VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZITROMICINA EN TABLETAS

DEVELOPMENT OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF AZITHROMYCIN IN TABLETS

Juan Luis Diaz Camacho, Luisa Marcela Duran Sánchez, Daniela Heredia Paniagua, María Fernanda Domínguez Aceves, Marco Antonio Ramírez Morales.
Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia.
ma.ramirez@ugto.mx[1]

Resumen

Los estudios de estabilidad son fundamentales para determinar la vida útil, almacenamiento y transporte óptimos de productos farmacéuticos. La azitromicina, un antibiótico macrólido de amplio uso clínico, posee una estructura sensible a condiciones ácidas que puede ser aprovechada para su cuantificación. Tradicionalmente, se utiliza HPLC para determinar su concentración; sin embargo, este método presenta limitaciones en cuanto a costos y requerimientos técnicos.

Este estudio propone una metodología alternativa de cuantificación de la azitromicina basada en espectroscopía UV-Visible, mediante la hidrólisis ácida que genera un producto con absorbancia a 246 y 480 nm. Se desarrolló una curva de calibración utilizando tanto un estándar puro como una muestra comercial del medicamento. La prueba demostró que ambas muestras ofrecen resultados adecuados a los valores esperados.

La metodología mostró buena linealidad ($R^2 = 0.9993$) y reproducibilidad entre diferentes analistas, lo que la hace adecuada para fines didácticos y de investigación.

En conclusión, el método propuesto representa una alternativa sencilla, económica y reproducible para la cuantificación de azitromicina, favoreciendo tanto el aprendizaje estudiantil como el desarrollo de métodos accesibles en contextos con recursos limitados.

Palabras clave: azitromicina, método de cuantificación, Ultravioleta-Visible, macrólido.

Introducción

Los estudios de estabilidad constituyen una base científica esencial para determinar la vida útil de fármacos, medicamentos y productos herbolarios (REF). Estos ensayos permiten establecer con precisión los periodos de caducidad, la viabilidad de almacenamiento de productos a granel o intermedios, las condiciones óptimas de conservación y transporte, así como la selección adecuada del sistema de envasado[1] o [1]. En los productos farmacéuticos, pueden presentarse transformaciones irreversibles de índole química, física o microbiológica que comprometan la estabilidad del ingrediente farmacéutico activo (IFA) o de los excipientes. La intensidad y la cinética de dichas alteraciones están influenciadas tanto por las características fisicoquímicas de la formulación y su envase primario, como por factores ambientales externos tales como la temperatura, la exposición lumínica, la presencia de oxígeno y la humedad relativa.[2]

La azitromicina pertenece a la familia de los macrólidos que constituyen una clase muy importante de compuestos antibacterianos altamente activos. Es un fármaco antibacteriano muy eficaz que se utiliza a menudo para utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones bacterianas contra cocos Gram positivos y Gram negativos del tracto respiratorio, piel y tejidos blandos. [3-5]

Los antibióticos macrólidos contienen un grupo básico de dimetilamina [–N $(CH_3)_2$], que es capaz de ganar un protón. Su característica principal es un anillo de lactona macrocíclico con uno o dos restos de azúcar.

Estructuralmente, la azitromicina (figura 1) es un anillo de lactona de 14 miembros con diez centros asimétricos y dos moléculas de azúcar (L-cladinosa y eritralosamina).

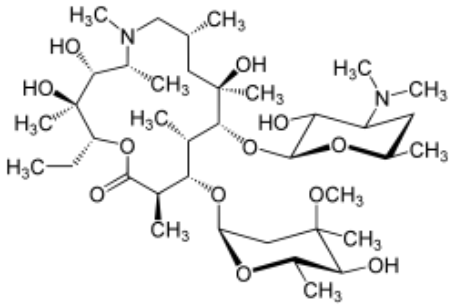
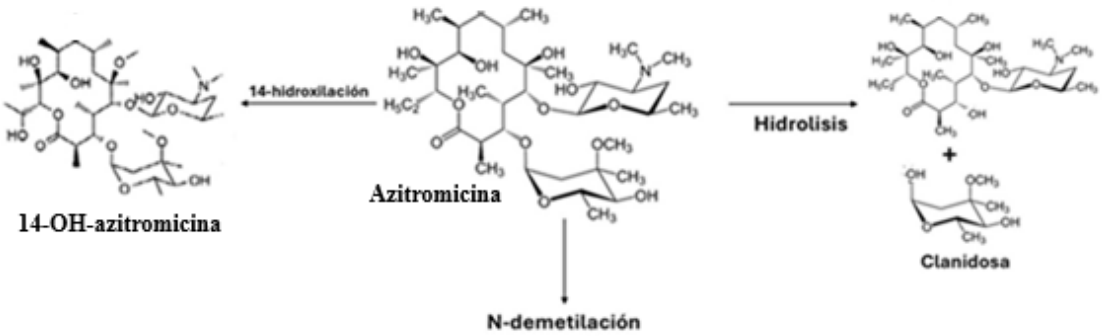


Figura 1. Estructura química de la azitromicina.

La azitromicina es estable en ácido, mostrando una buena actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La azitromicina se metaboliza principalmente (¿QUÉ ORGANO? ¿ENZIMAS? a su metabolito biológicamente activo **14-hidroxi-6-O-metil-azitromicina** tanto en animales como en humanos ¿POR DONDE SE ELIMINA? (Figura 2). Puede ser inactivado por la eliminación hidrolítica del resto de azúcar cladinosa, que tiene lugar en condiciones ácidas.[6] ¿EN LA IMAGEN



MUESTRAS LA N-DEMETILACIÓN Y NO SE EXPLICA EN EL TEXTO.

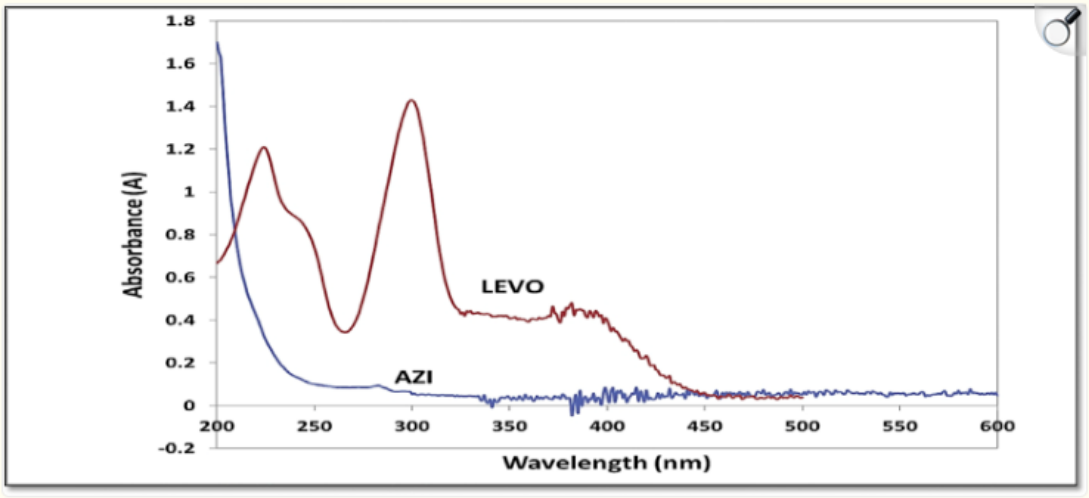
Figura 2. *Metabolismo de la azitromicina.*

Actualmente se dispone de un método para la cuantificación de la azitromicina en todas sus formas farmacéuticas, este el HPLC que es el utilizado comúnmente, sin embargo, presenta algunas limitaciones al ser el único método, siendo la principal de ella el costo del equipo y personal capacitados para operarlo.[7-8]

Los antibióticos macrólidos no poseen suficientes grupos cromóforos, lo que impide su determinación directa mediante espectrofotómetro,[9] la azitromicina reacciona con ácido clorhídrico (HCl) concentrado, lo que le da un color amarillo, ya que la fracción de azúcar de la azitromicina reacciona con el HCly muestra dos absorbancias 246 y 480 nm.[10]

Por lo que en el presente trabajo se propone desarrollar un método de cuantificación sencillo y de bajo costo, para la determinación de concentración de azitromicina, basado en la reacción de hidrólisis del principio activo, para la eliminación hidrolítica de la fracción de azúcar clanidosa (Figura 2) los cuales forman una coloración amarilla que absorbe en la zona visible del espectro.

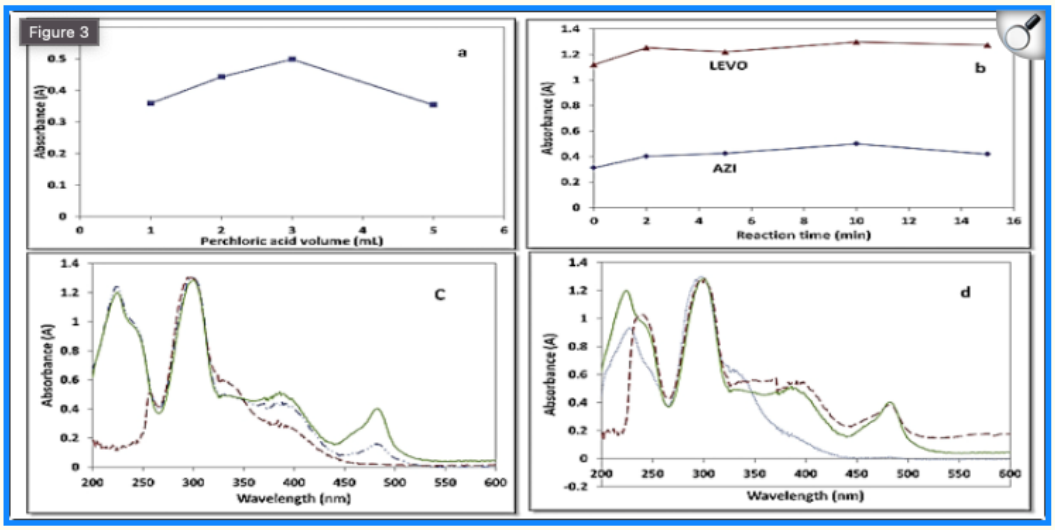
Figure 2.



Open in a new tab

Zero order absorption spectrum of 20 µg/mL AZI and 20 µg/mL LEVO in methanol.

Figure 3.



Open in a new tab

(a) Studying the effect of perchloric acid volume, (b) the effect of reaction time, (c) the effect of different solvents, methanol (▬▬▬▬▬▬), water (– .. – .. – .. –) and DMF (– – – –), (d) the effect of different oxidizing acids, perchloric acid (▬▬▬▬▬▬), sulfuric acid (– – – –) and phosphoric acid (.....) on the oxidative reaction product of 20 µg/mL of AZI and LEVO.

Objetivos

• Desarrollar un método espectroscópico por Ultravioleta-visible para terminar la presencia de la azitromicina.

• Facilitar a los alumnos participantes la comprensión de los principios básicos para la determinación de un metabolito por espectroscopia Ultravioleta-visible.

• Los resultados de la investigación facilitaran el proceso de difusión del conocimiento por los canales comunes como congresos, artículos científicos y presentaciones, tanto en foros dentro y fuera de la universidad.

Metodología

Colección de la muestra: Para este estudio se utilizó una marca comercial de medicamento “Charyn” de tabletas de azitromicina con una concentración de 500 mg (laboratorios Wermar lote 250897).

Reactivos: Se utilizo ácido clorhídrico concentrado y solución buffer 0.2M de fosfato pH:6.8. El ácido clorhídrico concentrado se consiguió de una marca comercial.

Instrumentación: Se usó un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher). La detección UV fue acoplada a una longitud de onda de 246 y 480 nm para detectar los picos de las muestras.

Preparación de la curva de calibración: Se preparó una solución madre con azitromicina pura de la marca comercial Sigma-Aldrich. Se pesaron 25 miligramos de azitromicina, inmediatamente se mezcló con 5 ml de HCl concentrado por un minuto y se aforó a 25 ml de buffer de fosfato pH:6.8, obteniendo una solución madre de 1000 µg/mL. Posteriormente, se procedieron a realizar las diluciones en seis matraces volumétricos de 10 mL siguiendo la Tabla 1 utilizando la solución madre anteriormente obtenida y aforando con solución de fosfato pH:6.8.

Tabla 1. *Concentración de diluciones realizadas para la curva de calibración*

Concentración	mL de la solución madre
50 µg/mL	0.5 mL
100 µg/mL	1 mL
200 µg/mL	2 mL
400 µg/mL	4 mL
600 µg/mL	6 mL
800 µg/mL	8 mL



Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 246 y 480 nm, y se obtuvo la ecuación de la recta.

Preparación de la muestra comercial de azitromicina**:** Se preparo la muestra triturando una tableta y se tomaron 50mg de la muestra triturada. Posteriormente se disolvieron en 10mL de HCl concentrado durante un minuto y se aforo la muestra a 100 mL con buffer de fosfato pH:6.8, obteniendo una solución de 500 µg/mL. Las diluciones se realizaron por triplicado (Figura 3) y se llevaron a leer en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 246 y 480 nm. Y se replicó durante los siguientes días.



Figura 3. *Preparación de la muestra y diluciones*

Discusión de Resultados

La azitromicina sin tratamiento muestra una máximo de absorción a 208 nm, aunque por el tipo de señal, no es tan adecuada para realizar la cuantificación con esta señal (REFERENCIA), Vaishnav *et al*. en 2016 trato de cuantificar la azitromicina usando HCl 0.1N, sin embargo, la concentración de HCl no es adecuada para

generar la hidrolisis,[13] cuando la muestra se somete a la hidrolisis con HCl concentrado aparecen 2 nuevas señales una a 246nm y otra a 480 nm (Figura4),

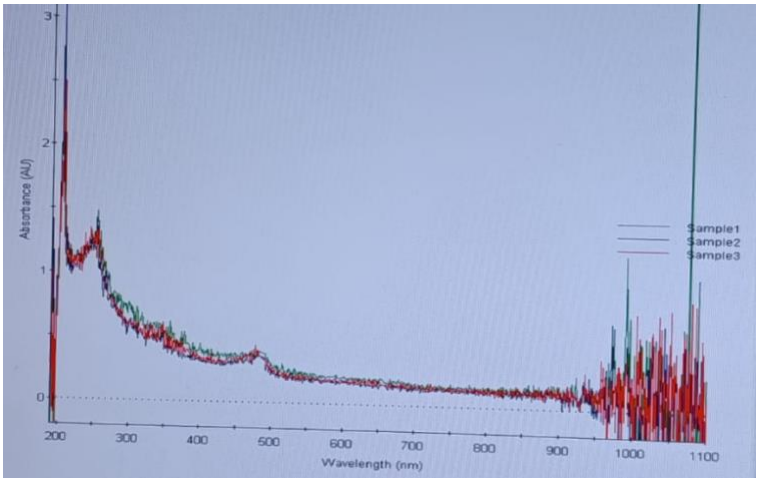
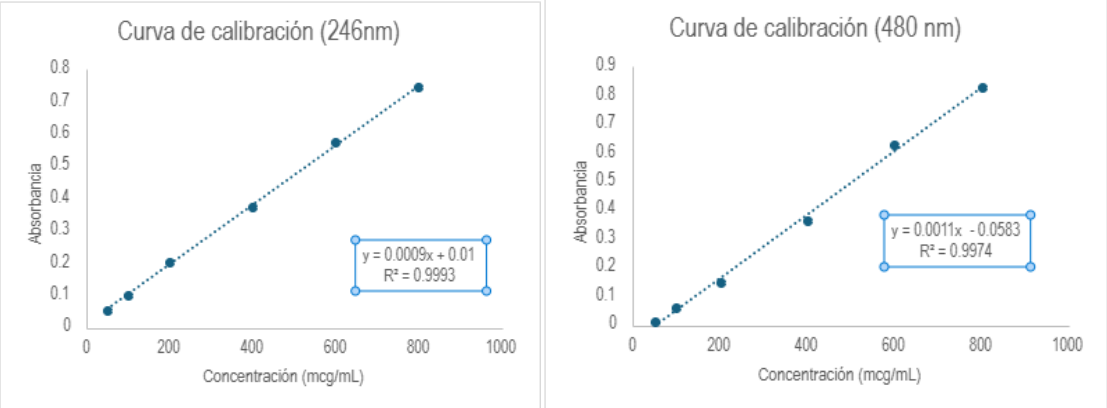


Figura4. Espectro obtenido después de la hidrolisis.

Se realizó la curva de calibración con el estándar de azitromicina empleando las diferentes diluciones para realizar las gráficas a 246 y 480 nm (Gráfica 1) donde se observa como la absorbancia es directamente proporcional a su concentración (tabla 1). Se observa un R^2 de 0.9993 a 246nm y de 0.9974 a 480nm que nos permite ver la linealidad de las concentraciones.

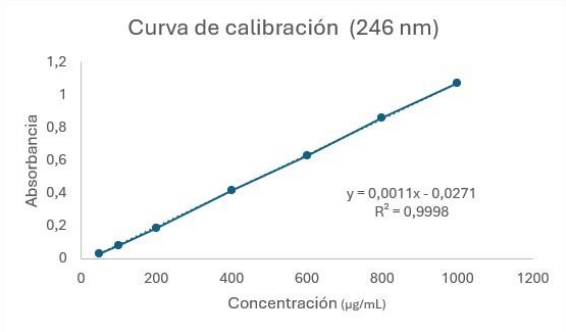
***Grafica 1**. Curvas de calibración del estándar de azitromicina.*

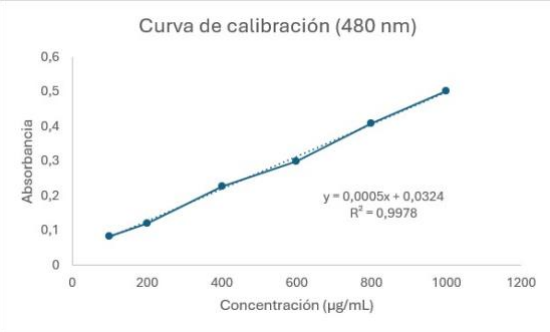


Posteriormente se planteó realizar la lectura al siguiente día, para ver la estabilidad del método, sin embargo, se observó que la solución al día siguiente se tornó verde lo cual nos muestra que la reacción no es estable en el tiempo.

Se tomo la tableta y con ella se realizó una curva de calibración para que los alumnos pudieran realizar cada uno su propia curva y ver la reproducibilidad al cambiar el analista. La cual demostró que el proceso es reproducible y con una buena linealidad, obteniéndose la ecuación de la recta y el valor de R^2. (figura 5).

***Grafica 2**. Curvas de calibración con la tableta de azitromicina.*





Parámetros de Validación		
Absorción máxima (nm)	246	480
Rango de linealidad (µg/ml)	50-1000	50-1000
Ecuación de la regresión lineal	y=0.0009x+0.01	y=0.0011x-0.0583
Coeficiente de correlación	0.9993	0.9974

TABLA 5. Datos de la curva de calibración usando la tableta como fuente de azitromicina.

Una vez que se vio que las condiciones de hidrolisis pueden ser reproducibles, se realizó la cuantificación con ambas curvas con el estándar de referencia y con la realizada con el medicamento, tomando una tableta la cual se procesó a una concentración de 500 µg/mL y se midió la absorbancia.

Absorbancia 246nm	Valor en microgramos	Tableta	Absorbancia 480nm	ref	tableta
0.9999	933.63	1099.88	0.3133	337.81	561.8
0.8416	789.72	924	0.3025	328.01	540.2
0.9049	847.27	994.33	0.3095	334.36	554.2
Promedio	856.87	1006.07	**Promedio**	333.39	552.06

De las pruebas de cuantificación se observa que la curva realizada con la tableta tiene un valor más cercano al esperado en la longitud de onda de 480nm, mientras que el valor con la sustancia de referencia tiene una desviación mayor. Las desviaciones se pueden explicar, si se toma en cuenta que la hidrolisis de la sustancia de referencia no contiene excipientes que pueden aumentar la señal de la absorbancia, por lo cual no reporta valores superiores a lo esperado, mientras que cuando se usa la tableta como fuente de azitromicina, el resultado es más cercano al esperado en la cuantificación.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Comparación de Métodos Químicos Sencillos

Método Químico	Reactivo Principal	Detección / Lectura	Aplicación Típica
Reacción con ácido fuerte	Ácido perclórico en metanol EL-YAZBI 2020	Absorbancia a 482 nm EL-YAZBI 2020	Materia prima y comprimidos EL-YAZBI 2020
Par iónico colorimétrico	Bromotimol azul (BTB) MAHMOOD 2024	Absorbancia a 415 nm MAHMOOD 2024	Formas farmacéuticas sólidas MAHMOOD 2024
Acoplamiento oxidativo	Periodato sódico / 4-aminoantipirina ABDULRAHMAN 2020	Compuesto rosa a 480 nm ABDULRAHMAN 2020	Tabletas y control de calidad ABDULRAHMAN 2020
Complejo metálico simple	Sulfato de cobre en medio ácido IBRAHIM 2017	Complejo a 250 nm IBRAHIM 2017	Formulaciones comerciales IBRAHIM 2017
Cromatografía en capa fina	HPTLC gel de sílice 60 F_{254} KASHID 2024	Densitometría a 209 nm KASHID 2024	Comprimidos y estabilidad KASHID 2024

FIGURE 1 Resumen de los métodos químicos y colorimétricos más accesibles y económicos para cuantificar azitromicina frente a técnicas instrumentales avanzadas.

Conclusión

Mediante la implementación de esta técnica, fue posible diseñar una experiencia didáctica orientada a que los estudiantes comprendan la relevancia de la cuantificación de principios activos en medicamentos, aspecto fundamental en el proceso de desarrollo farmacéutico. Esta aproximación experimental también facilitó la exploración de metodologías no reportadas previamente, evaluando su aplicabilidad y potencial.

Durante el desarrollo del experimento se identificaron diversas limitaciones inherentes al método en evaluación, tales una falta de exactitud en los resultados obtenidos y interferencia en la muestra problema debido a los excipientes.

Los datos experimentales evidencian una concordancia aceptable con los valores teóricos al emplear la formulación farmacéutica comercial; sin embargo, esta correspondencia disminuye al utilizar el estándar de referencia, debido a la complejidad de la matriz que interfiere en la hidrólisis alterando los valores de la absorbancia.

Se estima que, con un mayor tiempo de optimización, este procedimiento podría perfeccionarse, destacándose como una alternativa viable dada su simplicidad operativa y bajo costo.

En conclusión, el método alternativo basado en espectroscopía UV-Visible se presenta como una técnica eficaz y económica para la determinación cuantitativa de azitromicina, en comparación con métodos convencionalmente utilizados.

Bibliografía/Referencias

- Beauduy, C. E., & Winston, L. G. (2024). Tetraciclinas, macrólidos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas, oxazolidinonas y pleuromutilinas. En T. W. Vanderah (Ed.), *Katzung. Farmacología básica y clínica* (16e). McGraw Hill Education. https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3445&sectionid=285915276

- Bhimani, S., Sanghvi, G., Pethani, T., Dave, G., Airao, V., Sharma, T., Sheth, N., & Vaishnav, D. (2017). Development of the UV spectrophotometric method of azithromycin in API and stress degradation studies. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 68*, 48–53. https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILCPA.68.48

- Cumba, A., & Calderón, C. (2011). Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de claritromicina en comprimidos. *Química Central, 2*(1), 13–18.

- Deokate, U. A., Ahire, S., & Lahane-Ahire, S. (2020). Available analytical method for macrolide antibiotic. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 26*(2), 256–261. https://www.researchgate.net/publication/338335818_Available_Analytical_Method_for_Macrolide_Antibiotic

- García-Mayor, M. A., et al. (2015). Occurrence of erythromycin residues in sheep milk: Validation of an analytical method. *Food and Chemical Toxicology, 78*, 26–32.

- Hewala, I. I., & Afifi, S. A. (2011). Development and validation of stability-indicating UV-spectrophotometric and RP-HPLC methods for the determination of claritromycin in bulk powder and pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International, 94*(1), 185–192. https://doi.org/10.13171/mjc64/01706211420-tzouganaki (doi.org in Bing)

- Rattanapoltaveechai, R., Vongkom, W., Suntornsuk, W., & Suntornsuk, L. (2007). Simple and rapid spectrophotometric method for the analysis of erythromycin in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Food and Drug Analysis, 15*(1). https://doi.org/10.38212/2224-6614.243710

- Secretaría de Gobierno. (2015). NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. *Diario Oficial de la Federación*. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5440183

- Tan, J., Chu, J., Hao, Y., Wang, Y., Yao, S., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2013). A high-throughput screening strategy for accurate quantification of erythromycin. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 44*(4), 538–544. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.024

- Wang, Z., et al. (2015). Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chemistry, 171*, 98–107.

- Wankhade, R., Bhalerao, S., Panchory, H., Pundir, A., & Pradhan, R. (2012). Analysis of erythromycin and benzoyl peroxide in combined dosage form by UV-visible spectrophotometry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4*(4), 527–531. http://ijppsjournal.com/Vol4Suppl4/4612.pdf

- Zilker, M., Sörgel, F., & Holzgrabe, U. (2019). A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.016

- Zuckerman, J. M., Qamar, F., & Bono, B. R. (2009). Macrolides, ketolides, and glycylcyclines: Azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline. *Infectious Disease Clinics of North America, 23*(4), 997–1026. https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.013