetabilității – 1,666%; intervalul de siguranță – 3,05%; abaterea relativă standard (RSD) – 1,699%; abaterea tip relativă a reproductibilității – 0,745%; valoarea reproductibilității ( $CV_R$ ) – 0,755%. Condiția de admisibilitate prevede că o metodă poate să fie considerată reproductivă dacă  $RSD$  și  $CV_R \leq 2$ . După cum se observă, condiția este îndeplinită, deci metoda este repetabilă și reproductibilă.

Tabelul 1

**Evaluarea statistică a rezultatelor dozării Azitromicină în substanță**

Seria	X, %	$X_{med}$	T	$S^2$	S	Sx	$\epsilon_a$	$\Delta_x$ , %
01	97.86	98,03	3,18	2,777	1,666	0,962	3,0596	3,121
	99.78							
	96.46							
02	97,95	98,74	3,18	0,555	0,745	0,430	1,3678	1,385
	98,84							
	99,43							
								$\Delta_x = 2,253\%$

Pentru exprimarea exactității măsurărilor efectuate a fost determinată oblicitatea experimentală conform curbei de regresie, determinată în cadrul intervalului de liniaritate  $X_r/X_a \cdot 100$ , unde  $X_a$  reprezintă cantitatea de substanță luată pentru analiză, iar  $X_r$  – cantitatea de substanță regăsită (Tabelul 2)

Tabelul 2

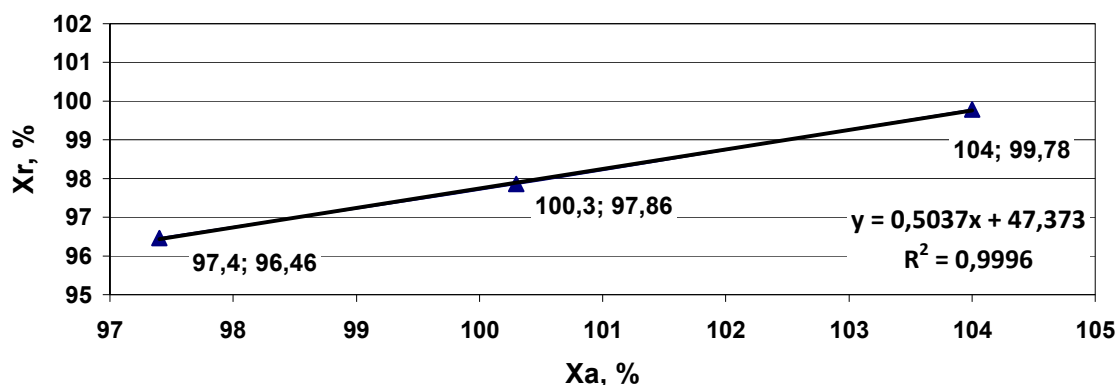
**Evaluarea exactității a metodei elaborate în intervalul de liniaritate**

Determinarea	$m_{st}$ , g	$X_a$ , %	$X_r$ , %	$X_d =  X_r - X_a $ , %
1.	0,03120	104,0	99,78	2,14
2.	0,03009	100,3	97,86	0,22
3.	0,02922	97,4	96,46	3,54

Curba de regresie construită (fig.5) este practic perfect liniară, cu un coeficient de abatere de circa 0,9996, iar oblicitatea acestei curbe este coerentă, cu o deplasare acceptabilă pentru metodele spectrofotometrice de dozare.

Tehnica spectrofotometrică elaborată a fost adaptată pentru determinarea cantitativă a conținutului de Azitromicină în capsule operculate 0,500 g și 0,250 g: 0,04 g (masă exactă) din conținutul unei capsule de 0,500 g sau 0,05 g (masă exactă) din conținutul unei capsule de 0,250 g se aduce într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă în aproximativ 70 ml de soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,0 și se completează pînă la cotă cu același solvent. Soluția obținută se filtrează prin filtru de hîrtie „bandă albastră”, aruncînd primele 10 ml de filtrat. 2,5 ml din soluția filtrată se aduc într-un balon cotat de 25 ml, se adaugă 10 ml (volum exact) de acid sulfuric concentrat și se aduce pînă la cotă cu soluție tampon fosfat cu pH 7,0.

Fig. 5 Curba de regresie  $X_r/X_a$



După 30 minute se măsoară absorbanta soluției colorate la spectrofotometru, la lungimea de undă de 482 nm, în cuva cu grosimea de 10 mm, folosind în calitate de soluție de compensare amestecul acid sulfuric concentrat – soluție tampon fosfat pH 7,0 în raport de 1:1,5. Paralel se măsoară absorbanta soluției standard de concentrația 30  $\mu\text{g/ml}$ , care a fost supusă aceleași reacții.

Conținutul Azitromicinei în capsule se calculează conform formulei:

$$X(g) = \frac{A_x \times m_{st} \times 100 \times 25 \times 2,5}{A_{st} \times m_x \times 2,5 \times 100 \times 25} \times P$$

în care:

$A_x$  – absorbanta soluției probă de analizat;

$A_o$  – absorbanta soluției standard de Azitromicină;

$m_o$  – masa probei de Azitromicină utilizată la prepararea soluției standard, g;

$m_x$  – masa probei de analizat, g;

$P$  – masa medie a capsulelor, g;

A fost efectuată evaluarea statistică a rezultatelor dozării Azitromicinei în capsule 0,500 pentru un prag de siguranță de 95% (Tabelul 3), care ne-a permis determinarea erorii relative a măsurărilor:  $\Delta_x = 3,020\%$ .

Tabelul 3

Evaluarea statistică a rezultatelor dozării Azitromicinei în capsule 0,500

Seria	X, g	$X_{med}$	T	$S^2$	S	$S_x$	$\epsilon_a$	$\Delta_x, \%$
01	0,48374	0,49708	2,78	$1,171 \times 10^{-4}$	$1,082 \times 10^{-2}$	$0,541 \times 10^{-2}$	$1,50398 \times 10^{-2}$	3,020
	0,51008							
	0,49859							
	0,49592							

### Concluzii

1. Au fost studiați factorii ce pot influența dozarea spectrofotometrică a Azitromicinei (solubilitatea, volumul reagentului, stabilitatea în timp, pH-ul compusului colorat);
2. A fost elaborată tehnica de dozare spectrofotometrică a Azitromicinei în substanță și în capsule operculate;
3. Tehnica elaborată a fost evaluată statistic și validată după criteriile de liniaritate, repetabilitate, reproductibilitate și exactitate;
4. Tehnica elaborată poate fi inclusă, în calitate de metodă alternativă, în proiectul DAN pentru capsule operculate cu Azitromicină la capitoul „Dozare”.

## **Bibliografie**

1. **Balaescu C.**, Metode spectrofotometrice aplicate în controlul medicamentelor, *Editura medicală, București, 1996*;
2. **Farmacopeea Română**, Ed. a X-a, Editura medicală, București, 2000;
3. **Farmacopeea Europeană**, Ed. a IV-a, 2002;
4. **Iurie Tihon, Livia Uncu, Vladimir Valica, Oxana Vislouh, Roman Ciobanu**, Elaborarea metodei spectrofotometrice de dozare a metiferonului, *Anale științifice a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2008*;
5. **Liviu Roman, Marius Bojita, Robert Sandulescu, Radu Oprean**, Analiza și controlul medicamentelor (vol. 1: Bazele teoretice și practice; vol. 2: Metode instrumentale în analiza și controlul medicamentelor), Ed. Intelcredo, 2003.

## **PERSPECTIVE DE ELABORARE ȘI UTILIZARE A PREPARATELOR MEDICAMENTOASE NOI. FLORALGHIN GEL ȘI FLORALGHIN UNGUENT**

**Liliana Rusnac, Aureliu Postolachi, Sergiu Parii, Gheorghe Dodu, Vladimir Valica**

Centrul Științific în Domeniul Medicamentului de pe lângă  
USMF „Nicolae Testemițanu”, Î.S. S.P.B. „Constructorul”

### **Summary**

*Perspectives of elaboration and medical use of new drugs.  
Floralghin gel and Floralghin ointment*

The project of innovation and technological transfer “Implementation of Floralghin, ointment and dental adhesive paste in medical practice” N 09.824.09.101T intends to elaborate and place into medical use two new domestic drugs. The drugs Floralghin, ointment and dental adhesive paste are made according to a innovative formula, on the base of standardized extracts from medicinal plants *Arnica montana*, *Symphytum officinalis* and *Matricaria chamomilla*, also *Apis mellifera*. The methods of extraction and processing of those new compositions and the original formula determines the optimal therapeutic effects.

### **Rezumat**

În cadrul proiectului de inovare și transfer tehnologic „Implementarea în practica medicală a produselor Floralghin, unguent și Floralghin, pastă dentară adezivă” N 9.824.09.101T se preconizează elaborarea și implementarea terapeutică a două produse indigene noi. Produsele Floralghin, unguent și pastă dentară adezivă sunt fabricate după formule originale, având la bază extracte standardizate și controlate în nivelul de substanțe active a plantelor *Arnica montana*, *Symphytum officinalis* și *Matricaria chamomilla*, precum și *Apis mellifera*. Metodele de extracție și procesare a acestor compoziții noi, precum și formula originală asigură obținerea unor efecte terapeutice scontate optime.

Medicina naturistă, veche de mii de ani, cunoaște astăzi o renaștere în climatul modern de interes fără precedent față de vindecarea naturală și de insatisfacție față de medicina convențională. Numeroase reacții adverse la medicina clasică, înregistrate anual determină pe bolnavi în primul rând să caute o medicație care să nu le facă rău ci numai bine. De aceea asistăm în ultimul timp, la o creștere vertiginoasă a utilizării plantelor medicinale și aromatice, atât ca materii prime în industria de medicamente cât și sub forme simple tradiționale chiar și în țările cu o industrie farmaceutică foarte dezvoltată [4].

Tehnicile terapiei naturale s-au îmbogățit simțitor în toată lumea; s-au acumulat date importante de cercetare fundamentală, s-au nuanțat foarte mult metodele de individualizare, s-au mărit numărul de medici, laboratoare, farmacii, institute care lucrează în acest domeniu. Astăzi progresele fitoterapiei depind în mare măsură de cunoașterea compoziției chimice a produsului