

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О.**  
**БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ**

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Оптимізація кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом».**

Виконала: здобувач вищої освіти 5-го курсу, групи 9801  
фармацевтичного напрямку підготовки 226 Фармація,  
промислова фармація

Чхало Олександра Віталіївна

Керівник:

Професор кафедри аналітичної, фізичної та колоїдної хімії,  
кандидат хімічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент : завідувачка кафедри хімії ліків та лікарської  
токсикології, д.мед.н., професор Ніженковська Ірина  
Володимирівна

**Київ – 2024**

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
Основна частина. Розділ 1. Азитроміцин, методи визначення.	8
1.1. Застосування азитроміцину.	8
1.2. Фізико-хімічні властивості азитроміцину.	8
1.3. Механізм та метаболізм азитроміцину.	10
1.4. Протипоказання, побічні ефекти та взаємодія з іншими лікарськими засобами.	10
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення азитроміцину.	12
1.6. Використання спектрофотометрії в аналізі речовин.	13
Розділ 2. Експериментальна частина.	16
2.1. Матеріали та методи.	16
2.1.1. Мета дослідження.	16
2.1.2. Об'єкти дослідження.	16
2.1.3. Посуд та обладнання.	17
2.1.4. Реактиви.	17
2.1.5. Методики та умови приготування розчинів.	18
2.1.6. Методики спектрофотометричного визначення.	20
2.1.7. Кількісне визначення аналізованої речовини.	20

Розділ 3. Результати та обговорення.	21
3.1. Часткова валідація методики.	25
3.1.1. Перевірка лінійності методики.	25
3.1.2. Перевірка стабільності розчинів у часі.	26
3.1.3. Робасність.	28
3.1.4. Специфічність методики.	28
3.1.5. Перевірка методики на правильність.	29
Висновки.	30
Список використаних джерел.	31
Додатки.	33
Анотація (Summary).	40

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

УФ - ультрафіолетова спектрофотометрія

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

НМУ – Національний медичний університеті мені О.О. Богомольця

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

д.р.- діюча речовина

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр поглинання

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С<sup>0</sup> – градуси Цельсія

## ВСТУП

Макролідами називають хімічні сполуки, які містять у своєму складі макроциклічне лактонне кільце. Макроліди відносять до антибіотиків і станом на сьогодні налічують більше десяти. До складу лактонного кільця може входити різна кількість атомів карбону, тому розрізняють 14-15- та 16-членні цикли [1]:

14-членний макролід	15-членний макролід	16-членний макролід
Еритроміцин	Азитроміцин	Спіраміцин
Олеандоміцин		Мідекаміцин
Рокситроміцин		Джозаміцин
Диритроміцин		Міокаміцин
Кларитроміцин		Рокітоміцин
Флуритроміцин		

В залежності від способу отримання, макроліди класифікують на природні (еритроміцин, спіраміцин тощо) та синтетичні (кларитроміцин, флуритроміцин, азитроміцин тощо) речовини.

Будова ланцюгів макролідів впливає на їх властивості та характеристики, переносимість, взаємодію з іншими речовинами, але всі вони проявляють антибактеріальну активність. У 90-х роках минулого сторіччя азитроміцин був виведений на ринок фармацевтичних препаратів та на початку 21 сторіччя став лідером при лікуванні інфекцій дихальних шляхів.

Вважають, що макроліди відносяться до найменш токсичних антибіотиків і застосовуються при лікуванні інфекцій у випадках

непереносимості пеніцилінів. Спектр антимікробної активності сполук з цього класу є достатньо широким, природну стабільність по відношенню до дії макролідів мають грамнегативні мікроорганізми родини ентеробактеріаце, псевдомонади, ацинетобактерів [1].

**Актуальність теми:** У зв'язку із вищезазначеним, актуальним на сьогодні є розробка нових та оптимізація відомих методик кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах.

**Мета:** Оптимізація методики кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах спектрофотометричним методом.

**Завдання:**

1. Спираючись на сучасні наукові розвідки провести бібліосемантичний аналіз щодо застосування лікарських засобів з азитроміцином, визначити його властивості та фармакологію, механізм дії азитроміцину та метаболізм азитроміцину.
2. Проаналізувати методики ідентифікації та кількісного визначення азитроміцину у субстанції та лікарських засобах.
3. Спираючись на сучасні наукові дослідження оптимізувати методику кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах методом спектрофотометрії.
4. Провести часткову валідацію методики спектрофотометричного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах.

**Методи дослідження:** бібліосемантичний, спектрофотометрія.

***Новизна та значення одержаних результатів:***

В результаті проведеного дослідження пропонується оптимізація кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах методом спектрофотометрії.

***Апробація результатів дослідження.*** Результати роботи були представлені на Міжнародній мультидисциплінарній науковій інтернет-конференції (м. Тернопіль, Україна, м. Ополе, Польща, 21-22 березня 2024 р.)

***Структура роботи.*** Робота представлена на 41 сторінці, додатків -2, рисунків- 4, таблиць- 4.

## ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Азитроміцин, методи визначення.

### 1.1 Застосування азитроміцину.

Сполука азитроміцин відноситься до макролідного антибіотика і є єдиним представником, який з хімічної точки зору відноситься до азалідів. У медицині та фармації азитроміцин застосовують при терапії хронічного обструктивного захворювання легень, синуситах, нерідко при інфекційних ураженнях шкіри, уретриті, виразках у чоловіків та оториноларингологічних інфекціях (наприклад, тонзиліті), тобто азитроміцин гальмує дію бактерій *Haemophilus influenzae*, *Moraxellacatarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*. Азитроміцин знайшов місце і у комплексній комбінованій терапії з гідроксихлорхіноном проти вірусу COVID-19 [2-7].

### 1.2 Фізико-хімічні властивості азитроміцину.

За IUPAC азитроміцин називають (2R,3S, 4R,8R, 10 R 11R, 12S, 13S, 14R)-13-[(2,6-дидеокси-3-С-метил-3-О-метил- $\alpha$ -L-рибогексопіранозил)окси]-2-етил-3,4,10-тригідрокси-3,5,6,8,10,12,14-гептаметил-11-[[3,4,6-тридеоокси-3-(диметиламіно)- $\beta$ -D-ксило-гексопіранозил]окси]-1-окса-6-азациклопентадекан-15-он (Рис.1). Це кристалічна сполука, майже білого кольору, з поганою розчинністю у воді. Азитроміцин добре розчиняється у етиловому спирті, деяких інших розповсюджених органічних розчинниках (метиленхлориді, диметилсульфоксиді тощо). Нижче наведено деякі фізико-хімічні характеристики азитроміцину:

Брутоформула:  $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot xH_2O$  ( $x = 1$  або  $2$ );

Молекулярна маса 749,0 г/моль;

Температура плавлення 113°C-115°C [8]:



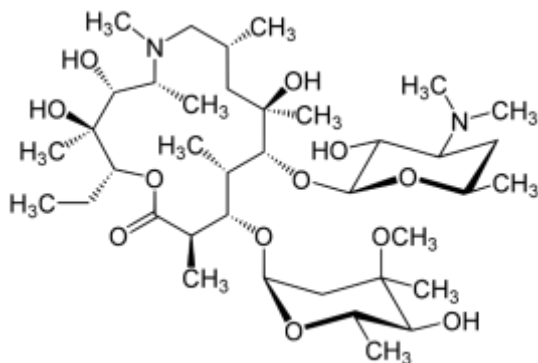


Рис.1. Азитроміцин [1].

Зберігають препарат без доступу повітря.

Сполуку азитроміцин вперше синтезували у 1980 році науковці американської хімічної лабораторії PLIVA Laboratories з еритроміцину за нижчезазначеною схемою через стадії оксимації, перегрупування Бекмана, відновлення та N-метилювання (Рис.2.) [8]:

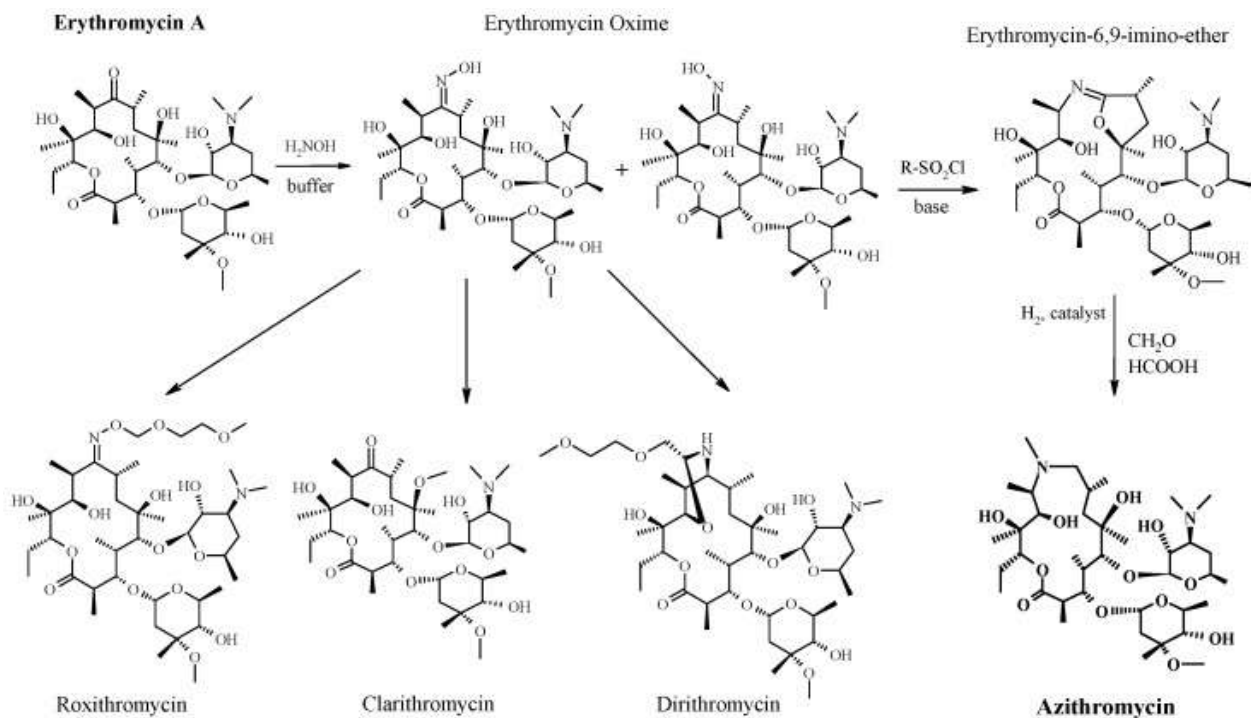


Рис. 2. Синтез азитроміцину.

### **1.3. Механізм та метаболізм азитроміцину.**

Азитроміцин проявляє антимікробну властивість завдяки блокуванню вихідного тунелю білка, пригнічує синтез цитокінів та іновазію нейтрофілів, змінює поляризаційний вектор макрофагу оскільки зв'язує компонент 50S, який входить до рибосомальної субодиноці з субодиноцею 70S. При цьому синтез білка гальмується зі зростанням кількості антибіотика, особливо антимікробна властивість збільшується у лужному середовищі (азитроміцин зв'язується у ділянці поруч з центром пептилтрансферази на 23SpPHK і частково закупорює канал виходу насцентного пептиду) [2-8].

Науковими розвідками було доведено, що азитроміцин здатний модулювати імунну систему організму шляхом зменшення синтезу цитокінів, запобігає фіброзу легенів та зміцнює цілісність епітелію. Біодоступність при внутрішньому прийомі азитроміцину досягає 40 відсотків, середній плазмовий кліренс одноразової дози у 500 мг становить 630 мл/хв. Метаболіти азитроміцину не проявляють антимікробної активності, процес метаболізму здійснюється через печінку разом з жовчю. Також азитроміцин виводиться з організму разом з сечею та калом і період напіввиведення становить майже три доби. По відношенню до еритроміцину слід відмітити, що азитроміцин вважається майже удвічі менш токсичним і за стабільністю у кислому середовищі теж є значно кращим препаратом ніж інші [2-8].

### **1.4. Протипоказання, побічні ефекти та взаємодія з іншими лікарськими засобами.**

На жаль, азитроміцин, як і кожний антибіотик, має низку протипоказань, а саме:

- Препарат не може бути використаний у терапії при підвищеній чутливості організму до макролідних антибіотиків;
- При хронічних захворюваннях печінки, жовтяниці та певних печінкових дисфункціях.

При прийомі препарату можуть спостерігатися побічні ефекти, а саме:

- Клінічне ураження печінки, гепатит, біль у животі і інші дисфункції, які пов'язані із роботою шлунково-кишкового тракту;
- Лихоманка та еозинофілія;
- Алергічні прояви (свербіж);
- Усі різновиди еритеми;
- Офтальмологічні розлади;
- Запаморочення, вертиго, головний біль, порушення сну або сонливість, галюцинації, судоми;
- Міастенічний синдром.

При вагітності або грудному вигодовуванні прийом азитроміцину заборонено.

*Одночасний прийом з іншими лікарськими засобами:*

- Концентрація азитроміцину зменшується при його одночасному прийомі з антацидними лікарськими засобами;
- Непримустимий одночасний прийом препарату з субстратами Р-глікопротеїну;
- Неприпустимий одночасний прийом препарату з похідними ріжків оскільки виникає ризик виникнення ерготизму;
- Нелфінар спричиняє зростання концентрації азитроміцину у крові;
- Неприпустимий одночасний прийом препарату з цизапридом.

Азитроміцин не призводить до індукції або інактивації цитохрому Р 450 завдяки цитохром-метаболічному комплексу [2-8].

### 1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення азитроміцину.

Державна фармакопея України [9] (ДФУ, Додаток 1) та Європейська фармакопея [10] (Додаток 2) нормативними статтями регламентують ідентифікувати субстанцію азитроміцин нижчезазначеними методами, а саме:

- Адсорбційною спектрофотометрією в ІЧ – області, спектри записують у розчині метиленхлориду;
- За фізико-хімічними показниками (температурою плавлення, питомим оптичним обертанням).

Кількісно азитроміцин рекомендують визначати методом рідинної хроматографії (Додаток 1):

Один з розчинників (розчин 1) - суміш ацетонітрилу та калій гідрофосфату (6,7 г/л) у співвідношенні 60:40, рН рухомої фази рН = 8,0 створюють шляхом додавання до суміші фосфорної кислоти.

Випробуваний розчин являє собою розчин проби (53 мг) у 2 мл ацетонітрилу, розчином порівняння виступає 53 мг фармакопейного стандартного зразка у попередньому розчиненні (2 мл ацетонітрилу) та послідовному розчиненні у розчиннику 1.

Нерухомою фазою обирають вінілполімер октадецилсилільний з розміром часточок 5 мкм, розмір колонки 0,25 м на 4,6 мм. Температурний режим хроматографічної колонки - 40<sup>0</sup>С.

Рухомою фазою обирають суміш ацетонітрилу з калій гідрофосфатом у співвідношенні 60:40, рН розчину = 11,0, швидкість проходження рухомої фази 1,0 мл/хв., інжекція 10 мкл, детектування проводять за допомогою спектрофотометричного детектора при довжині хвилі 210 нм.

Проводячи бібліосемантичний аналіз нами було з'ясовано, що у різноманітних лікарських формах (таблетках, капсулах) дослідники використовують сучасний загальноприйнятний метод ВЕРХ [11] і нижче наведено умови хроматографування:

- Колонка «Extend-18» розміром 250×4,6 мм з твердою фазою 5мкм;
- Рухома фаза А: розчин динатрій гідрофосфату 1,8 г/л;
- Рухома фаза В: суміш ацетонітрилу та метанолу (75:25);
- Елюєнт – суміш розчинів А та В у співвідношенні 1,0:0,7;
- Спектрофотометричне детектування при довжині хвилі 210 нм;
- Температура колонки 50<sup>0</sup>С;
- Інжекція - 20 мкл;
- Швидкість – 1,0 мл/хв.

#### **1.6. Використання спектрофотометрії в аналізі речовин.**

Спектрофотометрія є одним із сучасних методів інструментального дослідження, який ґрунтується на аналізі спектрів, що виникають при поглинанні або випромінюванні речовиною (речовинами) монохроматичного світла [12-13]. Аналітичним сигналом у методі є зміна інтенсивності світлового потоку, яку ще називають оптичною густиною. Іноді спектрофотометрію називають ще колориметрією оскільки інтенсивність світлового потоку дослідник порівнює з інтенсивністю світлового потоку

розчину, концентрація якого відома (стандартного розчину). Вимірювання можна проводити в УФ-, видимій та ІЧ-області.

Розчинниками у методі можуть бути як органічні, так і неорганічні сполуки, але основним правилом є те, що розчинник не повинен поглинати світло, тобто не приймати участь у процесах світлопоглинання. Спектрофотометрія широко використовується у фармацевтичній практиці [16] при проведенні як кількісного, так і якісного аналізу, як безбарвних, так і забарвлених речовин. Спектрофотометрія ґрунтується на об'єднаному Законі світлопоглинання (Закон Бугера-Ламберта-Бера), який пов'язує у пропорційну залежність величину світлопоглинання з концентрацією досліджуваної речовини, поглинання залежить від довжини хвилі світлового потоку.

При проведенні спектрофотометричних досліджень речовини, які аналізуються в ІЧ-області повинні бути забарвленими або, якщо речовина безбарвна, аналітику треба провести комплексну фотометричну реакцію з певним, як правило, органічним реагентом.

Органічні реагенти можуть відноситися до різних класів, за будовою можуть бути як мономерними, так і полімерними, за механізмом дії можуть вступати у різні реакції концентрування, розділення, маскування і використовуються з цією метою дуже давно.

При апробації методики ми спиралися на висновки авторів роботи [15], тому органічним реагентом для проведення фотометричної реакції ми обрали 2-нітробензальдегід.

Залежно від їх використання, до хіміко-аналітичних властивостей органічних реагентів пред'являють різні вимоги.

Реагенти для фотометричного визначення повинні володіти інтенсивним забарвленням - або забарвлення повинно з'являтися при їх взаємодії з обумовленими речовинами. Якщо фотометричне визначення

проводиться у водному розчині, то утворений хелат повинен бути добре розчинним у воді. Підвищенню розчинності сприяє наявність у молекулі реагенту гідрофільних функціональних груп. Наприклад, алізарин практично не розчиняється у воді, в той час як його сульфопохідний - алізарин-3-сульфо кислота - розчинний у воді.

## **Розділ 2. Експериментальна частина.**

Експериментальна частина роботи була виконана на кафедрі аналітичної, фізичної та колоїдної хімії НМУ імені О.О. Богомольця.

### **2.1. Матеріали та методи.**

#### **2.1.1. Мета дослідження.**

Спираючись на фармакопейні статті ДФУ та Європейської фармакопеї (Додатки 1 та 2) та висновки певних наукових розвідок [11, 15], метою нашого дослідження ми поставили оптимізацію кількісного визначення азитроміцину у таблетках спектрофотометрією.

#### **2.1.2. Об'єкти дослідження.**

Для кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах нами були обрані нижченаведені об'єкти дослідження, які реалізуються аптечними державними та комерційними мережами та мають склад:

- Азитроміцин Євро (Зразок 1). Діючою речовиною є азитроміцин, 1 таблетка містить 500 мг. Допоміжними речовинами є кальцію гідрофосфат, лактози моногідрат, крохмаль, натрій кроскармілоза, магній стеарат, натрій лаурилсульфат, барвник 03B50883, гідромелоза, титану діоксид, поліетиленгліколь, індокармін.
- Азитроміцин 500 (Зразок 2). Діючою речовиною є азитроміцин, 1 таблетка містить 500 мг. Допоміжними речовинами є целюлоза мікрокристалічна, крохмаль, повідон, магній стеарат, тальк, кремній діоксид безводний, натрій лаурилсульфат, атрій крохмаль гліколят, гідроксипропілметилцелюлоза, титану діоксид, заліза жовтий оксид.



Азитроміцин Євро, Зразок 1

Азитроміцин 500, Зразок 2



### 2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Хімічний мірний посуд для приготування розчинів класу точності А.
2. Ваги лабораторні MettlerToledo XS204.
3. Спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214.

### 2.1.4. Реактиви.

При апробації методики ми використовували нижчезазначені реактиви марки х.ч.:

- Фармакопейний стандартний зразок ДФУ азитроміцин , Azithromycin каталожний номер 117772-70-0, реєстрація А0044;
- Дистильована вода;
- 2-нітробензальдегід;

- Кислота етанова льодяна;
- Кислота хлористоводнева концентрована.

### **2.1.5. Методики та умови приготування розчинів.**

#### *Приготування первинного розчину-стандарту.*

У льодяній етановій кислоті готували розчин фармакопейного стандартного зразка ДФУ концентрації 500 мг/л (0,5 г/л). Для цього зважували на терезах 0,5 г стандартного зразка ДФУ та повільно розчиняли його в 1 л розчинника.

#### *Приготування первинного розчину випробуваної речовини.*

Одну таблетку (кожного зразка окремо) повільно розчиняли у 1 л розчинника (розчинником є так саме льодяна етанова кислота), при необхідності струшували. Фільтрували.

#### *Приготування фотометричного реагенту для проведення фотометричної реакції.*

Зважували 0,4 г 2-нітробензальдегіду та розчиняли наважку у 100 мл льодяної етанової кислоти. Ретельно струшували. Вважали, що концентрація індикатора становила 0,4%.

#### *Приготування стандартних розчинів для побудови градуовального графіка.*

Вісім розчинів з концентраціями від 0,3 до 0,5 мг/мл і об'ємом 25 мл для побудови градуовального графіка готували стандартними методиками розведення. Для цього відбирали певний нижченаведений об'єм розчину-

стандарту концентрації 0,5 мг/мл, вміщували у мірну колбу на 25 мл і доводили льодяною етановою кислотою до риси:

№ розчину	Концентрація розчину, мг/мл	Об`єм первинного розчину-стандарту, мл
1	0,025	1,25
2	0,030	1,5
3	0,035	1,75
4	0,045	2,25
5	0,055	2,75
6	0,060	3,00
7	0,065	3,25
8	0,070	3,50

*Приготування компенсаційного розчину.*

У мірну колбу на 25 мл вміщували 5 мл приготованого розчину фотометричного реагенту 2-нітробензальдегіду і 5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Перемішували. Доводили об`єм до риси концентрованою хлоридною кислотою.

*Приготування розчинів для спектрофотометричного вимірювання.*

У мірну колбу на 25 мл відбирали 2 мл первинного розчину-стандарту або первинного розчину випробуваної речовини, для побудови градуовального графіка, додавали 5 мл приготованого розчину фотометричного реагенту 2-нітробензальдегіду і 5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Перемішували. Доводили об`єм до риси концентрованою

хлоридною кислотою. Вважали, що концентрація діючої речовини азитроміцин у розчинах має значення 0,04 мг/мл.

#### **2.1.6. Методика спектрофотометричного визначення.**

5 мл приготованого розчину для спектрофотометричного вимірювання (стандартного, стандартного розведеного або випробуваного) вміщують у кювету з товщиною шару  $l = 1,0$  см і вимірюють оптичну густину розчину при довжині хвилі 490 нм на фоні компенсаційного розчину.

#### **2.1.7. Кількісне визначення аналізованої речовини.**

Кількісне визначення діючої речовини азитроміцин проводять за методом градуувального графіка.

### Розділ 3. Результати та їх обговорення.

При моделюванні та апробації методики спектрофотометричного визначення одним з основних завдань є визначення довжини хвилі, при якій доцільно вимірювати величину оптичної густини  $A$ . З цією метою будується та аналізується спектр поглинання, тобто зміна величини оптичної густини  $A$  від постійної зміни довжини хвилі  $\lambda$ . Ми вимірювали оптичну густину  $A$  стандартного розчину, концентрація якого 0,04 мг/мл в інтервалі довжини хвилі від 420 нм до 520 нм. Для наочності у Таблиці 1 та на Рисунку 3 наведено результати, спираючись на які можна стверджувати, що оптимальною довжиною спектрофотометричного вимірювання оптичної густини є 490 нм і подальші спектрофотометричні дослідження необхідно проводити саме при вищезазначеній довжині хвилі:

Таблиця 1. Залежність оптичної густини  $A$  (величини абсорбції) стандартного розчину азитроміцину з концентрацією 0,04 мг/мл від довжини хвилі  $\lambda$ .

Довжина хвилі $\lambda$	420	425	439	450	483	488	490	500	510	520
Величина абсорбції (оптична густина $A$ )	0,015	0,016	0,020	0,040	0,061	0,083	0,086	0,051	0,043	0,029

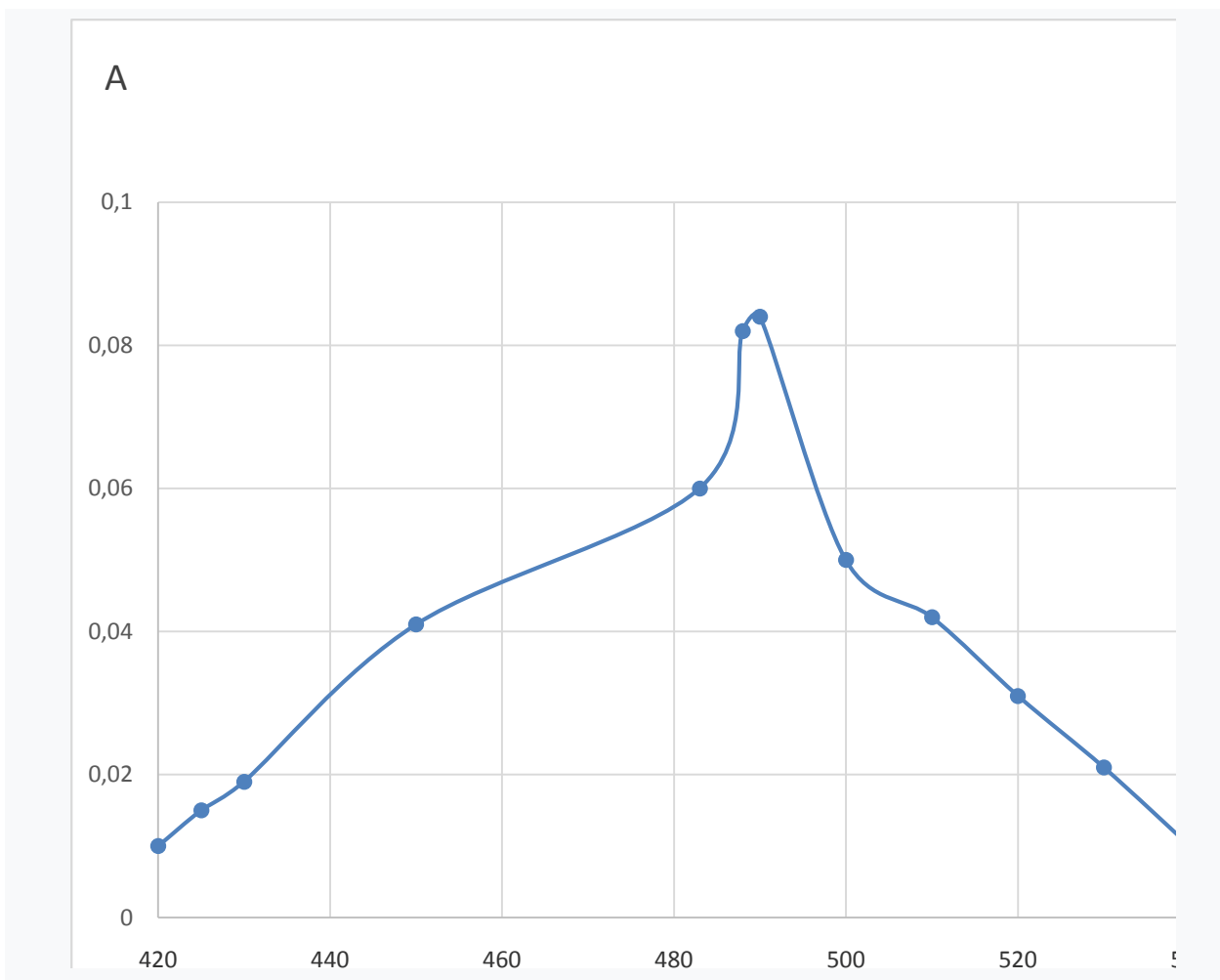
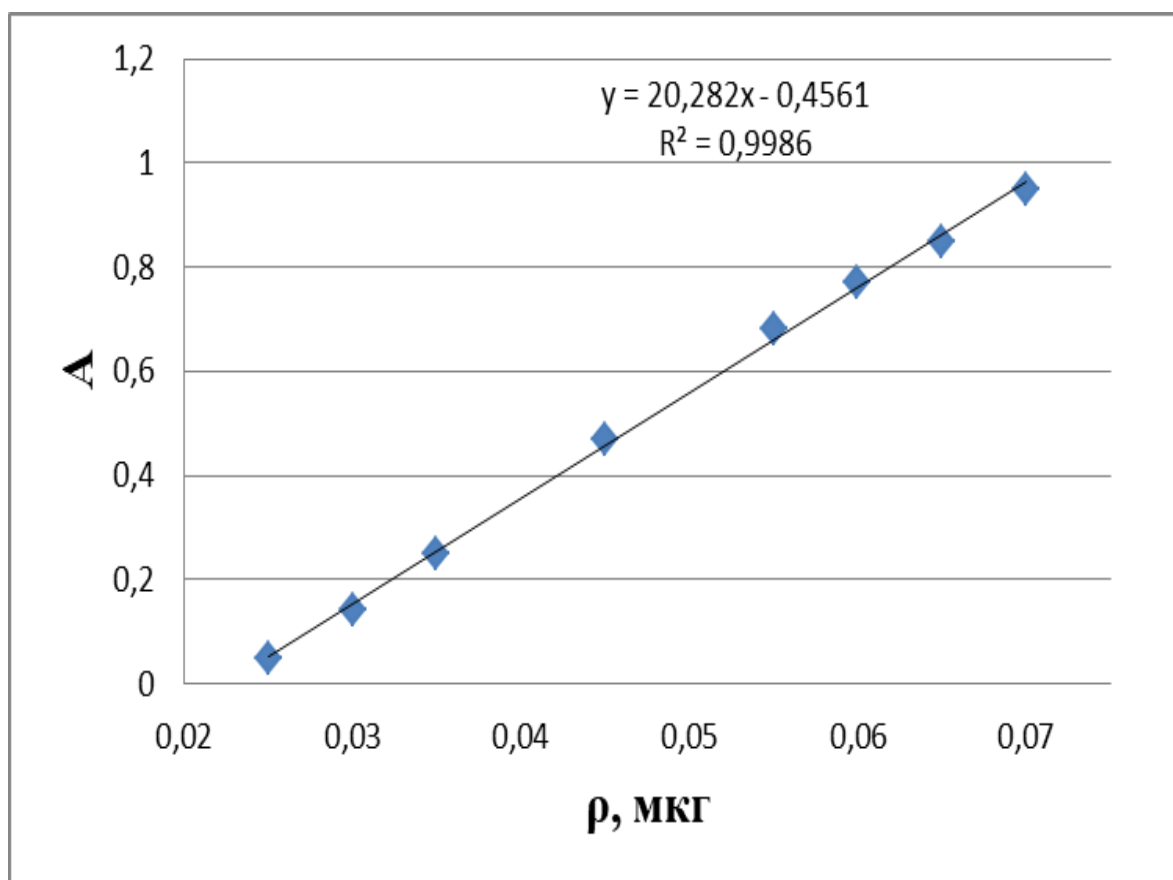


Рис.3. Спектр поглинання стандартного розчину (концентрація азитроміцину 0,04 мг/мл).

Після визначення оптимальної довжини хвилі (490 нм) для подальших досліджень ми побудували градувальний графік (Рис.4) та визначали величину оптичної густини досліджуваних розчинів (так, як це наведено у п. 2.1.5.). За методом градувального графіка знаходили концентрацію діючої речовини азитроміцин у досліджуваних розчинах для спектрофотометричного визначення. Результати кількісного визначення діючої речовини азитроміцин наведено у Таблиці 2:



Таблиця 2. Кількісний вміст азитроміцину у Зразках 1 та 2.

Тверда лікарська форма	Кількісний вміст діючої речовини азитроміцин, мг, враховуючи розведення	
	Зразок 1	Зразок 2
	498,7	496,9
	498,3	495,6
	500,3	502,2
	500,9	501,7
	501,3	502,7
Середнє значення, $\bar{x}$	499,9	499,8
Стандартне відхилення, $s$	1,334	3,334
Дисперсія, $s^2$	1,78	10,96
Відносне стандартне відхилення, $RSD$ %	0,27	0,66
Довірчий інтервал, $\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	499,9 $\pm$ 1,6	499,8 $\pm$ 4,1
Відносна похибка середнього значення, $\bar{\epsilon}$ , %	0,33	0,82

Враховуючи вищезазначене, відтворюваність результатів можна вважати достатньою.



### 3.1. Часткова валідація методики.

Валідацією аналітичної методики називають процес збору та оцінки експериментальних даних з метою вивчення гарантій здатності очікувати прогнозовані результати у дослідженні. Методика повинна мати метрологічні характеристики, тобто бути оцінена певним чином, і, що є немалозначущим, при виконанні процедур валідації дослідник повинен вміти визначати «слабкі місця», тобто змінювати параметри для проведення певної оптимізації [16-20]. Нами була проведена часткова валідація методики за лінійністю, стабільністю у часі, специфічністю та робасністю.

#### 3.1.1. Перевірка лінійності методики.

Лінійність вивчали у межах концентрацій розведених стандартних розчинів (0,025-0,07 мг/мл). Шляхом регресійного аналізу методом найменших квадратів знаходили величини  $y$  та  $x$  у лінійній залежності, коефіцієнти  $a$  та  $b$ ,  $a$  також стандартні квадратичні відхилення  $s_a$   $s_b$  та довірчі інтервали  $\Delta$ :

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2 - a \cdot \sum_{i=1}^n y_i - b \cdot \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i}{v}, v = n - 2.$$

$$s_0^2 = 1,9 \cdot 10^{-4}$$

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2},$$

$$s_b^2 = 9,9 \cdot 10^{-2}$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2.$$

$$s_a^2 = 2,5 \cdot 10^{-4}$$

$$s_b = \sqrt{s_b^2}, s_b = 0,31536 \quad s_a = \sqrt{s_a^2}, s_a = 1,6 \cdot 10^{-2}$$

$$\Delta_b = t(P, v) \cdot s_b, v = n - 2,$$

$$t(0,95; 6) = 2,4469$$

$$\Delta_b = 0,7716$$

$$\Delta_a = t(P, v) \cdot s_a, v = n - 2.$$

$$\Delta_a = 0,039086$$

Враховуючи вищезазначене, функція лінійної регресії приймає вигляд:

$$y = 20,282 (\pm 0,772) x - 0,4561 (\pm 0,0391).$$

### 3.1.2. Перевірка стабільності розчинів у часі.

При апробації методики ми вивчали стабільність розчинів як функцію від часу. Нашою задачею була перевірка стабільності розчину певної концентрації через величину абсорбції (оптичну густину), яку ми вимірювали кожні 10 хвилин. Результати, які представлені у Таблиці 3, дозволяють стверджувати, що розчин для спектрофотометричного аналізу у часі є стабільним.

Таблиця 3. Вивчення стабільності розчину у часі, концентрація розчину 0,035 мг/мл,  $\lambda = 490$  нм.

Величина абсорбції, t, хв.							Середнє	RSD, %	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
0	10	20	30	40	50	60					
0,250	0,256	0,251	0,254	0,254	0,251	0,253	0,253	0,85	0,253±0,00198	0,78	4,57·10 <sup>-6</sup>

### 3.1.3. Робасність.

Висновок про робасність, або висновок про спроможність запропонованої альтернативної методики спектрофотометричного визначення азитроміцину у твердій лікарській формі, ми зробили після аналізу результатів, які були отримані нами у різні дати (Таблиця 4):

Таблиця 4. Спектрофотометричне визначення азитроміцину у твердих лікарських формах у різні календарні дні.

	День 1	День 2
Маса знайденої діючої речовини, мг (враховуючи розведення)		
Зразок 1	498,7	499,8
	498,3	502,1
	500,3	501,5
	500,9	501,7
	501,3	498,2
Зразок 2	496,9	497,4
	495,6	496,9
	502,2	499,2
	501,7	501,6
	502,7	501,9

Як можна бачити, наведені результати у Таблиці 4 корелюють між собою і різниця у кількісних визначеннях не перебільшує 2 %.

### 3.1.4. Специфічність методики.

Методика кількісного визначення азитроміцину була апробована на ТЛФ, що дає можливість зробити висновок про специфічність даної альтернативної методики оскільки результати корелюють між собою і

допоміжні речовини, які входять до складу твердих лікарських форм не заважають визначенню.

### **3.1.5. Перевірка методики на правильність.**

Спираючись на вищезазначене, а саме, на висновки про лінійність методики, робастність, специфічність та перевірку стабільності розчинів у часі можна вважати запропоновану альтернативну методику кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах правильною.

## ВИСНОВКИ

1. В результаті виконання випускної кваліфікаційної роботи був проведений бібліосемантичний аналіз щодо застосування лікарських препаратів з азитроміцином, визначено властивості азитроміцину, фармакологію та метаболізм.
2. Проаналізовано методики ідентифікації та кількісного визначення азитроміцину у субстанції та лікарських засобах, які наведені у ДФУ, Європейській фармакопеї та представлені різними дослідниками.
3. Оптимізована нова альтернативна методика кількісного визначення азитроміцину у твердих лікарських формах методом спектрофотометрії та проведена її часткова валідація.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1308/makroli-di>.
2. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rxindex Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
3. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М.,Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
4. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В, Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
5. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська, Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко. Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
6. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
7. [www.pharma-center.com.ua](http://www.pharma-center.com.ua).веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
8. <https://uk.wikipedia.org/wiki/Азитроміцин>
9. Державна фармакопея України: Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — С. 85—100.
10. European Pharmacopoeia 9.8. Schisandra fruit. European directorate for the quality of medicines. Strasburg. – 2019. P. 3553-3555.

- 11.С.А. Шкляєв, О.О. Цуркан, О.П. Колядич, О.О. Кулікова (2019). Валідація ВЕРХ-методики визначення азитроміцину в лікарських формах та її порівняння із СФ-методикою за реакцією з 2-нітробензальдегідом. *Фармацевтичний журнал*, (1), 64-68.
12. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свечнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
13. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/432/fotokolorimetriya>
14. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
- 15.С.А. Шкляєв, О.О. Цуркан, О.П. Колядич, О.О. Кулікова (2019). Визначення азитроміцину в лікарських формах за реакцією з 2-нітробензальдегідом та валідація методики відповідно до вимог Державної Фармакопеї України. *Фармацевтичний журнал*, (6), 48-52. вилучено із <https://pharmj.org.ua/index.php/journal/article/view/746>
- 16.<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1661/validaciya>
17. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
- 18.Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
- 19.Гризодуб А.И. Валидация спектофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. №3. С.42 – 50.
- 20.Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств – Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств, 2016. – 396 с.



## ДОДАТКИ

## Додаток 1. Витяг з ДФУ та Європейської фармакопеї.

## Азитроміцил

**Розчин порівняння (a).** 1,0 мл випробовуваного розчину доводить сумішшю розчинників до об'єму 100,0 мл.

**Розчин порівняння (b).** Вміст віалі ФСЗ азитроміцину для перевірки придатності хроматографічної системи (містить домішки F, H і J) розчиняють в 1,0 мл суміші розчинників і витримують в ультразвуковій бані протягом 5 хв.

**Розчин порівняння (c).** 8,0 мг ФСЗ азитроміцину для ідентифікації піка (містить домішки A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P) розчиняють в 1,0 мл суміші розчинників.

## Колонка:

— розмір: 0,25 м × 4,6 мм,  
— нерухома фаза: полімер кремнієорганічний, для мас-спектрометрії, аморфний, октадецилсильний, ендсепований P(5 мкм),  
— температура: 60 °С.

## Рухома фаза:

— рухома фаза A: розчин 1,80 г/л диіацетрио гідрофосфату безводного P, рН якого доводять до 8,9 фосфатною кислотою розведеною P або натрію гідроксиду розчинили розведеним P;  
— рухома фаза B: метанол P1 — ацетонітрил P1 (250:750);

Час (хв)	Рухома фаза A (% об/об)	Рухома фаза B (% об/об)
0 - 25	50 → 45	50 → 55
25 - 30	45 → 40	55 → 60
30 - 80	40 → 25	60 → 75
80 - 81	25 → 50	75 → 50
81 - 93	50	50

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

Інжекція: 50 мкл.

Ідентифікація домішок: використовують хроматограму, що надається до ФСЗ азитроміцину для ідентифікації піка, і хроматограму розчину порівняння (c) для ідентифікації піків домішок A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O та P; використовують хроматограму, що надається до ФСЗ азитроміцину для перевірки придатності хроматографічної системи, та хроматограму розчину порівняння (b) для ідентифікації піка домішки H.

Відносні утримування до азитроміцину (час утримування азитроміцину (45 - 50) хв): домішки L — близько 0,29; домішки M — близько 0,37; домішки E — близько 0,43; домішки F — близько 0,51; домішки D — близько 0,54; домішки J — близько 0,54; домішки I — близько 0,61; домішки C — близько 0,73; домішки N — близько 0,76; домішки H — близько 0,79; домішки A — близько 0,83; домішки P — близько 0,92; домішки O — близько 1,23; домішки G — близько 1,26; домішки B — близько 1,31.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння (b):

— відношення пік/западина: не менше 1,4, де  $H_p$  — висота піка домішки J над базовою лінією,  $H_b$  — висота над базовою лінією найнижчої точки хроматограми між піком домішки J і піком домішки F.

## Нормування:

— поправкові коефіцієнти: для розрахунку вмісту мюють площі піків наведених нижче домішок на відповідній поправковий коефіцієнт: для домішки F — 0,3; для домішки G — 0,2; для домішки H — 0,1; для домішки L — 2,3; для домішки M — 0,6; для домішки N — 0,7;

— домішка B: площа піка не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (2,0 %);

— домішки A, C, E, F, H, I, L, M, N, O, P: площа піка кожної домішки не має перевищувати 0,5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,5 %);

— сума домішок D і J: сума площі піків не має перевищувати 0,5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,5 %);

— домішка G: площа піка не має перевищувати 0,2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,2 %);

— будь-яка інша домішка: площа піка кожної домішки не має перевищувати 0,2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,2 %);

— сума домішок: сума площі піків не має перевищувати 3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (3,0 %);

— не враховують: домішки, площа піків яких менше 0,1 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,1 %); не враховують піки, що елюються перед домішкою L і після домішки B.

Важкі метали (2.4.8, метод B). Не більше 0,0025 % (25 ppm).

2,0 г субстанції розчиняють у суміші вода P - етанол P (15:85) і доводять тією самою сумішшю розчинників до об'єму 20 мл. 12 мл одержаного розчину мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням еталонного розчину свинцю (2,5 ppm Pb), одержаного шляхом розведення свинцю еталонного розчину (100 ppm Pb) P сумішшю вода P - етанол P (15:85).

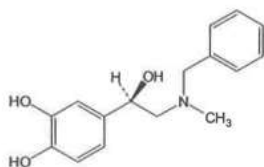
Вода (2.5.12). Від 1,8 % до 6,5 %. Визначення проводять із 0,200 г субстанції.

Сульфатна кислота (2.4.14). Не більше 0,2 %. Визначення проводять з 1,0 г субстанції.

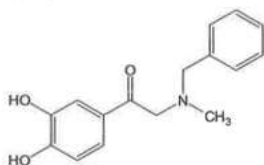
## КЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Ріднина хроматографія (2.2.29).

## Азитроміцин



D. 4-[(1R)-2-(бензилметиламіно)-1-гідроксіетил]-бензол-1,2-діол,



E. 2-(бензилметиламіно)-1-(3,4-дигідроксифеніл)етанон.

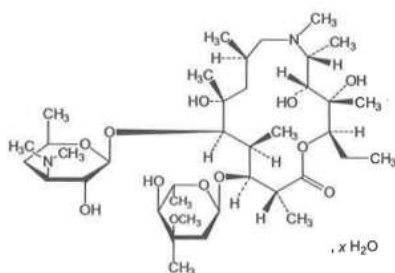
## АДРЕНАЛІНУ ГІДРОТАРТРАТ

*Adrenalini hydrotartras*

## АЗИТРОМІЦИН

*Azithromycinum*

## AZITHROMYCIN



$C_{28}H_{42}N_2O_{12} \cdot xH_2O$  М.м. 749 (безводна речовина)  
 $x = 1$  або 2

Азитроміцин моногідрат [121470-24-4]

Азитроміцин дигідрат [117772-70-0]

(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Дидеокси-3-С-метил-3-О-метил-α-L-рібо-гексопіранозил)окси]-2-етил-3,4,10-тригідрокси-

3,5,6,8,10,12,14-гептаметил-11-[[3,4,6-тридеокси-3-(диметиламіно)-β-D-ксило-гексопіранозил]окси]-1-окса-6-азаціклопентадекан-15-он. Рівень гідратації становить 1 або 2.

Напівсинтетичний продукт, одержаний із продукту ферментації.

*Вміст:* не менше 96.0 % і не більше 102.0 %, у перерахунку на безводну речовину.

## ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Порошок білого або майже білого кольору.

*Розчинність.* Практично не розчинний у воді *P*, легко розчинний в етанолі *P* і метиленхлориді *P*.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Абсорбційна спектродотометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

*Відповідність:* спектру ФСЗ азитроміцину.

У разі різниці одержаних спектрів речовин у твердому стані подальші спектри записують, використовуючи розчини 90 г/л у метиленхлориді *P*.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Розчин S.* 0.500 г субстанції розчиняють в етанолі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50.0 мл.

*Прозорість розчину (2.2.1).* Розчин *S* має бути прозорим.

*Кольоровість розчину (2.2.2, метод II).* Розчин *S* має бути безбарвним.

*pH (2.2.3).* Від 9.0 до 11.0.

0.100 г субстанції розчиняють у 25.0 мл метанолу *P* і доводять об'єм розчину водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P* до 50.0 мл.

*Питоме оптичне обертання (2.2.7).* Від -45 до -49, у перерахунку на безводну речовину. Визначення проводять, використовуючи розчин *S*.

*Супровідні домішки.* Рідинна хроматографія (2.2.29).

*Суміш розчинників.* Готують розчин 1.73 г/л амонію дигідрофосфату *P*, встановлюючи pH 10.0 за допомогою аміаку розчину *P*. 350 мл одержаного розчину переносять у підхожий контейнер, додають 300 мл ацетонітрилу *P* і 350 мл метанолу *P* і ретельно перемішують.

*Випробовуваний розчин.* 0.200 г субстанції розчиняють у суміші розчинників і доводять об'єм розчину сумішню розчинників до 25.0 мл.

## Азитроміцин

**Розчин А.** Суміш ацетонітрилу Р1 – розчин 6.7 г/л дикалію гідрофосфату Р (60:40), рН якої доводять до 8.0 фосфорною кислотою Р.

**Випробовуваний розчин.** 53.0 мг субстанції розчиняють у 2 мл ацетонітрилу Р1 і доводять розчином А до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (а).** 53.0 мг ФСЗ азитроміцину розчиняють у 2 мл ацетонітрилу Р1 і доводять розчином А до об'єму 100.0 мл.

**Розчин порівняння (б).** 5 мг субстанції і 5 мг ФСЗ азитроміцину домішки Арозчиняють у 0.5 мл ацетонітрилу Р1 і доводять розчином А до об'єму 10 мл.

**Колонка:**

- розмір: 0.25 м × 4.6 мм,
- нерухома фаза: вінілполімер для хроматографії, октадецилсилільний Р (5 мкм),
- температура: 40 °С.

**Рухома фаза:** суміш ацетонітрилу Р1 – розчин 6.7 г/л дикалію гідрофосфату Р (60:40), рН якої доводять до 11.0 розчином 560 г/л калію гідроксиду Р.

**Швидкість рухомої фази:** 1.0 мл/хв.

**Детектування:** спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

**Інжекція:** 10 мкл.

**Час хроматографування:** у 1.5 рази більший часу утримування азитроміцину.

**Час утримування:** азитроміцину – близько 10 хв.

**Придатність хроматографічної системи:** розчин порівняння (б);

– ступінь розділення: не менше 3.0 між піками домішки А й азитроміцину.

Вміст  $C_{39}H_{72}N_2O_{13}$ , у відсотках, розраховують, використовуючи значення вмісту азитроміцину у ФСЗ азитроміцину.

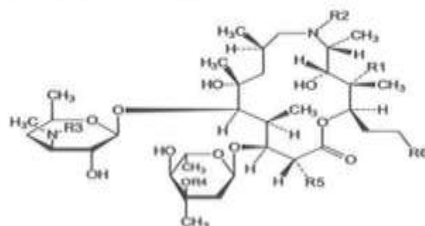
## ЗБЕРІГАННЯ

У повітронепроникному контейнері.

## ДОМІШКИ

**Специфіковані домішки:** А, В, С, D, Е, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P.

**Інші домішки,** що виявляються (дані домішки, якщо вони наявні у достатній кількості, можуть визначитися тим або іншим випробуванням монографії. Їх вміст нормується загальноприйнятими критеріями для інших/неспецифікованих домішок і/або загальною статтею «Субстанції для фармацевтичного застосування». Тому немає необхідності їх ідентифікувати, щоб показати відповідність вимогам. Див. також 5.10. «Контроль домішок у субстанціях для фармацевтичного застосування»): К.



**A.** R1 = OH, R2 = R6 = H, R3 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>; 6-деметилазитроміцин,

**B.** R1 = R6 = H, R2 = R3 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>; 3-деоксиазитроміцин (азитроміцин В),

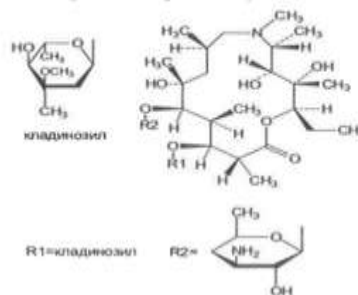
**C.** R1 = OH, R2 = R3 = R5 = CH<sub>3</sub>, R4 = R6 = H: 3'-O-деметилазитроміцин (азитроміцин С),

**D.** R1 = OH, R2 = R3 = R4 = CH<sub>3</sub>, R5 = CH<sub>2</sub>OH, R6 = H: 14-деметил-14-(гідроксиметил)азитроміцин (азитроміцин F),

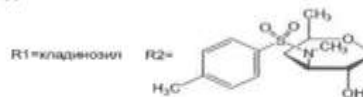
**E.** R1 = OH, R2 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>, R3 = CHO, R6 = H: 3'-N-деметил-3'-N-формілазитроміцин,

**I.** R1 = OH, R2 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>, R3 = R6 = H: 3'-N-деметилазитроміцин,

**O.** R1 = OH, R2 = R3 = R4 = R5 = R6 = CH<sub>3</sub>; 2-дезетіл-2-пропілазитроміцин,



**E.** 3'-(N,N-дидеметил)азитроміцин (аміноазитроміцин),



**G.** 3'-N-деметил-3'-N-[(4-метилфеніл)сульфоніл]азитроміцин,

## Azithromycin

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

– *disregard limit*: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

## ASSAY

*In order to avoid overheating in the reaction medium, mix thoroughly throughout and stop the titration immediately after the end-point has been reached.*

Dissolve 0.300 g in 5 mL of anhydrous formic acid R. Add 30 mL of acetic anhydride R. Titrate quickly with 0.1 M perchloric acid, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

1.0 mL of 0.1 M perchloric acid is equivalent to 41.84 mg of  $C_{38}H_{72}N_2O_{11} \cdot xH_2O$ .

## IMPURITIES

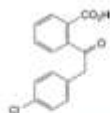
Specified impurities: A, B, C, D, E.



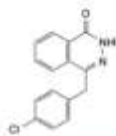
A. benzoyldiazane (benzohydrazide),



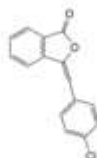
B. 1-benzoyl-2-[(14R)-1-methylhexahydro-1H-azepin-4-yl]diazane,



C. 2-[(4-chlorophenyl)acetyl]benzoic acid,



D. 4-(4-chlorobenzyl)phthalazin-1(2H)-one,

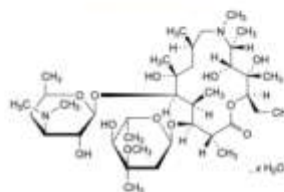


E. 3-(4-chlorobenzylidene)isobenzofuran-1(3H)-one.

01/2011:1649

## AZITHROMYCIN

## Azithromycinum



$C_{38}H_{72}N_2O_{11} \cdot xH_2O$   $M_r$  749 (anhydrous substance)  
with  $x = 1$  or 2

Azithromycin monohydrate: [121470-24-4]

Azithromycin dihydrate: [117772-70-0]

## DEFINITION

(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[[[2,6-Dideoxy-3-C-methyl-5-O-methyl- $\alpha$ -L-ribo-hexopyranosyl]oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- $\beta$ -D-xyllo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one. The degree of hydration is 1 or 2.

Semi-synthetic product derived from a fermentation product.

Content: 96.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance).

## CHARACTERS

*Appearance*: white or almost white powder.

*Solubility*: practically insoluble in water, freely soluble in anhydrous ethanol and in methylene chloride.

## IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

*Comparison*: azithromycin CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, prepare further spectra using 90 g/L solutions in methylene chloride R.

## TESTS

**Solution S.** Dissolve 0.500 g in anhydrous ethanol R and dilute to 50.0 mL with the same solvent.

**Appearance of solution.** Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

**pH** (2.2.3): 9.0 to 11.0.

Dissolve 0.100 g in 25.0 mL of methanol R and dilute to 50.0 mL with carbon dioxide-free water R.

**Specific optical rotation** (2.2.7): – 45 to – 49 (anhydrous substance), determined on solution S.

**Related substances.** Liquid chromatography (2.2.29).

*Solvent mixture.* Prepare a 1.75 g/L solution of ammonium dihydrogen phosphate R adjusted to pH 10.0 with ammonia R. Transfer 350 mL of this solution to a suitable container. Add 300 mL of acetonitrile R1 and 350 mL of methanol R1. Mix well.

*Test solution.* Dissolve 0.200 g of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 25.0 mL with the solvent mixture.

*Reference solution (a).* Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture.

**Reference solution (b).** Dissolve the contents of a vial of azithromycin for system suitability CRS (containing impurities F, H and J) in 1.0 mL of the solvent mixture and sonicate for 5 min.

**Reference solution (c).** Dissolve 8.0 mg of azithromycin for peak identification CRS (containing impurities A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O and P) in 1.0 mL of the solvent mixture.

**Column:**

- size:  $l = 0.25$  m,  $\varnothing = 4.6$  mm;
- stationary phase: end-capped octadecylsilyl amorphous organosilica polymer for mass spectrometry R (5  $\mu$ m);
- temperature: 60 °C.

**Mobile phase:**

- mobile phase A: 1.80 g/L solution of anhydrous disodium hydrogen phosphate R adjusted to pH 8.9 with dilute phosphoric acid R or with dilute sodium hydroxide solution R;
- mobile phase B: methanol R1, acetonitrile R1 (250:750 V/V);

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 25	50 → 45	50 → 55
25 - 30	45 → 40	55 → 60
30 - 80	40 → 25	60 → 75
80 - 81	25 → 50	75 → 50
81 - 93	50	50

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 210 nm.

**Injection:** 50  $\mu$ L.

**Identification of impurities:** use the chromatogram supplied with azithromycin for peak identification CRS and the chromatogram obtained with reference solution (c) to identify the peaks due to impurities A, B, C, E, F, G, I, J, L, M, N, O and P; use the chromatogram supplied with azithromycin for system suitability CRS and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peak due to impurity H.

**Relative retention** with reference to azithromycin (retention time = 45–50 min): impurity L = about 0.29; impurity M = about 0.37; impurity E = about 0.43; impurity F = about 0.51; impurity D = about 0.54; impurity J = about 0.54; impurity I = about 0.61; impurity C = about 0.73; impurity N = about 0.76; impurity H = about 0.79; impurity A = about 0.83; impurity P = about 0.92; impurity O = about 1.23; impurity G = about 1.26; impurity B = about 1.31.

**System suitability:** reference solution (b):

- peak-to-valley ratio: minimum 1.4, where  $H_p$  = height above the baseline of the peak due to impurity J and  $H_v$  = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to impurity F.

**Limits:**

- correction factors: for the calculation of content, multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity F = 0.3; impurity G = 0.2; impurity H = 0.1; impurity L = 2.3; impurity M = 0.6; impurity N = 0.7;
- impurity B: not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (2.0 per cent);
- impurities A, C, E, F, H, I, L, M, N, O, P: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);
- sum of impurities D and J: not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);

- impurity G: not more than 0.2 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent);
- any other impurity: for each impurity, not more than 0.2 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent);
- total: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (3.0 per cent);
- disregard limit: 0.1 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.1 per cent); disregard the peaks eluting before impurity L and after impurity B.

**Heavy metals** (2.4.8): maximum 25 ppm.

Dissolve 2.0 g in a mixture of 15 volumes of water R and 85 volumes of anhydrous ethanol R and dilute to 20 mL with the same mixture of solvents. 12 mL of the solution complies with test B. Prepare the reference solution using lead standard solution (2.5 ppm Pb) obtained by diluting lead standard solution (100 ppm Pb) R with a mixture of 15 volumes of water R and 85 volumes of anhydrous ethanol R.

**Water** (2.5.12): 1.8 per cent to 6.5 per cent, determined on 0.200 g.

**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.2 per cent, determined on 1.0 g.

**ASSAY**

Liquid chromatography (2.2.29).

**Solution A.** Mix 60 volumes of acetonitrile R1 and 40 volumes of a 6.7 g/L solution of dipotassium hydrogen phosphate R adjusted to pH 8.0 with phosphoric acid R.

**Test solution.** Dissolve 53.0 mg of the substance to be examined in 2 mL of acetonitrile R1 and dilute to 100.0 mL with solution A.

**Reference solution (a).** Dissolve 53.0 mg of azithromycin CRS in 2 mL of acetonitrile R1 and dilute to 100.0 mL with solution A.

**Reference solution (b).** Dissolve 5 mg of the substance to be examined and 5 mg of azithromycin impurity A CRS in 0.5 mL of acetonitrile R1 and dilute to 10 mL with solution A.

**Column:**

- size:  $l = 0.25$  m,  $\varnothing = 4.6$  mm;
- stationary phase: octadecylsilyl vinyl polymer for chromatography R (5  $\mu$ m);
- temperature: 40 °C.

**Mobile phase:** mix 60 volumes of acetonitrile R1 and 40 volumes of a 6.7 g/L solution of dipotassium hydrogen phosphate R adjusted to pH 11.0 with a 560 g/L solution of potassium hydroxide R.

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 210 nm.

**Injection:** 10  $\mu$ L.

**Run time:** 1.5 times the retention time of azithromycin.

**Retention time:** azithromycin = about 10 min.

**System suitability:** reference solution (b):

- resolution: minimum 3.0 between the peaks due to impurity A and azithromycin.

Calculate the percentage content of  $C_{18}H_{27}N_2O_{12}$  from the declared content of azithromycin CRS.

**STORAGE**

In an airtight container.

**IMPURITIES**

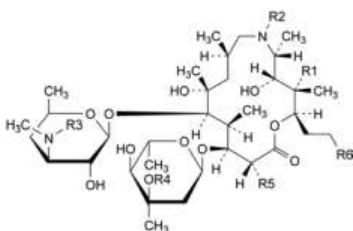
**Specified impurities:** A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P.

**Other detectable impurities** (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general

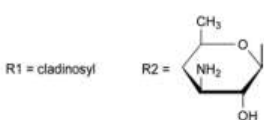
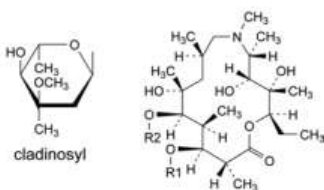
## Azithromycin

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

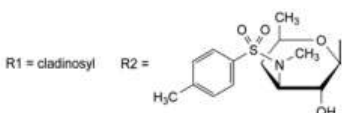
acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*: K.



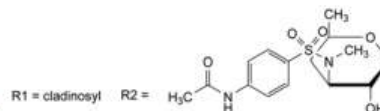
- A. R1 = OH, R2 = R6 = H, R3 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>:  
6-demethylazithromycin,
- B. R1 = R6 = H, R2 = R3 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>: 3-deoxyazithromycin  
(azithromycin B),
- C. R1 = OH, R2 = R3 = R5 = CH<sub>3</sub>, R4 = R6 = H:  
3'-O-demethylazithromycin (azithromycin C),
- D. R1 = OH, R2 = R3 = R4 = CH<sub>3</sub>, R5 = CH<sub>2</sub>OH, R6 = H:  
14-demethyl-14-(hydroxymethyl)azithromycin  
(azithromycin F),
- E. R1 = OH, R2 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>, R3 = CHO, R6 = H:  
3'-N-demethyl-3'-N-formylazithromycin,
- I. R1 = OH, R2 = R4 = R5 = CH<sub>3</sub>, R3 = R6 = H:  
3'-N-demethylazithromycin,
- O. R1 = OH, R2 = R3 = R4 = R5 = R6 = CH<sub>3</sub>:  
2-desethyl-2-propylazithromycin,



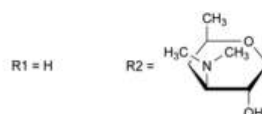
- E. 3'-(N,N-dimethyl)azithromycin (aminoazithromycin),



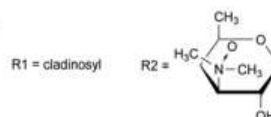
- G. 3'-N-demethyl-3'-N-[(4-methylphenyl)sulfonyl]azithromycin,



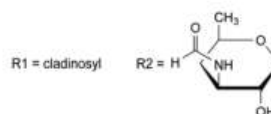
- H. 3'-N-[[4-(acetamino)phenyl]sulfonyl]-3'-N-demethylazithromycin,



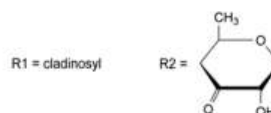
- J. 13-O-decladinosylazithromycin,



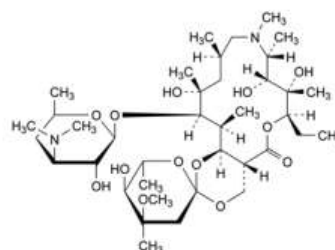
- L. azithromycin 3'-N-oxide,



- M. 3'-(N,N-dimethyl)-3'-N-formylazithromycin,



- N. 3'-de(dimethylamino)-3'-oxoazithromycin,



- K. C<sup>4</sup>,1''-epoxyazithromycin (azithromycin E),

- P. unknown structure.

Додаток 2. Сертифікат участі у науково-практичній науковій конференції.



## АНОТАЦІЯ (SUMMARY)

According to the Ministry of Health of Ukraine, the number of deaths associated with the excessive use of antibiotics and their uncontrolled intake exceeds a million people in the world, and every year it becomes more difficult to treat infectious diseases of bacterial origin. Therefore, one of the most important one of the tasks of pharmaceutical chemistry is the development of new methods for the quantitative determination of antibiotics of various origins, including macrolides.

In the State Pharmacopoeia of Ukraine, it is regulated to quantitatively determine azithromycin by liquid chromatography method. The method of liquid chromatography is undoubtedly a modern and sensitive method of quantitative research, but, in our opinion, the main drawback of this method is the high cost of the equipment and the shortage of competent researchers. When studying the scientific research in the direction of quantitative determination of azithromycin, we came to the conclusion that the antibiotic can be determined by other methods, and in this we are in solidarity with the authors of the paper, who propose a spectrophotometric method for determining azithromycin in medicinal products.

During the development and partial validation of the methodology for the quantitative determination of azithromycin in tablets, we relied on the scientific research of the authors of the work and selected solid dosage forms (sample 1 and sample 2), which include azithromycin in the amount of 500 mg. Undoubtedly, the composition of the tablets includes auxiliary substances, but based on the authors' own conclusions and conclusions, it can be stated that the presence of other substances in the spectrophotometric determination of azithromycin in solid dosage forms does not affect the result.



It should be noted that the reagents and equipment for the spectrophotometric method of quantitative determination of azithromycin are not scarce and expensive, for the analysis we used 2-nitrobenzaldehyde (for the photometric reaction), a pharmacopoeial sample of DFU azithromycin (registration number 117772-70), glacial ethanoic acid and hydrogen chloride, laboratory scales MettlerToledo XS204, spectrophotometer Jenway 6305. Determination of optical density was carried out at the optimal wavelength of 490 nm, which was set after constructing the absorption spectrum of a solution with a concentration of azithromycin 0,5 mg/ml.

The amount of the active substance in the solid dosage form was determined by the method of the graduation schedule. For this, a series of standard solutions with a known concentration was prepared. Below are the results of the quantitative determination of azithromycin in solid dosage forms:

Sample	Average value (n=5) of the mass of the active substance found in solid dosage form, mg, taking into account dilution
1	497,2
2	498,4