

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS TOLEDO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ENSINO E TECNOLOGIA

SABRINA EHRENBRIENK

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO E
SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS EM AZITROMICINA (MATÉRIA-PRIMA) POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

TOLEDO
2019

SABRINA EHRENBRIENK

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO E
SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS EM AZITROMICINA (MATÉRIA-PRIMA) POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Especialização em análise instrumental, Campus Toledo como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Schneider

TOLEDO

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO E SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS EM AZITROMICINA (MATÉRIA-PRIMA) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

SABRINA EHRENBRIENK

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 05 de julho de dois mil e dezanove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. RICARDO SCHNEIDER (Presidente/Orientador)

Prof. Dra. KELEN MENEZES F. ROSSI DE AGUIAR (Membro – UTFPR)

Prof. Dr. LINCOLN COUTINHO (Membro – Prati-Donaduzzi)

** A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação da Especialização*

RESUMO

Foi obtida resposta linear para o doseamento de azitromicina entre a faixa de 80 a 120% da concentração nominal do método obtendo $R= 0,9987$. O método apresentou precisão e exatidão com DPR máximo de 1,05%. O método mostrou seletividade, sendo possível separar e identificar o ativo com segurança. Foi visualizada susceptibilidade de degradação da azitromicina exposta aos meios ácido, básico e oxidativo. Em todas as condições de robustez avaliadas, deliberadas variações não causaram impacto negativo na quantificação. A azitromicina apresentou estabilidade em solução de até 25 horas.

Para a quantificação das substâncias relacionadas, foi possível identificar e separar todas as impurezas prováveis de serem encontradas na matéria-prima, sem coeluição de impurezas com o ativo. Foram quantificadas as impurezas obtidas pela degradação forçada, sendo que a degradação ocorreu nos mesmos meios citados para doseamento. A precisão do método foi obtida com DPR máximo de 1,98% e na exatidão a recuperação média ficou próxima a 100% com DPR máximo de 1,80%. O limite de quantificação do método foi de 0,10%.

Palavras chave: Seletividade. Degradação. Separação.

ABSTRACT

A linear response was obtained for the assay of azithromycin in the range of 80 to 120% of the nominal concentration of the method obtaining $R=0,9987$. The method presented accuracy with maximum RSD of 1,05%. The method showed selectivity, being possible to separate and identify azithromycin safely. Degradation susceptibility of azithromycin exposed to acidic, basic and oxidative media was visualized. In all the robustness conditions evaluated, deliberate variations did not have a negative impact on the quantification. Azithromycin showed stability in solution of up to 25 hours.

For the quantification of the related substances, it was possible to identify and separate all possible impurities to be found in the raw material, without coelution of impurities with the active. The impurities obtained by forced degradation were quantified, and the degradation occurred in the same media mentioned for assay. The accuracy of the method was obtained with a maximum DPR of 1.98% and the average recovery was close to 100% with a maximum DPR of 1.80%. The limit of quantification of the method was 0.10%.

Key words: Selectivity. Degradation. Separation.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Objetivos	8
1.1.1	Objetivo Geral	8
1.1.2	Objetivo Específico.....	8
1.2	Justificativa.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	Validação de métodos analíticos.....	9
2.1.1	Parâmetros de validação analítica	10
2.2	Azitromicina	11
3	METODOLOGIA.....	13
4	RESULTADOS	13
4.1	Validação de teor de azitromicina na matéria-prima	13
4.1.1	Seletividade.....	13
4.1.2	Linearidade	14
4.1.3	Exatidão	16
4.1.4	Precisão	17
4.1.5	Faixa de trabalho.....	18
4.1.6	Robustez.....	19
4.2	Validação de substâncias relacionadas de azitromicina na matéria-prima.....	24
4.2.1	Seletividade.....	24
4.2.2	Exatidão	31
4.2.3	Precisão	32
4.2.4	Limite de quantificação	33
5	CONCLUSÃO.....	33
6	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Com a criação de legislações voltadas ao controle de medicamentos, a rotina analítica se tornou mais padronizada. Para ter a implementação de um novo produto ou adequação dos produtos do portfólio à legislação atual, são necessárias adequações nos processos, sendo um deles, a validação analítica. A publicação da RDC 166 trouxe definições em relação as validações analíticas. Mesmo com a utilização de metodologia descrita em monografias oficiais é necessária a comprovação pela indústria de que os requisitos mínimos são atendidos dentro da rotina analítica, comprovando assim a aplicabilidade do método em questão. Assim, com a realização da validação, comprova-se que o método atende aos requisitos para o escopo que se propõe (ANVISA, 2017).

Mesmo com a implementação de definições, o parâmetro seletividade, por exemplo, gera bastante discussões sobre como deve ser conduzido. Considerando que, mesmo mundialmente, há apenas sugestões de como proceder com a análise, principalmente considerando o elevado número de moléculas utilizadas nas indústrias, e sua ampla variabilidade nos testes. Em 2015 a Anvisa disponibilizou o Guia 04 trazendo maiores explicações acerca das análises de perfil de degradação (ANVISA, 2015).

A validação analítica conduzida nesse estudo foi da matéria-prima de Azitromicina. É um antibiótico amplamente conhecido e produzido por várias indústrias. Pertence à classe de macrolídeos indicada no tratamento de infecções causadas por bactérias sensíveis ao ativo. O medicamento age impedindo que bactérias produzam as proteínas necessárias para crescimento e reprodução dentro do organismo do paciente (ANVISA, 2018). Por se tratar de um produto de linha antigo com as alterações de legislação se faz necessária a adequação as legislações vigentes, necessitando assim da validação para doseamento do ativo e quantificação das impurezas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Realizar validação de doseamento e substâncias relacionadas do insumo farmacêutico ativo de azitromicina por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com legislações vigentes.

1.1.2 Objetivo Específico

- Realizar validação da metodologia de substâncias relacionadas de azitromicina de acordo com metodologia farmacopeica.
- Realizar validação da metodologia de doseamento para Azitromicina de acordo com método desenvolvido localmente.
- Avaliar as potenciais degradações da azitromicina quando exposta a condições drásticas de temperatura, umidade, luz ultravioleta, ampla faixa de pH, meio oxidativo e íons metálicos.
- Avaliar a precisão, exatidão e linearidade pertinentes de cada metodologia.
- Avaliar a susceptibilidade da metodologia desenvolvida localmente a pequenas e deliberadas variações.

1.2 Justificativa

Ao utilizar método analítico descrito em compêndio oficial é necessário que a adequabilidade da metodologia seja demonstrada. E, para métodos analíticos que não estejam descritos em monografia oficial, é requerido uma validação completa de acordo com os parâmetros técnico-operacionais. Durante a validação analítica é confirmada a aplicabilidade da metodologia, mostrando que é possível obter resultados confiáveis para a finalidade proposta. Assim, este trabalho irá demonstrar a validação das metodologias analíticas de azitromicina para doseamento e substâncias relacionadas (ANVISA, 2017).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Validação de métodos analíticos

Devido a necessidade da avaliação da qualidade e eficácia de medicamentos antes da utilização pelo consumidor final, a criação de um conselho que unifique de maneira geral o desenvolvimento farmacêutico a nível global foi necessária. Em 1990 foi realizado o primeiro encontro registrando o início do ICH (Conselho internacional de harmonização). Inicialmente, agências regulatórias dos Estados Unidos da América, Japão e Europa se reuniram. Os tópicos definidos como critérios básicos para discussão foram de segurança, eficácia e qualidade de medicamentos. Depois de 25 anos, em 2015, o ICH teve sua inauguração oficial como a conferência internacional de harmonização, sendo reconhecido como uma entidade legal sob lei suíça. Assim, o ICH em todo seu período de atuação vem fornecendo guias harmonizados para desenvolvimento farmacêutico no mundo todo (ICH, 2018).

No Brasil o órgão regulamentador para indústrias farmacêuticas é a Anvisa. Atualmente a legislação que traz definições em relação a validação analítica é a RDC 166 (Resolução da diretoria colegiada), publicada em julho de 2017. Ela revogou a antiga resolução RE 899 de 2003, trazendo definições mais atualizadas para os parâmetros a serem seguidos. A RDC 166 estabelece também a diferença entre validação analítica e validação analítica parcial, onde, a validação parcial incorpora apenas alguns itens de validação analítica para confirmação de que um método previamente validado por um órgão oficial fornece resultados dentro do esperado para a empresa que se propõe a utilizá-lo. E a validação analítica completa, se mostra necessária quando a empresa opta pelo desenvolvimento local da metodologia em questão (ANVISA, 2017).

Dentro de uma validação analítica para métodos de quantificação de impurezas e doseamento do ativo as análises a serem realizadas são: seletividade, precisão, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, linearidade, faixa de trabalho, robustez e limite de quantificação, sendo, o último, apenas para método de quantificação de impurezas. Em casos de validação parcial apenas os três primeiros itens são necessários para doseamento do ativo e além desses, o limite de quantificação, quando método de quantificação de impurezas (ANVISA, 2017).

2.1.1 Parâmetros de validação analítica

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância de resultados individuais. Partindo do mesmo lote do material homogêneo, o mesmo procedimento deve ser aplicado no preparo das amostras. Deve ser avaliada a dispersão dos resultados obtidos, expressa pelo desvio padrão relativo. A precisão da metodologia é avaliada em dois níveis: repetibilidade e intermediária. A repetibilidade avalia a precisão dos resultados dentro das mesmas condições operacionais, e pequeno intervalo de tempo enquanto a precisão intermediária, avalia as variações laboratoriais, em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou utilização de diferentes equipamentos (WHO, 2016).

Exatidão expressa a proximidade entre o valor aceitável como referência de aceitação em relação ao valor encontrado. De acordo com a RDC 166, para todos os casos, deve ser utilizada substância química de referência (SQR) na quantificação da recuperação. Sendo que, para métodos de doseamento de produto acabado, o SQR do ativo deve ser acrescentado na matriz (placebo) para quantificação, e para métodos de impurezas, a impureza a ser avaliada deve ser acrescida à amostra, sendo matéria-prima ou produto acabado, conforme método a ser avaliado (ANVISA, 2017).

Linearidade é a capacidade de obter sinal analítico diretamente proporcional à concentração do analito na amostra e deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. Avaliações estatísticas dos resultados obtidos são requeridas. Em método de quantificação de impurezas, onde a impureza é quantificada em relação ao ativo, a avaliação da linearidade se mostra importante. Uma vez que, ao comparar os coeficientes angulares do ativo e da impureza, é possível avaliar se ambos possuem a mesma resposta, e em caso negativo, um fator resposta relativo deve ser adicionado para que a quantificação da impureza seja realizada corretamente (WHO, 2016).

A comprovação de que o método analítico é seletivo é realizada com a comprovação de que o analito de interesse consegue ser separado, identificado e quantificado com confiança, na presença de outros componentes na matriz como excipientes, produtos de degradação, diluente e impurezas (WHO, 2016). De acordo

com a RDC 166 a pureza cromatográfica do ativo deve ser comprovada para demonstração da seletividade do método (ANVISA, 2017).

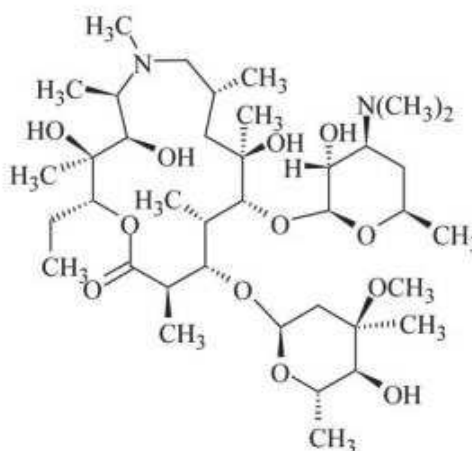
A confirmação da faixa de trabalho do método se dá após a conclusão das análises de precisão, exatidão e linearidade para o método proposto. O limite de quantificação é definido como a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Esse resultado pode ser obtido a partir das análises de precisão e exatidão (ANVISA, 2017).

A robustez de um método analítico avalia a susceptibilidade desse método a resistir pequenas variações nas condições originais, como alterações de fluxo, temperatura, composição de fase móvel, entre outras. Essa avaliação é necessária para que seja do conhecimento do analista que irá utilizar o método, que determinados parâmetros devem ter uma atenção e controle mais rigoroso (WHO, 2016).

2.2 Azitromicina

A azitromicina (Figura 1) é um antibiótico semissintético da classe dos macrolídeos e derivada da eritromicina. Sua formação se dá pela inserção de um nitrogênio metil substituído na eritromicina, possuindo assim maior estabilidade em meio ácido. Sua atuação no organismo é de amplo espectro, sendo utilizada para diversas aplicações (FERREIRA, 2007).

Figura 1: Molécula da azitromicina



Fonte: Farmacopéia Brasileira, 5º Ed.

A solubilidade da azitromicina é maior em soluções orgânicas e ácidas, e é muito pouco solúvel em água e soluções alcalinas. Apresenta-se como um pó cristalino branco (ANVISA, 2018).

Para quantificação do teor de azitromicina na matéria-prima, a farmacopeia brasileira fornece método microbiológico por difusão em ágar utilizando cilindros. Para avaliação de substâncias relacionadas não é fornecida metodologia analítica (ANVISA, 2018). A farmacopeia americana fornece quantificação para ambas análises por cromatografia líquida. A azitromicina possui 15 possíveis impurezas no insumo farmacêutico, tornando o método analítico desafiador, uma vez que todas as impurezas devem ser separadas entre elas e também do ativo, dessa forma, o método de substâncias relacionadas por cromatografia líquida de alta eficiência se torna longo, mas, específico (USP, 2018).

Waghule et. al. (2013) realizaram desenvolvimento de método analítico para quantificação de azitromicina em produto acabado por cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores propuseram um método com eluição isocrática com fluxo de 1,2 mL/min utilizando tampão fosfato 0,0335 M com pH 7,5 e metanol na proporção 20:80. A azitromicina eluiu da coluna com tempo de retenção de 8,35 minutos e o método se apresentou preciso, exato e linear na faixa avaliada.

GHARI, KOBARFARD e MORTAZAVIA (2013) também desenvolveram um método de quantificação de azitromicina em comprimidos de forma alternativa ao método da farmacopeia americana. Os autores obtiveram um método preciso, exato, linear e sensível utilizando uma coluna C18 com eluição isocrática de fluxo 1,5 mL/min utilizando como fase móvel as soluções de tampão fosfato e metanol na proporção de 10:90.

Metodologias para a quantificação das impurezas de azitromicina são escassas na literatura. Uma vez que a farmacopeia americana apresenta método para esse fim, a indústria pode optar por segui-la evitando assim desprendimento de tempo no desenvolvimento local do método, considerando o grande número de impurezas que precisam ser separadas seria um desenvolvimento de alta criticidade.

3 METODOLOGIA

Para a realização da validação parcial do método de substâncias relacionadas foi seguida a metodologia de impurezas orgânicas procedimento 2 disponível na farmacopeia americana USP 41 (ANEXO A).

A metodologia para quantificação do teor de azitromicina na matéria prima foi desenvolvida localmente por método de gradiente utilizando as mesmas soluções da metodologia de substâncias relacionadas com fluxo de 1,0 mL/min. A coluna C18 utilizada também foi a mesma com temperatura na coluna em 45 °C, com volume de injeção de 50 µL e tempo de corrida de 36 minutos. A metodologia completa está apresentada no ANEXO B.

4 RESULTADOS

4.1 Validação de teor de azitromicina na matéria-prima

4.1.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade da azitromicina, o ativo foi exposto a condições drásticas de estresse compreendendo ampla faixa de pH, oxidação, presença de íons metálicos, luz ultravioleta, temperatura elevada e alta umidade. As condições utilizadas no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de estresse utilizadas

Amostra	Condição de estresse	Tempo de exposição
Controle	-	-
Estresse ácido	Ácido clorídrico 1,0 M	30 minutos
Estresse alcalino	Hidróxido de potássio 2,0 M	1 dia
Estresse oxidativo	Peróxido de Hidrogênio 0,3%	1 hora
Estresse íons metálicos	Sulfato de Cobre 10 mM	1 dia
Estresse térmico	60 °C	10 dias
Estresse por umidade	75% U.R. e 40 °C	10 dias
Estresse Fotolítico	1,2 milhões lux/h	110 horas

Fonte: Autoria própria.

As condições de estresse em meios químicos apresentaram curtos períodos de exposição, uma vez que já apresentaram degradação nesse tempo. Vale ressaltar que

a condição de estresse por íons metálicos é realizada pelo período máximo de 24 horas, conforme recomendação da Anvisa.

A azitromicina apresentou degradação quando exposta aos meios ácido, básico e oxidativo, com degradações superiores a 10% nessas condições. A avaliação da pureza espectral, mostrou que não houve coeluição de compostos com o ativo e apresentou-se adequada em todas as condições avaliadas com valores de purity angle menores que os de purity threshold, assim como a resolução obtida entre as impurezas geradas com o ativo foi superior a 1,5. Nos demais meios o ativo se mostrou estável. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Resultados das soluções em estresse

Amostra	Teor (%)	Varição (%)	Purity Angle	Purity Threshold
Controle	99,94	-	0,137	0,348
Ácido	76,02	23,94	0,144	0,344
Álcalino	89,27	10,67	0,148	0,368
Oxidativo	78,95	21,00	0,157	0,372
Íons metálicos	98,79	1,15	0,114	0,319
Térmico	99,43	0,20	0,200	0,422
Umidade	99,86	0,63	0150	0,359
Fotolítico	98,81	0,43	0,166	0,370

Fonte: Autoria própria.

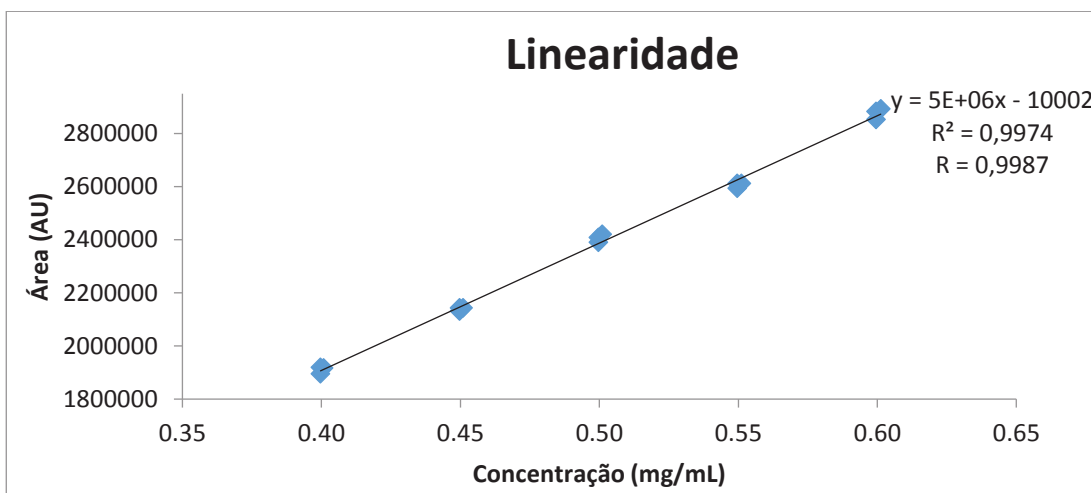
Com os resultados apresentados confirma-se que foi possível separar, identificar e quantificar a azitromicina frente a condições drásticas de estresse e a metodologia utilizada se mostrou seletiva. Os valores de purity angle ficaram menores que os respectivos purity threshold, assim como não houve cruzamento das linhas no purity plot. Durante o manuseio, transporte e armazenamento do ativo devem ser tomados cuidados para evitar a exposição aos meios onde há tendência de degradação.

4.1.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi efetuada mediante a obtenção de curva analítica com cinco níveis de concentração e com três réplicas em cada nível,

compreendendo o intervalo de 80,0% a 120,0% da concentração nominal da azitromicina (0,50 mg/mL) abrangendo o intervalo de concentração de 0,40 a 0,60 mg/mL de Azitromicina. A Figura 2 apresenta o gráfico da linearidade com a respectiva equação da reta.

Figura 2: Gráfico da linearidade da azitromicina

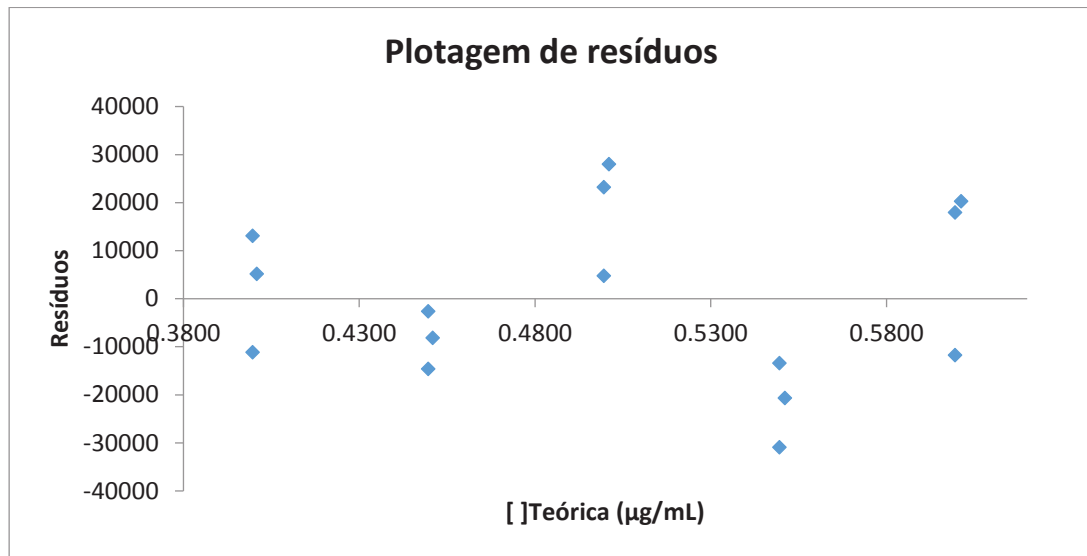


Fonte: Autoria própria.

Pela Figura 2 é possível verificar que o R obtido para a regressão linear foi acima de 0,990, conforme especificado.

A análise visual dos resíduos em conjunto com os testes de Cochran e Grubbs foram utilizados para validar a adequabilidade do modelo de regressão. De acordo com a avaliação da distribuição dos resíduos (Figura 3) verifica-se que os erros não são totalmente independentes, mas há variância constante uma vez que os pontos se apresentaram distribuídos de forma aleatória em torno da reta de resíduo zero, sem tendência linear.

Figura 3: Gráfico de resíduos para azitromicina



Fonte: Autoria própria.

Adicionalmente, os resultados do teste estatístico de Cochran para a homogeneidade das variâncias demonstrou que os resíduos são homocedásticos em um nível de significância de 5% (C calculado $0,3332 < C$ tabelado $0,6838$). Desta forma, verifica-se que mesmo com a avaliação visual do gráfico de resíduos apresentando resíduos dependentes, eles possuem variâncias homogêneas, não comprometendo a análise.

Para verificar a ocorrência de valores extremos (outliers) utilizou-se o teste de Grubbs. Dentre os 15 resíduos obtidos na construção da regressão linear não houve a ocorrência de nenhum valor extremo (outlier), pois o maior valor calculado (1,74) foi menor que o valor tabelado ($G_{\text{tabelado}} = 2,409$).

Assim, comprova-se que o método é linear, obtendo resposta analítica proporcional a concentração avaliada na faixa de 80 a 120% da concentração nominal.

4.1.3 Exatidão

A recuperação do padrão de azitromicina foi avaliada em três níveis (80,0, 100,0 e 120,0%) em triplicata de cada nível. Foi avaliada a recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) para cada nível. A especificação foi de 1,3% de DPR e recuperação entre 98,0 – 102,0%. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Exatidão

Nível	Recuperação (%)	Média rec. (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)	Especificação Recuperação (%)
80%	98,25	99,45	1,05	1,3	98,0 – 102,0
	99,93				
	100,18				
100%	100,75	100,13	0,87	1,3	98,0 – 102,0
	99,13				
	100,50				
120%	99,25	100,15	0,86	1,3	98,0 – 102,0
	100,95				
	100,26				

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados apresentados verifica-se que as recuperações e os desvios obtidos estão dentro do especificado, mostrando assim que o método é capaz de quantificação com exatidão a azitromicina dentro da faixa de 80% a 120%.

4.1.4 Precisão

A precisão da metodologia foi avaliada em dois níveis. Foram preparadas seis réplicas da solução amostra e injetadas, sendo avaliada a repetibilidade obtida entre os preparos com parâmetro de especificação sendo o DPR. Posteriormente, seis novas amostras foram preparadas, por um segundo analista e foi avaliado o DPR obtido entre os dois preparos (precisão intermediária). Os resultados obtidos estão apresentados abaixo.

Tabela 4: Precisão 1º dia

Nível (%)	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
100	98,08	98,33	0,27	1,30
	98,19			
	98,67			
	98,44			
	98,57			
	98,04			

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5: Precisão 2º dia

Nível (%)	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
100	101,83	101,28	0,56	1,30
	101,65			
	100,72			
	100,61			
	101,02			
	101,89			

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6: Comparativo – precisão intermediária

Nível (%)	Teor 1º dia (%)	Teor 2º dia (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
100	98,08	101,83	1,60	2,00
	98,19	101,65		
	98,67	100,72		
	98,44	100,61		
	98,57	101,02		
	98,04	101,89		

Fonte: Autoria própria.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que o método validado é preciso, fornecendo confiabilidade dos resultados obtidos.

4.1.5 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho para a metodologia analítica foi estabelecida pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados entre as concentrações de 0,40 mg/mL a 0,60 mg/mL de azitromicina, o que corresponde ao intervalo de 80% a 120% da concentração nominal da amostra no método analítico.

4.1.6 Robustez

As variações testadas na robustez foram: tempo de extração, fluxo da fase móvel, composição e pH da fase móvel, filtros, estabilidade das amostras, temperatura e variação de lote da coluna.

As alterações analíticas foram comparadas frente ao método sem alteração, quantitativamente através do cálculo da recuperação de azitromicina na *Solução teste*. Esta avaliação se refere à comprovação da robustez conforme os critérios de exatidão, demonstrando que a alteração proposta não resulta em diferença na quantificação do analito de interesse.

Na Tabela 7 estão apresentados os dados para avaliação do impacto das variações propostas no sinal analítico de maneira quantitativa.

Tabela 7 - Avaliação quantitativa da robustez

Condição	Amostra Teste		Especificação (%)
	Teor (%)	Recuperação (%)	
Tempo de extração 5 min (original)	100,79	-	
Tempo de extração 4 min	100,51	99,72	
Tempo de extração 6 min	100,62	99,83	
Centrifugada (controle)	101,88	-	
Filtro PVDF 0,22 µm (descarte de 1 mL)	101,28	99,41	
Filtro PVDF 0,22 µm (descarte de 2 mL)	101,22	99,35	
Filtro PTFE 0,45 µm (hidrofílico) (descarte de 1 mL)	101,28	99,42	
Filtro PTFE 0,45 µm (hidrofílico) (descarte de 2 mL)	101,38	99,51	98 – 102
Filtro PET 0,22 µm (descarte de 1 mL)	101,50	99,63	
Filtro PET 0,22 µm (descarte de 2 mL)	101,69	99,81	
Fluxo da fase móvel (original)	99,50	-	
Fluxo da fase móvel 0,95 mL/min	101,47	101,99	
Fluxo da fase móvel 1,05 mL/min	99,72	100,22	
Composição da fase móvel (original)	100,57	-	
Composição da fase móvel (Grad. 1)	102,28	101,70	
Composição da fase móvel (Grad. 2)	101,42	100,85	

Tabela 7 - Avaliação quantitativa da robustez

(continua)

Condição	Amostra Teste		Especificação (%)
	Teor (%)	Recuperação (%)	
pH da fase móvel 8,80	98,76	98,89	
pH da fase móvel (original)*	100,39	-	
pH da fase móvel (9,00)	101,87	101,48	
Temperatura da coluna (original)	99,68	-	
Temperatura da coluna 44°C	99,95	100,27	
Temperatura da coluna 46°C	100,07	100,39	
Lote da coluna (original)	100,61	-	
SN 01753603713813			
Lote da Coluna	100,82	100,21	
SN 01643427413842			

Fonte: Autoria própria.

Nota: As variações de pH foram realizadas em períodos diferentes e, portanto, possuem valores de controle diferentes.

Os impactos qualitativos das alterações foram avaliados conforme os critérios de seletividade na *Solução teste - degradação alcalina* devido a maior proximidade do pico da degradação com o ativo. A Tabela 8 mostra a resolução entre os picos da degradação alcalina na *Solução teste – degradação alcalina* e azitromicina, para o método com e sem alteração. Para todas as condições avaliadas o valor de *purity angle* obtido foi menor que o de *purity threshold*, mostrando assim que não houve coeluição com o pico referente ao analito de interesse, indicando adequada separação cromatográfica.

As informações referentes à avaliação qualitativa de possíveis interferências dos filtros são apresentadas logo abaixo.

Tabela 8 - Avaliação qualitativa de robustez

Condição	Resolução	Especificação (%)
Fluxo da fase móvel (original)	23,12	
Fluxo da fase móvel 0,95 mL/min	23,08	
Fluxo da fase móvel 1,05 mL/min	22,77	
Composição da fase móvel (original)	20,85	
Composição da fase móvel (Grad. 1)	20,94	
Composição da fase móvel (Grad. 2)	20,59	
pH da fase móvel (original)*	17,49	
pH da fase móvel 8,80	21,78	1,50
pH da fase móvel (original)*	23,00	
pH da fase móvel (9,00)	23,07	
Temperatura da coluna (original)	22,74	
Temperatura da coluna 44°C	22,91	
Temperatura da coluna 46°C	22,80	
Lote da coluna (original) SN 01753603713813	20,85	
Lote da Coluna SN 01643427413842	20,12	

Fonte: Autoria própria.

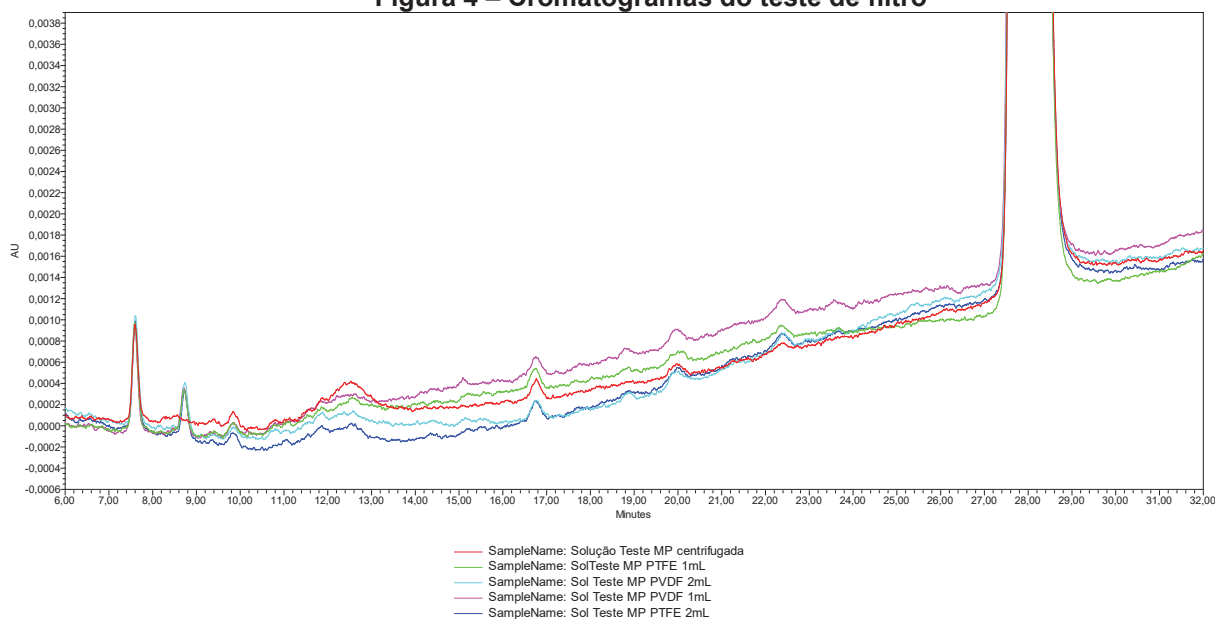
Nota: As variações de pH foram realizadas em períodos diferentes e, portanto, possuem valores de controle diferentes.

Teste de filtros – avaliação qualitativa

A relação *purity angle* < *purity threshold* foi mantida para os filtros PVDF e PTFE. Com a utilização de filtro PET houve interferência do filtro no pico do ativo, obtendo inclusive visível coeluição no *purity plot*, desta forma, esse filtro não deve ser utilizado na rotina analítica.

Na Figura 4 foi realizada a sobreposição dos cromatogramas da solução centrifugada juntamente com os demais filtros aprovados.

Figura 4 – Cromatogramas do teste de filtro



Pela Figura 4 é observado que não há interferência de nenhum dos filtros uma vez que todos apresentam o mesmo perfil que a solução centrifugada próximo e no tempo de retenção do ativo. Assim ambos filtros podem ser utilizados na rotina analítica, mantendo o volume de descarte de 1 e 2 mL.

Estabilidade de Soluções

Para a determinação da estabilidade das soluções teste e padrão as mesmas foram mantidas sob refrigeração à 5°C e ao abrigo da luz. As soluções foram avaliadas nos períodos de 0, 9, 17 e 25 horas.

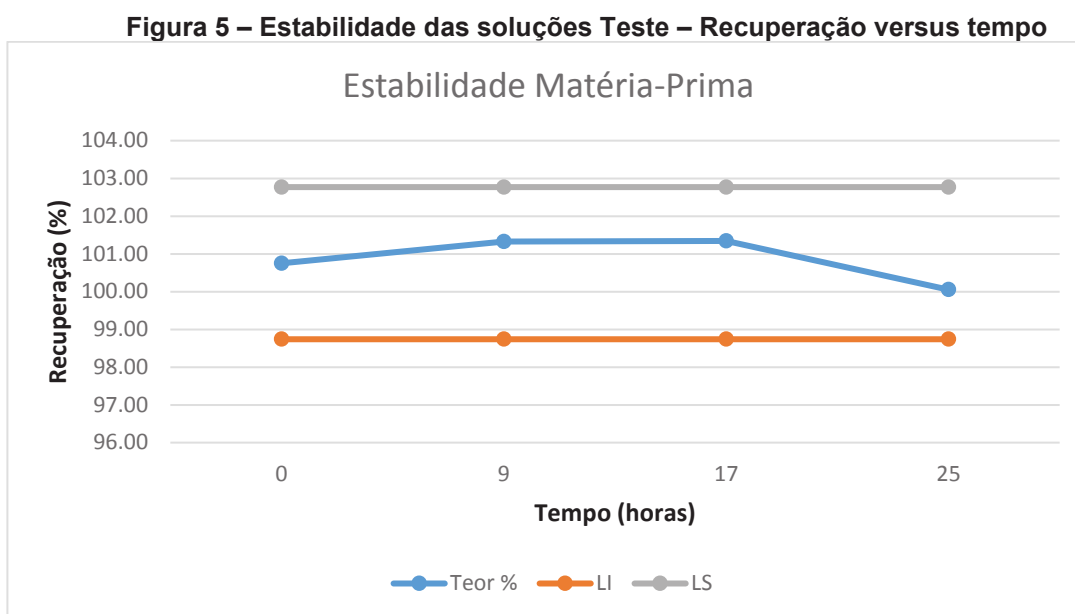
Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da recuperação média das soluções teste utilizadas em cada período analisado. E na Tabela 10 os resultados para a solução padrão.

Tabela 9 – Estabilidade da solução teste

Tempo de coleta	Teor (%)	Recuperação (%)	Limite inferior	Limite superior
0 horas	100,8	N/A		
9 horas	101,3	100,6	98,7	102,8
17 horas	101,3	100,6		
25 horas	100,1	99,3		

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 5 estão plotados os valores de limites superiores (LS) e inferiores (LI) e os teores obtidos a cada tempo de análise da solução teste e na Figura 6 para a solução padrão.



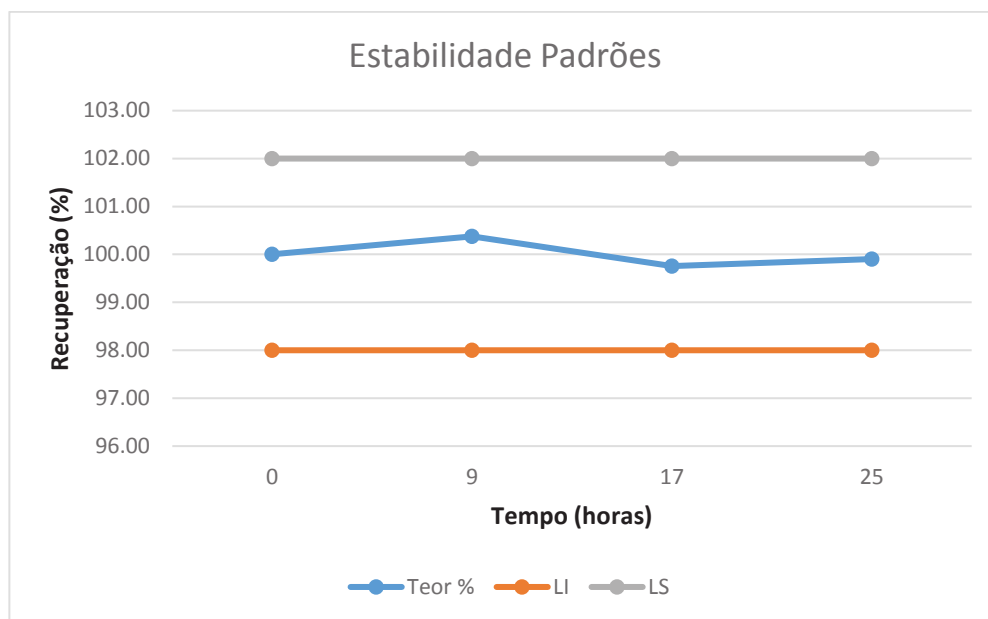
Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 – Estabilidade da solução padrão

Tempo de coleta	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Limite inferior	Limite superior
0 horas	100,0	N/A		
9 horas	100,4	100,4	98,0	102,0
17 horas	99,8	99,8		
25 horas	99,9	99,9		

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Estabilidade das soluções Padrão – Recuperação versus tempo



Fonte: Autoria própria.

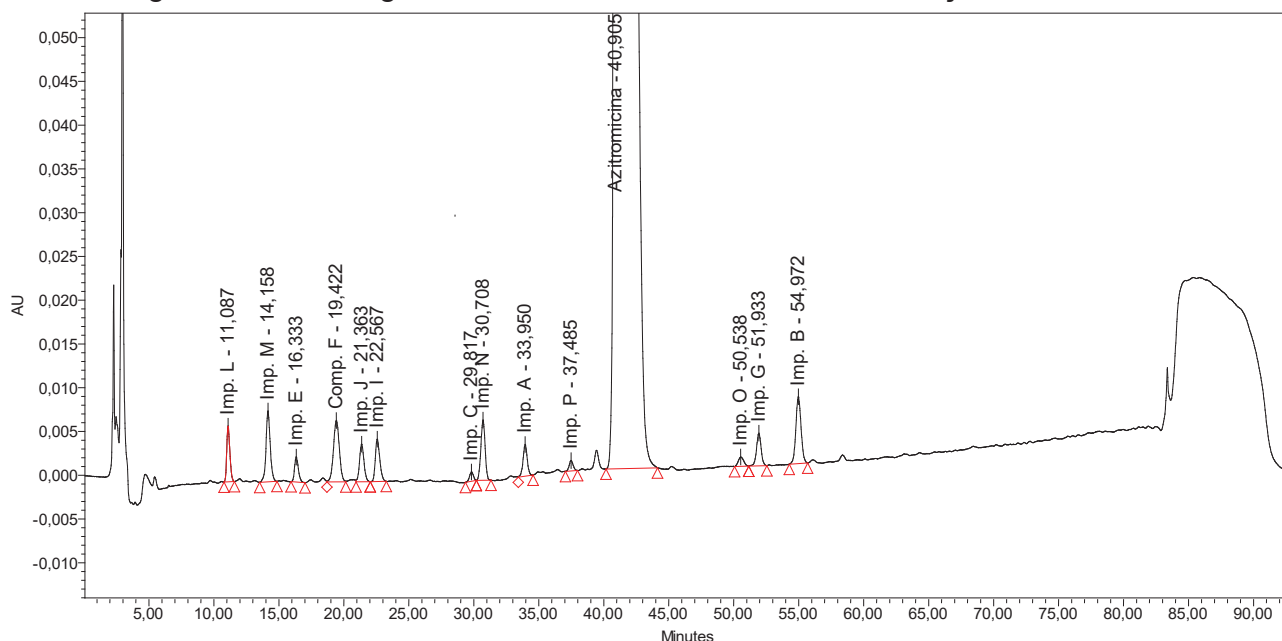
Com os dados apresentados, verifica-se que a recuperação da solução teste e da solução padrão se manteve dentro da faixa dos limites superior e inferior durante todo o período analisado. A variação entre o tempo 0 e o final da análise ficou dentro da faixa de recuperação da exatidão que é de 98,0 a 102,0%. Assim, se mantida sob refrigeração à 5°C as soluções podem ser utilizadas até o período máximo de 25 horas. Para a rotina de trabalho esse tempo pode ser utilizado com confiança principalmente na recuperação de soluções controle ao final da análise, mas recomenda-se o preparo das soluções teste antes de sua injeção.

4.2 Validação de substâncias relacionadas de azitromicina na matéria-prima

4.2.1 Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método, foi utilizado o padrão Azithromycin identification mixture fornecido pela farmacopeia americana – USP, o qual corresponde a uma mistura da azitromicina e algumas impurezas descritas no método farmacopeico. A Figura 7 corresponde ao cromatograma da solução proveniente do padrão de Azitromicina mistura de identificação.

Figura 7: Cromatograma azitromicina mistura de identificação

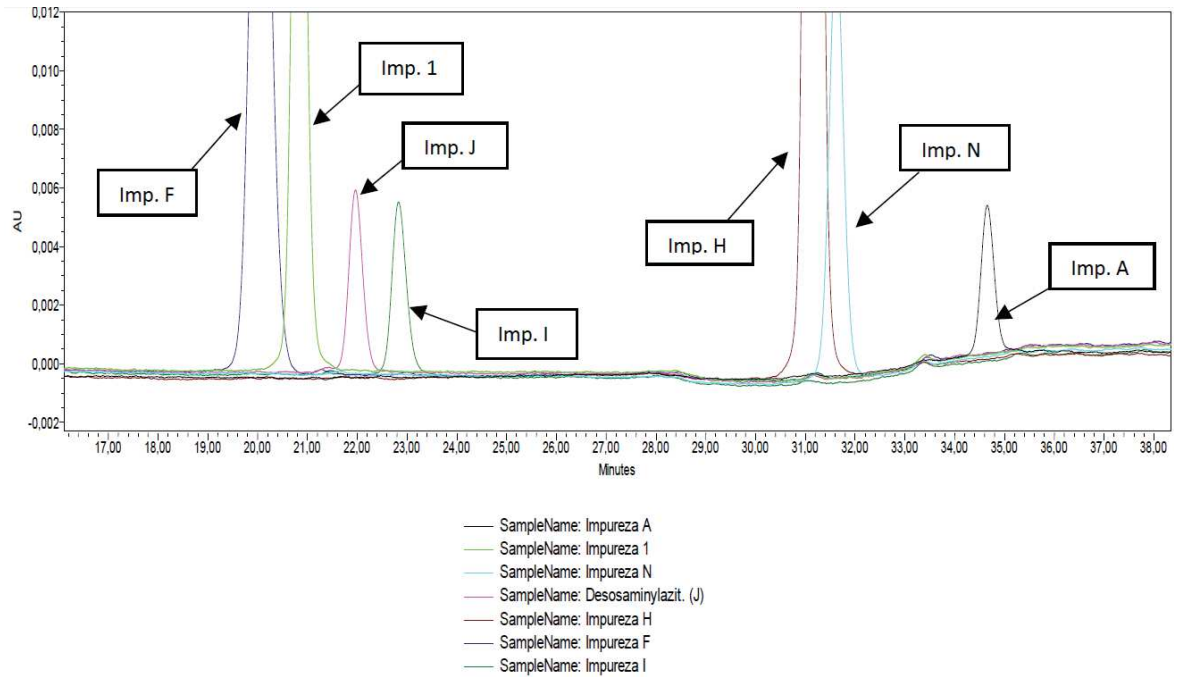


Fonte: Autoria própria.

Pela Figura 7 é possível verificar que o método é capaz de separar todas as impurezas presentes no padrão utilizado. Dentre as impurezas descritas no procedimento 2 da USP 41, este padrão não possui as impurezas H (3'-N--{4-(Acetamilamino)fenil]sulfonila}-3'-demetilazitromicina e impureza 1 (3'-N--{4-(acetilamino)fenyl]sulfonila}-3',3'-didemetilazitromicina). De acordo com o tempo de retenção relativo (TRR) citado pela farmacopeia, a impureza 1 elui com parcial sobreposição frente a impureza J, e a impureza H elui entre as impurezas N e A.

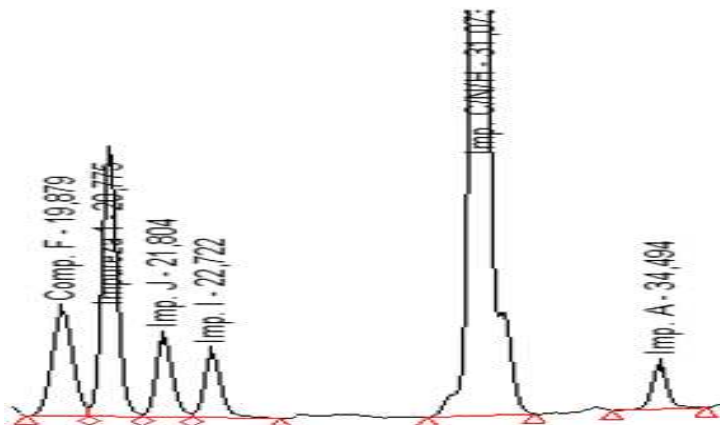
Para verificação da separação dessas impurezas com as demais, elas foram injetadas separadamente. Na Figura 8 está a sobreposição dos cromatogramas das impurezas F, J, 1, I, N, H e A, todas as impurezas foram avaliadas na concentração da especificação, compreendendo as especificações de 0,5%, 0,7%, 0,3% e 0,15%, respectivamente.

Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas das impurezas



Com os dados da Figura 8, verifica-se que tanto a impureza 1 quanto a impureza H reproduziram internamente tempo de retenção ligeiramente inferior ao descrito na monografia farmacopeica. A impureza 1 aparece no cromatograma entre as impurezas F e J, e a impureza H coeluiu com a impureza N. Foi realizada a fortificação do padrão de Azitromicina mistura de identificação com essas impurezas a fim de observar o perfil cromatográfico, os resultados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9: Ampliação do cromatograma padrão de mistura de identificação fortificado com impurezas 1 e H



Fonte: Autoria própria.

A Figura 9 apresenta a ampliação na região de eluição das impurezas F até A, verifica-se que a impureza 1 mostra-se resolvida entre as impurezas F e J. A resolução obtida em relação ao composto F é de 1,39 e a relação pico/vale de 12,82. Considerando que a avaliação de system suitability da metodologia requer a relação pico/vale superior a 1,4 entre as impurezas F e J, ainda com a presença da impureza 1 entre elas, obtém-se essa relação entre as impurezas F e 1. Desta forma, a presença da impureza 1 na matéria-prima pode ser identificada com segurança e sem comprometer a quantificação das demais.

Já com a adição da impureza H, ocorre coeluição dos picos das impurezas C, N e H, devido a sua maior intensidade e seu tempo de retenção se sobrepõem ao da impureza N. Mas, como pode ser visualizado na Figura 7, as impurezas C e N, sem a presença da H, se separam entre elas.

Tanto a impureza 1 quanto a H possuem em sua estrutura um grupamento sulfonil o que causa uma resposta superior as demais impurezas, bem como, um espectro de absorção no UV característico (Figura 10), podendo ser visualizada sua presença em relação as demais facilmente.

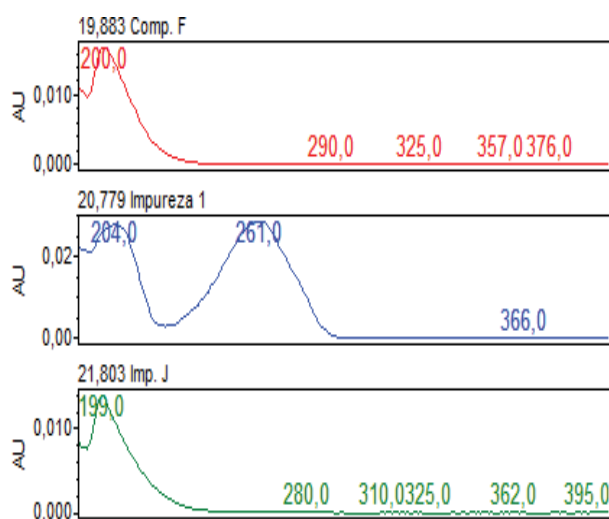
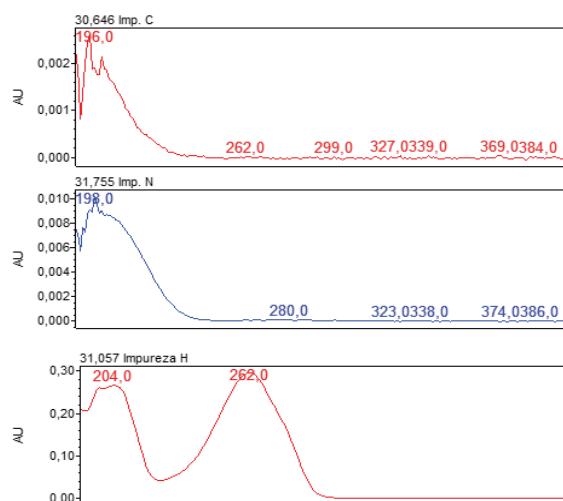


Figura 10: Espectro de absorção



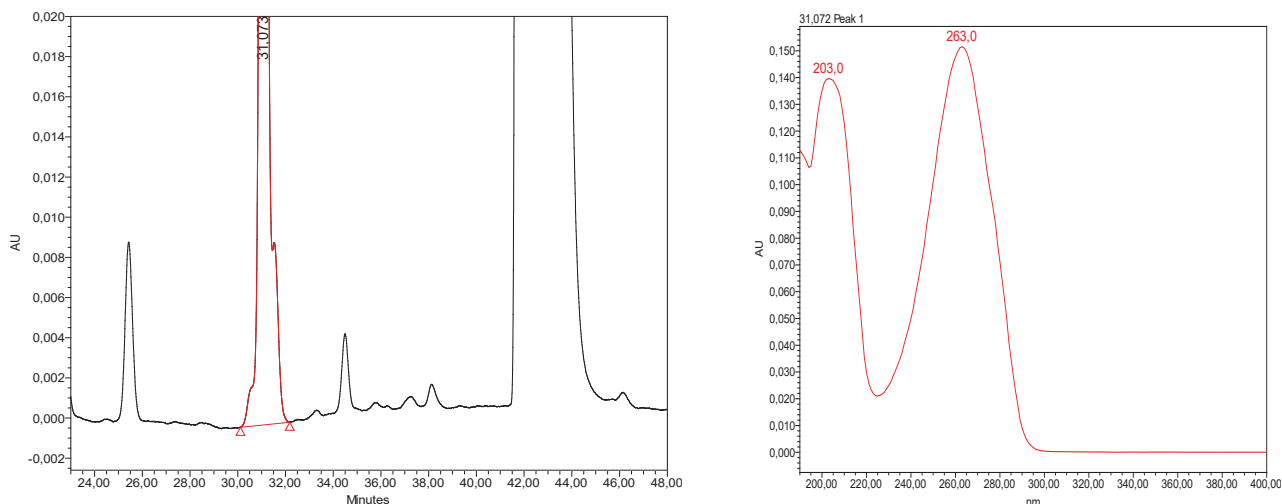
no UV-vis de algumas impurezas

Fonte: Autoria própria.

Pela Figura 10 verifica-se a intensidade de sinal em torno de 260 nm para as impurezas 1 e H, facilitando assim sua identificação quando presentes.

Na Figura 11 está apresentado o cromatograma da solução azitromicina mistura de identificação fortificado com a impureza H evidenciando apenas as impurezas C, N e H bem como o espectro no ultravioleta desse sinal.

Figura 11: Cromatograma e espectro UV para impurezas C, N e H



Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados apresentados acima, verifica-se que é possível diferenciar a presença da impureza H na solução pela sua intensa absorção em 263 nm (Figura 10), mesmo ocorrendo coeluição com a impureza C e N. Porém, pela rota de síntese da matéria-prima do fabricante avaliado, a impureza H é impossível de ser obtida ao final da síntese do produto. Então mesmo com a limitação da metodologia, todas as impurezas passíveis de apresentação na matéria-prima podem ser quantificadas com segurança.

A degradação forçada do ativo também foi avaliada agora utilizando a metodologia de substâncias relacionadas, podendo assim quantificar as impurezas geradas no estudo. Os resultados obtidos estão descritos abaixo.

Tabela 11: Degradação forçada em meio químico – substancias relacionadas

Tipo de amostra	Teor (%)	Imp. L (%)	Imp. J (%)	Imp. C (%)	Imp. A (%)	Imp. O (%)	Imp. B (%)	Imp. Desc. (%)	Soma Imp. (%)	Recup. (%)
Controle	99,83	-	-	0,13	0,10	0,10	0,40	-	0,73	-
Ácido	85,60	-	12,42	-	0,09	0,08	0,34	0,15	13,07	98,12
Oxidativo	82,25	16,33	-	0,10	0,07	0,08	0,32	0,09	16,99	98,69

Íons Metálicos	100,09	-	0,05	0,13	0,08	0,11	0,40	0,10	0,87	100,40
Básica	84,78	-	0,42	-	-	-	-	3,92	4,34	89,12

Fonte: Autoria própria.

As degradações foram superiores a 10% do ativo nas condições ácida, básica e oxidativa, e na condição de estresse por íons metálicos a azitromicina demonstrou estabilidade. O ativo também demonstrou homogeneidade espectral em todas as soluções avaliadas, com *purity angle* menor que *purity threshold*.

Em condição ácida a azitromicina apresentou como degradação principal a impureza J, em meio oxidativo a impureza L e em meio básico foram obtidas impurezas desconhecidas. Para as condições ácida e oxidativa as recuperações em relação à solução controle estiveram próximas de 100%, enquanto para o meio básico ficou em apenas 90%. A formação de impurezas nessa condição ficou em torno de 4% enquanto a degradação do ativo chegou quase a 15%.

A fim de realizar um estudo mais detalhado da degradação básica, foi realizado um novo estresse. Coletas com maior frequência foram realizadas até que houvesse degradação em torno de 10%. Os resultados estão apresentados na Tabela 12 e Tabela 13.

Tabela 12: Resultados das soluções em estresse básico com coletas periódicas

Tipo de amostra	Teor (%)	Impurezas conhecidas (%)	Impurezas desconhecidas (%)	Soma Imp. (%)	Recuperação (%)
Controle	99,45	0,75	-	0,75	-
Básico 2 h	98,88	0,81	0,50	1,31	99,99
Básico 4 h	98,12	0,68	0,91	1,59	99,51
Básico 8 h	96,28	0,73	1,63	2,36	98,44
Básico 12 h	93,87	0,73	2,18	2,91	96,59
Básico 24 h	93,33	0,83	3,40	4,23	97,37
Básico 48 h	89,98	1,66	5,41	7,07	96,86

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13: Resultados das impurezas presentes na solução degradada pelo estresse básico

Tipo de amostra	L (%)	M (%)	F (%)	J (%)	I (%)	C (%)	A (%)	O (%)	B (%)	Desc. RRT (%)	Desc. RRT (%)	Desc. RRT (%)	Desc. RRT (%)
										0,438	0,454	0,659	0,695
Controle	-	-	-	-	-	0,13	0,11	0,11	0,40	-	-	-	-

Básico 2 h	-	-	-	0,10	-	0,13	0,10	0,11	0,37	0,07	0,19	0,25	-
Básico 4 h	-	-	-	-	-	0,11	0,09	0,11	0,37	0,09	0,17	0,56	0,08
Básico 8 h	-	-	-	-	0,09	0,09	0,07	0,11	0,36	0,13	0,21	1,15	0,13
Básico 12 h	-	-	0,02	-	0,10	0,08	0,06	0,11	0,36	0,13	0,20	1,68	0,17
Básico 24 h	-	-	0,03	-	0,27	0,07	-	0,11	0,35	0,15	0,17	2,88	0,20
Básico 48 h	0,23	0,04	0,05	0,28	0,62	-	-	0,10	0,33	0,15	0,22	4,85	0,19

Fonte: Autoria própria.

Os dados reportam a inconsistência entre a queda de teor do ativo e a possibilidade de recuperação para fechamento do balanço de massas, a qual é potencializada ao longo do período de estresse. Os resultados de recuperação individual das impurezas (Tabela 13) indicam que tal comportamento se refere a degradações secundárias. Esta avaliação é coerente frente ao comportamento das impurezas A, B, C e O de síntese que, assim como azitromicina, apresentam redução de teor na amostra sob estresse. Mesmo as impurezas de degradação podem sofrer degradação secundária, impossibilitando o fechamento do balanço de massas. De acordo com os dados do estudo são reportados quatro produtos de degradação (impurezas desconhecidas) a partir de 4 horas de análise. Dentre estes, apenas o de tempo de retenção relativo (RRT) 0,454 mantém-se com baixa variabilidade, ocorrendo aumento para os demais no decorrer da análise. O pico com RRT 0,659 corresponde ao produto majoritário da degradação básica e sua formação potencial permite justificar o término do estresse alcalino com 4 horas de exposição, neste período de estresse é possível recuperar o ativo em 98% e o nível do PD se apresenta acima do permitido para impurezas desconhecidas (0,2%). Assim como, com 4 horas de estresse, já são observadas degradações secundárias, a partir do desaparecimento da impureza J.

Na Tabela 14 constam os resultados de teores e recuperações das degradações físicas (ultravioleta, umidade e temperatura).

Tabela 14: Seletividade física

Tipo de amostra	Teor (%)	Impurezas (%)	Recuperação (%)
Controle	98,56	0,74	-
UV	98,22	0,76	99,68
Umidade	98,95	0,71	100,35
Temperatura	98,01	0,74	99,44

Fonte: Autoria própria.

As condições de estresse por meios físicos não apresentaram degradação, obtendo teores para as impurezas semelhantes ao da solução controle. Desta forma é possível afirmar que a azitromicina é estável quando exposta em umidade, temperatura e luz ultravioleta. Em todos os casos, foi verificada homogeneidade espectral.

4.2.2 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi efetuada a partir de três níveis de concentração com três réplicas em cada nível, nos níveis de 0,10%, 1,00% e 1,20% da concentração nominal da solução teste (8,60 mg/mL), abrangendo o intervalo de concentração de 0,0086 mg/mL, 0,086 mg/mL e 0,1032 mg/mL de azitromicina.

Tabela 15 – Exatidão

ID.	Recuperação (%)	Média (%)	Especificação média (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
Exatidão 0,10%	101,21	100,24	95-105	1,14	≤3,7
	98,98				
	100,52				
Exatidão 1,00%	102,29	100,59	97-103	1,80	≤2,7
	98,69				
	100,78				
Exatidão 1,20%	99,03	99,34	97-103	0,35	≤2,7
	99,27				
	99,71				

Fonte: Autoria própria.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 15, tanto os valores individuais, quanto as médias de recuperação para azitromicina, nas concentrações avaliadas, estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de exatidão em cada nível. Os valores de DPR também cumprem com as especificações. Sendo assim, o método analítico possui exatidão adequada nos níveis de concentração 0,0086 mg/mL à 0,1032 mg/mL.

4.2.3 Precisão

Os resultados das análises de precisão 1° e 2° dia estão apresentados abaixo.

Tabela 16 – Precisão 1° dia

ID.	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
0,10%	100,19	100,65	1,98	≤3,7
	102,84			
	98,93			
1,00%	101,90	101,40	0,56	≤2,7
	101,51			
	100,78			
1,20%	101,05	99,54	1,93	≤2,7
	97,37			
	100,20			

Fonte: Autoria própria.

Os resultados da precisão 2° dia estão apresentados na Tabela 17 e pode-se observar que o desvio padrão relativo (DPR%) em todos os níveis de concentração estão de acordo com o critério de aceitação.

Tabela 17 – Precisão 2° dia

ID.	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
0,10%	100,22	99,38	1,45	≤3,7
	97,72			
	100,21			
1,00%	97,98	98,96	1,10	≤2,7
	100,14			
	98,75			
1,20%	99,02	98,43	1,19	≤2,7
	99,18			
	97,08			

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 18 apresenta os dados necessário para determinação da precisão intermediária, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias

diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações.

Tabela 18 – Precisão intermediária

ID.	Teor 1º dia (%)	Teor 2º dia (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
0,10%	100,19	100,22	1,70	≤6,0
	102,84	97,72		
	98,93	100,21		
1,00%	101,90	97,98	1,54	≤4,0
	101,51	100,14		
	100,78	98,75		
1,20%	101,05	99,02	1,57	≤4,0
	97,37	99,18		
	100,20	97,08		

Fonte: Autoria própria.

Conclui-se que o método é preciso uma vez que a proximidade dos resultados das duas precisões para azitromicina cumpre com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro.

4.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação da metodologia de substâncias relacionadas foi comprovado pelos resultados obtidos no nível de 0,10%. Foram encontrados resultados dentro do especificado, com a precisão e exatidão necessária.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos com todas as análises realizadas, foi possível validar as metodologias para quantificação do teor de azitromicina de maneira robusta, com precisão, exatidão, seletividade e resultados lineares, assim como a de substâncias relacionadas do mesmo ativo, quantificando também as impurezas de maneira precisa, exata e seletiva. Foi possível identificar os pontos de instabilidade do ativo para que medidas de cuidados sejam tomadas durante a manipulação, evitando assim, problemas com o produto final.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº 04/2015- Versão 01. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.0>>. Acesso em: 02/10/2018

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº. 166 - **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**, 24 de julho de 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em 30/09/2018

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.** 2018

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Azitromicina di-hidratada.** Nova química Farmacêutica S/A. 2018 Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8040832018&pIdAnexo=10728362. Acesso em 03/10/2018

FERREIRA, João Ronaldo Notargiacomo. **Azitromicina: Desenvolvimento e validação de método de análise em formas farmacêuticas.** 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/6030/joao.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 30/09/2018.

GHARI, Tayebah; KOBARFARD, Farzad; MORTAZAVIA, Seyed Alireza. **Development of a Simple RP-HPLC-UV Method for Determination of Azithromycin in Bulk and Pharmaceutical Dosage forms as an Alternative to the USP Method.** 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813375/#B3>. Acesso em: 02/10/2018.

ICH. CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HARMONIZAÇÃO – **Harmonização para uma saúde melhor.** 2018. Disponível em: <https://www.ich.org/home.html>. Acesso em 30/09/2018.

USP. **The United States Pharmacopeia 41**, United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2018

WAGHULE, Sangita N.; JAIN, Nitin P.; PATANI, Chetan J.; PATANI, Aparana C. **Method development and validation of HPLC method for determination of azithromycin.** 2013. Disponível em: <https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemica/method-development-and-validation-of-hplc-method-for-determination-of-azithromycin.pdf>. Acesso em 02/10/2018

WHO. World Health Organization. **Guidelines on Validation** – Appendix 4. 06/2016. Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidationQAS16-671.pdf. Acesso em 30/09/2018

ANEXO A - Monografia oficial da USP 41 para análise de azitromicina matéria-prima.

Relative standard deviation: NMT 5.0%, Standard solution

Analysis

Samples: Identification solution, Standard solution, and Sample solution

Calculate the percentage of each impurity in the portion of Azelastine Hydrochloride taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times (1/F) \times 100$$

- r_U = peak area of each impurity from the Sample solution
 - r_S = peak area of azelastine from the Standard solution
 - C_S = concentration of USP Azelastine Hydrochloride RS in the Standard solution (mg/mL)
 - C_U = concentration of Azelastine Hydrochloride in the Sample solution (mg/mL)
 - F = relative response factor (see Table 1)
- Acceptance criteria: See Table 1. [NOTE—Disregard peaks that are less than 0.05% of the azelastine peak.]

Table 1

Name	Relative Retention Time	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
Benzohydrazide	0.2	0.38	0.1
Azelastine related compound B ^a	0.3	0.22	0.1
Chlorophenylacetylbenzoic acid ^b	0.4	0.45	0.1
Azelastine related compound D ^c	0.6	1.2	0.1
Azelastine	1.0	1.0	—
Azelastine related compound E ^d	1.4	0.48	0.1
Any individual unspecified impurity	—	1.0	0.10
Total impurities	—	—	0.2

^a N'-(1-Methylazepan-4-yl)benzohydrazide; also known as 1-Benzoyl-2-[(4R)-1-methylhexahydro-1H-azepin-4-yl]diazane.

^b 2-[2-(4-Chlorophenyl)acetyl]benzoic acid.

^c 4-(4-Chlorobenzyl)phthalazin-1(2H)-one.

^d 3-(4-Chlorobenzylidene)isobenzofuran-1(3H)-one.

SPECIFIC TESTS

• **LOSS ON DRYING** (731)

Analysis: Dry at 105° to constant weight.
Acceptance criteria: NMT 1.0%

• **ACIDITY OR ALKALINITY**

Sample solution: 10 mg/mL of Azelastine Hydrochloride in water
Analysis: Add 0.2 mL of bromothymol blue TS to 10 mL of the Sample solution.
Acceptance criteria: NMT 0.1 mL of 0.01 M hydrochloric acid or 0.01 M sodium hydroxide is required to produce a color change.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

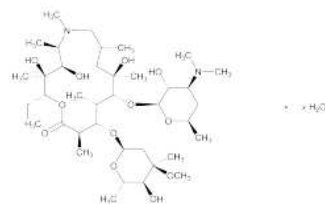
• **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers. Protect from light and moisture. Store at controlled room temperature.

• **USP REFERENCE STANDARDS** (11)

USP Azelastine Hydrochloride RS
USP Azelastine Related Compound B RS
N'-(1-Methylazepan-4-yl)benzohydrazide.
C₁₄H₂₁N₃O 247.34
USP Azelastine Related Compound D RS
4-(4-Chlorobenzyl)phthalazin-1(2H)-one.
C₁₅H₁₁ClN₂O 270.71

USP Azelastine Related Compound E RS
3-(4-Chlorobenzylidene)isobenzofuran-1(3H)-one.
C₁₅H₉ClO₂ 256.68

Azithromycin



C₃₈H₇₂N₂O₁₂ 748.98

C₃₈H₇₂N₂O₁₂ · H₂O 767.00

C₃₈H₇₂N₂O₁₂ · 2H₂O 785.02

1-Oxa-6-azacyclopentadecan-15-one, 13-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-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)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-, [2R-(2R*,3S*,4R*,5R*,8R*,10R*,11R*,12S*,13S*,14R*)]; (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-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)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one;
9-Deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerythromycin A
Anhydrous [83905-01-5].
Monohydrate [121470-24-4].
Dihydrate [117772-70-0].

DEFINITION

Azithromycin is anhydrous or contains one or two molecules of water of hydration. It contains the equivalent of NLT 945 µg and NMT 1030 µg of azithromycin (C₃₈H₇₂N₂O₁₂) per mg, calculated on the anhydrous basis.

IDENTIFICATION

- **A. INFRARED ABSORPTION** (197K): If a difference appears in the IR spectra of the analyte and the Standard, dissolve equal portions of the test specimen and the USP Reference Standard in equal volumes of methanol. Evaporate the solutions to dryness on a water bath, and dry at 80° for 30 min under vacuum. Perform the test on the residues.
- **B.** The retention time of the azithromycin peak of the Sample solution corresponds to that of the Standard solution, as obtained in the Assay.

ASSAY

• **PROCEDURE**

Solution A: 10 M Potassium hydroxide
Solution B: 6.7 g/L of dibasic potassium phosphate adjusted with Solution A to a pH of 11.0
Solution C: 6.7 g/L of dibasic potassium phosphate adjusted with phosphoric acid to a pH of 8.0
Mobile phase: Acetonitrile and Solution B (60:40)
Diluent: Acetonitrile and Solution C (60:40)
System suitability solution: 0.5 mg/mL each of USP Azithromycin RS and USP Azaerythromycin A RS prepared as follows. Dissolve USP Azithromycin RS and USP Azaerythromycin A RS first in acetonitrile, using 5% of the final volume, and then dilute with Diluent to volume.

Standard solution: 0.53 mg/mL of USP Azithromycin RS prepared as follows. Dissolve USP Azithromycin RS first in acetonitrile, using 2% of the final volume, and then dilute with *Diluent* to volume.

Sample solution: 0.53 mg/mL of Azithromycin prepared as follows. Dissolve Azithromycin first in acetonitrile, using 2% of the final volume, and then dilute with *Diluent* to volume.

Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: UV 210 nm

Column: 4.6-mm × 25-cm; 5-μm packing L67

Column temperature: 40°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 10 μL

System suitability

Samples: *System suitability solution* and *Standard solution*

[NOTE—The relative retention times for azaerythromycin A and azithromycin are 0.7 and 1.0, respectively.]

Suitability requirements

Resolution: NLT 3.0 between azaerythromycin A and azithromycin, *System suitability solution*

Tailing factor: 0.8–1.5 for azithromycin, *Standard solution*

Relative standard deviation: NMT 1.10% for azithromycin, *Standard solution*

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the quantity, in μg, of azithromycin (C₃₈H₇₂N₂O₁₂) in each mg of Azithromycin taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times P$$

r_U = peak response from the *Sample solution*

r_S = peak response from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Azithromycin RS in the *Standard solution*

C_U = concentration of Azithromycin in the *Sample solution*

P = potency of USP Azithromycin RS (μg/mg of azithromycin)

Acceptance criteria: 945–1030 μg/mg on the anhydrous basis

IMPURITIES

- **RESIDUE ON IGNITION** (281): NMT 0.3%, the charred residue being moistened with 2 mL of nitric acid and 5 drops of sulfuric acid

Delete the following:

- **HEAVY METALS**, *Method II* (231): NMT 25 ppm (Official 1-^{Jan-2018})

• **ORGANIC IMPURITIES, PROCEDURE 1**

Use *Organic Impurities, Procedure 1* when the impurity profile includes erythromycin A oxime and erythromycin A iminoether.

Use water that has a resistivity of NLT 18 Mohm-cm.

Solution A: 20 mM Dibasic potassium phosphate

Mobile phase: Acetonitrile and *Solution A* (250:750).

Adjust with 5 M potassium hydroxide to a pH of 10.55 ± 0.05.

Standard stock solution: 45 μg/mL of USP Desosaminylazithromycin RS, 105 μg/mL of USP *N*-Demethylazithromycin RS, 150 μg/mL of USP Azaerythromycin A RS, and 160 μg/mL of USP Azithromycin RS in acetonitrile. Sonicate as necessary to dissolve.

Standard solution: 0.9 μg/mL of USP Desosaminylazithromycin RS, 2.1 μg/mL of USP *N*-Demethylazithromycin RS, 3.0 μg/mL of USP Azaerythromycin A RS, and 3.2 μg/mL of USP Azithromycin RS from the *Standard stock solution* in *Mobile phase*

Sample solution: 0.33 mg/mL of Azithromycin prepared as follows. Transfer a suitable amount of Azithromycin to a suitable volumetric flask. Add acetonitrile, using 5% of the final volume, and sonicate as necessary to dissolve. Dilute with *Mobile phase* to volume.

Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: Amperometric electrochemical

Detector type: Dual glassy carbon electrodes

Detector mode: Oxidative screen mode

Detector settings

Electrode 1: +0.70V

Electrode 2: +0.82V

Column: 4.6-mm × 15-cm; 3-μm packing L49

Temperatures

Detector preheater: 28°

Autosampler: 5°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 50 μL

System suitability

Sample: *Standard solution*

Suitability requirements

Resolution: NLT 3.0 between azithromycin and azaerythromycin A

Tailing factor: NMT 2.0 for azithromycin; NMT 2.5 for *N*-demethylazithromycin

Relative standard deviation: NMT 10.0% for azithromycin, azaerythromycin A, *N*-demethylazithromycin, and desosaminylazithromycin

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Record the *Sample solution* chromatograms for NLT 3.3 times the retention time of the azithromycin peak.

Calculate the percentages of desosaminylazithromycin, *N*-demethylazithromycin, and azaerythromycin A in the portion of Azithromycin taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times F \times 100$$

r_U = peak area of the relevant analyte from the *Sample solution*

r_S = peak area of the relevant analyte from the *Standard solution*

C_S = concentration of the appropriate USP Reference Standard in the *Standard solution* (μg/mL)

C_U = concentration of the *Sample solution* (mg/mL)

F = conversion factor, 0.001 mg/μg

Calculate the percentages of other related substances in the portion of Azithromycin taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times F \times 100$$

r_U = peak area of each additional impurity from the *Sample solution*

r_S = peak area of the azithromycin peak from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Azithromycin RS in the *Standard solution* (μg/mL)

C_U = concentration of the *Sample solution* (mg/mL)

F = conversion factor, 0.001 mg/μg

Acceptance criteria: See *Table 1*.

Table 1

Name	Relative Retention Time	Acceptance Criteria, NMT (%)
Erythromycin A iminoether ^a	0.19	0.5
Desosaminylazithromycin ^b	0.29	0.3
Erythromycin A oxime ^c	0.37	0.5
N-Demethylazithromycin ^d	0.49	0.7
Azaerythromycin A ^e	0.80	1.0
Azithromycin	1.0	—
3-Deoxyazithromycin (azithromycin B) ^f	2.33	1.0
Total impurities	—	3.0

^a (3R,4R,5S,6R,9R,10S,11S,12R,13S,15R,2)-12-[[3,4,6-Trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-6-ethyl-4,5-dihydroxy-10-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-3,5,9,11,13,15-hexamethyl-7,16-dioxo-2-azabicyclo[11.2.1]hexadec-1-en-8-one.

^b (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10,13-tetrahydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one.

^c (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R,15)-6-[[3,4,6-Trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-10-(hydroxyimino)-3,5,7,9,11,13-hexamethylhexacyclotetradecan-2-one.

^d (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-methylamino-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one.

^e 9-Deoxy-9a-aza-9a-homoerythromycin A; 6-Demethylazithromycin.

^f (2R,3R,4S,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-4,10-dihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one.

• ORGANIC IMPURITIES, PROCEDURE 2

Use *Organic Impurities, Procedure 1* when the impurity profile includes erythromycin A oxime and erythromycin A iminoether.

Solution A: 1.8 mg/mL of anhydrous dibasic sodium phosphate in water. Adjust with 1 N sodium hydroxide or 10% phosphoric acid to a pH of 8.9.

Solution B: Acetonitrile and methanol (3:1)

Solution C: 1.73 mg/mL of monobasic ammonium phosphate. Adjust with ammonia TS to a pH of 10.0 ± 0.05.

Solution D: Methanol, acetonitrile, and *Solution C* (7:6:7)

Mobile phase: See *Table 2*.

Table 2

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	50	50
25	45	55
30	40	60
80	25	75
81	50	50
93	50	50

System suitability solution: 0.0165 mg/mL of USP Azithromycin Related Compound F RS and 0.027 mg/mL of USP Desosaminylazithromycin RS in *Solution D*

Standard solution: 86 μg/mL of USP Azithromycin RS in *Solution D*

Sample solution: 8.6 mg/mL of Azithromycin in *Solution D*

Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), *System Suitability*.)

Mode: LC

Detector: UV 210 nm

Column: 4.6-mm × 25-cm; 5-μm packing L1

Column temperature: 60°

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 50 μL

System suitability

Samples: *System suitability solution* and *Standard solution*

Suitability requirements

Tailing factor: 0.8–1.5, *Standard solution*

Peak-to-valley ratio: NLT 1.4, *System suitability solution*. Calculate the peak-to-valley ratio as follows:

$$\text{Result} = H_p/H_v$$

H_p = height above the baseline of the desosaminylazithromycin peak

H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating the desosaminylazithromycin and azithromycin related compound F peaks

Analysis

Samples: *Standard solution* and *Sample solution*

Calculate the percentage of each related compound in the portion of Azithromycin taken:

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times P \times F_1 \times (100/F_2)$$

r_U = peak response of each impurity from the *Sample solution*

r_S = peak response of azithromycin from the *Standard solution*

C_S = concentration of USP Azithromycin RS in the *Standard solution* (mg/mL)

C_U = concentration of Azithromycin in the *Sample solution* (mg/mL)

P = potency of USP Azithromycin RS (μg/mg of azithromycin)

F_1 = conversion factor, 0.001 mg/μg

F_2 = relative response factor (see *Table 3*)

Acceptance criteria: See *Table 3*. Disregard peaks eluting before azithromycin *N*-oxide and after 3-deoxyazithromycin (azithromycin B). Disregard peaks with a response less than 0.1 times the response of the azithromycin peak in the *Standard solution* (0.1%).

SPECIFIC TESTS

• **OPTICAL ROTATION, Specific Rotation (781S):** −45° to −49°, at 20°

Sample solution: 20 mg/mL in dehydrated alcohol

• **CRYSTALLINITY (695):** Meets the requirements except, where it is labeled as amorphous, most of the particles do not exhibit birefringence and extinction positions

• **pH (791):** 9.0–11.0

Sample stock solution: 4 mg/mL in methanol

Sample solution: 2 mg/mL obtained by mixing equal volumes of *Sample stock solution* and water

• **WATER DETERMINATION, Method I (921)**

Where it is labeled as anhydrous: NMT 2.0%

Where it is labeled as the dihydrate: 4.0%–5.0%

Where it is labeled as the monohydrate: 1.8%–4.0%, except that it may be 4.0%–6.5% when the requirements of the *Loss on Drying* test are met

• **LOSS ON DRYING:** Where it is labeled as Azithromycin monohydrate and has a water content of 4.0%–6.5% (see *Thermal Analysis* (891))

[NOTE—The quantity taken for this procedure may be adjusted, if necessary, for instrument sensitivity.]

Analysis: Determine the percentage of volatile substances by thermogravimetric analysis in an appropriately calibrated instrument, using about 10 mg of Azithromycin. Heat the specimen at the rate of 10°/min between ambient temperature and 150° in an atmosphere of nitrogen at a constant flow rate of about

35 mL/min. From the thermogram plot the derivatives of the loss on drying (percent loss/min), and identify the inflection points of the two weight loss steps at about 70° and 130°.

Acceptance criteria: It loses NMT 4.5% of its weight between ambient temperature and the inflection point at about 70°, and 1.8%–2.6% between the inflection point at about 70° and the inflection point at about 130°.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in tight containers.
- **LABELING:** Label it to indicate whether it is anhydrous, or the monohydrate, or the dihydrate. The amorphous form

is so labeled. Where the quantity of azithromycin is indicated in the labeling of any preparation containing Azithromycin, this shall be understood to be in terms of anhydrous azithromycin (C₃₈H₇₂N₂O₁₂). The labeling states with which *Organic Impurities* procedure the article complies, if other than *Procedure 1*.

- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**
 USP Azaerythromycin A RS
 9-Deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A;
 6-Demethylazithromycin.
 C₃₇H₇₀N₂O₁₂ 734.96

Table 3

Name	Relative Retention Time	Relative Response Factor	Acceptance Criteria, NMT (%)
Azithromycin N-oxide ^a	0.29	0.43	0.5
3'-(N,N-Didemethyl)-3'-N-formylazithromycin ^b	0.37	1.7	0.5
3'-(N,N-Didemethyl) azithromycin (aminoazithromycin) ^c	0.43	1.0	0.5
Azithromycin related compound F ^{d,e}	0.51	3.8	0.5
Desosaminylazithromycin ^f	0.54	1.0	0.3
3'-N-[[4-(Acetylamino)phenyl]sulfonyl]-3'-didemethylazithromycin ^g	0.55	12	0.15
N-Demethylazithromycin ^h	0.61	1.0	0.7
Azithromycin C (3''-O-demethylazithromycin) ⁱ	0.73	1.0	0.5
3'-De(dimethylamino)-3'-oxoazithromycin ^j	0.76	1.5	0.5
3'-N-[[4-(Acetylamino)phenyl]sulfonyl]-3'-demethylazithromycin ^k	0.79	10	0.5
Azaerythromycin A ^l	0.83	1.0	0.5
Azithromycin impurity P ^m	0.92	1.0	0.2
Azithromycin	1.0	—	—
2-Desethyl-2-propylazithromycin ⁿ	1.23	1.0	0.5
3'-N-Demethyl-3'-N-[[4-methylphenyl]sulfonyl]azithromycin ^o	1.26	5	0.5
3-Deoxyazithromycin (azithromycin B) ^p	1.31	1.0	1.0
Any individual, unidentified impurity	—	1.0	0.2
Total impurities	—	—	3.0

^a (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylazinoyl)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^b (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-formamido-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^c (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-amino-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^d 3'-N-Demethyl-3'-N-formylazithromycin; (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-(N-methyl)formamido-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^e The system may resolve two rotamers of azithromycin related compound F. The sum of the two rotamers is reported.
^f (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-Ethyl-3,4,10,13-tetrahydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^g (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-[[N-(4-acetamidophenylsulfonyl)amino]-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^h (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-methylamino- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
ⁱ (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl- α -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- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^j (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3,3-dimethyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-oxo- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^k (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-[[N-(4-acetamidophenylsulfonyl)-N-methylamino]-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^l 9-Deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A; 6-Demethylazithromycin.
^m Specified unidentified impurity.
ⁿ (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-propyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^o (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3-[[N-(4-methylphenylsulfonyl)-N-methylamino]-3,4,6-trideoxy- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.
^p (2R,3R,4S,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl- α -L-ribo-hexopyranosyl)oxy]-2-ethyl-4,10-dihydroxy-3,5,6,8,10,12,14-heptamethyl-11-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)- β -D-xylo-hexopyranosyl]oxy]-1-oxa-6-azacyclotetradecan-15-one.

ANEXO B - Metodologia analítica para doseamento de azitromicina em matéria-prima

Sistema Cromatográfico

Fase Móvel:	Gradiente conforme tabela 1	
Soluções Limpeza:	Coluna: Acetonitrila 10% Injetor: Acetonitrila 70%	
Fluxo:	1,0 mL/min	
Volume de Injeção:	50 µL	
Coluna:	Waters Xbridge C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm	
Temperatura da Coluna:	45°C	
Temperatura injetor	5°C	
Detector:	Tipo: UV/Vis Comp. de Onda: 210 nm	Freq. de Aquisição: 2 Hz Slit Width: 8 nm¹
Tempo de Retenção:	Aproximadamente 28 minutos	
Tempo de Corrida:	36 minutos	

¹: Para análises onde será avaliada a pureza espectral, utilizar o Slit Width de 1,2 nm.

Tabela 1 – Gradiente.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	40	60
5	40	60
30	33	67
31	40	60
36	40	60

Preparo das Soluções

Solução A

Transferir 1,80 g de fosfato de sódio dibásico anidro em 1000 mL de água, ajustar o pH para 8,9 com hidróxido de sódio diluído ou ácido fosfórico diluído e filtrar.

Solução B

Fazer uma mistura de Acetonitrila e Metanol na proporção 3:1, homogeneizar e desgaseificar.

Solução C

Dissolver 1,73 g de fosfato de amônio monobásico em 1000 mL de água e ajustar o pH para 10,0 com hidróxido de amônia.

Diluyente (Solução D)

Fazer uma mistura de Metanol, Acetonitrila e Solução C na proporção 7:6:7, homogeneizar e desgaseificar.

Preparo das Amostras

Solução Padrão 1 e 2

Transferir 5,0 mg do padrão de Azitromicina anidra (corrigir a pesagem de acordo com a potência do padrão) para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 5 mL de diluente e levar ao ultrassom por 5 minutos ou até completa solubilização do padrão. Aguardar a solução retornar a temperatura ambiente, completar o volume do balão volumétrico com diluente, homogeneizar por inversão e filtrar utilizando membrana PVDF de 0,22 µm hidrofílica, com 1 a 2 mL de descarte. [Azitromicina] = 500 µg/mL

Solução Teste 1 e 2

Transferir o equivalente a 25 mg de Azitromicina anidra para balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 40 mL de diluente, deixar no ultrassom por 5 minutos ou até completa solubilização da amostra. Aguardar a solução retornar a temperatura ambiente, completar o volume do balão volumétrico com diluente, homogeneizar por inversão e filtrar utilizando membrana PVDF de 0,22 µm hidrofílica, com 1 a 2 mL de descarte. [Azitromicina] = 500 µg/mL

Solução Controle

Utilizar *Solução Padrão 1 e 2* como *Soluções Controle*.

Especificação

O teor de Azitromicina na solução teste deve estar entre 94,5 a 103,0% em base anidra.

Observação: Como referência para a especificação foi utilizada a Farmacopeia Americana USP 41.