



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Máster Interuniversitario en Técnicas cromatográficas aplicadas.

Curso académico 2024-2025

Trabajo Fin de Máster

Determinación de la Amoxicilina mediante cromatografía de líquidos en un laboratorio de rutina

Marta Bravo Camacho

Tutoras

Rosa Maria Marcé Recasens

Melody Fuentes

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Laboratorios Karizoo S.A	1
1.2 Amoxicilina	1
1.2.1 Propiedades farmacológicas	2
1.2.2 Propiedades químicas	2
1.2.3 Vías de degradación	3
1.2.4 Almacenamiento	4
1.3 Marco Regulatorio Internacional y Nacional Aplicable a Laboratorios Farmacéuticos	4
1.3.1 Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano	5
1.3.2 Agencia europea de medicamentos	6
1.3.3 Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	6
1.3.4 Farmacopea	6
1.4 Método de análisis	7
1.4.1 Cromatografía líquida de alta resolución	7
1.4.2 Otras técnicas analíticas	8
2. Objetivo del trabajo	9
3. Parte experimental	9
3.1 Documentación experimental	9
3.1.1 Entrada de muestras	10
3.1.2 Muestras estabilidad	11
3.1.3 Registro patrones	11
3.2 Parte analítica	12
3.2.1 Patrones y estándares	12
3.2.2 Desarrollo de la metodología de análisis	13
3.2.3 Preparación de patrones y muestras	13
3.2.4 Puesta en marcha del instrumento	14
3.2.5 Cromatografía líquida de alta resolución	16
3.2.6 Cuantificación de la amoxicilina y de sustancias relacionadas	18
3.2.7 Verificación de la idoneidad del sistema	18
3.3 Problemática en los ensayos de rutina	19
3.3.1 Problemas con el equipo	20
3.3.1.1 Columna	20
3.3.1.2 Precolumna	21
3.3.1.3 Detector	22
3.3.1.4 Inyector automático	22
3.3.2 Resultados no confiables	23
3.3.3 Problemas de preparativa y programación	23
3.4 Resultados fuera de especificación y de tendencia.	24
4. Resultados y discusión.	25
4.1 Resultados de un lote de fabricación.	26
4.2 Resultados de estudio de estabilidad.	26
4.3 Resultados anómalos e investigación de fuera de especificación.	28
5. Conclusiones.	31
6. Bibliografía	33

1. Introducción

Para introducir esta memoria es importante conocer sobre la empresa Laboratorios Karizoo S.A. que es donde está ubicado el laboratorio donde se realizan los ensayos de rutina de la amoxicilina. También se explicarán las principales características tanto químicas como farmacológicas de este producto, su principal vía de degradación y su correcto almacenamiento. Finalmente se comentarán las normas y estándares utilizados y los métodos de análisis.

1.1 Laboratorios Karizoo S.A

Laboratorios Karizoo, S.A. es una empresa de origen familiar fundada en 1983 dedicada a la fabricación y distribución de productos de sanidad y nutrición animal. Desde 2016 pertenece al grupo multinacional Alivira dedicado al 100% al sector farmacéutico veterinario, con su sede principal en la India. ^[1]

Karizoo está autorizada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para la fabricación de medicamentos de uso veterinario no estériles de acuerdo con las Normas de Correcta Fabricación (NCF). Los productos fabricados en las instalaciones de Alivira en España son: líquidos para uso interno, otras formas farmacéuticas sólidas (como gránulos, pellets y comprimidos), incluidos los antibióticos beta-lactámicos y premezclas veterinarias (autorización de laboratorio nº 4237-E). ^[1]

Es una empresa que produce medicamentos de alta calidad, destacándose en la fabricación de genéricos, como es el caso de la amoxicilina. Este fármaco es utilizado para tratar variedad de infecciones bacterianas. Es por ello por lo que debe cumplir estrictos estándares de calidad para garantizar su eficacia.

El departamento de producción produce siguiendo normativas de calidad y buenas prácticas de fabricación instauradas en la empresa. Produce grandes cantidades de lotes de amoxicilina de diferente concentración: 100, 500 y 1000 mg/g. Estas concentraciones se diferencian por la cantidad de amoxicilina contenida en cada gramo del producto final. Por ejemplo, la formulación de 500 mg/g contiene 500 mg de amoxicilina por cada gramo de producto total, mezclándose con ácido cítrico como excipiente.

1.2 Amoxicilina

La amoxicilina es el producto que más se comercializa desde Laboratorios Karizoo S.A. ya que es comúnmente conocido para el tratamiento de procesos infecciosos. Dentro de un laboratorio de rutina el principal problema de este producto es su fácil vía de degradación lo que dificulta su análisis y además es necesario un correcto almacenamiento.

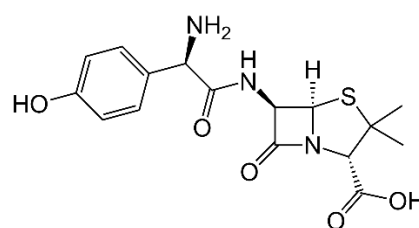


Figura 1 Estructura química Amoxicilina

En el caso de la amoxicilina 500 mg/g el principio activo es la amoxicilina trihidrato y el excipiente con el que se mezcla es el ácido cítrico. La amoxicilina trihidrato contiene aproximadamente un 87% de amoxicilina base, el resto corresponde a las moléculas de agua en la sal hidratada. Por lo tanto, para la fabricación de amoxicilina 500 mg/g se debe tener en cuenta que tanto el principio activo como el excipiente son puros, pero se hace el recalcu de las moléculas de agua y se acaba de ajustar con el ácido cítrico.

Seguidamente se muestra una ejemplificación para obtener 500 mg de amoxicilina base:

$$\text{Cantidad necesaria de amoxicilina trihidrato} = \frac{500 \text{ mg}}{0.87} \sim 574.71 \text{ mg}$$

$$\text{Cantidad necesaria ácido cítrico} = 1000 \text{ mg} - 574.71 \sim 425.29 \text{ mg}$$

1.2.1 Propiedades farmacológicas

La amoxicilina es un antibiótico que pertenece a la familia de los betalactámicos, dentro del grupo de las penicilinas semisintéticas de amplio espectro. Su acción antimicrobiana no solo abarca bacterias grampositivas, sino también una gran variedad de bacilos gramnegativos, entre los que se incluyen *Escherichia coli*, *Haemophilus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella* y *Salmonella*, entre otros. Por esto se emplea a menudo como primer remedio en infecciones de diferente gravedad, tanto en medicina humana como también en veterinaria. [2]

Desde el punto de vista farmacológico, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, específicamente en la etapa de transpeptidación, que implica la formación de enlaces cruzados entre péptidos. Esta inhibición ocurre en bacterias que se encuentran en fase de crecimiento exponencial, lo que conlleva un efecto bactericida por lisis osmótica. Impidiendo así que la pared celular se construya correctamente. [3]

La amoxicilina está incluida en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y su uso está ampliamente extendido tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo. Es un derivado para-hidroxilado de la ampicilina, y presenta ventajas sobre esta, como una mejor absorción a nivel gastrointestinal y una mayor eficacia cuando se administra por vía oral. Además, su absorción no se ve afectada por la presencia de alimentos, lo que facilita su administración. [2]

1.2.2 Propiedades químicas

Su estructura corresponde al ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hidroxifenilacetamido] penicilámico. Su fórmula molecular es $C_{16}H_{19}N_3O_5S$. Y su peso molecular es de 365.4 g/mol. Presenta una ligera solubilidad en agua, etanol y metanol, y es prácticamente insoluble en disolventes orgánicos no polares como el éter o el cloroformo. En soluciones acuosas ácidas, la molécula puede perder hasta tres protones: siendo estos

uno del grupo carboxilo, otro del grupo hidroxilo aromático y uno más del grupo amonio. [4]

Los pK_{as} respectivos a la pérdida de estos tres protones son 2.63, 7.55 y 9.64 a 23 °C y 2.61, 7.30 y 9.45 a 35 °C. Es un polvo cristalino fino, blanco a amarillo bajo, y tiene un sabor amargo. La alta humedad y las temperaturas tienen un efecto adverso en su estabilidad. [5]

Al ser este fármaco polar, tal y como se observa en la Figura 1, por la presencia de grupos hidroxilo, amino y carboxilo se utiliza una separación mediante cromatografía líquida en fase inversa con un detector UV para su cuantificación en laboratorios de rutina.

1.2.3 Vías de degradación

La amoxicilina tiene dos vías de degradación bastante comunes en laboratorios de rutina si no se trabaja con las condiciones adecuadas. La estabilidad de la amoxicilina puede verse afectada por la humedad, la temperatura y pH. Los rangos óptimos para minimizar su degradación son un pH de entre 4.5 y 6.0, una temperatura no superior a 30° C y una humedad relativa recomendada de entre 30-50% HR. Su degradación puede originarse por procesos como la hidrólisis del anillo betalactámico o por la dimerización tal y como se muestra en la Figura 2. Los productos originados por vías de degradación influyen en los resultados obtenidos en los ensayos rutina de cromatografía líquida. [6]

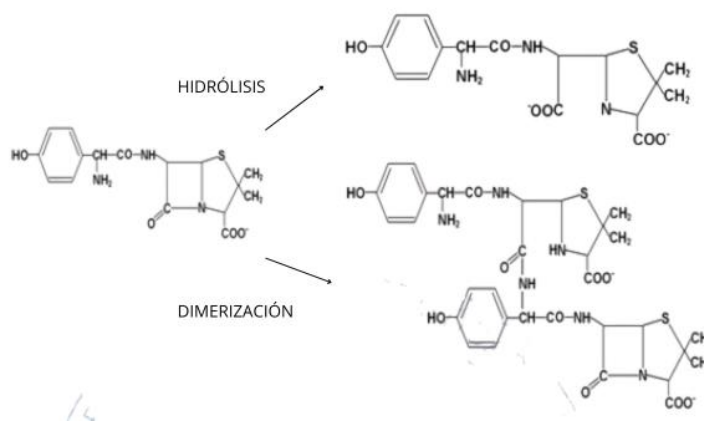


Figura 2 Vías de degradación amoxicilina [4]

La degradación por un proceso de hidrólisis ocurre cuando hay afectaciones en el anillo betalactámico que es químicamente inestable. La hidrólisis viene dada principalmente por una alteración en el pH, es decir, si la muestra se deja en soluciones con un pH fuera del rango neutro o si se emplean tampones inadecuados. Al trabajar con pH extremos ocurre lo siguiente:

- Medio ácido (pH <4): el anillo betalactámico puede empezar a abrirse lentamente.
- Medio básico (pH >6.5-7): la hidrólisis ocurre de manera más rápida, las soluciones alcalinas degradan potencialmente la amoxicilina.

La degradación mediante un proceso de dimerización ocurre cuando dos moléculas de amoxicilina reaccionan entre sí. La apertura del anillo betalactámico de una de ellas forma un enlace covalente y producto de la condensación se forma el dímero. Una molécula de amoxicilina sufre hidrólisis, abriendo su anillo betalactámico, primeramente. El grupo amino libre de otra molécula ataca el anillo betalactámico abierto. Finalmente se forma un enlace amida entre ambas moléculas. Esta reacción puede darse entre dos moléculas distintas de amoxicilina, es decir, intermolecular o incluso puede llegar a ser autocatalizada. ^[4]

A temperaturas elevadas la amoxicilina se degrada más rápidamente induciendo al proceso de hidrólisis de manera acelerada, al igual que en presencia de humedad. Una vez está disuelta, en el momento que se preparan las disoluciones acuosas para su análisis, es muy susceptible a hidrólisis si no se mantiene refrigerada y protegida de la luz.

Al darse la hidrólisis o dimerización se produce la degradación de este fármaco. Estas posibles vías de degradación afectan al contenido de las impurezas, pudiendo hacer que haya resultados fuera de especificación. Es por ello que los factores que hay que controlar son la temperatura, la humedad y el pH para que no se acelere la degradación del producto. Una temperatura elevada acelera la cinética de reacción, la presencia de agua provoca la reacción de la hidrólisis y un pH no adecuado aumenta la reactividad.

1.2.4 Almacenamiento

Llevar un control de las condiciones de humedad y temperatura del laboratorio es fundamental para garantizar un correcto almacenamiento de las muestras para analizar. La amoxicilina se debe conservar a una temperatura ambiente de no más de 30°C y en un lugar seco, tal y como se ha comentado anteriormente. Se almacenan en bolsas bien selladas porque la temperatura elevada y la humedad pueden llevar un proceso de degradación de este principio activo descomponiendo así el producto.

1.3 Marco Regulatorio Internacional y Nacional Aplicable a Laboratorios Farmacéuticos

La normativa que sigue laboratorios Karizoo son las GMP (*Good Manufacturing Practices*). Son un conjunto de normas que regulan la fabricación, el procesamiento, el envasado y el almacenamiento de productos.

Dependiendo del país al que se exportará el producto estas GMP están respaldadas por diferentes normativas o regulaciones. Las regulaciones para seguir son las siguientes:

- Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH).
- Agencia europea de medicamentos (EMA).
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

El departamento de control de calidad garantiza que la amoxicilina producida cumpla los requisitos establecidos en cuanto a composición, pureza y concentración. Normativa que viene regida por la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) y Farmacopea Española (FE).

El objetivo de la Farmacopea es garantizar la calidad de los medicamentos y las sustancias que contienen. Está compuesta por monografías que se convierten en normas oficiales aplicables en los territorios de los países partes del convenio.

Por lo tanto, usar la Farmacopea y estar regulado por las tres entidades anteriores, como son ICH, EMA y AEMPS son conceptos relacionados, pero no iguales. Las principales diferencias se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1 Diferencias entre Farmacopea, ICH, EMA y AEMPS

Aspecto	Farmacopea	ICH, EMA y AEMPS
Qué es	Conjunto de normas técnicas sobre la calidad de medicamentos	Autoridad reguladora de medicamentos ya sea para Europa o España.
Función	Define cómo debe ser un medicamento	Evalúa, aprueba y autoriza la comercialización
Ámbito	Técnico y científico	Regulatorio y legal
Aplicación	Laboratorios en fabricación y control de calidad	Fabricantes que buscan comercializar medicamentos

En resumen, la Farmacopea se centra en especificaciones fijas y métodos estándar, mientras que ICH, EMA y AEMPS promueven un enfoque más científico, basado en el ciclo de vida del medicamento y en la justificación técnica de los procedimientos utilizados.

La Farmacopea proporciona monografías y métodos analíticos oficiales que deben cumplirse obligatoriamente para ciertos productos y materias primas. Es especialmente útil para establecer especificaciones de calidad estándar y comparables en distintos países. Sus métodos, si se siguen, no requieren justificación adicional.

Por otro lado, las guías ICH, EMA y AEMPS ofrecen un enfoque más amplio y flexible, centrado en el desarrollo, validación y control de calidad de medicamentos, incluyendo principios de calidad por diseño (QbD), gestión de riesgos, validación de procesos y estudios de estabilidad. Estas guías no son tan normativas como la farmacopea, pero permiten una mayor adaptación a productos nuevos o complejos.

1.3.1 Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano

Es único en su capacidad para reunir a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica para debatir los aspectos científicos y técnicos de los productos farmacéuticos y desarrollar sus directrices. Por lo tanto, es un foro internacional que reúne a autoridades como la EMA y la AEMPS. Regula lo siguiente:

- GMP para principios activos.

- Diseño del producto y del proceso. Quality by Design (QbD).
- Gestión del riesgo de calidad durante todo el ciclo de vida del medicamento.
- Establece un sistema de calidad farmacéutico alineado con GMP.
- Desarrollo y fabricación de APIs, incluyendo controles de calidad.
- Gestión del ciclo de vida del producto y control de cambios post-autorización.
- Requisitos GMP para fabricación continua.
- Desarrollo de métodos analíticos como parte de control de calidad.
- Estructura de documentación regulatoria para presentar calidad ante autoridades. ^[10]

1.3.2 Agencia europea de medicamentos

Protege y promueve la salud humana y animal mediante la evaluación y el seguimiento de los medicamentos en la Unión Europea (UE) y el Espacio Económico Europeo (EEE). Aunque no redacta farmacopeas, exige el cumplimiento de la Farmacopea Europea y de GMP. ^[11]

1.3.3 Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Como agencia estatal adscrita al Ministerio de Sanidad, es responsable de garantizar a la sociedad, desde la perspectiva de servicio público, la calidad, seguridad, eficacia y correcta información de los medicamentos y productos sanitarios, desde su investigación hasta su utilización, en interés de la protección y promoción de la salud de las personas, de la sanidad animal y del medioambiente. Además, coordina la edición y actualización de la Farmacopea Española que complementa la Farmacopea Europea. ^[12]

1.3.4 Farmacopea

La farmacopea es un compendio oficial de normas y especificaciones de calidad para los medicamentos, sustancias activas, excipientes y preparados farmacéuticos. Sirve como una herramienta normativa que define cómo deben elaborarse, controlarse y analizarse para garantizar su calidad, seguridad y eficacia. ^[13]

Una farmacopea incluye monografías, métodos generales, reactivos, soluciones tipo, normas de envasado y etiquetado.

Para la amoxicilina 500 mg/g se limita que el contenido de la amoxicilina tiene que ser entre un 95.0% y un 105.0% respecto a la sustancia anhidra base. Por lo tanto, el intervalo permitido es de 475 mg/g como límite inferior y de 525 mg/g como límite superior. Y en el caso de las impurezas relacionadas, para las impurezas que se pueden especificar no pueden ser más de un 1.0% cada una, las impurezas no especificadas no pueden ser más de un 0.1% cada una y las impurezas totales no pueden ser más del 3.0% cada una.

También estipula que el método debe cumplir con los criterios de idoneidad del sistema, siendo los siguientes:

- La resolución entre los picos de amoxicilina y cefadroxil tiene que ser al menos de 2.0.
- La desviación estándar relativa máxima tiene que ser del 1.0% en seis inyecciones para la solución de referencia.

1.4 Método de análisis

1.4.1 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más usada en laboratorios de rutina para la determinación de la amoxicilina y de sus sustancias relacionadas. Al tener una alta sensibilidad y precisión permite detectar y cuantificar pequeñas cantidades de amoxicilina y de sus impurezas con una alta precisión y exactitud. Este producto tiende a tener impurezas o productos de degradación con estructuras muy similares y a través de esta técnica se pueden separar eficientemente, lo cual es crucial para identificar y cuantificar sustancias relacionadas. Además, es una técnica rápida y reproducible que está validada por farmacopeas, lo que estandariza su uso en laboratorios.

Mediante HPLC se realiza el análisis de la amoxicilina para poder determinar su contenido y la cantidad de sustancias relacionadas que contiene este producto, para poder garantizar si el lote que se comercializará cumple la especificación o no.

Como ya se ha comentado anteriormente el método estandarizado viene marcado por farmacopea siendo el siguiente:

- Columna: C₁₈ (250 x 0.46 cm, 5 μm).
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Fase móvil A: Acetonitrilo: Disolución tampón a pH 5.0 (1:99).
- Fase móvil B: Acetonitrilo: Disolución tampón a pH 5.0 (20:80).
- Flujo: 1 mL/min.
- Detector: 254 nm.
- Volumen de inyección: 50 μL.

La columna al ser una C₁₈ indica que la fase estacionaria está recubierta con grupos octadecil. Es una columna inversa donde la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es más polar, la cual es ideal para separar compuestos de moderadamente a fuertemente polares. El material de relleno dentro de la columna son partículas de sílice con un recubrimiento C₁₈.

La principal diferencia entre el método utilizado para la determinación de amoxicilina frente al de sustancias relacionadas es que la determinación del contenido de amoxicilina se realiza mediante un método isocrático y la de sustancias relacionadas es con gradiente. Seguidamente se muestran las proporciones de las fases móviles a utilizar en cada método:

- Método contenido de amoxicilina: 92% de la fase móvil A y 8% de la fase móvil B.

- Método sustancias relacionadas: se utiliza el gradiente indicado en la Tabla 2.

Tabla 2 Gradiente sustancias relacionadas

Tiempo retención (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0-tr	92	8
tr-(tr+25)	92→0	8→100
(tr+25)-(tr+40)	0	100
(tr+40)-(tr+55)	92	8

Dónde t_r es el tiempo de retención de la amoxicilina.

En el apartado 3, correspondiente a la parte experimental, se especificará el tiempo de retención de la amoxicilina. Este valor debe encontrarse dentro de un margen aceptable que permita validar el pico cromatográfico, lo cual asegura que el equipo funciona correctamente y que el análisis cumple con el patrón de referencia. En caso de que el tiempo de retención se desvíe de los valores establecidos, será necesario ajustar o volver a preparar la fase móvil.

1.4.2 Otras técnicas analíticas

Además de HPLC existen varias técnicas analíticas que se pueden usar para analizar la amoxicilina. Seguidamente se muestran las más comunes junto con sus aplicaciones, ventajas y limitaciones. En la Tabla 3 quedan reflejadas otras técnicas analíticas utilizadas tanto para cuantificar o para identificar la amoxicilina y que se pueden encontrar también en laboratorios rutina.

Tabla 3 Otras técnicas analíticas de la amoxicilina

Nombre	Uso	Ventaja	Limitaciones
Espectrometría UV-Visible. ^[7]	Cuantificación.	<ul style="list-style-type: none"> • Económica. • Rápida. • Fácil de implantar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja selectividad, no es adecuada para mezclas complejas.
Cromatografía de capa fina. ^[8]	Identificación.	<ul style="list-style-type: none"> • Económica. • No requiere instrumentación compleja. 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados menos cuantitativos. • Baja precisión y sensibilidad.
Espectrometría de masas. ^[9]	Cuantificación de muestras complejas.	<ul style="list-style-type: none"> • Muy alta sensibilidad y especificidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Coste. • Personal especializado.

La Tabla 3 presenta una comparativa entre varias técnicas analíticas empleadas para la identificación o cuantificación de la amoxicilina y principalmente por las limitaciones hace que el HPLC sea la opción más adecuada para garantizar resultados fiables en el control de calidad diario.

La espectrofotometría UV-Visible destaca por ser económica, rápida y fácil de implementar. Sin embargo, su baja selectividad impide un análisis fiable cuando la

muestra contiene impurezas o excipientes, lo cual es común en formulaciones farmacéuticas complejas.

La cromatografía de capa fina es útil como técnica preliminar de identificación, especialmente en laboratorios con recursos limitados. No obstante, su baja precisión y nula capacidad cuantitativa la hacen inadecuada para establecer especificaciones de calidad.

Por otro lado, la espectrometría de masas ofrece una excelente sensibilidad y especificidad, siendo ideal para estudios avanzados o investigaciones. Sin embargo, su elevado coste y la necesidad de personal especializado limitan su aplicación en el entorno rutinario, ya que sus ventajas no son necesarias en este ámbito.

2. Objetivo del trabajo

Este trabajo tiene como objetivo principal explicar la importancia de la aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en un laboratorio de rutina para garantizar la calidad de la amoxicilina. A través de una explicación detallada de este método, se explorarán los fundamentos de HPLC y los procedimientos involucrados en su implementación. El principal objetivo es garantizar la calidad del producto final en cada lote de producción. También se mostrará la importancia de llevar una buena documentación para tener una correcta trazabilidad desde que la muestra entra al laboratorio e incluso desde que se utiliza un patrón para hacer los ensayos. Además, se abordarán las problemáticas más frecuentes que se pueden encontrar en el día a día de esta analítica y sus respectivas soluciones.

3. Parte experimental

Seguidamente se mostrará la parte experimental de los ensayos de rutina de la amoxicilina. Se dividirá en dos partes, la parte experimental documental y la analítica. Además, se abordarán las diferentes problemáticas que aparecen durante los ensayos de rutina de dicho producto y que soluciones se suelen aplicar.

3.1 Documentación experimental

En cualquier laboratorio es de alta importancia un buen registro de toda la documentación que acredita la entrada de la muestra a analizar desde el departamento de producción al laboratorio. Es por ello que hay distintos formularios que rellenar para llevar un control estricto de todos los lotes fabricados.

Además, no solo es importante la documentación referenciada a la muestra, sino que en el departamento de control de calidad también hay un estricto control de los patrones utilizados en todos los análisis.

Toda esta documentación facilita la trazabilidad desde la recepción de materias primas hasta la entrega del producto final. Garantizando que cualquier problema pueda ser identificado y corregido rápidamente. Del mismo modo que con los patrones al haber documentado un registro de uso y comprobado su estado.

3.1.1 Entrada de muestras

Una vez se ha hecho la producción de cualquier lote de amoxicilina cada muestra debe de ser registrada por el departamento de control de calidad. Este registro se instaura para poder realizar una trazabilidad más eficaz de la entrada de las muestras al laboratorio.

Mediante estos registros, que se encuentran en las guías de fabricación del producto, se obtiene la información del analista que ha ido a recoger la muestra, asegurándose que la recogida ha sido como indica el protocolo, si ha habido incidencias y finalmente la hora y el día en la que se realiza la acción.

Se realiza una toma de muestras en diferentes puntos para garantizar la uniformidad y la calidad del producto terminado. Así se puede detectar cualquier problema que ocurra previa o posteriormente del envasado, como podría ser contaminación, errores de dosificación o deshomogeneidad en el lote. Tal y como se muestra en la Figura 3 el reactor de la amoxicilina se puede dividir en cuatro puntos imprescindibles para tener un control del estado del lote durante todo el proceso de envasado. Estos cuatro puntos son los siguientes:

- Granel: es la muestra que se recoge antes de ser envasado el lote. Se toma para verificar que la mezcla cumple con las especificaciones de calidad antes de ser fraccionada y envasada. Se coge del reactor antes de empezar a empaquetar el lote.
- Inicio: es la primera muestra tomada al empezar el proceso de envasado. Sirve para asegurar que el equipo de envasado funciona correctamente y que no se ha contaminado con el producto anterior.
- Medio: es la muestra tomada a mitad del proceso de envasado y corresponde a la mitad del reactor. Permite verificar que no hay desviaciones de calidad durante el proceso y las condiciones se mantienen estables.
- Final: es la última muestra recogida del lote y se utiliza para confirmar que hasta el final del proceso de envasado la calidad se mantiene correctamente.



Figura 3 Reactor amoxicilina

Cualquier lote que entra al laboratorio debe de estar registrado en los programas informáticos TRYTON y SAP. A partir de los cuáles se les da a los lotes un número de análisis y se obtiene el boletín con los ensayos que requiere la especificación.

Los cuatro puntos comentados anteriormente son cruciales para poder hacer un estudio en el caso que haya algún resultado anómalo, ya sea que ese resultado no cumpla con la especificación o se considere fuera de tendencia.

Para determinar la calidad del lote se realiza primeramente los ensayos críticos del granel, que son el aspecto y el pH. Una vez el granel cumple con la calidad requerida se realiza el envasado. Al realizarse el envasado de todo el lote, se dan de alta las muestras

en el laboratorio y se analizan las muestras de inicio, medio y final bajo la especificación adecuada. Una vez obtenidos los resultados el departamento de control de calidad ya puede dar luz verde o retestear los resultados anómalos para que se pueda comercializar y exportar ese lote.

3.1.2 Muestras estabilidad

El análisis de muestras de estabilidad de los lotes de amoxicilina es esencial para asegurar que el medicamento tiene determinado una correcta vida útil, es decir hasta cuándo puede utilizarse de manera segura y eficaz.

Mediante este estudio se observa como la calidad del producto puede variar con el tiempo debido a factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz, además del tipo de envase. Permiten establecer las condiciones óptimas de almacenamiento y uso. Ayudan a identificar posibles degradaciones químicas, físicas, biológicas o microbiológicas que pueden afectar a la eficacia del producto antes de su fecha de caducidad.

En las muestras de amoxicilina por cada diez lotes fabricados uno de ellos requiere hacer un estudio de esta estabilidad, para seguir comprobando que las condiciones estipuladas son las adecuadas. Las muestras de los lotes que requieren estudio de estabilidad son sometidas a las siguientes condiciones tal y como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Condiciones de las muestras de estabilidad

Condiciones	Temperatura (°C)	Humedad (%)
Normales	25	60
Intermedias	30	65
Aceleradas	40	75

Una vez se seleccionan los lotes se realizan los ensayos que requieren la especificación en el primer año cada tres meses, el segundo año cada seis meses y a partir del tercer año al menos una vez al año. Con todos los parámetros evaluados se puede hacer una interpretación de resultados. Detectando cambios significativos que implicarían desviaciones respecto a las especificaciones establecidas.

Un punto fundamental de la documentación de un laboratorio de rutina es documentar y registrar la entrada y salida de estas muestras de las diferentes cámaras climáticas para poder tener un seguimiento.

3.1.3 Registro patrones

El departamento de calidad registra los patrones una vez entran al laboratorio llevando un control exhaustivo del estado de ellos. El analista cada vez que los utiliza para los ensayos pertinentes debe de registrar la acción que está llevando a cabo y comprobar que esos patrones pueden ser utilizados.

3.2 Parte analítica

Seguidamente se desarrollará la metodología de análisis para determinar el contenido del producto como el de sus impurezas.

3.2.1 Patrones y estándares

Para realizar el contenido de amoxicilina y para cuantificar sus impurezas se utilizan tanto patrones primarios como patrones secundarios. La principal diferencia entre ambos es que la utilización de un patrón primario tiene mayor exactitud que la utilización de uno secundario, ya que el patrón primario es un estándar de referencia absoluta que viene referenciado por Farmacopea, mientras que el secundario viene calibrado con respecto al patrón primario.

Seguidamente en la Tabla 5 se muestra los diferentes patrones primarios y secundarios utilizados en el laboratorio. Cabe destacar que los patrones primarios utilizados se obtienen de casas comerciales y el patrón secundario se obtiene mediante una estandarización de una materia prima utilizada para la fabricación de cualquier lote de amoxicilina a comercializar.

Tabla 5 Patrones primarios y secundarios en Karizoo

Patrón primario	Patrón secundario
Amoxicilina trihidrato CRS	Amoxicilina trihidrato
Cefadroxilo	-

Se utiliza el patrón primario que viene estipulado por farmacopea de la amoxicilina trihidrato CRS para poder estandarizar una materia prima de amoxicilina y poder usarla como patrón secundario. Al conocer por el certificado el valor exacto de este patrón primario mediante la cromatografía líquida se puede fijar el contenido de esa materia prima y a partir de ahí poder usarla como patrón secundario. La estandarización de patrones secundarios mediante patrones primarios es muy habitual en laboratorios rutina. Además, con el patrón secundario también se comprueba la repetitividad de las áreas de las diferentes inyecciones y se comprueba si el equipo está inyectando bien.

Como patrón de control, también conocido como “*system*”, se utiliza un patrón primario que es el cefadroxilo. El patrón de control es utilizado, tal y como marca farmacopea, para comprobar que la separación durante el análisis es la óptima. Se utiliza el cefadroxilo como estándar del sistema en el análisis de HPLC ya que tiene una estructura similar a la amoxicilina, tal y como se muestra en la Figura 4, ya que ambos son betaláctamicos. Tiene un tiempo de retención distinto al pico de interés, pero lo suficientemente cercano como para verificar la resolución, reproducibilidad y eficiencia de la columna. Y además es un compuesto estable y comercialmente accesible.

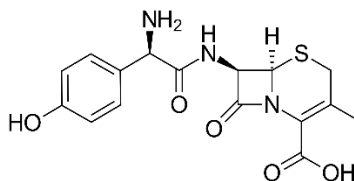


Figura 4 Estructura molecular cefadroxilo

3.2.2 Desarrollo de la metodología de análisis

Una vez las muestras llegan al laboratorio habiendo hecho su previa documentación y registro se pueden poner bajo análisis. En un laboratorio de rutina es fundamental tener los equipos a utilizar en sus condiciones óptimas, así como saber gestionar los tiempos de análisis para poder sacar el mayor número de resultados al día.

Primeramente, se pone en marcha el HPLC, haciendo una purga del sistema, se acondiciona la columna, se realiza un blanco, se inyectan patrones y muestras y finalmente se hace el lavado de la columna.

Los parámetros críticos que se suelen variar en cualquier método de cromatografía para validar un método son el pH, la temperatura, el flujo, volumen de inyección y dimensiones de la columna. En este caso como se ha comentado anteriormente al ser un método que ya está estipulado por farmacopea estos parámetros son fijos e inamovibles. Por lo tanto, los ensayos se harán bajo las siguientes condiciones, también se pueden encontrar en el apartado 1.4 Método de análisis de esta memoria.

- Columna: C₁₈ (250 x 0.46 cm, 5 μm).
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Fase móvil A: Acetonitrilo: Disolución tampón a pH 5.0 (1:99).
- Fase móvil B: Acetonitrilo: Disolución tampón a pH 5.0 (20:80).
- Flujo: 1 mL/min.
- Detector: 254 nm.
- Volumen de inyección: 50 μL.

Además, el tiempo de retención de la amoxicilina se debería de obtener entre 9-11 minutos.

3.2.3 Preparación de patrones y muestras

Cuando se analiza un lote de amoxicilina para comercializar se debe de analizar tanto el contenido de este producto como el de sus sustancias relacionadas. La preparativa de las muestras para los dos métodos son distintas, pero para el caso de los patrones hay preparativas en común que se pueden aprovechar. Es por eso, que en un mismo día para ahorrar tiempo se analizan tanto las sustancias como las riquezas.

La preparativa de los patrones es la siguiente:

- Referencia A: Pesar 60 mg del patrón secundario amoxicilina trihidrato y diluir en 100 mL con fase móvil A.

- Referencia B: También conocida como patrón control o “system”. Pesar 4 mg del patrón primario cefradoxilo y diluir en 50 mL con fase móvil A. Finalmente coger 5 mL de la referencia B anterior y 5 mL de la referencia A y diluir a 100 mL con fase móvil A.
- Referencia C: coger 5 mL de la referencia A y diluir a 100 mL con fase móvil A.

Seguidamente se muestra para cada método que patrón es necesario para poder cuantificar, cuántas inyecciones son necesarias y el tiempo del cromatograma:

Tabla 6 Patrones utilizados en cada método

Patrón	Riqueza	Sustancias relacionadas
Referencia A	6 inyecciones, 13 minutos	-
Referencia C	-	3 inyecciones, 13 minutos
Referencia D	-	2 inyecciones, 20 minutos

Con estos patrones se comprobará si el equipo está funcionando correctamente tal como indica farmacopea y además se cuantificarán tanto las riquezas como las sustancias relacionadas.

La preparativa de las muestras se realiza de la siguiente manera:

- Método de riquezas: pesar 600 mg de amoxicilina y diluir con agua en 100 mL. Seguidamente coger 10 mL y diluirlos en 25 mL con fase móvil A.
- Método sustancias: pesar 150 mg de amoxicilina y diluir con fase móvil A en 50 mL.

Como se ha comentado anteriormente la gran problemática de la amoxicilina es su fácil degradación sobre todo en contacto con agua. Es por eso, que las muestras que se preparan para analizar sustancias relacionadas deben prepararse justo antes de ser inyectadas en el equipo. Este procedimiento está estipulado para que esa degradación no influya en los resultados obtenidos.

Las muestras para el análisis de riqueza se inyectan por duplicado, excepto si son muestras de estabilidad que se inyectan por triplicado. El tiempo de cromatograma es de 13 minutos. Las muestras para el análisis de sustancias relacionadas se inyectan una única vez y el tiempo de cromatograma es de 65 minutos.

3.2.4 Puesta en marcha del instrumento

Para poder poner en marcha el HPLC primero se cambian los disolventes y las fases móviles de los canales mencionados anteriormente. Cabe comentar que los canales que llevan disolventes orgánicos se sonicen en el baño de ultrasonidos previamente para poder eliminar las burbujas de aire.

El canal A y D, que son las fases móviles, se cambian diariamente al tener disoluciones tampón, ya que el no hacerlo puede afectar al tiempo de retención en el que saldrá la amoxicilina. El canal B que es el del acetonitrilo se cambia semanalmente al ser calidad

UPLC. Y finalmente, el canal C que es el agua también calidad UPLC se cambia diariamente al ser más propensa a que se puedan generar hongos. El canal de limpieza al ser una mezcla de agua con metanol (85:15) se cambia también diariamente.

Una vez se han cambiado las botellas de los canales con los que se va a trabajar se purgan durante 15 minutos a un caudal de 5 mL/min. Se purgan para evitar que queden burbujas de aire en el circuito y que puedan influir en el análisis, además de acondicionar cada canal con el disolvente que toque. Al haber purgado los canales se procede a purgar el inyector, es decir, se purga la jeringa con la que se dosifica la cantidad de muestra al equipo. Se le hacen 3 ciclos de dosificaciones y con eso también aseguramos que la jeringa quede totalmente limpia y además que no tenga restos de burbujas de aire y que pueda influir en la repetitividad del análisis.

Al estar todo purgado y en las condiciones de trabajo óptimas se coloca la columna junto con la precolumna.

Cuando ya se ha colocado tanto la columna junto con la precolumna y se ha quitado el volumen muerto se procede a programar el método de acondicionamiento de la columna.

Este método equilibra la columna ya que esta viene de estar guardada con un disolvente de almacenamiento. El acondicionamiento elimina este solvente de guardado y lo reemplaza por la fase móvil con la que se usará el análisis. También elimina contaminantes residuales que pueden haberse quedado en la columna durante el almacenamiento. El método se muestra en la Tabla 7 y es el siguiente:

Tabla 7 Método acondicionado de columna

Tiempo retención (min)	Flujo (mL/min)	Canal A (%)	Canal B (%)	Canal C (%)	Canal D (%)
0	0.2	-	65.0	35.0	-
10.0	1.0	-	65.0	35.0	-
30.0	1.0	-	8.0	92.0	-

Al tener la fase estacionaria de la columna activada y acondicionada se puede comenzar con el análisis de patrones y muestras. Primero de todo se inyecta un blanco que es la fase móvil A para poder generar bien el gradiente, y una vez ya se ha hecho el primer blanco se pueden ir inyectando muestras y patrones.

Para finalizar el ensayo, al haberse inyectado todas las muestras y los patrones se programa el método de lavado guardado, con el que se lava la columna y se deja en condiciones de guardado hasta que se vuelva a utilizar para más lotes de amoxicilina. El método de lavado guardado sirve para eliminar residuos de muestras o sales que puedan precipitar. Se muestra en la Tabla 8 y es el siguiente:

Tabla 8 Método lavado de columna

Tiempo retención (min)	Flujo (mL/min)	Canal A (%)	Canal B (%)	Canal C (%)	Canal D (%)
0	1.0	100.0			
10.0	1.0	0	5.0	95.0	-
100.0	1.0	0	5.0	95.0	-
115.0	1.0	0	95.0	5.0	
205.0	1.0	0	95.0	5.0	
210.0	1.0	0	65.0	35.0	
240.0	1.0	0	65.0	35.0	
250.0	0	0	65.0	35.0	

3.2.5 Cromatografía líquida de alta resolución

Para el análisis del contenido de amoxicilina y de sustancias relacionadas se utiliza un método validado según farmacopea como ya se ha comentado anteriormente mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

El equipo utilizado es un HPLC marca WATERS con detector de absorbancia ultravioleta-visible y bomba cuaternaria, tal y como se muestra en la Figura 5 a.

- Equipo de HPLC: Waters e2695.
- Detector PDA WATERS 2996.
- Separations Module WATERS 2695.

Las características técnicas son las siguientes:

- Presión máxima: 5000 psi.
- Volumen LOOP: 200 μ L.
- Flujo máximo: 5 mL/min.

Al tener el equipo una bomba cuaternaria se trabaja con cuatro canales en los que se le deberá de poner el disolvente o disolución acuosa adecuada para que el propio equipo pueda hacer el método de trabajo. Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior se hace un breve resumen de los disolventes o disoluciones usados en cada canal:

- Canal A: Fase móvil A.
- Canal B: Acetonitrilo.
- Canal C: Agua.
- Canal D: Fase móvil B.

Además, cuenta con un quinto canal en el que se utiliza la disolución de limpieza, mediante ese canal hará la limpieza de la jeringa después de cada inyección. Esa disolución de limpieza es una mezcla de agua con metanol en proporción 85:15. La proporción de la fase móvil A y la fase móvil B se pueden encontrar en el apartado 1.4 Método de análisis de esta memoria. Los canales con los disolventes o disoluciones se muestran en la Figura 5 b y c.

Las características técnicas de la columna son las siguientes:

- Marca: Phenomenex.
- Número de serie: 00G-4252-E0.
- Lote: H22-308148.
- Fase estacionaria: C₁₈.
- Dimensiones: 250 x 0.46 cm.
- Tamaño de partícula: 5 µm.
- Rango de pH: 1.5-9.0.
- Presión máxima: 6000 psi.

La columna junto con la precolumna está escogida para cumplir con el método validado por farmacopea y se muestra en la Figura 5 d.

La columna siempre irá unida a la precolumna, como se ha comentado anteriormente. En este caso, al trabajar en rutina el uso de la precolumna es fundamental porque alarga la vida útil de la columna quedando retenidas en la precolumna micropartículas que pueden dañar la columna. Es decir, actúa tanto como filtro físico y químico. De filtro físico ya que como he comentado anteriormente las micropartículas se quedan retenidas en la precolumna y no pasan a la columna, y de filtro químico porque al estar rellena de la misma fase estacionaria de la columna alarga mínimamente la columna a la que está conectada ya que los compuestos también interactúan mínimamente con esta.

Las características técnicas de la precolumna son las siguientes:

- Marca: Phenomenex.
- Dimensión: 4 x 3 mm.
- Fase estacionaria: C₁₈.
- Tamaño de partícula: 5 µm.
- Rango de pH: 1.5-9.0.

El programa con el que se crean métodos y se procesan resultados es el EMPOWER.



Figura 5 a) Instrumento de HPLC de Waters



Figura 5 b) Canal A, B, C y D



Figura 5 c) Canal limpieza



Figura 5 d) Columna y precolumna

3.2.6 Cuantificación de la amoxicilina y de sustancias relacionadas

Una vez obtenidos los cromatogramas la cuantificación de la amoxicilina y de sus sustancias relacionadas se hace mediante comparativa de áreas. El EMPOWER tiene las siguientes fórmulas y así se obtienen los resultados.

Fórmula contenido amoxicilina:

$$\%Amoxicilina = \frac{A_{AP}}{A_{AR}} \cdot \frac{C_{AR}}{P} \cdot 50 \cdot 100$$

Dónde:

- A_{AP} es el área del pico de la amoxicilina de la muestra.
- A_{AR} es el área media del pico de la amoxicilina de la referencia A.
- C_{AR} es la concentración de la referencia A.
- P es el peso de la muestra.

Fórmula contenido sustancias relacionadas:

$$\%Impureza = \frac{A_{IP}}{A_{AR}} \cdot \frac{C_{AR}}{P} \cdot 50 \cdot \frac{100}{\%Amoxicilina}$$

Dónde:

- A_{IP} es el área del pico de la amoxicilina de la muestra.
- A_{AR} es el área media del pico de la amoxicilina de la referencia C.
- C_{AR} es la concentración de la referencia C.
- P es el peso de la muestra.
- % Amoxicilina es la riqueza de la muestra.

Para asegurar que los resultados que se obtienen son los correctos cada muestra se inyecta por duplicado. A excepción de las muestras que son de lotes de estabilidad que esos se analizan por triplicado tal y como indica el protocolo.

Al obtener el porcentaje de área de las sustancias relacionadas se verifica si esas áreas obtenidas están por encima tanto del límite de detección como del de cuantificación ya que si no es así no se tendrían en cuenta para las impurezas pertinentes. Los límites son los siguientes:

- Límite de detección $\geq 0.033\%$ (p/p).
- Límite de cuantificación $\geq 0.067\%$ (p/p).

3.2.7 Verificación de la idoneidad del sistema

Para poder dar por válidos los resultados o no hay que verificar previamente que el equipo haya trabajado de manera correcta y que no haya habido desviaciones. Para eso hay que comprobar que el método cumpla con los criterios de idoneidad del sistema. Los criterios están marcados por farmacopea y se pueden encontrar en el apartado 1.3.4 Farmacopea.

Una vez la resolución de la referencia B, tal y como se muestra en la Figura 9, y la desviación estándar relativa de la referencia A están dentro de los límites establecidos se procede a procesar tanto patrones como muestras para generar los resultados. Si los criterios de idoneidad del sistema no están dentro de los límites establecidos se invalidaría el día y sin llegar a procesar los resultados ya que no serían fiables.

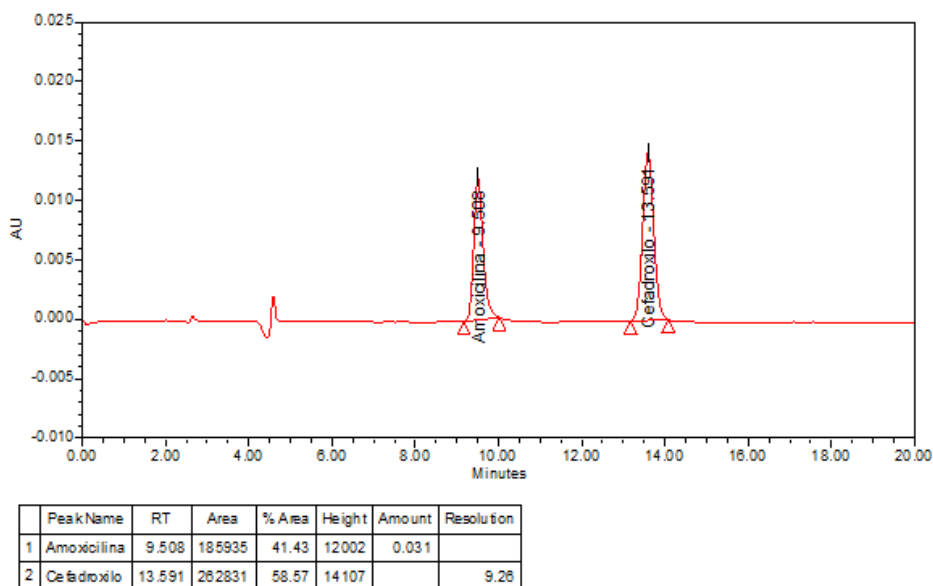


Figura 9 Ejemplo idoneidad del sistema referencia B

3.3 Problemática en los ensayos de rutina

Al hacer ensayos repetitivos o sistemáticos los analistas se enfrentan a diferentes inconvenientes o problemas en su día a día que deben saber resolver y minimizar. Normalmente con una alta carga de trabajo al tener muchos análisis en un tiempo reducido deben de resolver esos problemas técnicos, ya que en un laboratorio de rutina se necesitan unos resultados precisos y lo más rápido posible.

A continuación, se clasifican los principales problemas:

- Problemas con el equipo: Engloba la obstrucción de columnas y precolumnas, fugas en el sistema, problemas de presión, desalineación del detector o mal funcionamiento del inyector automático.
- Resultados no confiables: Puede haber picos fantasmas o irreproducibles, resolución insuficiente entre picos, desviaciones en tiempos de retención y problemas con la línea base.
- Preparativa de fases móviles y muestras: Contaminación cruzada, inestabilidad de la muestra y errores humanos en la preparativa de ambas.
- Presión y tiempo: alta carga de trabajo, presión por resultados rápidos y precisos y documentación exigente.

Seguidamente se ejemplificarán esos inconvenientes durante el análisis de la amoxicilina, se centrarán en los problemas de equipo, de resultados no confiables y de preparativa.

3.3.1 Problemas con el equipo

Uno de los problemas más frecuentes que se encuentra el analista en su día a día es tener fallos técnicos en el HPLC. Por lo tanto, es de alta importancia tener los equipos en buen estado y con un buen mantenimiento para minimizar posibles incidencias.

Entre los fallos más comunes se encuentra el de los problemas con la presión del equipo. Estos problemas se pueden clasificar en si son por sobrepresión o por una presión demasiado baja. Pueden estar relacionados con obstrucción de la columna, precolumna y de canales, en el primer caso. Y con fugas en el segundo caso.

Mediante el programa EMPOWER y su panel de control, tal y como se muestra en la Figura 10, se puede ir comprobando que los parámetros más críticos del equipo sean los adecuados y que está funcionando correctamente. Cualquier anomalía se vería reflejada.

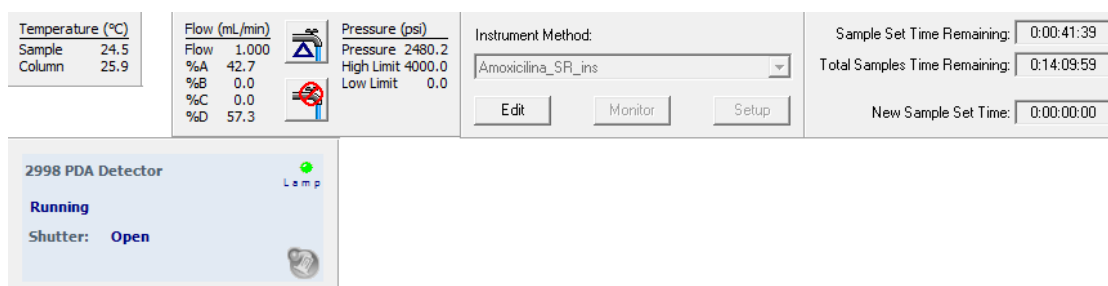


Figura 10. Panel de control EMPOWER

3.3.1.1 Columna

Durante el análisis de la amoxicilina, la columna es uno de los parámetros técnicos más críticos y que si no está en sus condiciones óptimas puede afectar a la reproducibilidad y presión del análisis, ya que es muy importante el rendimiento que esta tenga.

Entre los problemas más comunes se encuentran:

- Ensanchamiento de picos debido a una disminución en la eficiencia de esta. Lo comúnmente conocido como “picos con cola”. Puede ser causado por un deterioro de la fase estacionaria. Seguidamente se muestra un ejemplo.

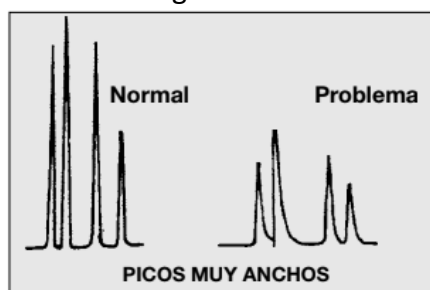


Figura 11. Ensanchamiento de picos

- Incorrecta resolución entre picos a causa de una fase estacionaria degradada. En el caso del análisis de la amoxicilina es muy difícil llegar al punto que no cumpla el criterio de idoneidad marcado por farmacopea al respecto de la resolución,

pero al dar resoluciones muy altas en el momento en el que empieza a bajar considerablemente ya es un aviso de que es probable que pueda haber un problema con la columna. Seguidamente se muestra un ejemplo.

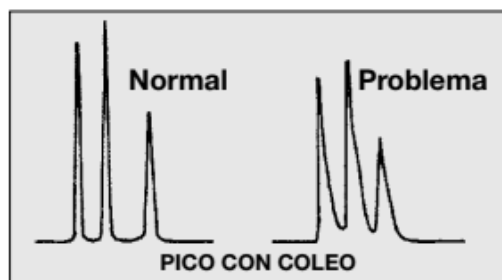


Figura 12. Pérdida de resolución

- Sobrepresión en el sistema debido a la obstrucción de la columna. Puede ser causado por el uso de una fase móvil no filtrada y que hayan acumulado micropartículas en la cabeza de columna. Y también acumulación de micropartículas por un elevado uso de la columna. La sobrepresión se vería marcada en el panel de control de EMPOWER, en la parte de “pressure” tal y como muestra en la Figura 10.

3.3.1.2 Precolumna

Otro factor muy relacionado con la columna es la precolumna ya que esta es una mínima extensión de esta. Como he comentado con anterioridad al ser un filtro tanto físico como químico, tal y como se muestra en la Figura 13, juega un papel fundamental durante el análisis.

Normalmente suele ser el principal motivo, ya que se cambian los filtros de precolumna cada tres semanas aproximadamente para evitar los mismos problemas que los que se han comentado en el apartado anterior.

Las columnas con sus respectivas precolumnas tienen un libro de equipo vinculadas para anotar cuantas muestras se han analizado y así poder hacer un recuento y decidir la periodicidad de cambio del filtro de la precolumna. En la amoxicilina como se fabrican unos dos lotes diarios se estipula que este filtro se cambia cada dos tres semanas. Cada vez que se realiza un cambio de filtro se debe de anotar en el libro de equipo para que cualquier persona del laboratorio pueda saber cada cuanto se ha cambiado dicho filtro y evitar problemas.



Figura 13 Funcionamiento precolumna

Seguidamente se muestra cómo se observaría de manera visual si el filtro está en buenas condiciones para continuar usándose. En la Figura 14 se observa que el filtro de abajo está claramente obturado y el de arriba es uno nuevo.

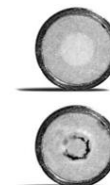


Figura 14 Filtro precolumna

3.3.1.3 Detector

El detector registra la presencia y la concentración de los analitos en el HPLC. Cuando esta parte del equipo falla provoca los siguientes problemas:

- Ruido excesivo en la línea base esto puede ser debido tanto por una contaminación en la celda como por una desgasificación insuficiente de las fases móviles.
- Deriva en la línea base. Normalmente va relacionada con un método con gradiente, ya que puede no estar bien equilibrado.
- Pérdida de sensibilidad causada por una celda sucia o una lámpara en mal estado. Es muy importante que una vez se enciende la lámpara esté pasando flujo para no dañarla.
- Picos fantasma causados por suciedad de la celda o por su propio desgaste.

Las soluciones ante estos problemas es dejar el tiempo correcto para que el gradiente se equilibre, añadiendo más blancos. Desgasificar mínimo 20 minutos las fases móviles cuando llevan grandes cantidades de orgánico. En el momento que se enciende la lámpara comprobar que esta está humedecida y pasando flujo. Y finalmente hacer un correcto mantenimiento a la celda del detector para evitar suciedad y contaminación cruzada.

3.3.1.4 Inyector automático

Los fallos del inyector automático afectan directamente a la reproducibilidad, precisión y exactitud del análisis. Además, al tener estipulado por farmacopea que las áreas de la referencia A no pueden superar un 1% que el inyector no trabaje adecuadamente puede hacer que se invaliden días enteros de trabajo. Los fallos más comunes son los siguientes:

- Volumen de inyección incorrecto causado por haber burbujas de aire en la jeringa o el sistema de inyección.

- Contaminación cruzada entre muestras causada por acumulación de contaminantes en la aguja, loop o que se haya contaminado la solución de lavado.
- Obstrucción en el sistema de inyección a causa de estar la aguja obstruida por utilizar muestras sin filtrar.

La solución ante estos problemas es principalmente comprobar que el sistema de inyección está bien purgado y sin burbujas de aire. Sonicar la solución de lavado para que no introduzca estas burbujas a la jeringa durante la limpieza de esta. Comprobar que la jeringa está limpia y la solución de lavado no está contaminada para evitar contaminación cruzada. Filtrar siempre las muestras y realizar un mantenimiento periódico al inyector.

3.3.2 Resultados no confiables

Dentro de los resultados no confiables se encuentra gran variedad de motivos por los cuales se descartarían resultados. Como se ha comentado anteriormente puede haber picos fantasmas o irreproducibles, resolución insuficiente entre picos, desviaciones en tiempos de retención y problemas con la línea base.

Como muchos de ellos ya se han hablado en apartados anteriores, este apartado se centrará en la problemática de los picos fantasmas o irreproducibles y los problemas con la línea base, ya que pueden ir vinculados.

En el análisis de las sustancias relacionadas la principal problemática viene por los problemas con la línea base al usar un método con gradiente. Tal como indica el método es necesario que el perfil del gradiente sea siempre igual durante todo el análisis. Unas de las problemáticas más comunes son:

- Picos fantasmas normalmente por contaminación cruzada o porque el gradiente no estaba lo suficiente estable. Provoca gran cantidad de fuera de tendencias e incluso resultados fuera de especificación. Es por eso que se tiene que asegurar siempre con los blancos suficientes que el gradiente es totalmente estable, arrastrando así posibles interferentes que hayan quedado en la columna durante su limpieza.
- Inestabilidad en la línea base normalmente provocada por que el gradiente todavía no estaba estable o por una inadecuada preparativa de las fases móviles.

3.3.3 Problemas de preparativa y programación

La problemática en la preparativa y programación de secuencias de HPLC involucran en primer lugar al analista y múltiples factores como pueden ser las condiciones del material, el equipo y del software. Los errores más comunes son los siguientes:

- Errores en la preparativa de muestras: el analista puede realizar diluciones incorrectas, que el material de uso no esté limpio y provoque contaminación

cruzada, identificación incorrecta de las muestras y que haya una confusión de ellas y un incorrecto cumplimiento del tiempo de estabilidad de las muestras.

- Incorrecta programación de las secuencias: es debido a una mala configuración de los parámetros cromatográficos. Los parámetros más críticos sería la equivocación en el volumen de inyección, en el método o en el tiempo de análisis.

Para minimizar esos errores el analista debe tener siempre a mano el protocolo normativo de trabajo (PNT) para no cometer ningún error de procedimiento. Disponer de buenos ciclos de limpieza y de secado del material de vidrio a utilizar. Una buena formación a los analistas para conocer la técnica a la perfección, ya sea a nivel de programación de secuencias, como conocimiento de los tiempos de estabilidad de las muestras y de buenas prácticas de laboratorio (identificación de muestras, gestión de residuos, etc).

3.4 Resultados fuera de especificación y de tendencia.

Las OOS (Out of specification) y OTS (Out of trend) son unas siglas muy usadas en los laboratorios de rutina. Ambas se refieren a situaciones en las que los resultados analíticos no cumplen con las expectativas establecidas, ya sea saliéndose de especificación o de tendencia.

Una OOS se refiere a cualquier resultado analítico que esté fuera de los límites especificados, en este caso por farmacopea y por tanto se debe de investigar para determinar la causa. Normalmente deriva la repetición del análisis siguiendo la Figura 15.

Mediante esta guía se fija el protocolo de actuación de la repetición de un análisis cuando este da fuera de especificación. Se divide en si la sospecha de que el resultado anómalo sea por una preparativa de muestra, por un error de analista o que la muestra esté en mal estado. Si la sospecha es por una preparativa de la muestra se repite por triplicado y si da dentro de especificación esos resultados se reemplazan y si no se pueden hacer más replicas, se plantean más hipótesis o se confirma el resultado OOS. Si se sospecha de error del analista ya puede ser porque no sea experimentado el analista que ha generado la OOS hace 2 preparativas más y un nuevo analista hace 3 preparativas y se comparan los resultados. Una vez se obtienen los nuevos resultados se actúa de la misma manera que el primer caso. Y si por último se sospecha de la muestra normalmente por una mala fabricación se realizan 2 preparativas más y otra comparándola con una muestra control. Una vez obtenidos resultados se actúa de la misma manera que el primer caso.

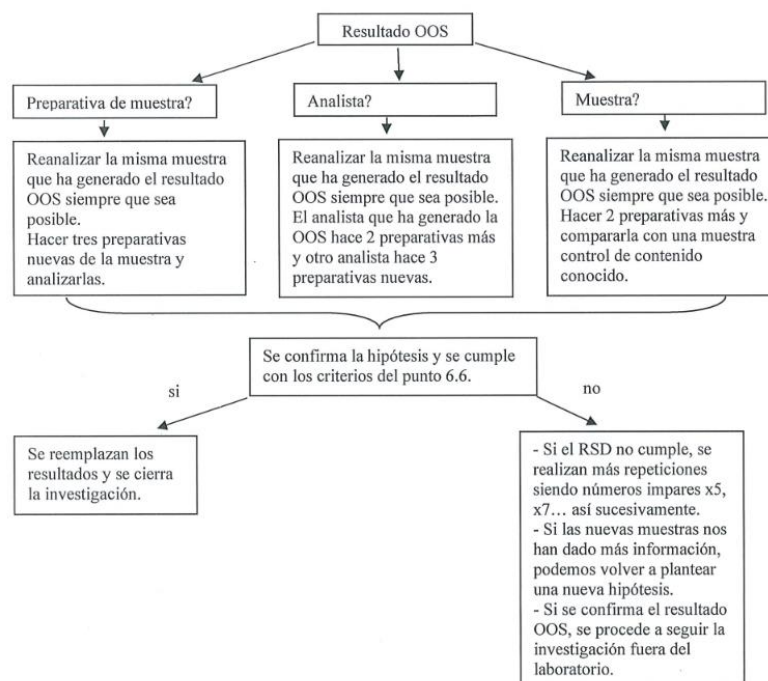


Figura 15. Guía repetición de resultados OOS

Una OTS se refiere a resultados que están dentro de las especificaciones pero que se desvían del comportamiento histórico esperado del producto. Es muy útil en el estudio de estabilidad de la amoxicilina.

Seguidamente en la Tabla 9 de muestran las principales diferencias entre una OOS y una OTS.

Tabla 9. Comparativa OOS y OTS

Criterio comparativo	OOS	OTS
¿Cumple especificación?	No	Sí
Gravedad	Afecta a la liberación del lote	Alerta preventiva
Requiere investigación	Sí	No siempre
Implica fallo en el proceso	Posiblemente	No necesariamente

Por lo tanto, la principal diferencia es que se realiza una OOS cuando el producto no cumple con las especificaciones regulatorias y puede implicar que el producto no sea apto para su uso. En cambio, se realiza una OTS cuando el producto cumple las especificaciones, pero no se comporta como se esperaba pudiendo ser una alerta de un problema futuro.

4. Resultados y discusión.

En este apartado se presentarán y se discutirán los resultados obtenidos para el análisis de la amoxicilina en un laboratorio rutina. Se presentarán diferentes lotes de amoxicilina, ya que se mostrará un lote analizado para salir a mercado directamente sin

anomalías, un lote que requiere estudio de estabilidad y un lote al que se le aplica el estudio de OOS.

Los límites de la especificación marcados por farmacopea se encuentran en el apartado 1.3.3. Y los límites de cuantificación y detección se encuentran en el apartado 3.2.6 de esta memoria.

Hay un total de 46 impurezas identificadas para el ensayo de sustancias relacionadas, las sustancias que no se muestran es porque dan inferior al límite de detección o no se detectan por lo tanto no se tienen en cuenta.

4.1 Resultados de un lote de fabricación.

Seguidamente se muestran los resultados de un lote que sale directamente a mercado sin ninguna investigación previa.

Como se observa en la Tabla 10 los resultados se encuentran dentro de especificación. La impureza encontrada en las sustancias relacionadas es la impureza número 10 que es la que aparece siempre en la amoxicilina 500 mg/g y es la que indica si el ensayo se ha degradado o no ya que es la más crítica. Como se observa al haber una única impureza el contenido de las sustancias individuales y el de las totales es el mismo.

Tabla 10. Resultados lote fabricación

Lote: 10043500211	Inicio	Medio	Final	Promedio
Riqueza (mg/g)	507.047	506.374	504.020	505.814
Sustancias relacionadas (HPLC) (%)				
Impureza 10	0.090	0.081	0.101	0.091
Impureza 19	<LQ (0.054)	<LQ (0.051)	<LQ (0.054)	<LQ (0.053)
Impureza 39	<LQ (0.044)	<LQ (0.047)	<LQ (0.048)	<LQ (0.046)
Impurezas totales	0.090	0.081	0.101	0.091

Los resultados de las muestras inicio, medio y final son muy similares con lo cual se puede demostrar que la fabricación del lote ha sido perfectamente homogénea. Por lo tanto, se utiliza el promedio de las tres muestras para la liberación del lote.

4.2 Resultados de estudio de estabilidad.

Seguidamente se muestran los resultados de un lote al que se le ha hecho un estudio de estabilidad. Este lote se selecciona para el estudio de estabilidad ya que corresponde al décimo lote de granel fabricado desde el último lote que fue evaluado, y según el procedimiento establecido, se debe de realizar un estudio de estabilidad cada 10 lotes de granel. Se realiza bajo condiciones normales, intermedias y aceleradas. Las condiciones se pueden encontrar en el apartado 3.1.2 de esta memoria.

Como se observa en la Tabla 11, correspondiente a aplicar condiciones normales, tanto la riqueza como las sustancias relacionadas con bastantes similares, y siguen la misma tendencia. Las impurezas son bajas y estables. Por lo tanto, las condiciones aplicadas no

alteran la vida del producto y se mantiene estable cada 3 meses. Bajo estas condiciones se espera que el producto se mantenga dentro de los límites especificados, puede haber una ligera disminución con el tiempo, pero no es significativa.

Tabla 11. Resultados condiciones normales

Condiciones normales	0 meses	3 meses	6 meses
Riqueza (mg/g)	499.400	504.583	494.203
Sustancias relacionadas (HPLC) (%)			
Impureza 10	0.073	0.067 (<LQ)	0.072
Impureza 19	0.046 (<LQ)	ND	ND
Impureza 34	ND	0.036 (<LQ)	ND
Impureza 41	0.045 (<LQ)	ND	ND
Impureza 42	ND	0.076	ND
Impurezas totales	0.073	0.076	0.072

Por lo tanto, al salir los resultados como lo esperado se da por válido esta parte del estudio.

Como se observa en la Tabla 12, correspondiente a aplicar condiciones intermedias, bajo estas condiciones se empieza a notar una ligera degradación del producto. A partir de los 3 meses se confirma que el producto empieza a degradarse viéndose reflejado en la riqueza que va disminuyendo y en las sustancias relacionadas con la impureza 10 y la 12. La impureza 10 como ya se ha comentado anteriormente es la impureza crítica que muestra la degradación del producto y se observa que a medida que avanza el tiempo aplicando las condiciones intermedias va aumentando, influyendo así en la riqueza del producto.

Tabla 12. Resultados condiciones intermedias

Condiciones intermedias	0 meses	3 meses	6 meses
Riqueza (mg/g)	499.400	485.654	488.280
Sustancias relacionadas (%)			
Impureza 10	0.073	0.076	0.097
Impureza 19	0.046 (<LQ)	ND	ND
Impureza 20	ND	ND	0.058 (<LQ)
Impureza 21	ND	0.034 (<LQ)	ND
Impureza 34	ND	0.05 (<LQ)	ND
Impureza 40	ND	ND	0.079
Impureza 41	0.045 (<LQ)	ND	ND
Impureza 42	ND	0.085	ND
Impurezas totales	0.073	0.161	0.176

Bajo estas condiciones puede observarse una disminución de la riqueza con el paso del tiempo. Sin embargo, al estar los resultados dentro de los límites aceptables se da como válida la estabilidad del producto.

Como se observa en la Tabla 13, correspondiente a aplicar condiciones aceleradas, bajo estas condiciones se muestra la inestabilidad del producto. A partir de los 3 meses se confirma que el producto empieza a degradarse, cada vez más rápidamente, viéndose reflejado en la riqueza que va disminuyendo y en las sustancias relacionadas que aumentan críticamente. La impureza 10 muestra la degradación del producto, que va aumentando más. Además, aparecen nuevas impurezas que influyen significativamente en las totales.

Tabla 13. Resultados condiciones aceleradas

Condiciones aceleradas	0 meses	3 meses	6 meses
Riqueza (mg/g)	499.400	484.179	476.873
Sustancias relacionadas (%)			
Impureza 10	0.073	0.082	0.090
Impureza 19	0.046 (<LQ)	ND	ND
Impureza 20	ND	ND	0.053 (<LQ)
Impureza 28	ND	ND	0.088
Impureza 30	ND	0.067 (<LQ)	ND
Impureza 32	ND	ND	0.091
Impureza 34	ND	0.078	ND
Impureza 40	ND	ND	0.071
Impureza 41	0.045 (<LQ)	ND	ND
Impureza 42	ND	0.081	ND
Impurezas totales	0.073	0.241	0.340

Cuando se hace el estudio de estabilidad a lotes de amoxicilina el último punto de condiciones aceleradas es 6 meses, porque a partir de este el producto es inestable. Estos resultados son debidos a la sensibilidad de la amoxicilina a la humedad y el calor.

4.3 Resultados anómalos e investigación de fuera de especificación.

Seguidamente se muestran los resultados de un lote que sale directamente a mercado con una investigación previa de OOS.

En la Tabla 14 se muestran los resultados del ensayo de riqueza de las muestras inicio, medio y final. Como se puede observar la muestra inicio se encuentra fuera de especificación ya que el resultado es inferior al límite establecido. La muestra medio y final los resultados están dentro de especificación observándose una tendencia de incremento a medida que se obtiene la muestra de final de envasado.

Una vez se obtiene un resultado anómalo se realiza una investigación para conocer las causas de este resultado fuera de especificación y poner acciones correctivas para que no se vuelva a dar. Por lo tanto, tal y como se muestra en la Tabla 14 se realiza por triplicado la preparativa de la muestra inicio, siguiendo así el diagrama del apartado 3.4 de esta memoria. Al repetir la muestra por triplicado se obtienen unos resultados dentro de especificación y a partir de estos resultados se puede confirmar que el primer resultado obtenido anómalo era debido a una mala preparativa de la muestra.

Tabla 14. Resultados lote OOS

Muestra	Riqueza (mg/g)
Inicio	465.338
Medio	482.264
Final	502.389
Retesteo	
Inicio R1	486.006
Inicio R2	485.803
Inicio R3	488.359
Promedio	486.723

Al confirmar que la OOS es debida a una mala preparativa de la muestra se puede concluir el estudio de investigación indicando lo siguiente:

- Causa: La preparativa de la muestra no ha sido la correcta, probablemente no se haya enrasado correctamente el matraz.
- Acción correctiva: Se le informa al analista la importancia de comprobar el enrase del matraz una vez se ha enrialado la muestra para analizar mediante HPLC.
- Resultado final: se utiliza el resultado de la repetición por triplicado de la muestra inicio como valor promedio.

En la Tabla 15 se muestran los resultados finales para la liberación del lote. Utilizando como se ha comentado anteriormente el resultado promedio del triplicado de la repetición de riqueza de la muestra inicio. El valor es utilizado para el cálculo de las sustancias relacionadas.

Tabla 15. Resultados lote después OOS

Lote: 10113900009	Inicio	Medio	Final	Promedio
Riqueza (mg/g)	486.723	482.264	502.389	490.458
Sustancias relacionadas (HPLC) (%)				
Impureza 10	0.098	0.090	0.108	0.099
Impureza 18	<LQ (0.053)	<LQ (0.048)	<LQ (0.051)	<LQ (0.051)
Impureza 40	<LQ (0.058)	<LQ (0.060)	<LQ (0.051)	<LQ (0.056)
Impurezas totales	0.098	0.090	0.108	0.099

Los resultados se encuentran dentro de especificación. La impureza encontrada en las sustancias relacionadas es la impureza número 10. También aparecen la impureza 18 y



40 pero al salir por debajo del límite de cuantificación no se tienen en cuenta en el recuento de las impurezas totales. Por lo tanto, el contenido de la impureza 10 y el de las totales es el mismo.

Los valores obtenidos en las muestras inicio, medio y final son muy similares con lo cual se puede demostrar que la fabricación del lote ha sido perfectamente homogénea. Por lo tanto, se utiliza el promedio de las tres muestras para la liberación del lote.

5. Conclusiones.

A través de esta memoria se demuestra que la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución en laboratorios de rutina es fundamental para garantizar la calidad de la amoxicilina para su comercialización.

Es necesaria una documentación rigurosa y el cumplimiento de las normativas farmacéuticas y de calidad para obtener una adecuada trazabilidad desde la adquisición de materias primas hasta la entrega del producto final. Con estas buenas prácticas se facilita la detección y corrección de problemáticas que puedan surgir durante el proceso.

Otros aspectos que contribuyen a la trazabilidad y validez de resultados son una atención exhaustiva a la preparación de muestras, el mantenimiento adecuado del equipo y la documentación precisa durante el análisis de estas.

Los problemas técnicos pueden generar resultados no confiables, resaltando la importancia del mantenimiento preventivo y de la monitorización continua del equipo.

La gestión de las anomalías, incluyendo picos fantasmas y desviaciones en los tiempos de retención, es esencial para distinguir resultados válidos de los que puedan estar afectados por interferencias o errores operativos. Siendo fundamental tener en un laboratorio rutina un protocolo a seguir en el momento que aparecen resultados fuera de especificación o de tendencia.

La verificación de la reproducibilidad y la resolución adecuada entre picos en los análisis asegura la sensibilidad y selectividad del método HPLC empleado, garantizando resultados confiables para la liberación de lotes.

El estudio de estabilidad y los análisis de lotes fabricados indican que el método HPLC es adecuado para evaluar la calidad de la amoxicilina durante su vida útil, asegurando que el producto cumple con las especificaciones establecidas por la farmacopea.

Los resultados de la determinación de la riqueza de amoxicilina en los lotes analizados demostraron que, bajo condiciones normales de fabricación y almacenamiento, los niveles se mantienen dentro de los límites establecidos, asegurando la calidad del producto.

La comparación entre las muestras inicio, medio y final muestra una gran homogeneidad en los resultados, lo que indica una fabricación homogénea y controlada del lote analizado.

Los análisis de las estabildades en condiciones aceleradas mostraron que, a partir de los 3 meses, la estabilidad del producto empieza a deteriorarse, con una disminución significativa en la riqueza y un aumento en las impurezas relacionadas, especialmente la impureza 10, lo cual evidencia la degradación del producto. La aparición de nuevas impurezas en condiciones aceleradas provoca la necesidad de estudio constante ya que pueden originarse nuevos procesos de degradación.



La investigación de lotes fuera de especificación (OOS) permitió identificar que los resultados anómalos en la muestra inicio del lote mencionado fueron consecuencia de errores en la preparación analítica, ya que los datos repetidos mostraron valores dentro de rango cuando se repitió la prueba.

En resumen, el desarrollo y aplicación de una metodología robusta de HPLC, combinada con procedimientos documentales, mantenimiento adecuado, control estadístico del proceso y protocolos de actuación ante desviaciones, son fundamentales para asegurar que los productos de amoxicilina cumplan los estándares regulatorios y mantengan su calidad y estabilidad durante su vida útil.

6. Bibliografía

- [1] Laboratorios Karizoo. (s.f.). *Empresa*. Último acceso: 1 de mayo de 2025, de <https://www.karizoo.com/>
- [2] Litter, M. *Farmacología Experimental y Clínica*. El Ateneo. Séptima edición, p. 1460-1471, 1988.
- [3] Cormick, S. B., Rebossio, M. E., Ranea, B. A., Castro, A. M., Domínguez, M. O., Stegmayer, C. I., & Pomilio, A. B. (2004). Cuantificación de amoxicilina en formas farmacéuticas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. [Revista Ciencia Tecnológica], (Nº 7a), 18-27.
- [4] Connors, K. A. *Chemical stability of pharmaceuticals*. Segunda edición, p.: 182:192, 1986.
- [5] Goodman, & Gilman. (s.f.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw – Hill Interamericana.
- [6] Ercolano, I., Pizzorno, M. T., & Vidal, M. (2009). *Estabilidad de drogas y medicamentos*. Argentina.
- [7] Giang, D. T., & Hoang, V. D. (2010). *Comparative study of RP-HPLC and UV spectrophotometric techniques for the simultaneous determination of amoxicillin and cloxacillin in capsules*. Journal of Young Pharmacists, 2(2), 190–195. [DOI: 10.4103/0975-1483.63168]
- [8] WHO European Pharmacopoeia (2019). *Thin Layer Chromatography (TLC)*. [Referencia: 9th Edition, Volume 1].
- [9] De Baere, S., et al. (2021). *Development and validation of an HPLC-ESI/MS/MS method for the determination of amoxicillin, its major metabolites, and ampicillin residues in chicken tissues*. Molecules, 24(14), 2652. [DOI: 10.3390/molecules24142652]
- [10] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (n.d.). *Quality guidelines*. ICH. Último acceso: 05 de mayo de 2025, de <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [11] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). (n.d.). *Quality guidelines for veterinary medicines – non-immunologicals*. European Medicines Agency. Último acceso: 05 de mayo de 2025, de <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/scientific-guidelines-veterinary-medicines/quality-guidelines/quality-non-immunologicals>
- [12] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (n.d.). *¿Quiénes somos?* AEMPS. Último acceso: 05 de mayo de 2025, de <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/quienes-somos/?lang=ca>



[13] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2023). *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Council of Europe. Último acceso: 01 de junio de 2025. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia>

