



Universitat Autònoma
de Barcelona

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA NIR PARA LA
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CRÍTICOS EN LA
FABRICACIÓN DE COMPRIMIDOS EN LA INDUSTRIA
FARMACÉUTICA

Rubén Eduardo Cueva Mestanza

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA

Director: Dr. Marcelo Blanco Romia

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2012

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per Rubén Eduardo Cueva Mestanza

Sr. Rubén Eduardo Cueva Mestanza

Vist-i-plau,

Dr. Marcelo Blanco Romia

Catedràtic de Química Analítica

Bellaterra, 20 de septiembre de 2012.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la orientación, el apoyo y la colaboración de muchas personas que han estado a mi lado durante estos cuatro años de mi vida de doctorando. A través de estas cuantas palabras quiero realizar un pequeño pero sincero agradecimientos a estas personas.

Primeramente, quisiera agradecer al catedrático D. Marcelo Blanco por haberme recibido en el grupo de Quimiometría aplicada, haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto de investigación y haberme permitido formarme como investigador, gracias a su orientación y asus consejos. Quisiera hacer extensivo el agradecimiento a todos los profesores integrantes del grupo: Santiago MasPOCH, Jordi Coello, Hortensia Iturriaga, Manel Alcalá y Sergio Armenta.

También quiero agradecer a los compañeros que estuvieron al comienzo de mi camino, que me enseñaron y orientaron en las primeras fases de mi aprendizaje, y a los que se han ido sumando durante estos cuatro años de trabajo doctoral. Muchas gracias a *Laboratorios Kern Pharma* por haber colaborado, brindándome todas las facilidades para realizar los objetivos trazados.

Finalmente, quiero agradecer a la Universitat Autònoma de Barcelona la concesión de una beca PIF, que me ha permitido desarrollarme como investigador, y al Ministerio de Ciencia e Innovación, por la financiación del proyecto en el que he colaborado: *Desarrollo de nuevas metodologías espectrales para el control analítico de productos y procesos*. (CTQ2009-08312).

Y un especial agradecimiento a mis padres, Francisco Wander y Vilma Esperanza, y a mi hermano Wander Jesús; por estar presente en cada paso que he dado durante estos años así como el reconfortante soporte que nunca me ha hecho sentir lejos del hogar.

Rubén

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	11
1. Nuevos retos para asegurar la calidad en la industria farmacéutica.....	11
1.1. Introducción	11
1.2. Comprimidos.....	13
1.2.1. Mezcla	15
1.2.2. Granulación.....	17
1.2.3. Compresión.....	18
1.2.4. Recubrimiento	20
REFERENCIAS	22
2. Espectroscopia NIR.....	28
2.1. Introducción	28
2.2. Fundamentos de la radiación NIR.....	29
2.3. Tratamiento de la muestra.....	33
2.4. Reflectancia Difusa	34
2.5. Instrumentación.....	34
2.5.1. La fuente de radiación	35
2.5.2. Selección de longitudes de onda	36
2.5.3. Detectores	40
2.5.4. Registro de la muestra	40
2.6. Aspectos regulatorios	43
REFERENCIAS	46
3. Espectroscopia Raman.....	49
3.1. Introducción	49
3.2. El efecto Raman.....	50
3.3. Instrumentación.....	54
3.3.1. La fuente de radiación	55
3.3.2. Sistemas de iluminación de la muestra	56
3.3.3. Registro de muestras	57
3.3.4. Detector.....	58
3.4. Aplicaciones Raman	59
3.5. Ventajas de la espectroscopia Raman	61

INDICE

REFERENCIAS	62
4. Quimiometría	63
4.1. Introducción	63
4.2. Etapas del desarrollo de modelos de calibración	64
4.2.1. Preparación conjunto de calibración o de entrenamiento	64
4.2.2. Selección de un conjunto de calibración o de entrenamiento	67
4.2.3. Determinación de los valores de referencia	68
4.2.4. Obtención y registro de datos	68
4.2.5. Pretratamiento de los datos.....	69
4.2.6. Construcción y evaluación del modelo quimiométrico.....	74
4.3. Análisis cualitativo.....	74
4.4. Análisis cuantitativo	75
4.4.1. Regresión lineal Múltiple (MLR).....	75
4.4.2. Regresión en componentes principales (PCR).....	76
4.4.3. Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS).....	77
4.5. Validación de los métodos NIR	79
4.5.1. Selectividad	80
4.5.2. Linealidad.....	81
4.5.3. Exactitud.....	82
4.5.4. Precisión	82
4.5.5. Límite de detección (LD).....	83
4.5.6. Límite de cuantificación (LQ)	83
4.5.7. Robustez	83
4.6. Trabajo en rutina	83
REFERENCIAS	85
OBJETIVO	91
5. Objetivo de la tesis	91
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	95
6. Metodología.....	95
6.1. Introducción	95
6.2. Descripción y preparación de muestras	95
6.2.1. Muestras de producción y/o laboratorio	96
6.2.1.1. Mezclas farmacéuticas para monitorizar la homogeneidad	96

INDICE

6.2.1.2. Granulados y comprimidos de paracetamol 1g.....	98
6.2.1.3. Comprimidos de Irbesartan 300 mg.....	99
6.2.2. Preparación del conjunto de calibración/validación	100
6.2.2.1. Muestra sintética con propiedades físicas semejantes a la muestra de producción	101
6.2.2.2. Espectro proceso	102
6.3. Instrumentación y métodos de análisis.	104
6.3.1. Espectroscopía NIR.	104
6.3.2. Espectroscopia Raman.....	109
6.3.3. Preparación de comprimidos en el laboratorio.....	109
6.3.4. Mezclador para sólidos	109
6.3.5. Tamizadora	110
6.3.6. Métodos de referencia	110
6.4. Programas para la adquisición y tratamiento de los datos.....	112
6.5. Métodos de análisis cualitativos.....	113
6.5.1. Variación de la intensidad de pico	113
6.5.2. Desviación estándar de un bloque móvil (MBSD)	113
6.5.3. Disimilaridad del promedio de un bloque móvil y un espectro objetivo (DMBA-TS)	114
6.5.4. Disimilaridad de un espectro individual y el promedio de espectros objetivos (DIS-ATS)	115
6.5.5. Disimilaridad entre espectros (DIS).....	115
6.5.6. Análisis en componentes principales (PCA).....	115
6.5.7. Componentes principales- Análisis de la distancia de los <i>score</i> (PC-SDA)	116
6.6. Métodos de análisis cuantitativos	116
REFERENCIAS	118
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	123
7. Aplicaciones de NIR en la industria farmacéutica	123
7.1. Estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final.....	123
7.1.1. Métodos cualitativos para la determinación de la uniformidad en el mezclado	126
7.1.2. Método cuantitativo para la determinación de la uniformidad en el mezclado	134
7.2. Comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman	136

INDICE

7.2.1. Variación de la intensidad de pico para Raman	138
7.2.2. Metodos multivariantes.....	140
7.3. Determinación de parámetros críticos en dos etapas (granulación y compresión) de la fabricación de comprimidos farmacéuticos	144
7.3.1. Determinación de tamaño de partícula en granulados.....	144
7.3.2. Determinación de API en granulados	148
7.3.3. Determinación de presión de compactación en comprimidos	150
7.3.4. Determinación de API en comprimidos.....	154
7.4. Optimización y aplicabilidad de una nueva metodología basada en la obtención del espectro proceso.....	156
7.4.1. Construcción de los conjuntos y modelos de calibración.....	157
7.4.2. Influencia de los pretratamientos.....	160
7.4.3. Aumento de la variabilidad de las muestras de calibración.....	163
7.4.4. Determinación de API y excipientes con el método del espectro proceso	167
REFERENCIAS	171
CONCLUSIONES	181
8. Conclusiones	181
ANEXOS	189
9. Artículos publicados.....	189
9.1. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy.	
9.2. NIR analysis of pharmaceutical samples without reference data. Improving the calibration.	
9.3. Critical evaluation of methods for end-point determination in pharmaceutical blending processes.	

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA NIR PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CRÍTICOS EN LA FABRICACIÓN DE COMPRIMIDOS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Para crecer de forma exitosa, optimizar la productividad y cumplir las especificaciones de los organismos reguladores, la industria farmacéutica necesita elevar al máximo la eficiencia de todos sus procesos y mejorar la calidad de sus productos. Con este fin, la industria demanda técnicas que le permita aumentar su eficiencia rápidamente, reducir costes y acceder a información relevante y actualizada en tiempo real. Por este motivo, se están buscando técnicas que permitan obtener resultados más rápidos, pero sin perder calidad en el proceso ni en el producto.

La espectroscopia de infrarrojo cercano presenta una serie de ventajas ante otras técnicas instrumentales, que la convierten en una herramienta idónea, debido a factores económicos (rapidez, puesto que no existe tratamientos de la muestra y la obtención de resultados es rápida; ausencia de consumo de reactivos, mínima formación del personal y bajo coste de mantenimiento) y de seguridad (no se generan residuos y los resultados son fiables). El desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en la espectroscopia NIR, capaces de ser utilizados para el control del proceso y establecimiento de la calidad de los productos finales, es el principal objetivo de esta tesis. Bajo esta premisa se han elaborado los siguientes trabajos basados en la determinación de parámetros físicos y químicos relevantes en las diferentes etapas del proceso de fabricación y en el producto final:

1. Para asegurar la uniformidad de la dosificación de las formas farmacéuticas es necesario asegurar la correcta homogeneización de las mezclas. En este trabajo se ha realizado un estudio crítico de distintos métodos cualitativos y cuantitativos aplicables en la monitorización del proceso de mezclado farmacéutico y la detección de su punto final mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). El estudio muestra un importante avance para la

RESUMEN

- industria farmacéutica, ya que ayuda a definir cuál es el método más adecuado a utilizar para determinar el punto final para los procesos de mezclado, no todos los métodos tienen la misma sensibilidad ni facilidad de implementación.
2. Con el objeto de realizar el seguimiento y determinación del punto final del mezclado, se comparó tres metodologías para el tratamiento de los datos espectrales mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman: para Raman se aplicó la variación de intensidad de pico, este método fue utilizado por ser un método sencillo que requiere un tratamiento casi nulo de los datos. Por otro lado, los métodos de disimilaridad del promedio de un bloque móvil y un espectro objetivo (DMBA-TS) y componentes principales- análisis de la distancia de los *score* (PC-SDA) fueron utilizados para comparar la calidad de sus resultados al aplicarlos a los espectros registrados en tiempo real de las mezclas obtenidos tanto por NIR como para Raman. Se seleccionó estos dos métodos quimiométricos por no requerir de un método de referencia. Estos tres métodos son susceptibles de ser aplicados en tiempo real por lo cual pueden ser de gran utilidad para industria farmacéutica en el control de la homogeneidad.
 3. En el siguiente trabajo se estudió la determinación de parámetros físicos y químicos críticos en etapas del proceso de producción de comprimidos de paracetamol 1g. En la granulación se realizó el control de la distribución y tamaño de partícula medio, que son parámetros importantes para asegurar la correcta fluidez de los gránulos y el llenado homogéneo de la matrices de una máquina compactadora, además se realizó la determinación del principio activo para garantizar que no ha habido pérdidas durante el proceso y que la dosis correcta llegue al siguiente paso. En la compactación se determinó la presión de compactación, este es un parámetro relevante en esta etapa porque los comprimidos deben compactarse a una presión adecuada, de manera que sean

suficientemente duros para que en su manipulación no se desmenuen y/o fracturen, pero a su vez sean suficientemente blandos para facilitar su disgregación en el organismo. Con el fin de garantizar el cumplimiento de las especificaciones de concentración del principio activo se determinó la concentración de este en los comprimidos finales. El método fue validado siguiendo las guías ICH y EMA, que permiten su aplicación como método de calidad para el control analítico de un proceso de producción. Los modelos de calibración para la determinación de los parámetros descritos anteriormente fueron elaborados utilizando diferentes estrategias con el fin de obtener modelos de calibrado simples y adecuados. La correcta predicción de muestras externas revela la aplicabilidad de estos modelos en rutina.

4. En este estudio se realiza la optimización y la aplicación de una nueva metodología para desarrollar modelos de calibración que incorporen la variabilidad física producida durante el proceso de fabricación de cada formulación. El método utilizado es el del espectro proceso, que consiste en la adición de un conjunto de espectros proceso S_p (espectros obtenidos por cálculo de la diferencia entre los espectros de comprimidos de producción y espectros de muestras de laboratorio con la misma concentración nominal) al conjunto de muestras de laboratorio para calibración y predicción, como una forma de incorporar los cambios físicos producidos durante cada etapa del proceso de producción de comprimidos. Con el objetivo de elegir el mejor modelo de calibración se definieron dos objetivos en este estudio: establecer la influencia de los pretratamientos espectrales para la construcción del modelo de calibración por un lado; y por otro lado, determinar el factor multiplicador (m) a aplicar en los espectros del proceso para que se incluya la variabilidad del proceso al modelo de calibración. La herramienta utilizada para la elección del conjunto de muestras para el conjunto de calibración fue

RESUMEN

el análisis de componentes principales (PCA). El estudio se ha concretado como la construcción de modelos para la determinación de ingrediente farmacéutico activo (API) y excipientes en comprimidos de Irbesatan 300 mg y se corroboró al aplicarlo a comprimidos de paracetamol 1g. Este trabajo permite la sistematización de esta técnica para elaborar modelos de calibración robustos y sencillos para la cuantificación de los ingredientes en cada etapa del proceso productivo de fármacos.

La memoria de esta tesis proporciona un conjunto de pautas metodológicas basadas en la espectroscopia NIR para realizar el control de parámetros críticos en la producción de comprimidos farmacéuticos en cada una de sus etapas de fabricación.

ABSTRACT

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY FOR THE DETERMINATION OF CRITICAL PARAMETERS IN THE FABRICATION OF PHARMACEUTICAL TABLETS IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY

To successfully grow, improve productivity and meet the specifications of regulatory agencies, the pharmaceutical industry needs to maximize the efficiency of all its processes and improve the quality of its products. To this end, the industry demands techniques to quickly increase the efficiency, reduce costs and gain access to relevant information, updated in real time. For this reason, techniques for enabling faster results are sought, but without losing quality in the process or the product.

NIR spectroscopy has a number of advantages over other instrumental techniques, which make it a suitable tool, due to economic factors (speed, since there is no sample treatment and outcome is rapid; absence of consumption reagents, minimal staff training and low maintenance costs) and safety (no waste is generated and the results are reliable). The development of new analytical methods based on NIR spectroscopy, capable of being used for process control and establishment of the final product quality is the main objective of this thesis. Under this premise, the following works have been developed, based on the determination of the physical and chemical parameters relevant at different stages of the fabrication process and the final product:

1. In order to ensure the uniformity of the pharmaceutical forms dosage, it is necessary to ensure the correct homogenization of the mixtures. This work has carried out a critical study of various qualitative and quantitative methods applicable in monitoring the pharmaceutical blending process and end point detection by near-infrared spectroscopy (NIRS). The study shows a significant development for the pharmaceutical industry, as it helps defining which is the best method to use for determining the end point for blending, not all methods having the same sensitivity and easiness of implementation.
2. In order to perform the monitoring and end point determination mixing, I compared three methods for the treatment of the spectral data using NIR and

ABSTRACT

Raman spectroscopy: For Raman, peak intensity variation was applied ; this method was used as it is a simple method that requires almost no data processing, on the other hand the Difference between Moving Block Average and Target Spectrum (DMBA-TS) and Score Distance Principal Component Analysis (PC-SDA) were used to compare the quality of their results when applied to real-time recorded spectra of mixtures obtained both for Raman and NIR. These two were selected by chemometric methods, not requiring a reference method. These three methods are capable of being implemented in real time, which can be useful in the pharmaceutical industry for controlling the homogeneity.

3. In the following work, the determination of critical physical and chemical parameters in the stages of the paracetamol 1g tablets production was studied. In the granulation, the control of the average particle distribution and size was performed, which are important parameters for ensuring proper fluidity of the granules and homogeneous filling of the matrices of a compacting machine; moreover, the determination of the active ingredient was performed, in order to guarantee that no losses were registered during the process and that the correct dose reached the next step. In the compaction, the compaction pressure was determined, this being an important parameter in this stage because the tablets should be compacted to an appropriate pressure so as to be sufficiently hard not to smash and/or break during their handling, but at the same time, sufficiently soft to facilitate disintegration in the body. To ensure compliance with the concentration specifications of the active principle, its concentration in the final tablets was established. The method was validated according to ICH guidelines and EMA, which allow its application as a quality method for the analytical control of a production process. The calibration models for the determination of the parameters described above were

ABSTRACT

elaborated using different strategies in order to obtain simple and adequate calibration models. The correct prediction of external samples reveals the applicability of these models in routine.

4. In this study, the optimization and application of a new methodology is performed, for developing calibration models that incorporate the physical variability produced during the manufacturing process of each formulation. The method used is the spectrum process, which consists in adding a set of S_p process spectra (spectra obtained by calculating the difference between spectra of production tablets and spectra of laboratory samples with the same nominal concentration) in addition to laboratory samples for calibration and prediction, as a way to incorporate the physical changes produced during each step of the tablet production process. In order to choose the best calibration model, two objectives of this study were defined: establishing the influence of spectral pretreatments for building the calibration model on one hand and on the other hand, determining the multiplication factor (m) to apply in the process spectra in order to include the process variability in the calibration model. The tool used for choosing the set of samples for the calibration set was the principal component analysis (PCA). The study has resulted in the construction of models for the determination of the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients in Irbesatan 300 mg tablets and it was corroborated by applying it to paracetamol 1 g tablets. This work allows the systematization of this technique for the elaboration of robust and simple calibration models for the quantification of ingredients in each stage of the pharmaceutical production process.

ABSTRACT

The memory of this thesis provides a set of methodological guidelines based on NIR spectroscopy for monitoring the control of critical parameters in the production of pharmaceutical tablets in each manufacturing stage.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Nuevos retos para asegurar la calidad en la industria farmacéutica

1.1. Introducción

La industria farmacéutica debe demostrar y garantizar que sus medicamentos son seguros, eficaces y de calidad. Para lograr este fin se valen del control de calidad como instrumento para el seguimiento y la garantía de la calidad.

La producción de fármacos es por lo general una actividad de varias etapas. El aseguramiento de la calidad del mismo es la consecuencia de una sistemática atención a todos aquellos factores críticos que pueden influir en su calidad, para ello es necesario un alto número de evaluaciones de diferentes parámetros de interés (físicos o químicos) a lo largo de un proceso de producción (materias primas de los productos intermedios y también de los productos acabados).

Actualmente las pruebas se basan en el análisis fuera de línea de una pequeña muestra del producto escogida al azar en cada etapa del proceso productivo. Este enfoque a menudo toma mucho tiempo y aumenta considerablemente el tiempo del ciclo de fabricación, ya que requiere que el proceso sea detenido durante la extracción de muestras. Este control exige la aplicación de un elevado número de metodologías analíticas que requieren protocolos de análisis que llevan tiempo. Además, no asegura cero defectos en la calidad del producto. En vista de esta situación no deseable para la industria y la salud pública, se ha reconocido que son necesarios nuevos paradigmas en las pruebas analíticas para tener éxito para asegurar un aumento de la eficiencia de la fabricación y la seguridad del producto.

La Tecnología Analítica de Procesos (PAT) es una iniciativa impulsada por la *US Food and Drug Administration* (FDA) y las principales empresas farmacéuticas. Es un nuevo enfoque

INTRODUCCIÓN

de trabajo que consiste en la sustitución del control del producto final por la vigilancia durante todo el proceso de producción de los parámetros de control con el fin de identificar cualquier debilidad y garantizar la calidad en el producto. Uno de los principales objetivos de esta iniciativa es mejorar la calidad de los productos finales y aumentar la eficiencia de los procesos de producción para conseguir de esta manera construir la calidad en todo el proceso.

De acuerdo con una reciente publicación de la FDA *Guías para la industria* [1,2], PAT se define como sistemas de monitoreo en tiempo real, control de parámetros críticos del proceso y cualidades técnicas del material de esta manera se trata de mejorar la comprensión de los procesos, el tiempo de ciclo de fabricación y la calidad del producto final, permitiéndonos actuar sobre el mismo en el caso de que sea necesario. El objetivo de PAT es un conocimiento científico más profundo de los procesos de fabricación, es decir, el proceso de la próxima fabricación no debe ser un sistema de caja negra.

Una de las declaraciones más importantes dentro del concepto PAT es que "la calidad no debe ser comprobada en el producto, sino que debe ser construida en proceso de fabricación"[1]. PAT, por tanto, desempeñan un papel crucial en el diseño, análisis y control de los procesos de fabricación en la base de mediciones *in-line*, *on-line* y *at-line*, es decir, durante el proceso [1-3]. Por lo tanto, se busca obtener información en tiempo real de todos los puntos críticos del proceso para guiar los procesos a través de un control de los pasos anteriores y así asegurar que el siguiente paso se dirija hacia su estado deseado y de esta manera garantizar la calidad del producto final y posiblemente, permitiendo la liberación en tiempo real. Esto debe permitir que los ajustes anteriores en tiempo real mantengan las especificaciones del producto dentro de los límites previstos, evitando así la pérdida de lotes.

La espectroscopia puede ser una de las principales herramientas PAT, ya que es una técnica analítica que nos permite obtener resultados de una manera rápida, fácil, no destructiva, robusta y aplicable en distintos tipos de muestras (gases, sólidos o líquidos)

durante el proceso o fuera, lo cual permite su utilización tanto en el laboratorio como en la monitorización de las diferentes etapas de un proceso.

A día de hoy, la espectroscopia NIR se utiliza de manera generalizada para proporcionar una gran cantidad de información química y física, importante para medir el desempeño del proceso y abrir oportunidades para avanzar del concepto de control de calidad tradicional a cualificación de proceso y de pruebas de conformidad de productos [4-9]. A pesar de una serie de retos que se deben superar para sacar el pleno potencial de la espectroscopia NIR como herramientas PAT, se puede esperar que en el futuro ideas como liberación en tiempo real puedan ser bien atendidas a través del uso de técnicas NIR.

1.2. Comprimidos

En la Farmacopea Europea [10] se definen los comprimidos como “preparados sólidos que contienen una dosis única de uno o más principios activos y que se obtiene por compresión de volúmenes uniformes de partículas”. La forma de dosificación en comprimidos es una de las más usadas a nivel mundial para la administración de sustancias medicamentosas en el tratamiento de diversas enfermedades. De tal manera, la fabricación de comprimidos corresponde como mínimo a un 60 % del total de las distintas formas de dosificación que se utilizan como medicamentos y se prevé que en un futuro ha de continuar siendo la preferida por los pacientes y, sin duda, por la industria farmacéutica; al ser una forma “fácil” de industrializar y de gran rendimiento [11].

Los comprimidos contienen uno o más principios activos y diversos excipientes, llamados en ocasiones coadyuvantes, y se obtienen por compresión de la mezcla resultante entre ellos. La forma, el tamaño y el peso de los comprimidos pueden variar sensiblemente de unos a otros. Por lo general, el tamaño se sitúa entre 5 y 17 mm; el peso, entre 0.1 y 1.5 g, y la forma puede ser redonda, oblonga, biconvexa, ovoide, etc. [12].

El rendimiento de un proceso de producción de comprimidos puede verse afectado por la gran cantidad de muestras que se tienen que analizar para asegurar la calidad del producto final, ya que estos análisis suelen ser lentos y costosos. Un análisis demasiado largo

INTRODUCCIÓN

repercute sobre la productividad de la empresa, aumentando el coste del producto y disminuyendo el margen de beneficios. Para subsanar estos inconvenientes y obtener un buen conocimiento del proceso productivo de comprimidos en cada etapa, se propone la aplicación de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) como una alternativa a los métodos tradicionales de análisis (UV-Vis, HPLC...). La producción de comprimidos lleva varias etapas, entre las cuales podemos destacar la mezcla de las materias primas, granulación, compresión y recubrimiento (Figura 1.1). A continuación se describirá cada una de ellas, parámetros importantes a controlar así como la aplicación de la espectroscopia NIR para garantizar la calidad durante el proceso productivo y de esta manera tener un producto farmacéutico de calidad, seguro y eficaz.

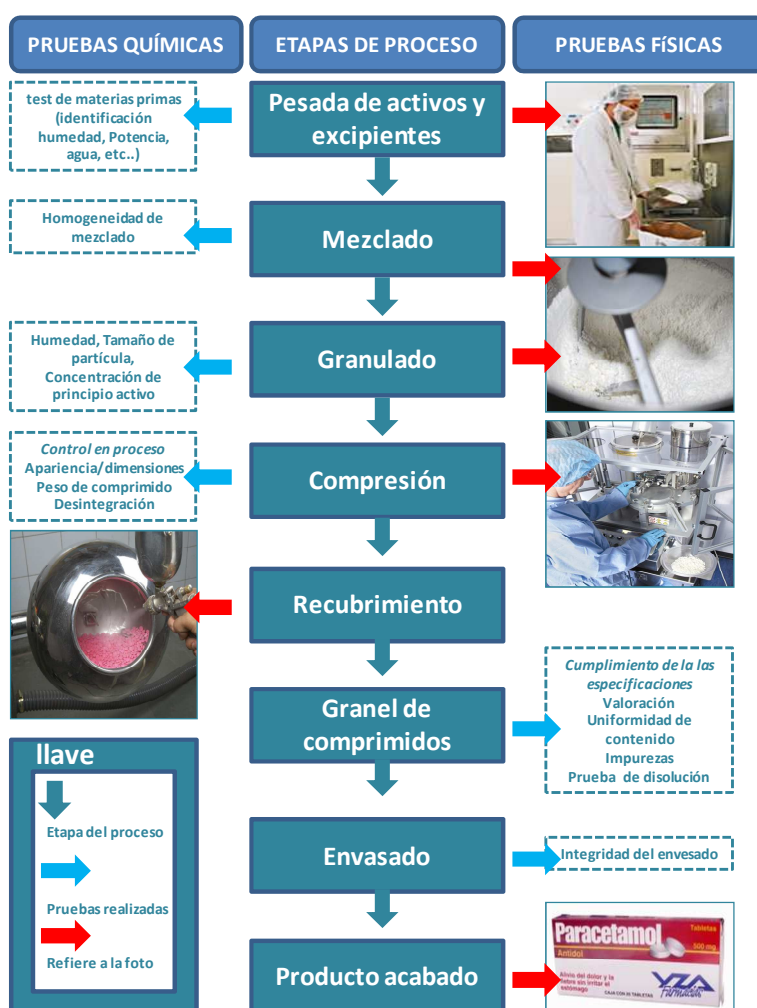


Figura 1.1 Diagrama de flujo para el proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos.

1.2.1. Mezcla

La mezcla es un proceso fundamental y crítico en el proceso de fabricación de sólidos. El objetivo de cualquier procedimiento de mezclado es lograr una “mezcla ideal”, es decir, una situación en la que los componentes de una mezcla tengan una distribución homogénea. En la práctica, en muchos casos esto no se puede conseguir, en particular cuando se trata de mezclas de polvos, ya que la naturaleza de una mezcla “óptima” en polvo puede ser bastante variable, en función de las características del material y el tipo de mezclador [13].

La mezcla es un proceso complejo y afectado por diferentes variables. Por ejemplo, las características de los sólidos y del recipiente donde se realizará la mezcla y las condiciones de funcionamiento del mezclador son factores importantes en el proceso de mezclado [13,14]. Para asegurar la uniformidad de la dosificación de las formas farmacéuticas, es necesario asegurar la correcta homogeneización de las mezclas; normalmente mediante la toma de muestras en diferentes etapas del proceso de mezclado. La toma de muestras ya constituye en sí misma una dificultad en estudios de homogeneidad de mezcla debido a que afecta a la mezcla e introduce errores en el proceso, debidos principalmente a la segregación, posibilidad de contaminación, etc.

El contenido del ingrediente activo farmacéutico (API) de estas muestras se determina generalmente mediante métodos cromatográficos o espectroscópicos de una disolución de la mezcla, pero estos métodos son lentos en la obtención de los resultados lo que retrasa la toma de decisiones. De hecho, en muchas ocasiones el mayor consumo de tiempo del proceso de mezcla no es la operación de mezcla en sí, sino el tiempo invertido en los análisis realizados para confirmar la homogeneidad de la mezcla (punto final del proceso de mezcla). Dada la importancia de que cada unidad posológica contenga la cantidad o concentración correctas de los componentes activos y con el fin de determinar el tiempo de mezcla adecuado, es necesario comprobar el proceso. La manera tradicional de hacer esto es extrayendo y analizando muestras representativas a distintos intervalos de

INTRODUCCIÓN

mezclado. Esta comprobación puede indicar también si se produce segregación en el mezclador o si la prolongación del tiempo de mezclado causa problemas.

Desde el punto de vista de la farmacia tradicional, la homogeneidad de mezcla sólo aborda la distribución, es decir, la uniformidad de contenido de API, mientras que se supone que los excipientes también se distribuyen de la misma manera. Sabiendo que el papel de los excipientes es no sólo mejorar el cumplimiento de la forma de dosificación, sino que también afectan a la capacidad tecnológica y biofarmacéutica del desempeño de la formulación, es simplemente descuidado hacer únicamente un análisis de la uniformidad de API. Teniendo en cuenta estas desventajas de los procedimientos tradicionales de control de la mezcla, el potencial valor de un procedimiento no invasivo NIR es evidente.

El monitoreo NIR de la mezcla de polvo se puede realizar con sondas de fibra óptica en modo reflectancia, de esta manera se minimiza el tiempo de ensayo y error de muestreo. Por otra parte, ya que la mayoría de los ingredientes activos y excipientes farmacéuticos absorben la radiación NIR, las mediciones de NIR pueden proporcionar información de homogeneidad en cuanto a todos los componentes de la mezcla. La posibilidad de utilizar múltiples sensores NIR para registrar espectros en reflectancia difusa resultante de la absorción y la dispersión, proporciona una “huella digital multivariable” tanto de las propiedades químicas y físicas de la muestra.

Se ha informado por varios autores el uso de la espectroscopia NIR en la mezcla de polvo para la determinación de uniformidad utilizando análisis fuera de línea de las muestras procedentes de diferentes lugares en diferentes mezcladoras y tiempos de mezcla [15,16], y *on-line* o *in-line* control de polvo de la mezcla [17-22]. Para el control *on-line* y *in-line*, se han utilizado dos enfoques diferentes para adquisición de datos espectrales, es decir, la primera una manera “*stop-start*”, donde la mezcladora se mantiene estacionaria durante las mediciones NIR, y la segunda una manera “dinámica” con las muestras en movimiento. Se han desarrollado varias estrategias de procesamiento de datos para la evaluación de la homogeneidad de mezcla y/o tiempo óptimo de mezclado. La mayoría de estos trabajos

estaban orientados a las evaluaciones cualitativas, tales como la disimilitud entre los espectros de una mezcla y el espectro de una mezcla ideal [23,20] o la desviación estándar de un bloque móvil de espectros NIR [23,17,19].

Estos métodos generalmente revelaron resultados aceptables, aunque Wargo y Drennen [16] sugiere que la técnica de *bootstrap* presentan una mayor sensibilidad para la evaluación de la homogeneidad del mezclado que los cálculos del chi-cuadrado. Algunos trabajos recientes [24,16] también están interesados en el análisis cuantitativo, señalando que el análisis cuantitativo es un requisito para una completa resolución de las propiedades químicas y físicas de la mezcla.

En resumen, se puede concluir que la monitorización *on-line* e *in-line* del proceso de mezclado con la espectroscopia NIR no es una tarea fácil, pero posible y necesaria de acuerdo con el paradigma PAT de la liberación en tiempo real, centrándose en comprensión de los procesos continuos y control de calidad de todas las etapas de producción, en lugar de un único control del producto final.

1.2.2. Granulación

La granulación consiste en la aglomeración de los componentes pulverulentos mediante presión o adición de una sustancia aglutinante (que engancha o une partículas) dispersas en un líquido. Se trata pues, de una operación básica farmacéutica que tiene por misión la unión de partículas entre sí, disminuyendo ostensiblemente la superficie específica inicial y dando lugar a un producto granulado.

El producto granulado puede ser una forma farmacéutica por sí misma (granulado) o bien un producto intermedio para la obtención de otra forma farmacéutica o de dosificación, como pueden ser los comprimidos o las cápsulas duras de gelatina. Ello se debe a que el granulado presenta unas buenas características reológicas que hacen que se deslice bien y llene homogéneamente envases, cápsulas o matrices de una máquina de comprimir;

además, un granulado es fácilmente comprimible y puede proporcionar gran dureza al comprimido [25].

Las características que afectan a la fluidez de un polvo o granulado son: el tamaño medio de partícula, la distribución del tamaño de partícula, la forma de las partículas, la rugosidad de la superficie y el contenido de humedad. En general, las partículas finas con una relación muy alta entre superficie y masa son más cohesivas que las partículas más gruesas. Las partículas mayores de 250 μm suelen fluir con relativa libertad, pero cuando el tamaño se encuentra por debajo de 10 μm los polvos se vuelven cohesivos y es probable que surjan problemas de fluidez [26], por todos estos motivos la industria farmacéutica realiza una granulación de las mezclas pulverulentas. Para asegurar la fluidez de la muestra, se acostumbra utilizar granulados que posean una distribución de tamaños estrecha, es decir, que el tamaño tenga una reducida variabilidad con respecto al tamaño promedio [27,28].

La espectroscopia NIR en las etapas de granulación se han aplicado principalmente para el control en línea de contenido de agua, distribución de tamaño de partículas, determinación de API y del punto final de los procesos de granulación [29-42].

1.2.3. Compresión

La compresión es un fenómeno de contacto que se consigue aproximando fuertemente las partículas y tiene por objeto dar forma estable a las sustancias pulverulentas o previamente granuladas.

Un comprimido requiere determinada dureza (fuerza de rompimiento diametral) para soportar el choque mecánico por la manipulación durante su fabricación, empaquetado, distribución y uso [43]. La compresión produce una enorme disminución de la superficie eficaz del fármaco que puede afectar a la velocidad de disolución del API. La velocidad de desintegración de un comprimido depende de varios factores interrelacionados, entre los que se pueden citar: la naturaleza del fármaco, concentración, disolvente, fijador,

INTRODUCCIÓN

disgregante, lubricante, humectante y presión de compactación [2]. La dureza del comprimido se ve afectada por la superficie, la fuerza de cohesión, la distribución del tamaño de las partículas y el contenido de agua entre otros factores [44].

La compresión del producto granulado se realiza mediante la acción de dos punzones o troqueles a través de los cuales se aplica la fuerza compresiva al material que se encuentra en la matriz. El llenado de la matriz se realiza, normalmente, por un flujo gravitacional del granulado desde la tolva hasta la matriz. La matriz está cerrada en su extremo inferior por el punzón inferior. El punzón superior desciende y entra en la matriz y el granulado se comprime hasta formar el comprimido. Posteriormente, el comprimido es expulsado de la matriz.

Los comprimidos deben compactarse a una presión adecuada de manera que sean suficientemente duros para que en su manipulación no se desmenucen y/o fracturen, pero a su vez sean suficientemente blandos para facilitar su disgregación en el organismo. La determinación de la presión de compactación constituye información esencial en el control de calidad en la industria farmacéutica, por su influencia en la biodisponibilidad del API.

La espectroscopia NIR ha sido ampliamente utilizada para analizar comprimidos farmacéuticos (cuantificación de API, identificación de estado sólido, transformaciones inducidas por el proceso) de forma rápida, directa y no destructiva como se ha descrito por Räsänen y Sandler (2007) y Rantanen (2007) [45,46]. Por tal razón, hay un deseo de utilizar la espectroscopia NIR en línea para evaluar los comprimidos. La velocidad de análisis de espectroscopia NIR hace posible aumentar en gran medida el número de comprimidos analizados de una manera no destructiva antes de su lanzamiento al mercado en comparación con la situación actual donde los métodos tradicionales, métodos fuera de línea (por ejemplo, HPLC y UV-Vis) donde los tiempos de análisis son largos y es necesario la toma de muestras. Sin embargo, las publicaciones que describen el uso en línea de la espectroscopia NIR y la interconexión de herramientas para el análisis de los

comprimidos son escasas y de ahí la importancia de hacer más investigaciones en esta área.

M. Blanco y M. Alcalá (2006) y Tabasi *et al.* (2008a) [43,47] describen la aplicación de la espectroscopia NIR para controlar comprimidos el proceso de fabricación. La espectroscopia NIR en combinación con modelo multivariado se utilizó como una técnica rápida y no destructiva para la predicción de la uniformidad de contenido, la fuerza de compresión y la resistencia al aplastamiento de los comprimidos de orbifloxacino. Cogdill *et al.* (2004) [5] presentaron el desarrollo y validación de un método NIR basado en PAT para la predicción en línea de la dureza de la tableta y contenido de API.

1.2.4. Recubrimiento

El recubrimiento es un proceso comúnmente empleado en la industria farmacéutica para enmascarar el sabor, color u olor desagradables; aumentar la estabilidad mecánica durante la fabricación, empaquetado y almacenado; proporcionar protección física y química contra degradaciones por la luz, aire y humedad; evitar incompatibilidades; facilitar la administración y proteger el fármaco contra la acción de los jugos digestivos o asegurar liberación controlada del fármaco.

Independientemente del uso previsto, la funcionalidad del recubrimiento está relacionada con su espesor y la uniformidad en todo el núcleo. En la mayoría de casos, el punto final de un proceso de recubrimiento se determina tomando muestras durante el proceso, pesándolas y luego, a partir del peso inicial, determina la cantidad teórica de la adhesión del azúcar o polímero al núcleo del comprimido. El espesor correcto de la capa recubrimiento y la uniformidad se evalúan indirectamente por la desintegración y/o la prueba de disolución. En el concepto de PAT, este procedimiento de análisis presenta dos inconvenientes principales: el primero, la determinación del aumento de la masa no tiene en cuenta las pérdidas de material del núcleo, por lo tanto, la exactitud del método es

INTRODUCCIÓN

reducida; y el segundo, la desintegración y/o las pruebas de disolución son métodos indirectos y muy laboriosos.

Las técnicas NIR, por el contrario, permiten un monitoreo rápido, no invasivo en línea de los procesos de recubrimiento. Kirsch y Drennen [48] y Wargo y Drennen [49] fueron los primeros en describir el uso de NIR para la vigilancia *at-line* del recubrimiento en el procesos fabricación de comprimidos y *pellets*. Las muestras fueron recogidas en diferentes intervalos de tiempo y registradas en un espectrómetro NIR en modo reflectancia. Trabajos posteriores sobre este tema fueron publicadas por Andersson *et al.* [50,51], quienes describieron en la industria un enfoque *in-line* para el control de *pellets* con sondas de fibra óptica. Los modelos de calibración para la determinación del espesor de la capa de la película se basaron en datos de referencia obtenidos a partir de análisis de imágenes NIR [52]. A pesar de estas interesantes investigaciones en las distintas etapas productivas de un comprimidos que refleja claramente el gran valor de las técnicas de las NIR para *at-line*, *on-line* o *in-line* en el seguimiento de un proceso de fabricación, el potencial de la espectroscopia NIR con métodos multivariantes no ha sido plenamente explotado en este campo.

REFERENCIAS

1. EUFEPS QbD and PAT Sciences Network, 2010 EUFEPS QbD and PAT Sciences Network 2010. <http://www.eufeps.org/PATnetwork.html>.
2. G. Alderborn, Comprimidos y compactación. En Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. (2004) 2ª edición. Ed. M.E. Aulton. Elsevier.
3. American Food Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. FDA (2004).
4. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and D. Serrano, Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets. *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.
5. R.P. Cogdill, C.A. Anderson, J.K. Drennen, Using NIR spectroscopy as an integrated PAT tool, *Spectroscopy* 19 (12) (2004) 104-109.
6. J. Parris, C. Airiau, R. Escott, J. Rydzak, R. Crocombe, Monitoring API drying operations with NIR. *Spectroscopy* 20 (2) (2005) 34-42.
7. B. Swarbrick, B. Grouta, J. Noss, The rapid, at-line determination of starch content in sucrose-starch blends using near-infrared reflectance spectroscopy; a process analytical technology initiative. *J. Near Infrared Spectrosc.* 13 (2005) 1-8.
8. Y. Roggo, C. Roeseler, M. Ulmschneider, Near infrared spectroscopy for qualitative comparison of pharmaceutical batches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (4) (2004) 777-786.
9. Y. Dou, Y. Sun, Y.Q. Ren, P. Ju, Y.L. Ren, Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (4) (2005) 543-549.
10. R. Salazar, I. Lenin, S. Forner, Compresión. En Tecnología farmacéutica industrial fabricación y control de medicamentos sólidos de administración por vía oral, Tomo II. (2003) 1ª edición. Ed. R. Salazar Macian. Romargraf S.A.

11. A. R. Gennaro. Remington The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20ª edición. Ed. Médica Panamericana.
12. European Pharmacopoeia 5.0. En Dosage Forms. (2005) Volumen 1, 01/2005:0478. 5ª edición.
13. H.J. Venables, J.I. Wells, Powder mixing, Drug Dev. Ind.Pharm. 27 (2001) 599-612.
14. E.W. Ciurczak, Pharmaceutical mixing studies using near infrared spectroscopy, Pharm. Technol. 15 (1991) 140-145.
15. F.C. Sanchez, J. Toft, B. van den Bogaert, D.L. Massart, S.S. Dive, P. Hailey, Monitoring powder blending by NIR spectroscopy, Fresenius J. Anal. Chem. 352 (1995) 771-778.
16. D.J. Wargo, J.K. Drennen, Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 1415-1423.
17. S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Haily, P.K. Aldridge, On-line monitoring of powder homogeneity by near-infrared spectroscopy, Anal. Chem. 68 (1996) 509-513.
18. P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, P.K. Aldridge, Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 551-559.
19. S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, P.A. Hailey, Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy: Part II. Qualitative approaches to blend evaluation, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 1285-1309.
20. R. De Maesschalck, F. Cuesta Sanchez, D.L. Massart, P. Doherty, P. Hailey, On-line monitoring of powder blending with near-infrared spectroscopy, Appl. Spectrosc. 52 (1998) 731-752.
21. C. Ufret, K. Morris, Modeling of powder blending using online near-infrared measurements, Drug Dev. Ind. Pharm. 27 (2001) 719-729.

22. N.-H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, S. Reynolds, A homogeneity study using NIR spectroscopy: tracking magnesium stearate in Bohle binblender, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29 (2003) 679- 687.
23. F.C. Sanchez, J. Toft, B. van den Bogaert, D.L. Massart, S.S. Dive, P. Hailey, Monitoring powder blending by NIR spectroscopy, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 771- 778.
24. O. Berntsson, Characterization and application of near infrared reflection spectroscopy for quantitative process analysis of powder mixtures. Doctoral Thesis, Stockholm (2001).
25. J. Suñe Negre. Granulación. En *Tecnología farmacéutica industrial fabricación y control de medicamentos sólidos de administración por vía oral* ,Tomo II. (2003) 1ª edición. Ed. R. Salazar Macian. Romargraf S.A.
26. L.X. Liua, I. Marziano, A.C. Bentham, J.D. Litster, E.T.White, T. Howes, Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders. *Int. J. Pharm* 362 (2008) 109-117.
27. T. Närvänen, T. Lipsanen, O. Antikainen ,H. Räikkönen, J. Yliruusi, Controlling granule size by granulation liquid feed pulsing. *Int J. Pharm* 357 (2008) 132-138.
28. J. Rantanen, E. Rasanen , J. Tenhunen, M. Kansakosk, Jukka-Pekka Mannermaa,, J. Yliruusi, In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near-infrared sensor: an evaluation of particle size and binder effects. *European J. Pharm and Bio Pharm* 50 (2000) 271-276.
29. K. List, K.J. Steffens, Supervising and controlling of granulation processes by near-infrared spectroscopy. *Pharm. Ind.* 58 (1996) 347-353.
30. J. Rantanen, E. Räsänen, O. Antikainen, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near-infrared sensor: an evaluation of process-related variables and a development of non-linear calibration model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001a) 51-58.
31. J. Rantanen, E. Räsänen, J. Tenhunen, M. Kansakoski, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near infrared

- sensor: an evaluation of particle size and binder effects. *Eur. J.Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 271-276.
32. S. Watano, H. Takashima, Y. Sato, T. Yasutomo, K. Miyanami, Measurement of moisture content by IR sensor in fluidized bed granulation. Effect of operating variables on the relationship between granule moisture content and absorbance IR spectra. *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 1267-1269.
33. P. Frake, D. Greenhalgh, S.M. Grierson, J.M. Hempenstall, D.R. Rudd, Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 75-80.
34. W.P. Findlay, G.R. Peck, K.R. Morris, Determination of fluidized bed granulation end point using near-infrared spectroscopy and phenomenological analysis. *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 604-612.
35. P. Luukkonen, M. Fransson, I.N. Bjorn, J. Hautala, B. Lagerholm, S. Folestad, Real-time assessment of granule and tablet properties using in-line data from a high-shear granulation process. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 950-959.
36. M. Alcalá, M. Blanco, M. Bautista, J.M. González, On-line monitoring of a granulation process by NIR spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 336-345.
37. W. Li, G.D. Worosila, W. Wang, T. Mascaro, Determination of polymorph conversion of an active pharmaceutical ingredient in wet granulation using NIR calibration models generated from the premix blends. *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 2800-2806.
38. J. Rantanen, S.J. Laine, O.K. Antikainen, J.P. Mannermaa, O.E. Simula, J.K. Yliruusi, Visualization of fluid-bed granulation with self-organising maps. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001b) 343-352.
39. J. Rantanen, A. Jorgensen, E. Räsänen, P. Luukkonen, S. Airaksinen, J. Raiman, K. Hänninen, O. Antikainen, J. Yliruusi, Process analysis of fluidized bed granulation. *AAPS PharmSciTech* 2(4) (2001) 13-20.

INTRODUCCIÓN

40. J. Rantanen, H. Wikström, R. Turner, L.S. Taylor, Use of in-line near-infrared spectroscopy in combination with chemometrics for improved understanding of pharmaceutical processes. *Anal. Chem.* 77, (2005b) 556-563.
41. A.C. Jorgensen, J. Rantanen, P. Luukkonen, S. Laine, J. Yliruusi, Visualization of a pharmaceutical unit operation: wet granulation. *Anal. Chem.* 76 (2004a) 5331-5338.
42. A.C. Jorgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schaefer, A.M. Juppo, J. Yliruusi, Comparison of torque measurements and near-infrared spectroscopy in characterization of a wet granulation process. *J. Pharm. Sci.* 93 (2004b) 2232-2243.
43. M. Blanco, M. Alcalá, Content Uniformity and Tablet Hardness testing of intact Pharmaceutical tablets by Near Infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.
44. H. Tanabe, K. Otsuka, M. Otsuka, Theoretical Analysis of Tablet Hardness Prediction Using Chemoinformetric Near-Infrared Spectroscopy *analytical sciences*, The Japan Society for Analytical Chemistry 23 (2007) 857-862.
45. E. Räsänen, N. Sandler, Near infrared spectroscopy in the development of solid dosage forms. *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 147-159
46. N. Sandler, J. Rantanen, J. Heinamaki, M. Römer, M. Marvola, J. Yliruusi, Pellet manufacturing by extrusion-spheronization using process analytical technology. *AAPS PharmSciTech* 6 (2) (2005) E174-E183.
47. S.H. Tabasi, R. Fahmy, D. Bensley, C. O'Brien, S.W. Hoag, Quality by design, part I: application of NIR spectroscopy to monitor tablet manufacturing process. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008a) 4040-4051.
48. J.D. Kirsch, J.K. Drennen, Near-infrared spectroscopic monitoring of the film coating process, *Pharm. Res.* 13 (1996) 234- 237.
49. D.J. Wargo, J.K. Drennen, AAPS Annual Meeting, Seattle, WA, 1996 (paper # PT6116).

INTRODUCCIÓN

50. M. Andersson, M. Josefson, F. Langkilde, K.-G. Wahlund, Monitoring of a film coating process for tablets using near infrared reflectance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 27-37.
51. M. Andersson, S. Folestad, J. Gottfries, M.O. Johansson, M. Josefson, K.-G. Wahlund, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2099-2108.
52. M. Andersson, B. Holmquist, J. Lindquist, O. Nilsson, K.-G. Wahlund, Analysis of film coating thickness and surface area of pharmaceutical pellets using fluorescence microscopy and image analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 325-339.

2. Espectroscopia NIR

2.1. Introducción

La espectroscopia de infrarrojo cercano es una técnica analítica instrumental rápida, fácil de utilizar, no destructivo, fiable y versátil, capaz de analizar múltiples constituyentes de prácticamente cualquier matriz. Cubre las longitudes de onda cercana al infrarrojo medio y se extiende hasta la región del visible.

El descubrimiento de la radiación invisible se debe a Sir William Herschel [1] (1800), cuando observó que el efecto de calentamiento relativo generado por las diferentes porciones del espectro de la luz solar al atravesar un prisma, continuaba aumentando cuando colocaba el termómetro más allá del rojo del espectro visible. Sin embargo, la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético fue muy poco utilizada hasta el año 1950. La principal razón de ello era su complejidad en comparación con las regiones del infrarrojo medio (MIR) y lejano (FIR). Estas regiones, MIR y FIR, proporcionan gran cantidad de información útil a través de la utilización de métodos univariantes de tratamiento de datos debido a que los picos espectroscópicos están resueltos y se pueden interpretar directamente. El espectro NIR, por el contrario, es el resultado de sobretonos y bandas de combinación generadas por los diferentes grupos funcionales como son C-H, N-H y O-H.

La radiación del infrarrojo cercano penetra en la muestra lo cual es de extrema importancia en el caso de la medición de muestras heterogéneas. Actualmente, la espectroscopia NIR se utiliza de manera generalizada para la determinación de multitud de parámetros de calidad tanto químicos como físicos en un gran número de materiales. Esta potencia analítica se ha demostrado claramente en numerosas aplicaciones, tanto cualitativas como cuantitativas [2-7]. Su gran versatilidad hace que se utilice, tanto a nivel de laboratorio como a nivel Industrial, como técnica de análisis en línea (*on-line*) y para la monitorización de procesos.

En los últimos años, la espectroscopia NIR ha ganado amplia aceptación dentro de la industria farmacéutica, utilizándose para identificación de materias primas, control de calidad de productos y en la vigilancia del proceso productivo. El creciente interés de la industria farmacéutica en la espectroscopia NIR es probablemente el resultado directo de sus grandes ventajas sobre otras técnicas analíticas, es decir, preparación sencilla de muestra, sin ningún tipo de tratamiento previo, la posibilidad de separar la posición de medición de la muestra y el espectrómetro, gracias al uso de sondas de fibra óptica y la predicción de parámetros químicos y físicos a través de un solo espectro.

2.2. Fundamentos de la radiación NIR

La región NIR del espectro electromagnético comprende las longitudes de onda desde 780 a 2500 nm ($12800-4000\text{ cm}^{-1}$). Las absorciones en esta región están causadas por tres mecanismos diferentes (**Figura 2.1**):

- Sobretonos de las vibraciones fundamentales que ocurren en la región del infrarrojo ($4000-300\text{ cm}^{-1}$).
- Bandas de combinación de las vibraciones fundamentales que aparecen en la región del infrarrojo.
- Absorciones electrónicas.

INTRODUCCIÓN

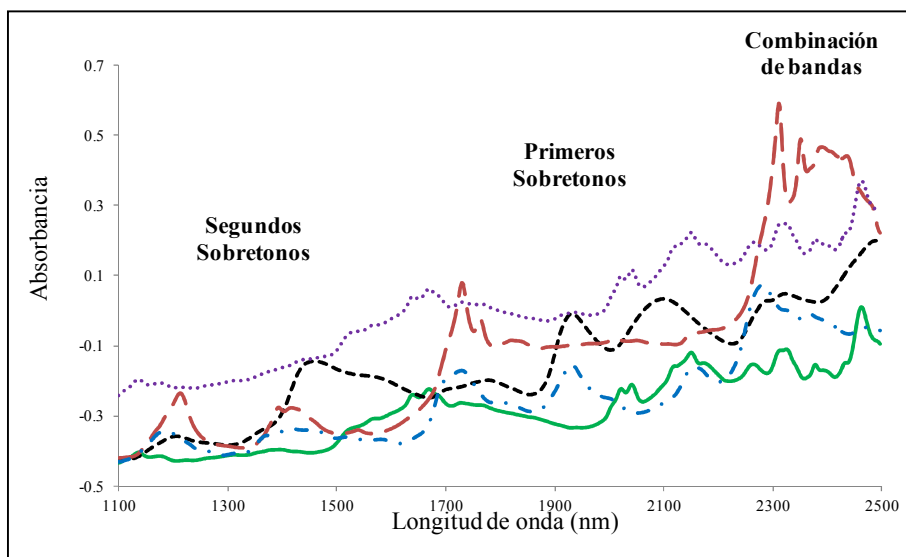


Figura 2.1 Ejemplo de espectro NIR.

Veamos los distintos mecanismos detenidamente:

- **Los sobretonos.** Se producen gracias a que el comportamiento de las moléculas se acerca a un modelo del oscilador anarmónico en el que los niveles de energía no están homogéneamente espaciados. Por tanto, la diferencia de energía decrece al aumentar v :

$$\Delta E_{\text{vib}} = hv [1 - (2v + \Delta v + 1)y] \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Donde v es la frecuencia fundamental de la vibración del enlace que genera una banda de absorción en la región del infrarrojo, h es la constante de Planck y y es el factor de anarmonicidad. La anarmonicidad puede dar lugar a transiciones entre estados de energía vibracional donde $\Delta v = \pm 2, \pm 3 \dots$. Estas transiciones entre estados vibracionales no continuos dan lugar a las bandas de absorción denominadas sobretonos (primer y segundo sobretono, respectivamente).

- **Bandas de combinación.** Se producen en moléculas poliatómicas en donde dos o más modos vibracionales pueden interactuar de tal manera que causen cambios de energía simultáneos y generar bandas de absorción llamadas bandas de combinación. Las frecuencias de estas bandas son la suma de múltiplos de cada

INTRODUCCIÓN

una de las frecuencias de interacción. Las bandas de combinación en el espectro infrarrojo aparecen entre 1900 y 2500 nm y tienen dos efectos en el espectro NIR:

- Las absorciones aparecen en posiciones inesperadas en el espectro NIR.
- Las regiones de absorción aparecen como bandas anchas causadas por el solapamiento de multitud de absorciones diferentes.
- **Las absorciones electrónicas.** Están causadas por el movimiento de los electrones desde una órbita a otra de mayor energía. Se observan normalmente en las regiones del visible y el ultravioleta del espectro electromagnético, pero también pueden aparecer en la región del infrarrojo cercano, en particular en la región entre 780-1100 nm.

La consecuencia de todos estos mecanismos diferentes hace que el espectro NIR sea muy complejo y a menudo esta complejidad se refleja en unas pocas bandas anchas del espectro. La intensidad de las bandas NIR depende del cambio en el momento dipolar y de la anarmonicidad del enlace. El átomo de hidrógeno es el más ligero y por ello presenta las vibraciones más grandes y la mayor desviación del comportamiento armónico. Como consecuencia de esto, las principales bandas observadas en la región NIR corresponden con los enlaces en los que está implicado el hidrógeno u otros átomos ligeros (concretamente C-H, N-H, O-H y S-H); por el contrario, las bandas para los enlaces como C=O, C-C y C-Cl, son mucho más débiles o incluso ausentes (**Figura 2.2**).

INTRODUCCIÓN

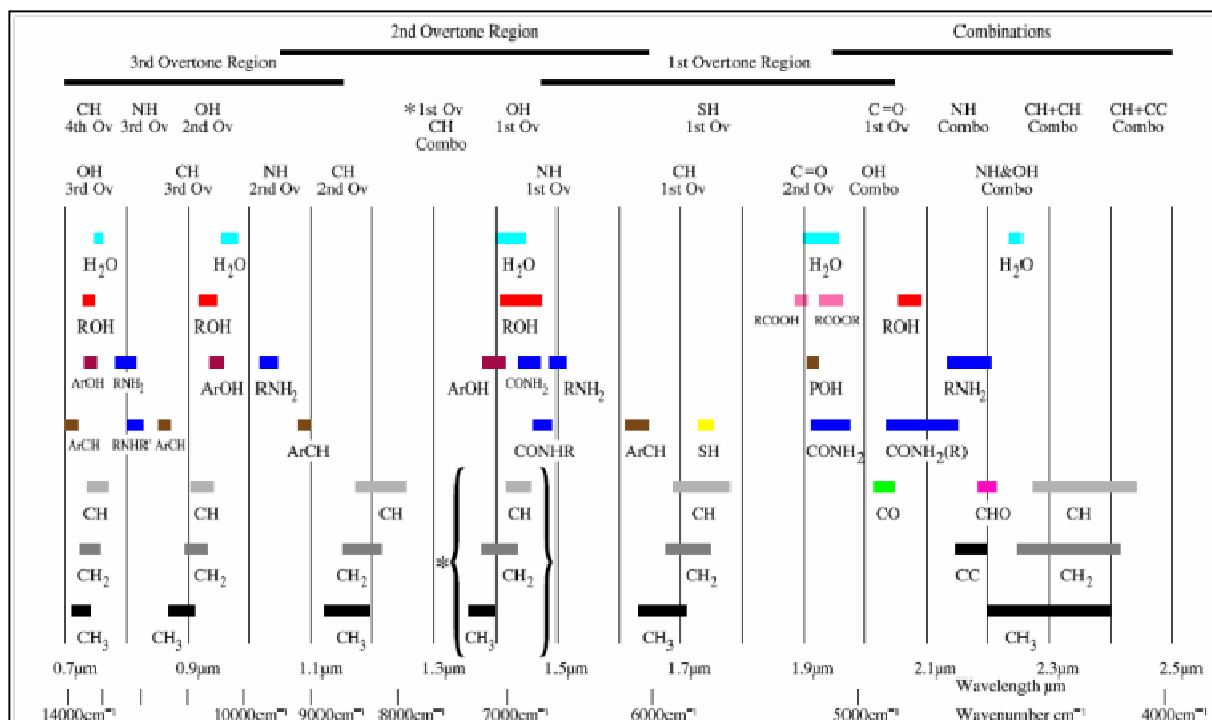


Figura 2.2 Asignación de bandas NIR a grupos orgánicos.

Las interacciones entre átomos de diferentes moléculas (por ejemplo: los puentes de hidrógeno o las interacciones dipolo-dipolo) alteran los estados vibracionales de energía, generando desplazamientos en las bandas de absorción o dando lugar a nuevas bandas debido a diferencias en la estructura cristalina. Los puentes de hidrógeno se generan debido a la tendencia del hidrógeno a formar enlaces débiles con átomos dadores de electrones, especialmente oxígeno y nitrógeno. La formación de un enlace débil afecta a todas las vibraciones asociadas a ese hidrógeno y su compañero dador-electrónico. Esto se traduce en desplazamientos de bandas (hacia mayores y menos energéticas longitudes de onda) que se observan habitualmente como ensanchamiento de picos. La estructura del puente de hidrógeno del agua es muy compleja y depende de la temperatura, el pH, la concentración iónica, etc. Por tanto, siempre que el agua esté presente en una muestra existirá una compleja y dinámica interacción entre el agua y la muestra, que será única para ese tipo de muestra.

Todo esto permite que se puedan diferenciar las distintas formas del cristal y determinar las diferentes propiedades físicas de una muestra (densidad, viscosidad, tamaño de partícula en sólidos pulverulentos). En otras palabras, el espectro NIR no solo contiene información química relacionada con la composición de la muestra, sino que también contiene información física que puede ser utilizada para determinar determinadas propiedades físicas de las muestras.

Los espectros NIR se presentan normalmente en unidades de absorbancia definidas por cualquiera de las expresiones $A = \text{Log}(1/R)$ o $A = \text{Log}(1/T)$, dependiendo de que los datos sean de reflectancia (R) o transmitancia (T).

Aunque los espectros NIR son muy complejos, el hecho de que los mismos átomos estén involucrados en múltiples absorciones diferentes significa que estas absorciones pueden ser utilizadas, a través de los tratamientos matemáticos adecuados, para obtener información analítica sobre grupos funcionales específicos [8,9]. Esta es la razón por la cual se hace extensiva la utilización de métodos de tratamientos multivariantes de datos con el objetivo de revelar la información específica y útil del espectro NIR.

2.3. Tratamiento de la muestra

Una de las grandes ventajas de analizar la muestra con un espectrofotómetro NIR es la poca o casi nula preparación de la muestra para el análisis. Podemos analizar muestras farmacéuticas de las diferentes etapas de producción (polvos, granulados, comprimidos, blíster, etc.) sin ninguna preparación previa, introduciendo el producto directamente en una cubeta adecuada. En el caso de querer eliminar la dispersión de la radiación NIR al interactuar con la muestra (debida entre otras causas al tamaño de la partícula), se puede moler la muestra mejorando al mismo tiempo su homogeneidad.

Dependiendo del tipo de análisis, debemos elegir la cubeta adecuada entre la gran variedad disponible para los diferentes tipos de análisis. Las más comunes son las de

transmisión, reflexión y transfectancia. Los tamaños varían en función del producto a analizar.

2.4. Reflectancia Difusa

La radiación NIR, procedente del monocromador, incide en la muestra perpendicularmente a su superficie. La luz penetra en la muestra y es reflejada en todas las direcciones, como muestra la **Figura 2.3**. Dependiendo del tamaño de partícula, de los índices de refracción y de otros fenómenos físicos, la representación del espectro cambiará.

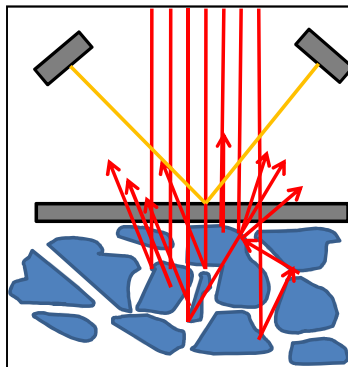


Figura 2.3 Esquema de la penetración de la luz en la muestra.

2.5. Instrumentación

La instrumentación NIR ha evolucionado de manera vertiginosa en respuesta a la necesidad de realizar análisis rápidos y la flexibilidad para adaptar la técnica a los diferentes tipos de muestra.

Los espectrofotómetros empleados para registrar los espectros NIR son, en esencia, idénticos a aquellos empleados en otras regiones del espectro electromagnético. Sin embargo, los equipos del infrarrojo cercano pueden incorporar una gran variedad de accesorios dependiendo de las características de la muestra, las condiciones analíticas particulares y necesidades (velocidad, complejidad de la matriz y condiciones ambientales), por lo que la técnica es muy flexible.

INTRODUCCIÓN

Los espectrofotómetros NIR pueden ser de dos tipos, en función de que la selección de la longitud de onda sea discreta o que recojan el espectro completo. El diseño de los espectrofotómetros NIR (Figura 2.4), consiste en una lámpara de tungsteno que emite una luz policromática dirigida hacia una rendija de entrada de un monocromador en cuyo interior una red de difracción convierte dicha luz en monocromática de longitudes de onda discretas. Posteriormente, atraviesa unos filtros “*order sorter*” que eliminan las longitudes de onda no deseadas y sale por la rendija de salida. Al salir del monocromador, la luz pasa por un “portamuestras”, donde se refleja o atraviesa la muestra para llegar a un detector adecuado. A partir de ahí, tarjetas preamplificadoras, convertidores analógico digitales y otra serie de dispositivos electrónicos, junto a un ordenador y software adecuados, harán que el espectro de la muestra aparezca en la pantalla del ordenador.

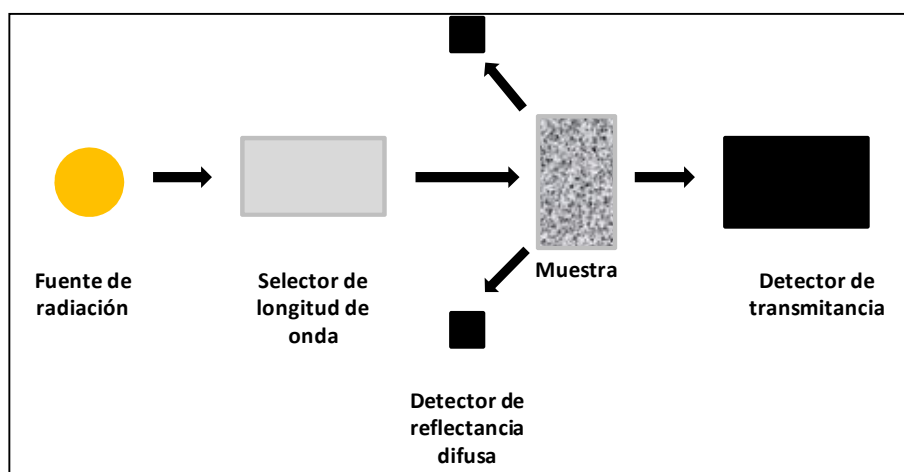


Figura 2.4 Esquema de la instrumentación de un espectrofotómetro NIR.

2.5.1. La fuente de radiación

Los espectrofotómetros NIR suelen utilizar lámparas halógenas de tungsteno, las cuales constan de un filamento de tungsteno en un envoltorio de cristal de cuarzo que ha sido rellenado con un gas inerte con una traza de un halógeno, capaz de proporcionar un espectro continuo en la región de 320 nm a 2500 nm con una potencia de 5 a 50 vatios.

INTRODUCCIÓN

Debido a la ventaja de su alto rendimiento, las bombillas halógenas tienen bajo consumo (es decir, funcionan con un voltaje o corriente reducido). Esto incrementa su vida útil [10]. Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los denominados LED's (*Light Emitting Diodes*), que dependiendo de su composición pueden llegar a emitir hasta 1600 nm. Las lámparas halógenas requieren de un sistema de selección de longitudes de onda, sin embargo los LED's no [11].

2.5.2. Selección de longitudes de onda

La selección de longitudes de onda es un factor importante para poder obtener un buen nivel de sensibilidad. Un buen sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de proporcionar un ancho de banda preciso y exacto para la longitud de onda seleccionada y señales altas a fin de conseguir una relación señal/ruido satisfactoria.

Los dispositivos de selección de longitudes de onda se pueden clasificar en tres tipos: filtros, redes de difracción e interferómetros.

- **Filtros**

Los filtros "*order sorter*" eliminan la llegada de longitudes de onda no deseadas al detector, procedentes de la red de difracción (**Figura 2.5**) [10,12]. Por poner un ejemplo, al emitir la red de difracción la longitud de onda de 2400 nm va asociada a ella un segundo armónico de longitud de onda 1200 nm y un tercer armónico de 800 nm, los cuales debemos prevenir que lleguen al detector. Para ello, un dispositivo previo al detector lleva una rueda de filtros, donde un primer filtro "A" permite el paso de longitudes de onda entre 1700 y 2500 nm, otro "B" entre 1100 a 1700 nm y otros, en el caso de llegar longitudes de onda inferiores. En el caso de la longitud de onda principal a 2400 nm, el segundo armónico de 1200 nm no llega al detector al colocarse delante del detector el filtro "A". Estos filtros van sincronizados con el movimiento de la red de difracción.

INTRODUCCIÓN

Para realizar los diagnósticos y linearización del equipo, se colocan delante de la rendija de salida unos filtros de poliestireno o didimio, con ello nos aseguramos de que la precisión y exactitud del equipo con respecto a los valores normales de los picos de estos filtros esté dentro de las tolerancias proporcionadas por el fabricante.

Los más sencillos son los filtros de absorción que transmiten longitudes de onda de forma selectiva según el material con el que estén producidos, y los de interferencia, donde las longitudes de onda transmitidas dependen del índice de refracción del material y del ángulo de incidencia de la radiación. Este último tipo de filtros tienen un ancho de banda de 10 ± 2 nm y transmiten aproximadamente un 40 % de la radiación [13].

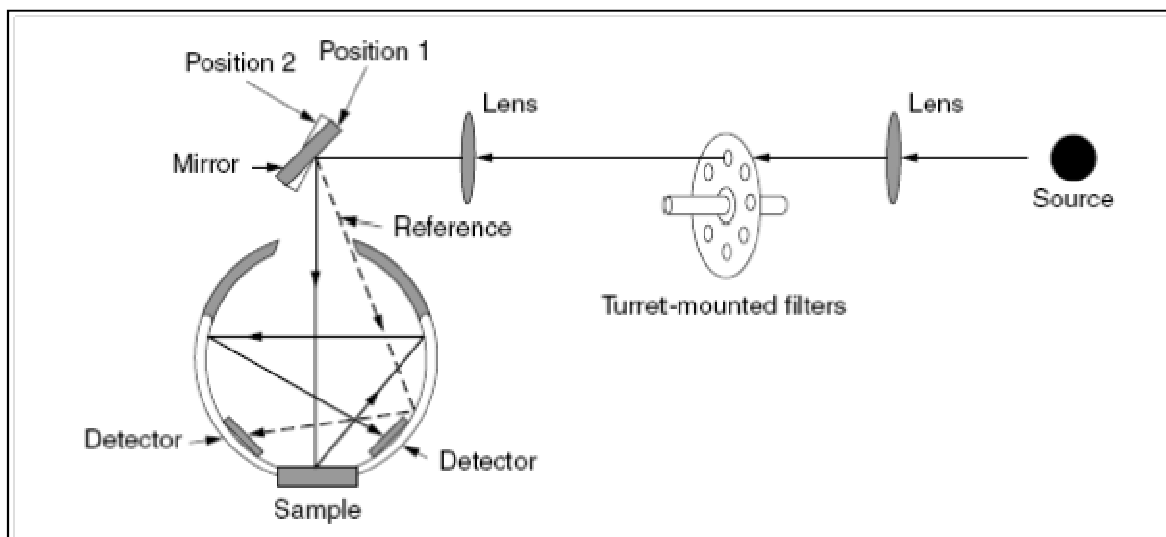


Figura 2.5 Esquema del sistema de filtros para la selección de longitudes de onda.

Los sistemas modernos están basados en filtros opto acústicos AOTF (*Acousto-Optic Tunable Filter*), donde el índice de refracción del material (TeO_2) cambia cuando este es atravesado por una onda acústica, generando luz monocromática polarizada. La frecuencia acústica controla la longitud de onda que atraviesa el filtro (**Figura 2.6**) [12].

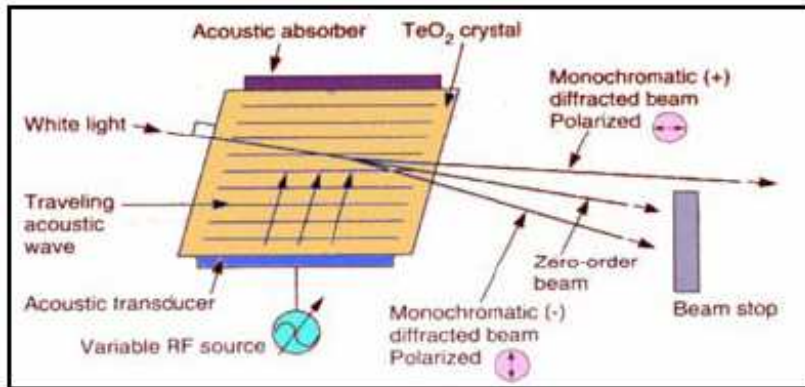


Figura 2.6 Filtros opto acústico para la selección de longitudes de onda.

- Redes de difracción

Se trata de una lente holográfica cóncava con una cantidad de surcos de aproximadamente 1200 por mm. Esta lente gira en ambos sentidos un determinado ángulo, el cual depende del rango de longitud de onda del espectrofotómetro. A mayor ángulo, mayor rango (Figura 2.7).

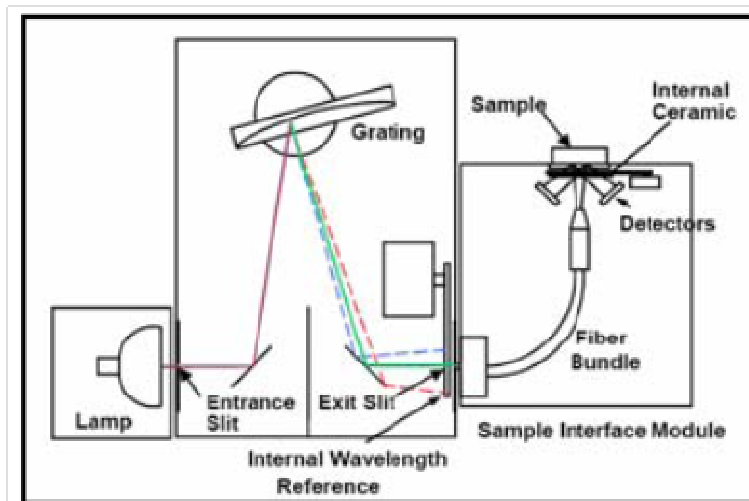


Figura 2.7 Sistema de selección de longitudes de onda con red de difracción.

- Interferómetros

INTRODUCCIÓN

Otros selectores de longitudes son los interferómetros, siendo el interferómetro de Michelson el más utilizado (**Figura 2.8**). Este sistema divide en dos el haz de luz, uno de los ellos se refleja en un espejo fijo y el otro en un espejo móvil, posteriormente, ambos haces se recombinan en el mismo punto. Variando la posición del cristal móvil se pueden crear interferencias constructivas o destructivas, obteniendo el interferograma (**Figura 2.9**) [14]. El espectro se obtiene del interferograma mediante transformada de Fourier [15].

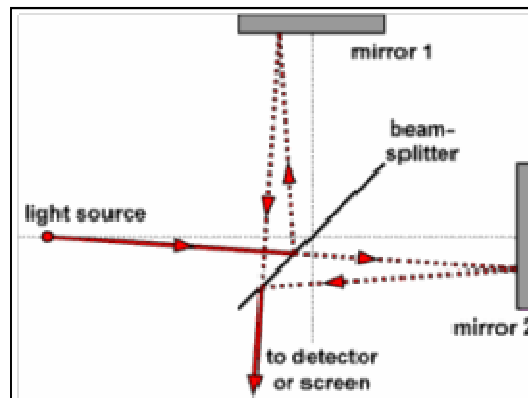


Figura 2.8 Interferómetro de Michelson

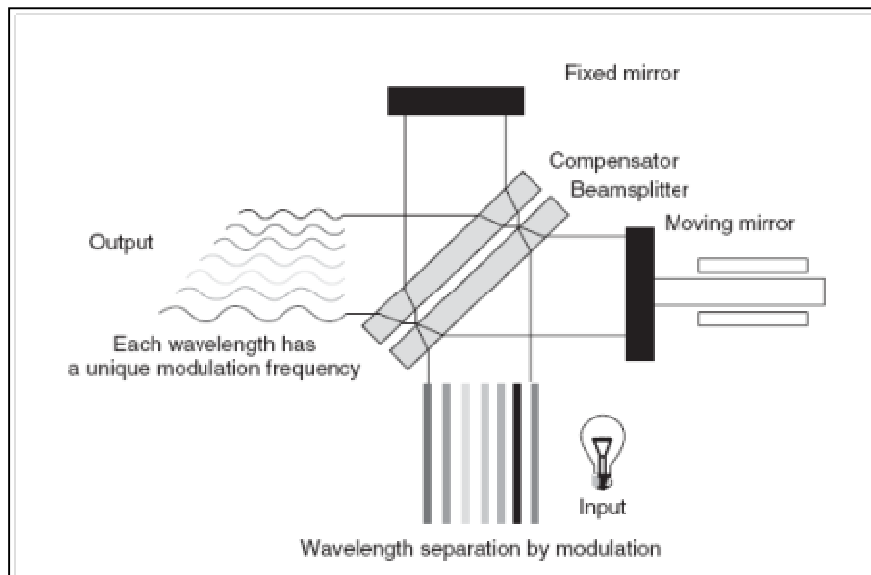


Figura 2.9 Generación de un haz de luz NIR mediante interferómetro

2.5.3. Detectores

Existen varios tipos de detectores para la detección de la radiación NIR, de diferentes características dependiendo de su rango, sensibilidad, geometría, etc.

La detección de los sistemas NIR utiliza dispositivos compuestos por semiconductores (InGaAs, PbS, InAs, InSb). Uno de los más utilizados es el sulfuro de plomo (PbS), que da unas buenas prestaciones tanto de sensibilidad como de rango (900-3300 nm) y que se puede acoplar a diferentes geometrías dado su pequeño tamaño (tienen forma de pequeñas láminas de 1 cm²). Estos detectores van sujetos a unos bloques metálicos acoplados a unas celdas Peltier.

El silicio es el detector utilizado para mantener la temperatura estable para medir longitudes de onda entre 400 y 1100 nm [16]. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de Arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), operativo de 600 a 1900 nm [10,17]. En los detectores multi-canal, los diferentes elementos de detección se encuentran alineados en filas (*diode arrays*) o planos (*charged coupled devices-CCDs*) para registrar múltiples longitudes de onda de una sola vez e incrementar al mismo tiempo la velocidad a la que se adquiere el espectro NIR. Este tipo de detectores ha dado lugar a la llamada espectroscopia de imagen NIR, en la que los espectros son registrados mediante el empleo de cámaras que pueden determinar la composición en diferentes puntos del espacio y registrar la forma y el tamaño del objeto. La toma de mediciones a diferentes longitudes de onda permite obtener la imagen tridimensional como una función de la composición espacial de la muestra y la longitud de irradiación usada [15].

2.5.4. Registro de la muestra

El análisis de las muestras es rápido, no solo por la velocidad a la que se registran los espectros NIR sino porque no hay necesidad de pretratamiento de las muestras. Esto ha permitido el desarrollo de accesorios de cuarzo y fibra óptica que permiten recoger los espectros de muestras con diferentes características mediante la previa selección del

INTRODUCCIÓN

modo más adecuado para cada muestra (normalmente reflectancia para sólidos, transmitancia para líquidos y transflectancia para emulsiones y líquidos turbios) (Figura 2.10).

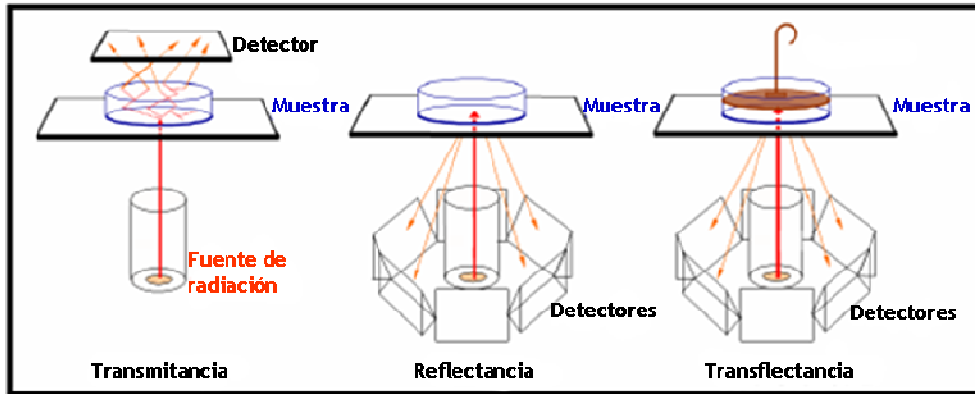


Figura 2.10 Esquema de las tres configuraciones para el registro de espectros NIR.

- **Reflectancia**

La reflexión de la radiación puede ser especular o difusa. La reflectancia especular descrita por las leyes de Fresnel no aporta información sobre la composición de la muestra, por lo que solo contribuye al ruido. La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión.

Cuando los materiales son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación con la longitud de onda, predomina la reflectancia difusa.

Debido a la complejidad del proceso de reflectancia difusa, no existen teorías rigurosas, sino aproximaciones entre las cuales la más importante es la de Kubelka-Munk [18]. Otra expresión empleada con mucha frecuencia es una aplicación empírica de la relación entre la concentración y la reflectancia relativa, similar a la ley de Lambert-Beer (Ec. 2.2):

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde A es la absorbancia aparente, R la reflectancia relativa ($R = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{referencia}}}$), a' la constante de proporcionalidad y c la concentración.

Se emplean cubetas especiales para este tipo de análisis, donde el paso óptico es, en realidad, indeterminado; pues no sabemos exactamente la profundidad a la que llegará la radiación NIR dentro de la muestra. En este tipo de análisis, dependiendo del producto, se puede producir gran cantidad de dispersión.

- **Transmitancia**

La absorción de la radiación sigue la ley de Lambert-Beer. La transmitancia de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución. Ambas medidas se relacionan en la siguiente expresión (Ec. 2.3):

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{P_o}{P} = abc \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde A es la absorbancia de la muestra, T la transmitancia, P_o la intensidad de la radiación incidente, P la intensidad de la radiación transmitida, a la absorptividad molar, b el camino óptico y c la concentración.

Pueden producirse desviaciones del cumplimiento de esta ley debidas a causas muy diversas (reflexión y/o dispersión de la radiación, concentraciones muy elevadas, interacciones químicas de la muestra, etc...). Esta se puede emplear tanto para sólidos como para líquidos. En este tipo de medida, el paso óptico está perfectamente fijado, por lo que existen diferentes tipos de cubetas con diferentes pasos ópticos según la absorción de la muestra. Se trata de elegir el paso óptico adecuado para ver el espectro de la muestra en unos niveles adecuados de absorción y no tener saturación.

- **Transflectancia**

Podemos considerar la transflectancia como una combinación entre la transmitancia y la reflectancia. Por una parte la luz atraviesa la muestra hasta llegar a un reflector donde es

reflejada. En este caso el paso óptico es el doble de la distancia del reflector del líquido ó sólido, ya que es atravesado dos veces.

El módulo porta muestras lleva incorporado mecanismos para colocar una cerámica en el lugar de la muestra cuando adquirimos el espectro de referencia (también conocido como “fondo” o “blanco”).

- **Registro de la muestra *in situ***

Otro factor que influye en la velocidad del análisis es la capacidad para realizar medidas de campo, en vez de tener que recoger las muestras para su posterior análisis en el laboratorio. Algunos espectrofotómetros NIR pueden realizar medidas *in situ*.

La miniaturización de los componentes ópticos ha potenciado el desarrollo de espectrofotómetros NIR portátiles. Los modelos de este tipo actualmente disponibles incluyen instrumentos de mano y equipos que pueden ser transportados en una mochila o colocados en un vehículo. Esto se hace mediante el uso de fibra óptica que transporta la radiación NIR directamente al contenedor de muestra. La luz reflejada o transmitida regresa al detector para ser procesada. Dependiendo de las características de la muestra, la fibra podrá ser sencilla o un mazo de un determinado número de ellas.

La fibra óptica se acopla a una sonda, la cual está en contacto con la muestra. Dicha sonda suele ser de acero inoxidable y con configuraciones de “transmitancia”, “reflectancia” o “transflectancia”. Las sondas pueden ser insertadas en tuberías, reactores, mezcladoras, etc. Existe la posibilidad de acoplar al final de la fibra óptica cabezales de iluminación NIR, para utilizar en cintas transportadoras [14,19,20].

2.6. Aspectos regulatorios

La espectroscopia NIR tiene un gran número de ventajas sobre otras técnicas de análisis y, por tanto, ofrece muchas perspectivas interesantes en el análisis para la industria farmacéutica.

El fundamento científico de esta tecnología se ha establecido para muchas aplicaciones diferentes y ha sido justificada por un gran número de publicaciones (ver capítulo 1). Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, en el mundo altamente regulado de la industria farmacéutica, un método analítico solo es válido para la implementación en rutina si es aprobado por las autoridades reguladoras. Actualmente, las farmacopeas más importantes han adoptado técnicas NIR.

La Farmacopea de la Unión Europea [21] y de los Estados Unidos [22] contienen un capítulo general de espectrometría de infrarrojo cercano y espectrofotometría, respectivamente. Estos capítulos abordan la idoneidad de los instrumentos NIR para su uso en análisis farmacéutico, centrándose sobre todo en la cualificación operativa y el rendimiento de la verificación de la comprensión de la escala de longitudes de onda, la repetibilidad, linealidad fotométrica y ruido fotométrico. Solo una limitada guía se presenta en términos de desarrollo, validación y aplicación.

Los requisitos legales que muestran los procedimientos de cualificación de la instrumentación, es decir, la cualificación del diseño (DQ), cualificación de la instalación (IQ), cualificación operacional (OQ) y cualificación de desempeño (PQ), se describen en el GMP título de la guía 21 CFR Parte 211. Para la realización práctica de estos requisitos, la *American Society for Testing Materials* (ASTM) ha dado instrucciones específicas en relación con la metodología apropiada para el establecimiento de pruebas para el desempeño de un espectrofotómetro NIR, entre las cuales incluye normas adecuadas y calibración multivariable [23].

Como una orientación adicional para la evaluación de un espectrofotómetro NIR, el Comité de Métodos analíticos de la Real Sociedad Británica de Química ha proporcionado un informe especial también con este mismo fin [24].

Muchas compañías farmacéuticas han tenido éxito implementado espectrómetros NIR en sus laboratorios de control de calidad para su uso rutinario en la identificación y calificación de materias primas. Este hecho se basa en que las principales farmacopeas permiten a los fabricantes utilizar métodos analíticos distintos a los descritos en las farmacopeas, siempre y cuando estén validados de acuerdo a parámetros, tales como especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión, repetitividad, reproducibilidad,

INTRODUCCIÓN

límite de detección, límite de cuantificación y robustez, como se detalla en el U.S.P. Capítulo 1225 sobre la validación-compendio de Métodos [25] y la guías generales ICH Q2A y Q2B sobre la validación de los procedimientos analíticos [26]. Sin embargo, solo unos pocos métodos cuantitativos NIR han obtenido la aprobación regulatoria hasta el momento. La principal razón de esto es que los métodos “no separativos” multivariado NIR difieren marcadamente de métodos “separativos” univariados cromatográficos descritos en la USP Capítulo 1225 y en la general guía ICH Q2A y Q2B. Moffat *et al.* [27], que discute ampliamente estos aspectos en un excelente artículo publicado en 2000. Basado en el ejemplo de un método NIR para el análisis cuantitativo de paracetamol en comprimidos, los autores hicieron sugerencias sobre cómo los ensayos NIR puede cumplir mejor con las directrices de ICH en validación. Las directrices recientemente publicadas para el desarrollo y validación de métodos espectroscópicos de infrarrojo cercano en la industria farmacéutica [28], establecidos por el subgrupo en NIR de la *UK Pharmaceutical Analytical Sciences Group (PASG)*, cubren los requisitos únicos y específicos para NIR sin dejar de ser complementarios a las guías ICH Q2A y Q2B, que direccionan los requisitos tradicionales de validación de los métodos analíticos.

Concluyendo, la técnica de la espectroscopia NIR no solo comprende los principios de la física teórica y la electrónica de la instrumentación, sino que incluye además la quimiometría y los análisis de referencia como parte de la metodología NIR. En la actualidad, el uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano se está extendiendo a nuevas aplicaciones. Por lo general, cada una de las tecnologías industriales presenta un período de crecimiento y auge, sin embargo, después de un cierto tiempo, dichas tecnologías son reemplazadas por otra más eficiente o versátil. Esto no ocurrirá con el NIR, ya que su crecimiento ha dependido y dependerá siempre de un conjunto de tecnologías que proporcionan, de manera conjunta, una herramienta poderosa en el campo de la química analítica.

REFERENCIAS

1. W. Herschel. Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 90 (1800) 255-283.
2. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and D. Serrano, Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets. *Analyst* 123 (1998) 2307-2312.
3. R.P. Cogdill, C.A. Anderson, J.K. Drennen, Using NIR spectroscopy as an integrated PAT tool. *Spectroscopy* 19 (12) (2004) 104-109.
4. J. Parris, C. Airiau, R. Escott, J. Rydzak, R. Crocombe, Monitoring API Drying Operations with NIR. *Spectroscopy* 20 (2) (2005), 34-42.
5. B. Swarbrick, B. Grouta, J. Noss, The rapid, at-line determination of starch content in sucrose-starch blends using near-infrared reflectance spectroscopy; a process analytical technology; a process analytical technology initiative. *J. Near Infrared Spectrosc.* 13 (2005) 1-8.
6. Y. Roggo, C. Roeseler, M. Ulmschneider, Characterizing process effects on pharmaceutical solid forms using near-infrared spectroscopy and infrared imaging. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (4) (2004) 777-786.
7. Y. Dou, Y. Sun, Y.Q. Ren, P. Ju, Y.L. Ren, Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (4) (2005) 543-549.
8. L. Bokobza, Chapter 1: Origin of Near-Infrared Absorption Bands. En *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, instruments, Applications.* (2002) 1ª edición. Ed. H.W Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise. Weinheim. Wiley-VCH Verlag.

INTRODUCCIÓN

9. É. Dufou, Chapter 1: Principles of Infrared Spectroscopy. En Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. (2009) 1ª edición. Ed. Da-Wen Sun. Amsterdam: Academic Press.
10. E.W. Ciurczack, Commercial NIR Instruments. En Handbook of Near Infrared Spectroscopy Analysis. (2008) 3ª edición. Ed. D.A. Burns, E.W. Ciurczack, Taylor and Francis Group.
11. W.F. McClure, Near-infrared spectroscopy. In: Spectroscopic Techniques for Food Analysis. (1994) Ed. R.H. Wilson. New York: VCH Publishers, Inc., pp. 13-52.
12. D. A. Burns, E. W. Ciurczak. Handbook of near-infrared analysis. Marcel Dekker 2001.
13. E. Stark and K. Luchter. Diversity in NIR instrumentation. Proceedings of the 11th International Conference on Near Infrared spectroscopy. NIR Publications (2004) 13.
14. M. B. Simpson. Near-infrared spectroscopy for process analytical chemistry: theory, technology and implementation. En Process Analytical Technology. (2005) 1ª edición. Ed. K.A. Bakeev. Blackwell Publishing. Oxford. UK.
15. M. Lin, B. A. Rasco, A. G Cavinato, M.Al-Holy, Chapter 6: Infrared (IR) Spectroscopy—Near-Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy. En Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. (2009) 1ª edición. Ed. Da-Wen Sun. Amsterdam: Academic Press.
16. F. Ronda Balbás, P. Caballero Calvo M. Gómez Pallarés, C. Blanco, Nuevas tecnologías para el control de proceso y de producto en la Industria Alimentaria. (2004) secretariado de publicaciones e intercambio editorial Universidad de Valladolid (España), pp. 214
17. .S. Kawata, Chapter 4: New techniques in near-infrared spectroscopy. En Near Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications. (2002) 1ª edición. Ed.W Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise. Weinheim: Wiley-VCH Verlag., pp 75-83.
18. P. Kubelka, E. Munk. Ein beitrage zur optik der farbanstriche. Z. Tech. Phys. 12 (1931) 593.

INTRODUCCIÓN

19. S. Kawanos, Chapter 6: Sampling and Sample Presentation. En Near-Infrared Spectroscopy: Principles, instruments, Applications, H. (2002) 1ª edición. Ed. W Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise. Weinheim: Wiley-VCH Verlag., pp 115-124.
20. Y. Ozaki y T. Amari, Spectroscopy in Process analysis near infrared spectroscopy in chemical process analysis 3 (1999) 68-71.
21. Near-infrared spectrometry, Chapter 2.2.40, European Pharmacopoeia. (2001) 4ª edición, pp. 55-56.
22. Near-infrared spectrophotometry, Chapter 1119, United States Pharmacopoeia USP26NF21 (2003) pp. 2388-2391.
23. American Society for Testing and Materials, E1866-97: Standard Guide for Establishing Spectrophotometer Performance Tests, and E1655: Standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, Official ASTM Publications, Philadelphia, PA (2000).
24. Report by the analytical methods committee, evaluation of analytical instrumentation, Part XIII. Instrumentation for UV-visible-NIR spectrometry, Analyst 125 (2000) 367- 374.
25. Validation of compendial methods, Chapter 1225, United States Pharmacopoeia USP26 (2002) pp. 2439-2442.
26. ICH Quality Guidelines for Method Validation, Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures, and Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, November 1996, FDA (<http://www.ifpma.org/ich5.html>).
27. A.C. Moffat, A.D. Trafford, R.D. Jee, P. Graham, Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets, Analyst 125 (2000) 1341-1351.
28. PASG Guidelines for the Development and Validation of Near Infrared (NIR) spectroscopic methods, May 2001, pp. 1-39 (<http://www.pasg.org.uk/NIRmay01.pdf>).

3. Espectroscopia Raman

3.1. Introducción

La espectroscopia Raman es una herramienta analítica que ha cobrado auge en los últimos tiempos debido a las características y ventajas que presenta. Esta técnica proporciona en pocos segundos tanto información química como estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación o su cuantificación. La técnica se basa en la dispersión inelástica, o dispersión Raman, de la luz monocromática, que por lo general procede de un láser en el rango visible, infrarrojo cercano, o ultravioleta. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. La espectroscopia Raman es una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre el material a analizar, es decir, es no-destruictiva. A pesar de esta ventaja, la espectroscopia Raman no ha sido muy utilizada por los químicos hasta que en los años sesenta se pudo disponer de los láseres, los cuales han permitido obtener los espectros más fácilmente. Actualmente la espectroscopia Raman tiene un amplio campo de aplicación, usándose en el análisis cualitativo y cuantitativo de sistemas inorgánicos, así como en el análisis de compuestos orgánicos ya que proporciona información acerca de los grupos funcionales presentes en los compuestos, también se ha aplicado para el estudio de sistemas biológicos. Entre las ventajas de esta técnica con respecto a otras técnicas espectroscópicas se incluye el pequeño tamaño de muestra requerido, la mínima interferencia del agua, picos estrechos y la sensibilidad respecto a los factores conformacionales y del entorno.

3.2. El efecto Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman se predijo teóricamente por A. Smekal en 1923 y cinco años después se descubrió experimentalmente por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman, cuando estaba investigando la dispersión de la luz por las moléculas, lo que le supuso la obtención del premio Nobel de física en 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de dispersión de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares [1]. El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La dispersión es la desviación de luz de su dirección original de incidencia. La interacción del vector de campo eléctrico de una onda electromagnética con los electrones del sistema con el que interactúa da lugar a la dispersión de la luz incidente. Tales interacciones inducen oscilaciones periódicas en los electrones del compuesto; por lo tanto, produce momentos eléctricos oscilantes. Esto lleva a tener nuevas fuentes emisoras de radiación, es decir, fuentes que reemiten radiación en todas las direcciones (la luz dispersada).

Existen dos tipos básicos de dispersión:

- Elástica. Misma frecuencia (longitud de onda) que la luz incidente, llamada dispersión Rayleigh, que no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada.
- Inelástica. Dentro de la inelástica existen dos tipos, una que tiene frecuencia más baja (longitud de onda mayor) y, la que tiene frecuencia más alta (longitud de onda más corta) que la luz incidente.

Es la luz dispersada inelásticamente la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman y, por lo tanto, existen dos tipos de ella: en uno de ellos la luz dispersada tiene menor energía que la luz incidente (la que tiene menor frecuencia) y el efecto se llama dispersión Raman Stokes [2].

INTRODUCCIÓN

En el otro, la luz dispersada tiene mayor energía que la luz incidente, es decir tiene mayor frecuencia que la luz incidente, y se le llama dispersión Raman anti-Stokes [2]. En la dispersión Rayleigh (misma frecuencia) no hay cambio en la energía de la luz incidente (Figura 3.1).

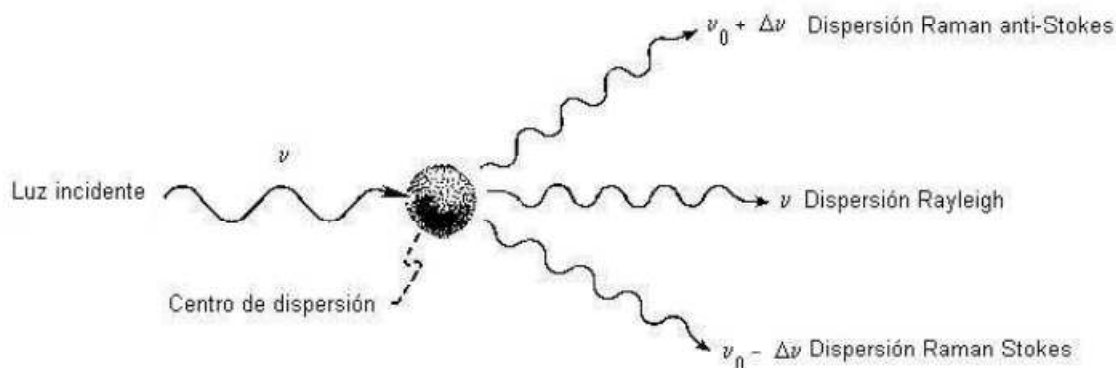


Figura 3.1 Representación esquemática de los tres tipos de luz dispersada.

Sólo una pequeña fracción de los fotones es dispersada inelásticamente, así que, por lo general, las líneas Raman son muy débiles (solamente 10^{-6} de la intensidad de la línea Rayleigh) [3]. La mayor parte de la luz dispersada tiene la misma frecuencia (energía) que la de la luz incidente original, lo cual hace que la observación del efecto sea relativamente difícil. Sin embargo, el advenimiento de los láseres permitió iluminar con un haz monocromático de muy alta densidad de energía, facilitando con ello su observación.

Las nuevas frecuencias, Anti-Stokes $+\nu_r$ y Stokes $-\nu_r$, son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente.

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía [4]. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidas a constantes de movimiento vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de

INTRODUCCIÓN

los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal se muestra en la **Figura 3.2**.

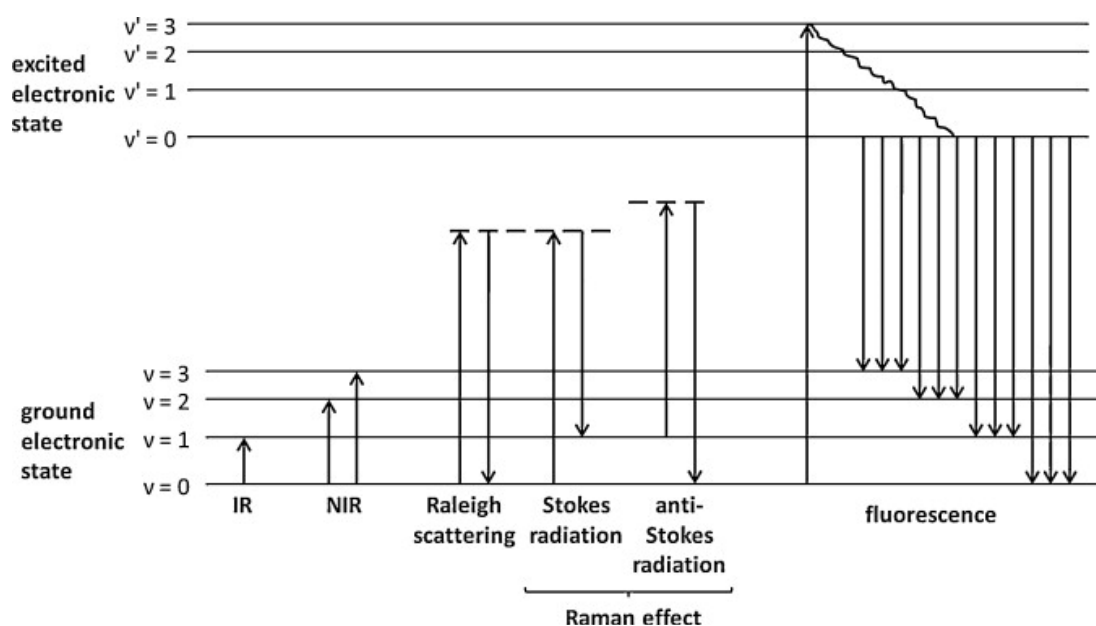


Figura 3.2 Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Plank) mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes). Esta dispersión puede ser interpretada como el proceso siguiente: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula.

INTRODUCCIÓN

Cada material tendrá un conjunto de ν_r característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman.

El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado ν al que se produce: El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, que se expresa en cm^{-1} (Ec. 3.1):

$$\nu = \nu/c = 1/\lambda \text{ [cm}^{-1}\text{]} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Como se observa en la **Figura 3.3** el espectro Raman [4] está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh.

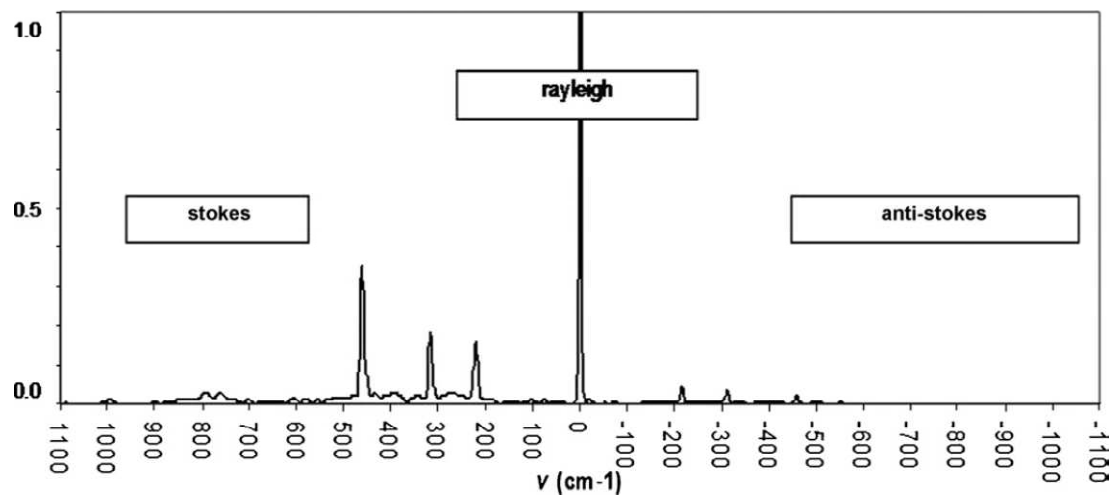


Figura 3.3 Ejemplo de un espectro Raman (CCL_4).

Es importante resaltar que el desplazamiento de las frecuencias Raman respecto a la frecuencia incidente ν_0 es independiente de esta última, y por ello suele tomarse como abscisa para representar los espectros Raman este desplazamiento, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, en el eje de abscisas en realidad aparecerá la

INTRODUCCIÓN

diferencia entre la frecuencia Raman y la de excitación del láser, normalizada respecto a la velocidad de la luz (Ec. 3.2):

$$u = (v - v_0) / c \text{ [cm}^{-1}\text{]} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentran en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes [5]. La diferencia entre la intensidad de efecto Stokes y el anti-Stokes hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes. En ocasiones, debido a la naturaleza química del material que se analiza, unido al efecto Raman se produce un efecto de fluorescencia (fenómeno de absorción de luz) que puede llegar a enmascarar las bandas Raman; en estos casos, podría resultar de interés medir el espectro anti-Stokes ya que a estas frecuencias, aunque el efecto Raman es más débil, también lo es el efecto de la fluorescencia y puede aparecer bandas Raman en la parte anti-Stokes del espectro, que se encuentran enmascaradas en la parte Stokes.

3.3. Instrumentación

Los instrumentos para la espectroscopia Raman moderna consta de tres componentes: una fuente láser, un sistema de iluminación de la muestra y un espectrómetro adecuado. Sin embargo, los requerimientos de funcionamiento de estos componentes son rigurosos, debido a la inherente debilidad de la señal de dispersión Raman comparada con la señal producida por la dispersión Rayleigh.

En la **Figura 3.4** se presenta en forma esquemática la instrumentación de la espectroscopia Raman, donde podemos ver que la luz que suministra un láser, incide en la

muestra y la dispersada a 90° se hace incidir en un monocromador, desde donde la señal se pasa a un foto detector o, en casos, a un fotomultiplicador y que, a través de un amplificador de la señal para las diferencias frecuencias conforme el monocromador va barriendo el intervalo de detección.

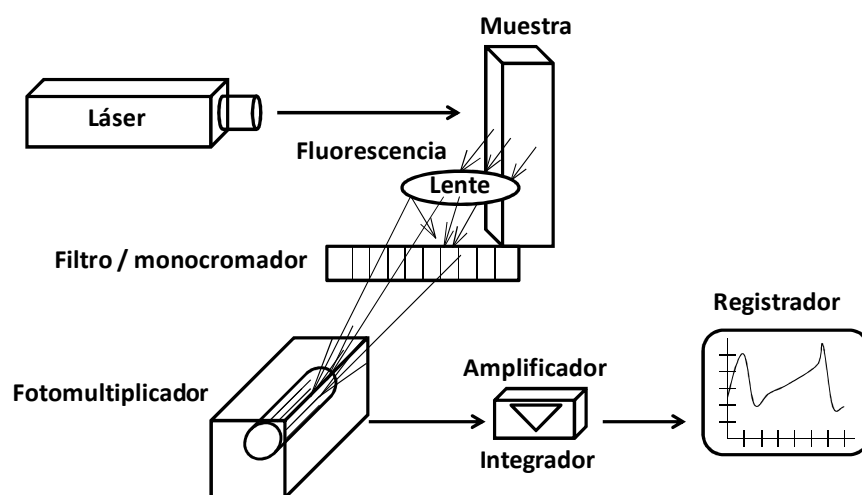


Figura 3.4 Esquema de la instrumentación de la espectroscopia Raman.

3.3.1. La fuente de radiación

Las fuentes utilizadas en la espectrometría Raman moderna son casi siempre láseres debido a su alta intensidad, necesaria para producir dispersión Raman lo suficientemente intensa como para poderse medir con una relación señal/ruido razonable. La propiedad del láser de tener una gran monocromaticidad es útil en Raman debido a que el espectro se obtiene como los desplazamientos en frecuencia con respecto a la luz incidente, con lo que cuanto más monocromática sea la radiación excitatriz, mejor definición y sensibilidad tendremos de las diferencias de frecuencia. En la **Tabla 3.1** se enumeran cinco de los láseres más utilizados en la espectroscopia Raman. Debido a que la intensidad de la dispersión Raman varía con la cuarta potencia de la frecuencia, las fuentes de ion argón y criptón, que emiten en la región azul y verde del espectro, presentan esta ventaja sobre las otras fuentes mostradas en la tabla. Por ejemplo, la línea del argón a 488 nm

INTRODUCCIÓN

proporciona líneas Raman casi tres veces más intensas que las excitadas mediante la fuente helio/neón, para la misma potencia de entrada.

Las dos últimas fuentes de la tabla, que emiten radiación del infrarrojo cercano, se usan cada vez más como fuentes de excitación. Las fuentes de infrarrojo cercano presentan dos ventajas importantes sobre los láseres de longitud de onda más corta. La primera es que pueden funcionar a potencias muy superiores (hasta 50 W) sin producir fotodescomposición de la muestra. La segunda es que no son lo suficientemente energéticas para poblar, en la mayoría de las moléculas, un número significativo de estados electrónicos excitados capaces de producir fluorescencia. Como consecuencia, con estos láseres, la fluorescencia es, en general, mucho menos intensa o inexistente. La línea a 1.064 nm de Nd/YAG es particularmente efectiva para eliminar la fluorescencia. Las dos líneas de láser de diodos en serie a 782 y 830 nm también reduce notablemente la fluorescencia en la mayoría de los casos [6].

Tabla 3.1 Algunas fuentes láser comunes en espectroscopia Raman.

Tipo de fuente	Longitud de onda, nm
Ion argón	488.0 o 514.5
Ion criptón	530.9 o 641.1
Helio/neón	632.8
Láser de diodos	782 o 830
Nd/YAG	1.064

3.3.2. Sistemas de iluminación de la muestra

La manipulación de las muestras en espectroscopia Raman es sencilla, debido a que puede emplearse el vidrio para las ventanas, lentes y otros componentes ópticos, en lugar de los haluros cristalinos que resultan más frágiles y menos estables a los componentes atmosféricos. Además, la fuente láser se puede enfocar con facilidad sobre una zona

pequeña de la muestra y, a su vez, la radiación emitida enfocarla eficazmente sobre una rendija. En consecuencia, se pueden examinar muestras muy pequeñas.

3.3.3. Registro de muestras

• Muestras líquidas

La mayor ventaja en cuanto a la manipulación de la muestra en espectroscopia Raman es la débil dispersión Raman producida por el agua. Por ello, las disoluciones acuosas se pueden estudiar por espectroscopia Raman. Esta ventaja es particularmente importante para los sistemas biológicos e inorgánicos y para los estudios relacionados con los problemas de polución de agua. El recipiente que se utiliza normalmente para muestras líquidas no absorbentes, es un capilar como el que se emplea normalmente para medir el punto de fusión.

• Muestras sólidas

Los espectros Raman de muestras solidas se obtienen, a menudo, llenando una pequeña cavidad con la muestra finamente pulverizada. Los polímeros por lo general se pueden examinar directamente sin tratamiento previo de la muestra.

• Muestras gaseosas

Por lo regular, los gases están contenidos en recipientes de vidrio de 1 a 2 cm de diámetro y de casi 1 mm de espesor. También se puede introducir el gas en tubos capilares pequeños y luego sellarlos. En el caso de dispersores débiles se puede utilizar un aparato externo de pasos múltiples con espejos.

• Muestreo con fibra óptica

Una de las ventajas importantes de la espectrometría Raman es que utiliza radiación visible o del infrarrojo cercano que puede transmitirse a lo largo de una distancia considerable (tanto como 100 m o más) a través de una fibra óptica. La **Figura 3.5a** muestra el esquema de un instrumento característico para el muestreo con una sonda de fibra óptica. En este caso, se utiliza una lente objetivo microscópica para enfocar el haz

INTRODUCCIÓN

de excitación láser sobre uno de los extremos del conjunto de fibras de entrada que llevan la radiación a una sonda de fibra óptica que está inmersa en la muestra. Como se ve en la **Figura 3.5b**, la sonda consta de fibras de entrada rodeadas de varias fibras de recogida que transportan la radiación dispersada al monocromador. A la entrada del espectrófotometro las fibras de recogida se disponen de forma lineal como aparece en la **Figura 3.5c** para que iluminen la rendija de la entrada.

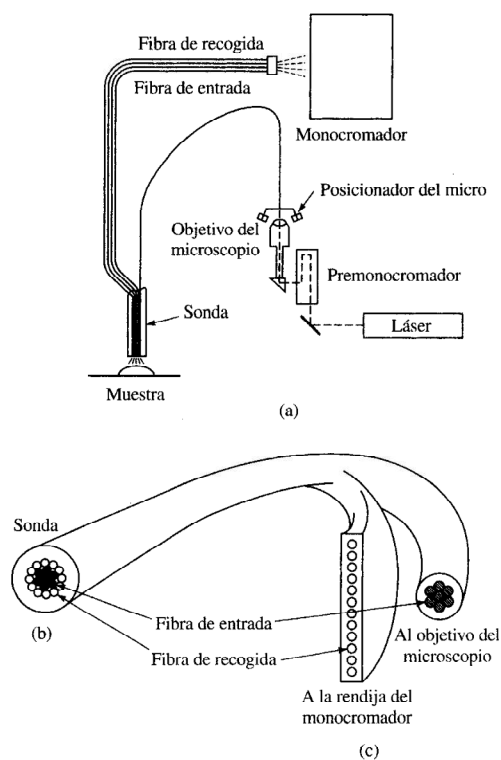


Figura 3.5 (a) Esquema de un sistema para la obtención de espectros Raman con una sonda de fibra óptica; (b) vista del extremo final de la sonda; (c) vista del extremo de las fibras de recogida de la rendija de entrada del monocromador. Los círculos oscurecidos representan la fibra de entrada y los círculos blancos las fibras de recogida.

3.3.4. Detector

El sistema de detección que requiere la espectroscopia Raman es de una alta sensibilidad, dada la poca intensidad de la señal respuesta. El sistema de foto detección debe ser capaz de registrar muy pocos fotones para poder detectar las líneas extraordinariamente débiles del espectro. Los detectores que se utilizan son los matriciales que recogen la luz dispersada por la muestra después de pasarla a través de un filtro holográfico de muchas líneas, y con ello se elimina la difusión Rayleigh, y, posteriormente, se dispersa y se recoge la imagen en una matriz CCD (dispositivo de carga acoplada y enfriada). De esta forma, se recoge el espectro completo de una vez, en lugar de ir barriendo las diferentes frecuencias.

3.4. Aplicaciones Raman

La espectroscopia Raman es usada en muchas áreas industriales incluyendo la industria farmacéutica, polímeros, semiconductores, arte, arqueología, biotecnología, seguridad, etc. Las aplicaciones incluyen el control de calidad de materias primas, identificación de falsificaciones de productos, verificación de materiales, monitoreo de procesos y otros. A continuación se remarca algunas de las áreas más importantes en donde se ha venido aplicando la espectroscopia Raman [6]:

- En la industria se ha venido determinado la forma y la estructura de polímeros, permitiendo la identificación molecular de materiales, donde por ejemplo se podrían identificar impurezas o componentes de una mezcla. Además, se puede controlar la cristalización y el tamaño y orientación de las moléculas en polímeros.
- En el campo del arte la espectroscopia Raman se ha venido utilizando en la Identificación de materiales pictóricos en obras de arte permitiendo la identificación de materiales, de entre estos materiales, destacan los pictóricos o pigmentos.
- Identificación de explosivos debido a la necesidad de prevenir los actos terroristas en aeropuertos o edificios protegidos y de importancia.

INTRODUCCIÓN

- En la Investigación espacial se ha venido utilizando en la investigación de minerales en otros planetas.
- En geología y mineralogía, espectroscopia Raman permite hacer un análisis estructural y químico que llega a determinar si una gema o una piedra preciosa son falsas o verdaderas.
- En la investigación forense la espectroscopia Raman se usa en la identificación de sustancias desconocidas. Hay que tener en cuenta que Raman es una técnica no destructiva, esto quiere decir que es capaz de poder identificar pequeñas cantidades de sustancias sin poner en peligro la evidencia de ninguna manera.
- En Biología y Biomedicina la espectroscopia Raman es usada en campos como dermatología, angiología, ortopedia, odontología, oftalmología. La espectroscopia Raman permite distinguir entre tejidos cancerosos, pre-cancerosos y normales y también tiene sensibilidad a los cambios en metabolismos de las células y estructuras de las proteínas.
- En la área de la industria farmacéutica. La espectroscopia Raman tiene un papel muy importante en el análisis en muchas de las etapas del diseño de productos farmacéuticos y proceso de producción. Las aplicaciones de la espectroscopia en este campo son la supervisión y control de procesos de fabricación a gran escala, para perfilar la distribución de ingredientes farmacéuticos activos y excipientes en diferentes etapas de un ciclo de formulación. Raman ofrece una incomparable discriminación de los materiales, es capaz de estudiar muestras líquidas y sólidas y es particularmente adecuado para combinar con otras técnicas de análisis ya que proporciona un análisis no destructivo que requiere poca o ninguna preparación de la muestra. En esta tesis es precisamente en esta área donde se aplica la espectroscopia Raman como herramienta para el control del proceso de mezclado.

3.5. Ventajas de la espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman ofrece varias ventajas como técnica de análisis respecto a otras tecnologías de análisis. Las ventajas más importantes para la industria farmacéutica son:

- La posibilidad de analizar sustancias a través de plásticos y/o vidrio transparente o semitransparente, ya que la espectroscopia Raman no requiere contacto físico con la muestra a analizar.
- La posibilidad de analizar sustancias en soluciones acuosas, ya que el agua emite una señal Raman muy débil que no interfiere con la señal Raman del producto en solución.
- La creación del método de análisis para una sustancia requiere de la obtención de un espectro adecuado con solo una muestra en un tiempo generalmente menor a una hora por cada método.
- Los métodos para análisis son estables, no son afectados por variaciones de tamaño de partículas, humedad o temperatura ambiente.
- En la mayoría de los casos no se requiere preparación previa de la muestra.
- La reciente aparición en el mercado de equipos Raman portátiles especializados para los requisitos de la industria con tiempos de análisis de pocos minutos por muestra.
- El desarrollo de algoritmos y software especializados integrados a esos equipos orientados a procedimientos de análisis simples y de resultados claros y precisos que permiten la operación por parte de personal sin conocimientos de espectroscopia Raman, generando registros que cumplen con las normas internacionales de la industria.
- La generación de bibliotecas de espectros Raman integrados a los equipos que cubren miles de sustancias de uso habitual en la industria farmacéutica.
- La posibilidad de instalar los archivos con los métodos desarrollados para materias primas específicas de cada industria en varios equipos del mismo tipo mediante transferencia electrónica, sin necesidad de realizar ajustes en los mismos.

REFERENCIAS

1. C.V. Raman, K.S. Krishnan, new type of secondary radiation. *Nature* 121 (1928) 501-502.
2. G.W. Chantry, H.A. Gebbie, C. Helson, Interferometric Raman Spectroscopy Using Infra-Red Excitation, *Nature* 203 (1964) 1052-1053.
3. T. Hirschfeld, D.B Chase, FT-Raman Spectroscopy: Development and Justification, *Appl. Spectrosc.* 40 (1986) 133-137.
4. J.G. Contreras, Espectroscopia Raman y estructura molecular, UNESCO 1 (1987).
5. B. Guineau, L'étude des pigments par les moyens de la Microspectrometrie Raman, *Spectrochimica Acta Part A* 53 (1997) 2159-2179.
6. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5ª ed. McGraw-Hill, Madrid (2001).

4. Quimiometría

4.1. Introducción

La automatización y computarización de los laboratorios ha llevado consigo diversas consecuencias. Una de ellas es la rápida adquisición de gran cantidad de datos. Ahora bien, sabemos que la posesión de dichos datos dista, muchas veces, de proporcionar respuestas adecuadas. La obtención de datos no es sinónimo de poseer información; debemos interpretarlos y colocarlos en el contexto adecuado para convertirlos en información útil para el usuario. La quimiometría es la disciplina que tiene esta finalidad.

La palabra quimiometría fue acuñada hace aproximadamente cuarenta años. Svante Wold empleó por primera vez este término en el año 1972, produciéndose un rápido desarrollo desde sus inicios [1]. La quimiometría quiere resumir el concepto que engloba la medición en química. Se podría argumentar que, ciertamente, la medición en química siempre ha sido el campo de actuación de la química analítica. La quimiometría trata, específicamente, todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. La quimiometría utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines.

La evolución rápida y constante de las aplicaciones del infrarrojo cercano (NIR) así como de otras técnicas espectroscópicas en la investigación y en los análisis de rutina hubiesen sido imposibles sin el desarrollo paralelo de los métodos de evaluación quimiométricas.

Los espectros NIR se componen típicamente de una amplia superposición de bandas y por tanto, las bandas de absorción están mal definidas. El espectro NIR contiene información química y física de todos los componentes de la muestra. La información analítica multivariable se encuentra no diferenciada, por tanto, para realizar el análisis NIR cualitativo o cuantitativo, es decir, relacionar las variables espectrales con las propiedades del analito en estudio, también es necesario que se extraiga la información “relevante” y reducir la información “irrelevante”. Ello supone interferir en los espectros para extraer

los parámetros de interés y para esto requiere métodos de matemáticos y estadísticos como la quimiometría. Las técnicas multivariantes para el estudio cuantitativo se han abordado profundamente en múltiples libros y publicaciones [2-9].

Este capítulo está destinado a introducir las técnicas más significativas que han sido utilizadas en las distintas etapas del desarrollo de los modelos como por ejemplo: la selección de los espectros para calibración o validación, pretratamientos espectrales y en la elaboración de los modelos.

4.2. Etapas del desarrollo de modelos de calibración

4.2.1. Preparación conjunto de calibración o de entrenamiento

La elección de un conjunto de muestras adecuadas es un punto crítico para cualquier calibración. Este conjunto de muestras tiene que ser representativo de toda la variabilidad química y física del proceso de fabricación con la finalidad de tener métodos robustos.

En los modelos cualitativos se deberá recoger variabilidad de diverso tipo: tamaño de partícula, densidad, proveedor...; en cambio, para modelos cuantitativos, además de la variabilidad mencionada, se deberá cubrir el rango del parámetro a determinar, por ejemplo, la concentración de analito.

El espectro NIR no solo depende de la composición química de la muestra, sino también de algunas propiedades físicas, tales como el tamaño, la forma, la distribución de las partículas y el grado de compresión de la muestra. Esto es útil en algunos casos, ya que permite la determinación espectroscópica de algunos parámetros físicos de la muestra. Sin embargo, las diferencias físicas pueden dar lugar a efectos multiplicadores en el espectro que, junto con otros efectos aditivos como el cambio de línea de base o de la absorción química, si no se toman en cuenta, pueden complicar los modelos de calibración en detrimento de la calidad de los resultados del análisis cuantitativo.

INTRODUCCIÓN

Estos efectos pueden ser modelados para asegurar que el conjunto de calibración abarque todas las posibles fuentes de variabilidad en las muestras, que a su vez se puede asegurar mediante el uso de muestras que incorporen un rango amplio de las variables a analizar. Los lotes de producción de las preparaciones farmacéuticas presentan concentraciones de $\pm 5\%$ del valor nominal de API y concentraciones de excipientes cerca del valor nominal, mientras que la farmacopea recomienda que el conjunto de calibración incluya muestras en un rango de $\pm 20\%$ del valor nominal de API. En el capítulo de Blanco *et al.*[10] se recogen las diferentes estrategias que se han usado en el campo farmacéutico para cumplir con estas especificaciones:

- **Muestras de planta piloto:** una planta piloto que imita la planta de producción se utiliza para obtener un conjunto de muestras con características físicas similares a las del proceso de producción (granulación, compactación y recubrimiento) con la concentración de API que abarcan el rango requerido. Este procedimiento es bastante laborioso, costoso y no siempre accesible.
- **Muestras dopadas:** las muestras en polvo de producción pueden doparse con cantidades conocidas de API (*overdosed*) o bien con una mezcla de excipientes (*underdosed*) con el objetivo de obtener el rango deseado de concentraciones de principio activo. Las cantidades de API o excipientes añadidos suelen ser pequeños, por lo que los consiguientes cambios en las propiedades físicas de la muestra también son pequeños y su matriz se puede suponer que es esencialmente idéntica a la de la muestra de la producción. Este es un método eficaz, menos laborioso que el anterior y permite que el rango de API requerido se incorpore en las muestras para ser uniformemente distribuido.
- **Muestra de laboratorio:** se preparan pesando cantidades conocidas de principio activo y excipientes en el rango deseado de principio activo. Como estas muestras no contienen la variabilidad del proceso de producción es necesario añadir un número

suficiente de muestras de producción para que aporten esta variabilidad. Este procedimiento tiene algunas ventajas. Es menos laborioso y costoso que los dos anteriores, también las concentraciones de la muestra requerida se obtienen fácilmente. Sin embargo, las muestras sintéticas de laboratorio pueden diferir de las muestras de la producción real en algunas características físicas como consecuencia de las diferencias entre los dos procedimientos de preparación. Esto puede llevar a errores en la predicción de las muestras de producción, no obstante, se puede evitar mediante la inclusión de un número suficiente de muestras de producción en el conjunto de calibración.

- **Espectro proceso:** es una nueva estrategia para la construcción de un conjunto de calibración con el objetivo de cuantificar tanto el principio activo como los excipientes de un comprimido farmacéutico. Se basa en la preparación de las muestras de laboratorio a partir de un diseño de muestras y en la obtención de un conjunto de espectros proceso utilizando muestras de producción. Los espectros de proceso se obtienen por cálculo de la diferencia entre los espectros de comprimidos de producción y espectros de muestras de laboratorio con la misma concentración nominal. La adición de la matriz de espectros proceso a la matriz de espectros NIR de muestras en polvo preparadas por pesada de los componentes en el laboratorio proporciona un conjunto de espectros que cubre el dominio experimental de los comprimidos de producción [11].

La **Figura 4.1** recoge las estrategias para la preparación de los diferentes tipos de muestras del conjunto de calibración mencionados en las líneas anteriores y el tipo de variabilidad que recogen.

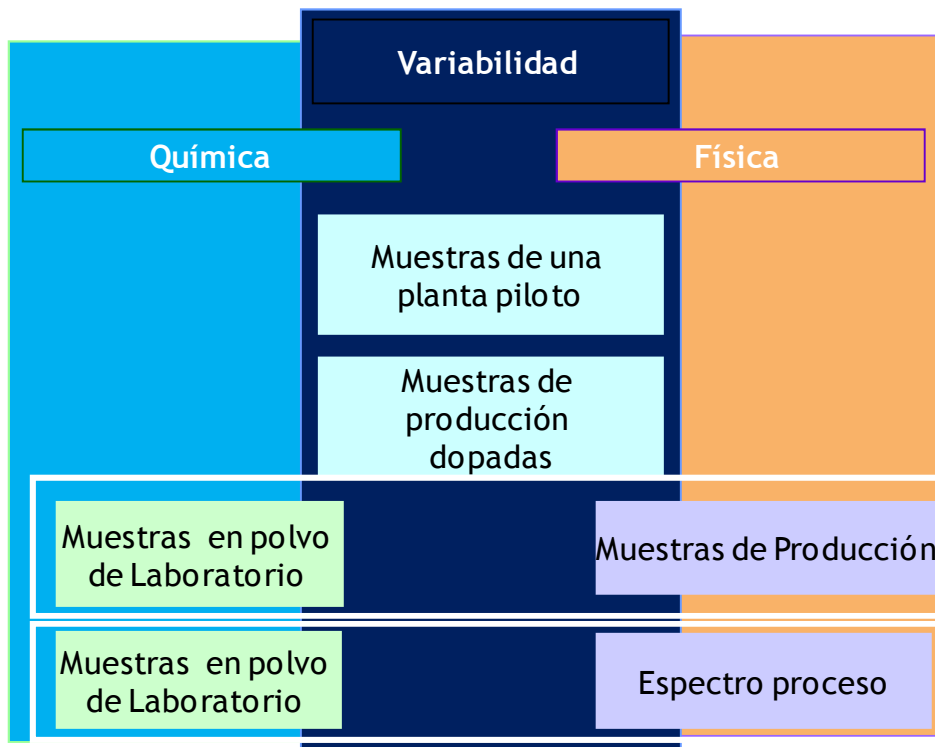


Figura 4.1 Esquema de las diferentes estrategias para construir un conjunto de calibración representativo de las muestras de producción [12].

4.2.2. Selección de un conjunto de calibración o de entrenamiento

Una vez preparadas el conjunto de muestras, se divide en dos subgrupos, es decir, el conjunto de calibración y el conjunto de validación. El primero se utiliza para construir el modelo de calibración y el segundo se usa para evaluar la capacidad predictiva del modelo.

- **Conjunto de entrenamiento o calibración:** son las muestras que formarán parte del desarrollo de la calibración, por lo que interesa que sean muestras que aporten variabilidad y robustez a la calibración.
- **Conjunto de validación:** se trata de muestras redundantes que no van a aportar variabilidad.

- **Conjuntos de anómalos o atípicos:** son muestras que se apartan del promedio global del conjunto total de muestras por diferentes razones. La detección de estas muestras y su posterior clasificación es muy importante, pues se puede tratar de muestras que pertenezcan a algún tipo de variedad distinta a las demás, de un espectro que hemos realizado con el equipo NIR sin estabilizar o averiado, de una muestra con una concentración fuera del rango seleccionado para la calibración, etc. La clasificación de estos conjuntos se hace representando cada muestra en un espacio multidimensional que representa los puntos de datos adquiridos. Dicha representación matemáticamente es muy compleja, por lo que aplicamos técnicas de representación en componentes principales PCA para poder reducir el número de dimensiones para hacerlo más manejable [13].

4.2.3. Determinación de los valores de referencia

Con el fin de construir un modelo de calibración, los valores de los parámetros a determinar se deben obtener mediante el uso de un método de referencia. La elección óptima será el método de referencia que proporcione la mayor exactitud y precisión posible.

4.2.4. Obtención y registro de datos

Para desarrollar un modelo de calibración, debemos “entrenar” al equipo NIR mediante la adquisición y almacenamiento de una serie de espectros de muestras de datos analíticos conocidos, habiendo sido analizados previamente por métodos tradicionales analíticos de referencia.

Es de gran importancia aportar variabilidad en la concentración del parámetro a analizar para poder obtener un rango adecuado de concentraciones sin dejar huecos que pudiesen afectar al cálculo de interpolación. El tiempo transcurrido entre el análisis de referencia y

el análisis por NIR debe de ser tenido en cuenta para, en caso necesario, almacenar la muestra lo mejor posible y evitar variaciones de humedad, color, etc.

Un punto a tener en cuenta para valorar los datos predichos por el NIR es conocer el denominado “Error de laboratorio”, el cual nos da una idea de la precisión y exactitud del proceso analítico utilizado en el cálculo del valor de referencia que se utilizará para el “entrenamiento” del NIR.

Comparar los datos estadísticos calculados por el NIR, con el error de laboratorio nos proporciona un dato importante a la hora de intuir cómo se va a comportar el modelo de calibración desarrollado. En esta tesis la información química y física se extraerá de los espectros NIR. Todas las muestras (calibración y predicción) deberán registrarse de la misma manera en el mismo equipo siguiendo el mismo protocolo de análisis. Previo al registro de cualquier muestra es necesario tomar un espectro de la placa cerámica que se utilizará como espectro de referencia. La idea es correlacionar un dato químico o físico, el suministrado por el método de referencia, con una banda o con todo el rango espectral NIR o con el desplazamiento del espectro [13]. Los espectros NIR se caracterizan por tener bandas anchas y solapadas, es por ello, que es necesario un posterior tratamiento quimiométrico de los datos para obtener la información de interés.

4.2.5. Pretratamiento de los datos

Antes de tratar de desarrollar una calibración se debe realizar una serie de tratamientos matemáticos destinados a corregir determinados fenómenos (dispersión, solapamiento de bandas, desviación de la línea base, ruido, etc.) que se observan en los espectros adquiridos en el NIR y a la vez que permita aumentar la relación señal/ruido y por ende acrecentar la señal correspondiente al analito de interés. Los más comunes son los siguientes:

INTRODUCCIÓN

- **Promedio de espectros:** el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce la contribución del ruido aumentando la relación señal/ruido espectral, ya que este es considerado aleatorio. Es un procedimiento muy usual en espectroscopia, siendo el espectro final el resultado de promediar un número determinado de espectros individuales.
- **Centrado de los datos:** se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta en cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables se encuentran ahora referidos a este centro.

$$X'_{i,m} = X_{i,m} - X_m \quad (\text{Ec. 4.1})$$

La fórmula se encuentra en la (Ec. 4.1) donde $X'_{i,m}$ es el dato centrado, $X_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del centrado y X_m es la media de la columna m [14].

- **Autoescalado de los datos:** posteriormente al centrado de cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la columna.

$$X'_{i,m} = \frac{X_{i,m} - X_m}{S_m} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

La fórmula se encuentra en la (Ec. 4.2) donde $X'_{i,m}$ es el dato autoescalado, $X_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del autoescalado, X_m es la media de la columna m y S_m es la desviación estándar de la columna [14].

- **Suavizado:** el suavizado espectral se aplica en aquellos casos en los que el promediado de espectros no es suficiente ya que la relación señal/ruido es pequeña. La eliminación de ruido de carácter no sistemático se hace a través de filtros mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) [15] o por Transformada de Fourier [16].

INTRODUCCIÓN

- **Variable normal estándar (SNV, *Standard Normal Variate*):** se trata de un “autoescalado” de los espectros, destinado a eliminar el efecto de dispersión (*scattering*) debido a efectos tales como el tamaño de partícula [18].

$$X_{i,m}^{SNV} = \frac{X_{i,m} - \bar{X}_i}{\bar{X}_i} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

La fórmula se encuentra en la (Ec. 4.3) donde $X_{i,m}^{SNV}$ es el valor de la absorbancia de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) una vez aplicado el pretratamiento, $X_{i,m}$ es el valor de la absorbancia original de la fila i (espectro i) y la columna m (variable m), \bar{X}_i es la absorbancia media del espectro i y \bar{X}_i es la desviación estándar de la fila i (espectro i).

- **Derivadas:** utilizando derivadas aumentamos la resolución espectral al aparecer nuevas bandas que se encontraban ocultas o semiocultas. También eliminan el efecto común en el NIR de desviación de la línea base. El uso de las derivadas debe hacerse con cierta precaución, ya que pueden dar lugar a corrimientos de las bandas y a aumentar el ruido. A pesar de estos problemas, las derivadas son una herramienta fundamental en el tratamiento de espectros NIR. La primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Los métodos de derivación más utilizados son el de Norris [17] y el de Savitzky-Golay [15], el cual incluye un suavizado previo a la derivación.
- **Análisis en componentes principales:** debido al gran número de variables correlacionadas (colinealidad) en los datos espectrales NIR, existe la necesidad de una reducción de las variables, es decir, resumir la variabilidad de los datos en algunas variables no correlacionadas que contienen la información relevante para el modelado de calibración. La técnica más conocida y más utilizada para reducción de variables es el análisis de componentes principales (PCA). Un PCA se basa en la reducción de la dimensionalidad de una matriz X , calculando un número inferior de nuevos ejes que expliquen la misma información original. Estos nuevos ejes se

INTRODUCCIÓN

nombrarán como Componentes Principales (PC, *Principal Components*). El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de las muestras; el segundo se escoge que sea perpendicular al primero, se explica la máxima variabilidad de la muestra una vez restada la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. En la **Figura 4.2** se puede apreciar un gráfico de la representación de los componentes principales. Para poder definir esos ejes matemáticamente se utilizan los cosenos de los ángulos que forman cada uno de los nuevos ejes con los ejes antiguos son los *loading* y las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes son los *score*.

El procedimiento de transformación se visualiza de forma esquemática en la **Figura. 4.2** sobre la base de tres variables originales, es decir, tres longitudes de onda por espectro [5].

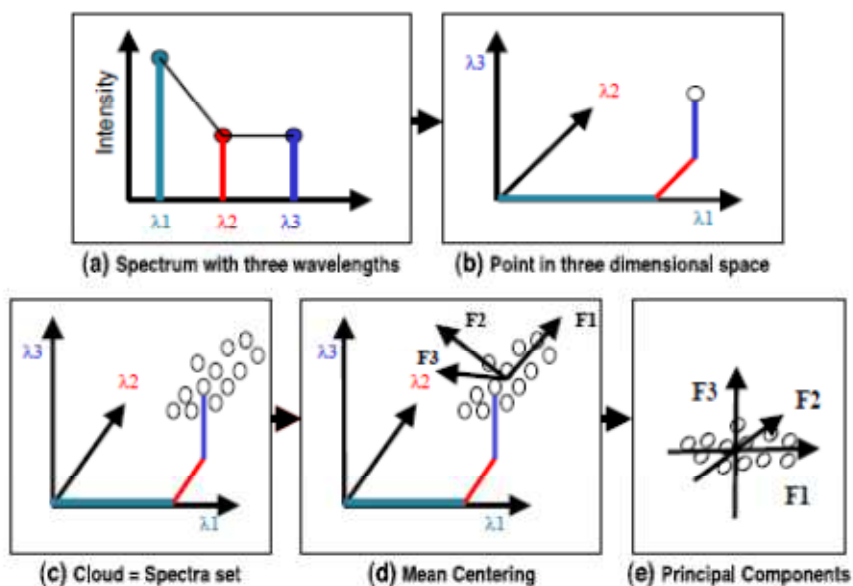


Figura 4.2 Transformación de un espectro con tres variables, es decir, longitudes de onda (a) a un nuevo sistema de coordenadas con un eje para cada longitud de onda convirtiendo así el espectro en un solo punto en un espacio tridimensional (b), la formación de nubes de varios espectros (c), con una media de centrado (d), y la determinación de los componentes principales de F_1 , F_2 y F_3 (e).

INTRODUCCIÓN

Consideremos la matriz X de datos, donde cada fila corresponde al espectro de cada muestra m y cada columna a la absorbancia a una longitud de onda k . Matemáticamente, las m muestras representan puntos en el espacio de dimensión k . Normalmente, se dispone de un número elevado de muestras m y de un número elevado de longitudes de onda k . Con lo que la matriz X está formada por $m \times k$ valores de absorbancia.

Numéricamente, la matriz de datos X se descompone en el producto de dos matrices: una de *scores*, T , y una de *loadings*, P , quedando un residual representado por la matriz E (Ec. 4.4).

$$X = TPt + E \quad (\text{Ec. 4.4})$$

T son las coordenadas de cada punto en el nuevo espacio definido por los PC y P son los cosenos de los ángulos formados entre los ejes originales y los nuevos PC. El conjunto de datos X queda definido por un nuevo conjunto de variables (PC) no correlacionadas entre sí y en un nuevo sistema de ejes ortogonales. Uno de los gráficos que se obtiene es el llamado gráfico de *scores*, el cual es un conjunto de puntos (muestras) representado en un nombre reducido de ejes.

Un aspecto fundamental en un PCA es la elección del número de componentes principales que contienen la información relevante del sistema en estudio. Se han descrito diferentes procedimientos para la estimación del número de componentes principales significativos. El más habitual es representar la varianza explicada (o varianza residual) en función del número de PC y escoger el número mínimo para el cual no se encuentra mejora significativa. Esta elección puede hacerse por simple visualización del gráfico o bien aplicando un test F al cociente de las varianzas. En cualquier caso, el número de componentes escogido debe tener sentido químico y debe ser coherente con lo que se observa en el gráfico [14].

4.2.6. Construcción y evaluación del modelo quimiométrico

La construcción del modelo quimiométrico seleccionado (cualitativo o cuantitativo) se realiza con un conjunto de muestras llamadas de calibración. Durante el desarrollo del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo (pretratamiento, intervalo espectral, umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros).

La evaluación del modelo se lleva a cabo mediante la aplicación de este a un conjunto de muestras conocidas (para modelos cualitativos se conoce su identidad y para cuantitativos se conoce el valor de la propiedad a determinar). Este nuevo conjunto de muestras debe ser independiente al anterior. Si los resultados de predicción no son satisfactorios, el modelo debe ser recalculado [19].

4.3. Análisis cualitativo

Una de las grandes ventajas de la utilización de la tecnología NIR es su uso en la identificación de materias primas. Para ello, se realiza una “Librería” con todos los productos que nos interese introducir. Esto se hará con muestras cuya aceptación esté garantizada con los métodos de referencia usados comúnmente.

Una vez que hayamos introducido, al menos cinco muestras en todos los productos, se realizan tratamientos matemáticos para discriminarlos todos sin ningún tipo de conflicto o ambigüedad. El método más sencillo para realizar una discriminación entre productos de una biblioteca es el de correlación, combinado con tratamientos matemáticos tales como la segunda derivada, la cual resalta las posibles diferencias entre los diferentes productos. Fijaremos un umbral de correlación global (normalmente 0.90 o 0.95) para poder identificar las muestras desconocidas según su similitud a los diferentes productos de la “Librería”. En caso de muestras de características muy similares, debemos subir el índice de correlación o recurrir a otros métodos matemáticos basados en cálculos de distancias o varianza residual.

Al realizar “Librerías” se pueden asociar métodos cualitativos a los productos. Distintos métodos, aparte de la identificación, realizarán una calificación o, lo que es lo mismo, controlarán que la muestra cumpla unos requerimientos de calidad establecidos. Algunos de ellos podrían ser la determinación del tamaño de la partícula, humedad, polimorfismo, etc. [20].

4.4. Análisis cuantitativo

El objetivo de la calibración multivariable es la determinación simultánea de varios analitos o de un único analito en presencia de una matriz compleja que participa en la señal analítica. Los métodos de regresión multivariables más establecidos son: regresión lineal múltiple (MLR); regresión en componentes principales (PCR) y regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS).

4.4.1. Regresión lineal Múltiple (MLR)

Partiendo del “Conjunto de calibración”, se desarrollará una recta de regresión en la que la concentración de analito está correlacionada con el valor de absorbancia proporcionado por el NIR a una o más longitudes de onda. En el caso de utilizar una sola longitud de onda sería lo que conocemos como “Regresión lineal simple” (SLR). En el caso de más de una se conoce como “Regresión lineal múltiple” (MLR).

La diferencia entre el valor de laboratorio y el valor predicho por el NIR, es lo que se conoce normalmente como “residual”. Los valores estadísticos que nos indican lo buena que puede ser la recta de regresión están basados en parte en estos valores de residuales. Uno de ellos es el “SEC” o “Error Estándar de calibración”. Otro dato que nos aporta información sobre la calidad del modelo de calibración es el “R cuadrado”. Este coeficiente es muy importante pues determina qué porcentaje (en tantos por uno) de la varianza de la variable dependiente es explicado por el modelo de regresión.

INTRODUCCIÓN

Para comprobar la eficacia del modelo de calibración se utilizan métodos de validación, donde se dispone de un conjunto de muestras (no incluidas en la calibración) de las cuales conocemos su valor analítico de referencia. El modelo de regresión nos dará unos valores de predicción y basándose de nuevo en los residuales obtenidos el dato “SEP” o “Error estándar de predicción”, que es un dato más real del comportamiento del modelo de regresión al implantarse en métodos de rutina.

El problema que puede aparecer en las “Regresiones lineales múltiples” es el de la “Colinearidad”, la cual se produce cuando dos o más de las longitudes de onda usadas en la calibración están correlacionadas. Esto afecta a la precisión de los valores a determinar, lo cual hará que la predicción tenga poca precisión, entre otras cosas por ser muy sensible al ruido o errores de tipo sistemático que no sean representativos de la muestra [2].

4.4.2. Regresión en componentes principales (PCR)

La regresión por componentes principales es un método que aplica mínimos cuadrados sobre un conjunto de variables artificiales, llamadas componentes principales y que son obtenidas a partir de la matriz de correlación.

PCR es una manera de tratar con el problema de colinealidad en los datos y permite una reducción del error aleatorio (ruido) al eliminar los componentes principales que menor varianza explican en los datos. En general, establece una regresión entre los *scores* de una matriz X y los valores de una matriz Y . Este método consta de dos etapas. En la primera etapa se efectúa la reducción de variables mediante un PCA. En la segunda se utilizan los componentes obtenidos de la matriz X y se realiza una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los *scores*, en lugar de realizarla sobre los datos originales con lo que se elimina cualquier problema en la inversión de la matriz.

Una vez establecido el modelo de calibración, se puede predecir el valor de la (s) variable (s) independiente (s) en un conjunto de nuevas muestras. Las muestras de predicción X^* son proyectadas en el espacio de las componentes principales, con lo que se obtiene su

matriz de *scores* T^* y, por último, se utiliza la matriz de regresores calculada en la calibración y se obtiene la propiedad a determinar en las muestras desconocidas [21,22,23].

4.4.3. Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS)

La regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) generaliza y combina características del análisis de componentes principales y análisis de regresión múltiple. Es utilizado para estudiar la estructura de covarianza entre los espacios correspondientes a dos matrices X y Y , para predecir un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto grande de variables independientes. Cada dirección en estos espacios es representada por un “factor” o variable latente, ya que la suposición básica de todos los modelos PLS es que el sistema o proceso estudiado depende de un número pequeño de variables latentes (VL). Así, al finalizar los cálculos de PLS se obtendrán *loadings* y *scores* para cada uno de los espacios X y Y .

En PLS, a diferencia de PCR, las variables latentes son determinadas considerando conjuntamente X y Y . Para la regresión PLS, cada componente se obtiene maximizando el cuadrado de la covarianza entre Y y las posibles combinaciones lineales de X . De este modo, se obtienen los “factores” que contienen la información de la correlación entre las matrices X y Y , presentando una relación más directa con la respuesta, de manera que los primeros “factores” concentran mayor información predictiva.

Se debe tener especial cuidado a la hora de ir añadiendo “factores” a la calibración, ya que cuando mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluido en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo la complejidad del modelo aumenta. Es por ello que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener un modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Para ello hay valores estadísticos para determinar el número de factores adecuados.

INTRODUCCIÓN

En el caso de calcular una sola propiedad a determinar de la matriz Y el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se puede considerar una simplificación del algoritmo global conocido como PLS2, en el cual se realiza la determinación simultánea de n variables [3,14,24].

- **Elección del número de componentes principales**

La elección del número de componentes principales (PC) o factores es un punto clave en cualquier técnica de calibración donde se realice una compresión de variables, ya que el modelo ha de incorporar la información relevante pero ha de excluir el ruido. La forma más común de seleccionar el número de factores adecuado es utilizar algún parámetro estadístico como el PRESS (Ec. 4.5) o la varianza explicada.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i) \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Cuando el número de muestras es relativamente pequeño, la metodología a seguir es la denominada validación cruzada (*Cross Validation*), para la cual el conjunto de calibración es dividido en determinados grupos de muestras para después ocultar uno de ellos y realizar la calibración con el resto de las muestras, a continuación se hace la predicción de las muestras ocultas. Este proceso se repite hasta completar la ocultación y predicción de todos los grupos. Esto se realiza para cada factor. Un valor estadístico que indica la fiabilidad del modelo de calibración es el MSECv (*Mean squared error of prediction by cross validation*) [25] (Ec. 4.6).

$$\text{MSECv} = \frac{\sum_{i=1}^M (\hat{y}_i - y_i)^2}{M} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Donde M es el número de muestras de calibración, \hat{y}_i es el valor calculado por el modelo e y_i el valor de referencia. Así, se puede seleccionar M números de factores representando el valor de MSECv frente al número de PC y buscar el mínimo. Se parte de la idea de que

INTRODUCCIÓN

el error disminuye al aumentar el número de PC que se utilizan en el modelo hasta que llega un momento en que los nuevos PC introducidos únicamente explican ruidos y el MSECv vuelve a aumentar debido al sobreajuste del modelo. Otro criterio para establecer el número de factores es la seleccionar aquel que proporcione un menor error en predicción. El RSE (relative standard Error) (Ec. 4.7) y el RMSE (Root Mean Square Error) (Ec. 4.8), ha sido utilizado para evaluar los errores de calibración y predicción, definido como RSEC(%) y RMSEC para calibración y RSEP(%) y RMSEP para predicción, seleccionado el número de factores en función del error de predicción.

$$RSE(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^M y_i^2}} \quad (\text{Ec. 4.7})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (\hat{y}_i - y_i)^2}{M}} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Siendo M el número de muestras, y_i los valores de referencia e \hat{y}_i los valores predichos por el modelo. El RMSE puede ser considerado como el error medio obtenido en el proceso de modelado y está expresado en las mismas unidades que los datos de referencia

4.5. Validación de los métodos NIR

La validación de un método analítico tiene como finalidad el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos. En la **Tabla 4.1** se enumeran las características consideradas como las más importantes para la validación de los diferentes tipos de procedimientos analíticos, tal como se define en la directriz ICH Q2A "Texto de validación de procedimientos analíticos " y otras guías para la validación para métodos analíticos [26,27,28].

INTRODUCCIÓN

Tabla 4.1 Requerimientos para la validación por métodos NIR.

ICH Q2A Parámetros de validación	Tipo de procedimiento NIR			
	Identificación	Cualificación	Cuantificación	
			Componentes principales	Impurezas /Componentes minoritarios
Selectividad	+	+	+	+
Linealidad	-	-	+	+
Rango	-	-	+	+
Exactitud	-	-	+	+
Precisión				
-Repetibilidad	-(a)	+(a)	+	+
-Precisión intermedia	-	-	+ (b)	+(b)
Robustez	+	+	+	+
Límite de detección (LD)	-	-	-	-
Límite de cuantificación (LQ)	-	-	-	+

-significa que esta característica no se evalúa normalmente.

+significa que esta característica se evalúa normalmente.

(a) No se requiere normalmente para los métodos de identificación. Para los métodos de cualificación, la repetibilidad es dirigida con el fin de demostrar que los límites de aceptación establecidos proporcionan la discriminación confiable entre materiales aceptables e inaceptables, por lo tanto, el enfoque es conceptualmente diferente de los métodos NIR en comparación con los métodos convencionales.

(b) En los casos en que ha sido la reproducibilidad realizada, precisión intermedia no es necesario.

4.5.1. Selectividad

La selectividad es la habilidad de un método analítico de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc. ICH

diferencia dos categorías en la evaluación de la selectividad: para test de identificación y para métodos cuantitativos.

- Identificación: es la confirmación de la identidad de la muestra en cuestión. Una correcta identificación debe ser capaz de discriminar entre dos muestras espectralmente muy parecidas.
- Métodos cuantitativos: estos incluyen el ensayo del contenido y la determinación de impurezas. Cuando se pretende validar un método cuantitativo es necesario también evaluar su selectividad.

En espectroscopia NIR la selectividad suele determinarse mediante la identificación del fármaco a través de una biblioteca construida a partir de muestras cuya identidad se conoce por otros métodos. Estas bibliotecas contienen los productos a analizar, junto con otros productos, componentes y placebos de los mismos, los cuales debe ser capaz de diferenciar. Con esto se garantiza que las muestras que van a ser cuantificadas son las que han sido identificadas correctamente.

4.5.2. Linealidad

Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. En las calibraciones univariadas la linealidad se evalúa mediante una relación lineal entre la señal y la concentración. En las calibraciones multivariadas se valora la relación lineal entre el valor de referencia y el valor estimado de la propiedad. Se recomienda tener un mínimo de cinco niveles de concentración que cubran todo el rango. El intervalo de la linealidad abarca el ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. Las guías ICH aconsejan cubrir intervalos de 80-120 % para el análisis cuantitativo de productos acabados y 70-130 % para los test de uniformidad de contenido (porcentajes referidos

sobre la concentración nominal del analito determinado). En espectroscopia NIR el intervalo dependerá también en gran medida de la finalidad del método. En cada caso se debe evaluar que el intervalo establecido sea el adecuado.

4.5.3. Exactitud

Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. Se recomienda realizar un mínimo de nueve determinaciones, cubriendo tres niveles de concentraciones (3 niveles x 3 replicados). Un test t de las diferencias entre los valores reales y el encontrado permite confirmar la exactitud del método.

4.5.4. Precisión

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de resultados obtenidas de múltiples análisis de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede ser calculado como la desviación estándar relativa o coeficiente de varianza (%). Se consideran tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- Repetibilidad: precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en el mismo equipo. Se evalúa con un mínimo de nueve determinaciones a tres niveles de concentración o con un mínimo de seis determinaciones al 100 % de la concentración nominal.
- Precisión intermedia: precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea. Se evalúa la influencia de estos factores mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y se expresa el resultado con el coeficiente de variación global (%).

- Reproducibilidad: expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios inter laboratorios diseñados para estandarizar la metodología.

4.5.5. Límite de detección (LD)

Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito. La determinación de este valor depende de la naturaleza del método de análisis y existen diversas aproximaciones estadísticas basadas en la relación señal/ruido o bien a través de los parámetros de la ecuación de calibración

4.5.6. Límite de cuantificación (LQ)

Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.

4.5.7. Robustez

Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

4.6. Trabajo en rutina

La idea final de todo el proceso de creación de un modelo de calibración es el desarrollo de un método para trabajo en rutina. Se trata de analizar las muestras que entran a diario en nuestro laboratorio en el equipo NIR, usando las ecuaciones desarrolladas para los diferentes productos. Obtendremos, en aproximadamente un minuto, el valor de concentración de todos los parámetros para los que fue desarrollado al ecuación. En un

INTRODUCCIÓN

método de rutina veremos también resultados de tipo “pasa” o “falla”, para informarnos de la calidad del producto una vez establecidos sus límites. Todo ello podrá ser acompañado de gráficos de control de la evolución de los resultados, fijando si se desean umbrales de activación de señales de aviso o acción.

REFERENCIAS

1. P. Geladi, K. Esbensen, The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part 2. *J. Chemometrics* 4 (1990b) 389-412.
2. H. Martens, T. Næs, *Multivariate Calibration*. (1989) John Wiley & Sons, Chichester.
3. M. J. Adams, *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, (1995). Royal Soc. Chem. Cambridge.
4. R. Kramer, *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*. (1998) Marcel Dekker.
5. K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz, *Chemometrics: A Practical Guide*, (1998) John Wiley & Sons, New York.
6. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry, *Analyst* 123 (1998) 135R-150R.
7. J.H. Duckworth, Spectroscopic quantitative analysis. En *Applied spectroscopy. A compact reference for practitioners*. (1998) 1ª edición. Eds. J. Workman, A. Springsteen. Academic Press, San Diego 93-190.
8. H. Mark, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. (2000) 1ª edición. Ed. R.A. Meyers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 13587-13606.
9. H.M. Heke, R. Winzer, Chapter 7: Chemometrics in Near-Infrared Spectroscopy. En *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, instruments, Applications*, (2002) 1ª edición. Eds. H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
10. M. Blanco, M. Alcalà. Use of near-infrared spectroscopy for off-line measurements in the pharmaceutical industry. En *Process Analytical Technology*. (2005), 1ª edición. Ed. K. A. Bakeev. Blackwell Publishing. Oxford. UK.
11. M. Blanco, A. Peguero Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 10 1127-1136.
12. A. Peguero, M. Blanco, Tesis doctoral: La Espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados (2010).

13. J.R. Cuesta, Fundamentos de la tecnología NIR. Instrumentación y aplicaciones en la industria alimentaria. En Nuevas tecnologías para el control de proceso y de producto en la industria alimentaria (2005) 1ª edición. Eds. F. Rondas Balbás, P.A. Caballero Calvo, M. Gómez Pallarés, C.A. Blanco. Secretaria de publicidad e intercambio editorial Universidad de Valladolid.
14. J. Coello, S. Maspoch capítulo 6: Calibración multivariable. En Temas avanzados de Quimiometría. (2007) 1ª edición. Eds. M. Blanco, V. Cerdá. Servicio de publicaciones y intercambio científico. Universidad de las Islas Baleares. Spain.
15. A. Savitzky, M.J.E. Golay. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. Anal. Chem. (1964) 36 1627.
16. G. Horlick. Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. Anal. Chem. 44 (1972) 943.
17. K.H. Norris, P.C. Williams. Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. Influence of particle size. Cereal Chemistry. 61 (1984) 158.
18. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister. Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra. Appl. Spectrosc. 43 (1989) 772.
19. H. Mark, Data analysis: Multilinear regression and principal component analysis, En Handbook of Near-Infrared Analysis, (2001) 2ª edición. Eds. D.A. Burns, E.W.Ciurczak. Marcel Dekker Inc., New York/Basel 129-184.
20. R. Watt, The characterization of herbal natural products-NIR spectroscopy back to its roots. Eur. Pharm. Rev. 4(2) (1999) 15-19.
21. T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, A.M.C. Davies, A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. (2002) NIR Publications, Chichester, UK.
22. E.V. Thomas, D.M. Haaland, Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. Anal. Chem. 62 (1990) 1091-1099.

INTRODUCCIÓN

23. A.M.C. Davis, The better way of doing principal component regression. *Spectrosc. Eur.* 7 (1995) 36-38.
24. J.C.V. Vilca, Generalizaciones de Mínimos Cuadrados Parciales con aplicación en Clasificación Supervisada. (2004) Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.
25. S. Wold, Cross Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models. *Technometrics* 20 (1978) 397-405
26. ICH Quality Guidelines for Method Validation, Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures, and Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, November 1996, FDA (<http://www.ifpma.org/ich5.html>).
27. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf> (2003) Note for guidance. The European Agency for the Evaluation of medical products.
28. PASG Guidelines for the Development and Validation of Near Infrared (NIR) spectroscopic methods (2001) 1-39 (<http://www.pasg.org.uk/NIRmay01.pdf>).

OBJETIVO

OBJETIVO

5. Objetivo de la tesis

La industria farmacéutica tiene como objetivo la fabricación de medicamentos y también asegurar que estos sean de calidad, seguros y eficaces. Los métodos utilizados para cumplir estos objetivos son lentos y poco seguros, lo que ha conducido a una insuficiente productividad de la empresa con la consiguiente pérdida de competitividad.

Con el objeto de superar estas deficiencias se ha planteado una nueva iniciativa, conocida como Tecnología Analítica de Procesos (PAT), que consiste en el seguimiento durante el proceso de producción de atributos críticos que tienen una influencia capital en el conocimiento del proceso productivo y en la calidad del producto final. Estos atributos pueden ser de naturaleza distinta, tanto físicos como químicos, y por tanto su seguimiento y control puede exigir la aplicación de diferentes técnicas instrumentales, que deben aplicarse a lo largo de la producción, desde las materias primas a los intermedios de fabricación hasta alcanzar el producto final con el propósito de controlar todo el proceso.

De este modo se asegura la calidad de los productos finales y aumenta la eficiencia de los procesos de producción ya que la calidad se construye a lo largo de todo el proceso.

Los métodos tradicionales de análisis consumen un tiempo considerable, son laboriosos y costosos y, por consiguiente, poco adecuados para realizar determinaciones en el proceso.

La incorporación de modernas tecnologías analíticas que la industria actual necesita, y cada vez con mayor urgencia, con nuevos métodos de análisis simples, rápidos, fiables, de bajo coste y que sean fáciles de aplicar en las etapas productivas, constituyen la respuesta adecuada al reto actual para la aplicación de PAT. De todas ellas, principalmente técnicas espectroscópicas vibracionales, la espectroscopía NIR se ofrece como técnica idónea para el control de la calidad, ya que es una técnicas analítica que nos permite obtener simultáneamente resultados de varios parámetros de una manera rápida, no destructiva,

OBJETIVO

sin preparación de muestra, robusta y aplicable en distintos tipos de muestras durante el proceso, lo que permite su utilización en la monitorización de las diferentes etapas de un proceso.

El objetivo de esta tesis es desarrollar nuevos métodos analíticos basados en la espectroscopia NIR en diferentes aplicaciones y la espectroscopia Raman en estudios de homogeneización, capaces de ser utilizados en el control y monitorización de parámetros relevantes para el control del proceso y establecimiento de la calidad de los productos finales tanto químicos como físicos y de esta manera mejorar el conocimiento y la comprensión de los procesos, la calidad del producto final y actuar sobre el mismo en el caso que sea necesario. Para alcanzar este objetivo, con la aplicación de métodos quimiométricos imprescindibles para extraer la información de interés de los datos NIR, se desarrollaran nuevos modelos cualitativos y cuantitativos para la determinación de aquellos parámetros físicos relevantes (distribución de tamaño de partícula, tamaño de partícula, presión de compactación, etc.) durante el mezclado, granulación y productos terminado, así como la composición química en las diferentes etapas del proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos. Se prestará especial atención al desarrollo de metodologías fáciles de implementar en un proceso industrial (monitorización) sin necesidad de extraer muestras para analizar en el laboratorio.

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6. Metodología

6.1. Introducción

La industria farmacéutica necesita determinar numerosos parámetros fisicoquímicos de forma eficiente, rápida y fiable, tanto en materias primas como los productos intermedios y finales, en un sentido amplio el proceso de fabricación, para asegurar que el producto que se pone a la venta cumpla todos los requisitos que exige la población y la normativa vigente. Para poder asegurar estos niveles de calidad, la industria farmacéutica se ve obligada a utilizar una gran variedad de técnicas fisicoquímicas y de distintas metodologías que desde el punto de vista de la productividad tienen limitaciones por los elevados tiempos de análisis, consumo de reactivos, pretratamientos laboriosos y largos, así como resultados que pueden depender de la habilidad y experiencia del analista.

Con el objetivo de brindar técnicas rápidas, eficientes, fiables y de bajo coste, en esta tesis se desarrollan nuevas metodologías NIR de aplicación en las diversas etapas del proceso de producción de fármacos que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos. En los apartados que siguen a continuación, se describen las características más relevantes de las metodologías empleadas en el desarrollo de los nuevos métodos propuestos: los distintos tipos de muestras analizadas y las formas de preparación en el laboratorio, el registro de los espectros NIR, la obtención de la propiedad analítica de interés mediante los métodos de referencia y el procesamiento de los datos.

6.2. Descripción y preparación de muestras

Las muestras estudiadas pertenecen a las diferentes etapas de producción de sólidos farmacéuticos: polvos, granulados y comprimidos.

METODOLOGIA

Las muestras se extrajeron de cada una de las etapas de producción o preparadas en el laboratorio. Debido a que la variabilidad máxima indicada en las farmacopeas para los productos farmacéuticos es de $\pm 5\%$ de la concentración del valor nominal del API, es necesaria la preparación de un conjunto de muestras de laboratorio que cubran el rango de las propiedades analíticas de interés y así obtener calibraciones correctas y robustas. Con este fin, se han mezclado cantidades conocidas del principio activo y excipientes, cubriendo el rango de concentraciones deseadas. La determinación de los parámetros de interés a partir del espectro NIR se ha realizado mediante modelos de calibración multivariados.

A continuación se hace una descripción más detallada de las muestras utilizadas y de la preparación de estas en cada uno de los trabajos realizados.

6.2.1. Muestras de producción y/o laboratorio

Se han preparado muestras que se han utilizado en la construcción de modelos para tres especialidades farmacéuticas y etapas productivas distintas: paracetamol 1g. (granulados, comprimidos), irbesartan 300mg. (comprimidos) y mezclas farmacéuticas (polvo).

6.2.1.1. Mezclas farmacéuticas para monitorizar la homogeneidad

- **Mezcla para el estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final**

La preparación farmacéutica está constituida por finasteride como API a una concentración nominal de 3.3 % (p/p), dos excipientes mayoritarios, lactosa a 50 % (p/p) y avicel® a 27 % (p/p) y tres excipientes minoritarios: dodecil sulfato de sodio, sepistab st200®, primojel® (C, D y E) que representan menos del 25% en combinación.

Las mezclas de las muestras preparadas en laboratorio se han realizado colocando los diferentes componentes de la preparación farmacéutica en un vaso de precipitado para

METODOLOGIA

luego ser mezclado con un agitador a 43 RPM. Se registraron un total de doce procesos de mezcla, la concentración de API para cada experimento estuvo comprendida entre el 90 y 110 % del valor nominal. Seis mezclas en conjunto con diez mezclas (preparadas para este fin) se utilizaron para el modelo de calibración PLS, y las seis mezclas restantes se utilizaron para probar diferentes tratamientos y predecir la concentración del API durante el proceso de mezclado.

- **Mezcla para la comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman**

El proceso de mezclado se realizó utilizando diferentes mezclas de ácido acetilsalicílico (AAS) como principio activo API, almidón y sacarosa como excipientes. El mezclado se realizó en un vial de 10 ml de volumen, el cual simuló un mezclador rotativo. Con la finalidad de realizar el mezclado y asegurar la reproducibilidad de los experimentos, se utilizó un mini robot mezclador. Se prepararon 2 grupos de 11 mezclas a diferentes concentraciones de los componentes (Tabla 6.1), uno para NIR y otro para Raman.

Tabla 6.1 Valores teóricos para los dos grupos de mezclas preparados para la supervisión del mezclado por espectroscopia NIR y Raman.

Mezcla	AAS (API) (% p/p)	Almidón (% p/p)	Sacarosa (% p/p)
1	6.0	75.0	19.0
2	6.0	75.0	19.0
3	5.5	72.5	22.0
4	5.5	75.0	19.5
5	5.0	75.0	20.0
6	5.0	72.5	22.5
7	5.0	75.0	20.0
8	4.5	75.0	20.5
9	4.5	75.0	20.5
10	4.0	75.0	21.0
11	4.0	72.5	23.5

Debido a la configuración de los equipos, no fue posible realizar las dos medidas simultaneas, por lo que los experimentos con cada técnica espectroscópica se realizaron por separado. El orden en el que se añadieron los componentes fue siempre el mismo:

METODOLOGIA

primero el API, seguido del almidón y la sacarosa. Los componentes se añadieron con el vial en posición vertical. El total de muestra para cada proceso fue de 6 gramos ($\pm 60\%$ del volumen del vial). A continuación se colocó el vial en posición horizontal (**Figura 6.1**). La velocidad de rotación fue fijada a 23 rpm para todos los experimentos. La rotación del vial se realizó en ambas direcciones, es decir 2 vueltas a la derecha y 2 a la izquierda sucesivamente. Todos los procesos fueron detenidos después de 25 min de mezclado.

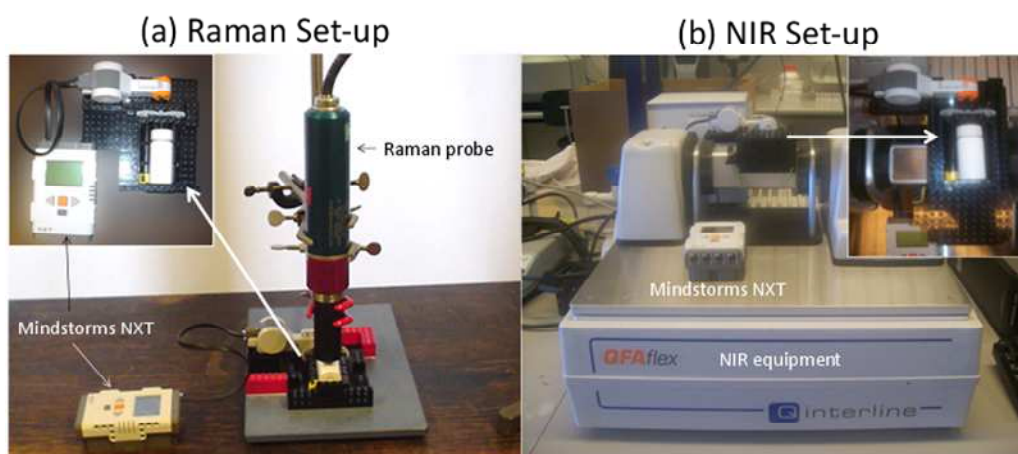


Figura 6.1 Mini robot mezclador y los equipos utilizado para mezclar las mezclas por (a) Raman y (b) NIR.

6.2.1.2. Granulados y comprimidos de paracetamol 1g

- **Muestras de producción**

Los granulados y comprimidos de producción están compuestos por el principio activo paracetamol (898 mg/g) y como excipiente mayoritario el almidón pregelatinizado (87 mg/g) y como excipientes en menor concentración: ácido esteárico (5 mg/g) y Povidona (10 mg/g)

- **Muestras de laboratorio**

Se han preparado un total de 26 mezclas por pesada con todos los ingredientes presentes en la formulación de las muestra de producción y con un rango de concentraciones del principio activo entre el 80 % y el 111 % del contenido nominal de paracetamol (898 mg/g).

La concentración de 111 % representa el paracetamol puro. El alto valor de concentración del API y la baja concentración de dos excipientes impide aplicar un diseño experimental para preparar muestras con una baja correlación entre las concentraciones. Después de la pesada de los componentes, las mezclas fueron homogenizadas durante treinta minutos en un mezclador de sólidos.

Los granulados de laboratorio fueron preparados a partir de las mezclas en polvo. Para ello, se pulverizó agua sobre las mezclas en polvo, se agitó la mezcla húmeda con una espátula para formar gránulos y después se secaron en una estufa de vacío a 60°C durante tres horas; posteriormente, se redujo el tamaño de partícula de los gránulos secos con la ayuda de un mortero hasta un tamaño de partícula semejante al del granulado de producción.

Con las muestras granuladas se prepararon comprimidos de laboratorio, tomando aproximadamente 1g. de la muestra en polvo y comprimiéndola en una prensa Perkin-Elmer aplicando un rango de presiones comprendido entre 195 y 215 MPa (muestras utilizadas en el modelo de cuantificación de API en comprimidos de paracetamol 1g).

Por otro lado, se prepararon otros comprimidos de laboratorio a partir de granulado de producción a las cuales se le ha adicionado cantidades conocidas de API y/o excipientes, es decir, sobre dosificar y subdosificar para obtener muestras de ± 5 % respecto al valor nominal de API con un rango de presión de compactación de 74 a 370 MPa (muestras utilizadas en el modelo de determinación de presión de compactación en comprimidos de paracetamol 1g).

6.2.1.3. Comprimidos de irbesartan 300 mg

- **Muestras de producción**

Los comprimidos de irbesartan 300 mg son comprimidos cilíndricos sin recubrimiento de color blanco, compuestos por irbesartan (59.29 % p/p) como principio activo y como excipientes mayoritarios Lactosa (19.76 % p/p) y Avicel pH 102 ® (10.97 % p/p) y como

METODOLOGIA

excipientes en menor concentración: PVP 25 ® (2.96 % p/p), Croscarmelosa sódica (2.67 % p/p), Estearil fumarato de sodio (2.57 % p/p) y Aerosil 200 © (1.78 % p/p).

- **Muestras de laboratorio**

Para los modelos de irbesartan 300 mg. se han preparado un total de treinta mezclas de laboratorio preparadas por mezcla de las cantidades pesadas de los componentes en polvo, cubriendo un rango de concentraciones de ± 20 % del valor nominal del API (guía ICH) [1]. Para la obtención del conjunto de muestras, se realizó un diseño D-optimal con el objeto de reducir al mínimo la correlación entre los valores de concentraciones. Los valores de correlación entre las concentraciones estudiadas se recogen en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2 Coeficientes de correlación entre las concentraciones de los diferentes componentes de las mezclas de laboratorio para irbesartan 300 mg.

Coeficiente de correlación	Irbesartan	Lactosa	Avicel pH 102	PVP 25	Croscarmelosa sódica	Aerosil 200	Estearil Fumarato de sodio
Irbesartan	1	-	-	-	-	-	-
Lactosa	0.32	1	-	-	-	-	-
Avicel pH 102	0.23	0.20	1	-	-	-	-
PVP 25	-0.99	-0.39	-0.29	1	-	-	-
Croscarmelosa sódica	-0.99	-0.40	-0.28	0.99	1	-	-
Aerosil 200	-0.99	-0.38	-0.29	1.00	0.99	1	-
Estearil Fumarato de sodio	-0.99	-0.40	-0.28	0.99	1.00	0.99	1

6.2.2. Preparación del conjunto de calibración/validación

El uso de la espectroscopia NIR para la determinación de principios activos y excipientes en una formulación farmacéutica requiere disponer de un conjunto de muestras de calibración

de concentraciones conocidas. La obtención de un conjunto de calibración representativo es la principal dificultad con que se enfrenta el analista.

Este conjunto de muestras debe cumplir los siguientes requisitos: 1) el rango de concentraciones debe ser lo suficientemente amplio para poder predecir muestras con concentraciones anómalas, 2) las muestras de calibración deben recoger la variabilidad (tanto física como química) del proceso productivo. La obtención de un conjunto de muestras procedentes de la producción que cumplan el primer requisito, es prácticamente imposible, ya que el proceso farmacéutico está optimizado para la obtención de un producto que cumpla con las especificaciones, por lo que normalmente las variaciones en contenido de principio activo y excipientes no van más allá del $\pm 5\%$ respecto al valor nominal [1] y, por lo tanto, será necesario ampliar el rango de concentraciones. Para este requisito, las guías ICH [2] recomiendan un rango de $\pm 20\%$ respecto al valor nominal para la determinación del principio activo; en cambio, para la determinación de excipientes no existe ninguna recomendación [1,3]. El segundo requisito es básico para obtener una adecuada calidad predictiva del modelo. Cuanto más semejantes sean las muestras de calibración y las que deben predecirse (muestras procedentes de producción) mejores serán los resultados en predicción.

La ampliación del rango de concentraciones y la incorporación de la variabilidad del proceso productivo al conjunto de calibración ha sido abordada con diferentes aproximaciones [4]. Para abordar estos requisitos en esta tesis se han utilizado dos metodologías:

6.2.2.1. Muestra sintética con propiedades físicas semejantes a la muestra de producción

El método consiste en preparar muestras en el laboratorio imitando los procesos de una planta de producción real (mezclado, granulación, molienda, compactación) con

propiedades físicas similares a las del proceso de producción y que contiene API en concentraciones que abarcan el rango requerido.

6.2.2.2. Espectro proceso

Este espectro contiene los cambios espectrales causados por los distintos tratamientos aplicados a la mezcla de componentes durante el proceso de fabricación. El método consiste en la adición de un conjunto de espectro proceso (espectros obtenidos por cálculo de la diferencia entre los espectros de comprimidos de producción y espectros de mezclas de laboratorio con la misma concentración nominal) al conjunto de mezclas de laboratorio para producir el conjunto de calibración, como una forma de incorporar los cambios físico producidos durante cada etapa del el proceso de producción de comprimidos. El espectro de proceso (**Sp**) se obtiene del cálculo siguiente (**Ec. 6.1**):

$$Sp = ST - S \text{ Referencia} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Siendo **Sp** el espectro del proceso (la contribución al espectro de los procesos de granulación y compresión, en este caso), **ST** el espectro de la muestra de producción (comprimidos) y **S Referencia** el espectro de una muestra en polvo preparada en el laboratorio con misma concentración de principio activo y excipientes que la muestra de producción.

Este cálculo se ha repetido para cinco comprimidos de lotes distintos en el caso del irbesartan 300 mg. y de 10 para paracetamol 1 g., con lo cual se obtiene cinco y diez espectros de proceso (**Sp**), respectivamente, que contienen la variabilidad espectral introducida en las etapas de producción. El conjunto de espectros constituyen el *reduced process variability matrix (Sp.red.)*, de las etapas de la producción, que se adiciona a la matriz de espectros de laboratorio de concentración conocida para producir la *reduced total variability matrix (St.red.)*.

El número de espectros de proceso es reducido y puede ser que no contengan la variabilidad total del proceso de fabricación; para aumentar la variabilidad de los espectros S_p se ha ensayado la multiplicación por un factor (m) comprendido entre 1.5 y 0.5 (se ensayaron valores de 0.5;1.5,0.75;1.25 y de 0.9;1.1); de esta manera se aumenta no solo el número de espectros de proceso sino también la variabilidad de este nuevo conjunto de espectros proceso que constituye la matriz de variabilidad del proceso ampliada (*extended process variability matrix, $S_{p.ext.}$*) (Ec. 6.2).

Este nuevo conjunto de espectros se adicionan de forma aleatoria a los espectros de las muestras en polvo de laboratorio que cubren el rango de concentraciones del principio activo entre el 80 y 120 % respecto al contenido nominal de irbesartan y de 80 % a 111 % del contenido nominal de paracetamol:

$$St.ext. = S_{conc.} + S_{p.ext.} \quad (Ec. 6.2)$$

Siendo $St.ext.$ la matriz de espectros con la variabilidad del proceso y el rango de concentraciones deseado para la calibración, $S_{conc.}$ es la matriz de espectros de las muestras en polvo de laboratorio y $S_{p.ext.}$ es la *extended process variability matrix*. El conjunto de espectros $St.ext.$ constituye la *extended total variability matrix*, a la cual se le pueden aplicar pretratamientos espectrales, tales como SNV y derivadas, antes de la construcción del modelo de calibración [5].

La **Figura 6.2** recogen los pasos que deben seguirse para construir los conjuntos de calibración y validación con el espectro proceso.

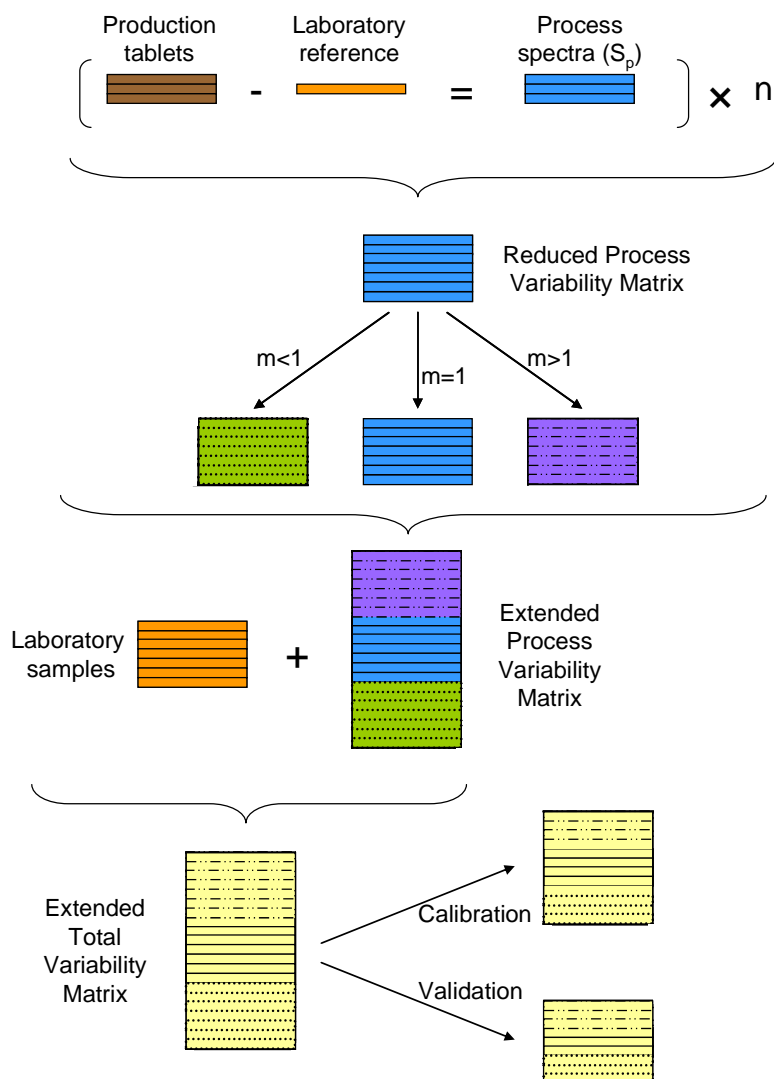


Figura 6.2 Esquema de la nueva propuesta para la construcción de los conjuntos de calibración y validación. Donde n es el número de lotes y m es un factor multiplicativo [5].

6.3. Instrumentación y métodos de análisis.

A continuación se describen los instrumentos utilizados a lo largo de esta tesis y los diferentes métodos de análisis.

6.3.1. Espectroscopía NIR.

- **Espectrofotómetro NIRSystems 5000.**

Los espectros de infrarrojo cercano fueron registrados en un espectrofotómetro *NIRSystems 5000* de FOSS *NIRSystems* (Silver Springs, MD) equipado con un módulo *Rapid*

METODOLOGIA

Content Analyzer (RCA) (Figura 6.3), controlado a través del software *Vision 2.51* de FOSS *NIRSystems*. Se registraron los espectros de reflectancia entre 1100-2500 nm con una resolución espectral de 2 nm y cada espectro es el promedio de 32 barridos. El espectro de referencia es el de la placa de cerámica incorporada al espectrofotómetro.

Con este equipo se registraron muestras de paracetamol 1g para ser utilizadas en la determinación de API a partir de muestras sintéticas. Las muestras en polvo y granuladas se registraron colocando la muestra en una cubeta de vidrio. Se obtuvieron dos espectros, removiendo la muestra entre registros y se promediaron los espectros.

El registro de cada uno de los comprimidos se realiza colocándolo directamente sobre la ventana de cuarzo del instrumento; después se registra la cara opuesta girando el comprimido 90° con respecto de la posición anterior. El espectro del comprimido es el promedio de los espectros de las dos caras. El registro de los comprimidos de laboratorio se ha realizado siguiendo el mismo procedimiento que para los comprimidos de producción.

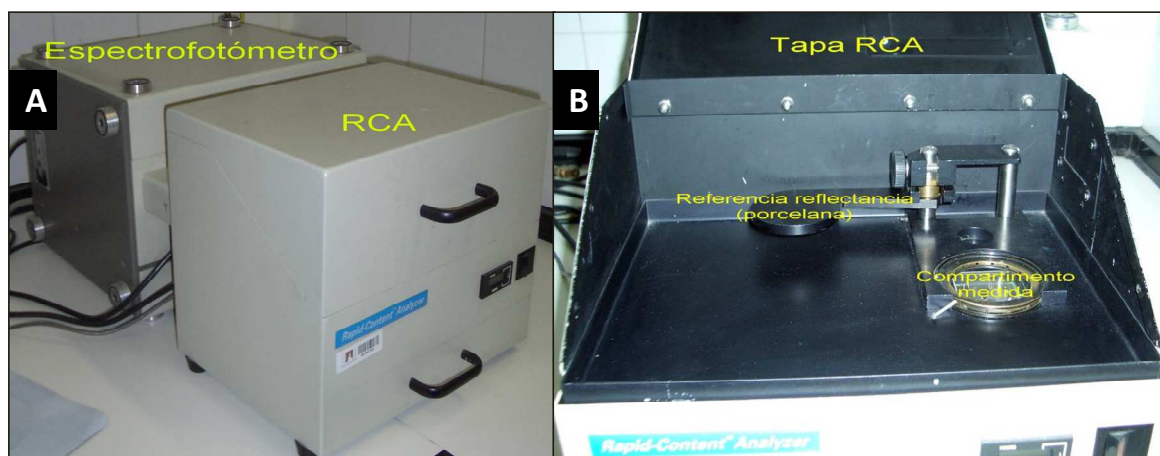


Figura 6.3 (A) Configuración del equipo NIR (*NIRSystems* 5000). La fotografía muestra el espectrofotómetro y el módulo RCA, (B) Módulo RCA. La fotografía muestra la tapa superior, el compartimento de medida y la referencia de reflectancia.

- **Espectrofotómetro BRUKER MPA**

Los espectros de infrarrojo cercano de las mezclas de laboratorio y comprimidos de irbesartan y paracetamol 1 g para determinación de API y excipientes con el método del espectro proceso, fueron registrados en un espectrofotómetro BRUKER MPA de Transformada de Fourier con esfera integradora y con un módulo rotatorio (**Figura 6.4**) controlado a través del software OPUS 6.5. El registro de los espectros de las muestras se ha realizado en modo reflectancia entre $12500\text{-}3750\text{ cm}^{-1}$ ($800\text{-}2666\text{ nm}$), con una resolución espectral máxima de 2 cm^{-1} y una exactitud de 0.3 nm ; cada espectro es el promedio de 32 barridos.

Las muestras en polvo fueron colocados en viales directamente sobre la ventana del automuestreador. Se obtuvieron dos espectros, removiendo la muestra entre registros y se promediaron los espectros.

El registro de los comprimidos se realiza colocándolos los comprimidos de irbesartan en moldes cilíndricos y los de paracetamol en moldes oblongos que a su vez se colocan en el automuestreador. Se registra los espectros de los comprimidos por duplicado y el promedio es utilizado en la predicción de la concentración.



Figura 6.4 Configuración del equipo NIR (BRUKER MPA). La fotografía muestra el espectrómetro y el automuestreador rotatorio.

- **Espectrofotómetro NIR Lab Spec@ Pro.**

La monitorización de mezclas para determinar la homogeneidad por NIR fue realizada con un espectrofotómetro NIR Lab Spec@ Pro. (*Analytical Spectra Devices, inc*) controlado a través del software Indico Pro. Versión 5.6. El instrumento NIR fue equipado con un sonda de fibra óptica modelo A 122.300. El espectro de referencia es el de la placa de cerámica, el cual toma su espectro antes del registro de los espectros.

La fotografía de cómo se colocó la sonda para tomar los espectros se muestra en la **Figura 6.5**. Los espectros fueron registrados en reflectancia a intervalos regulares, sin dejar de mezclar los componentes de la mezcla. Los espectros se registraron con una resolución de 1 nm en el rango de 1000-2500 nm, con un diámetro de fuente de luz de 20 mm a intervalos de dos minutos durante trescientos minutos. Se ha calculado que cada espectro (promedio de 32 barridos) recoge la información de aproximadamente un 4 % del total de la mezcla; este cálculo se ha realizado a partir del volumen irradiado por el haz de luz NIR.

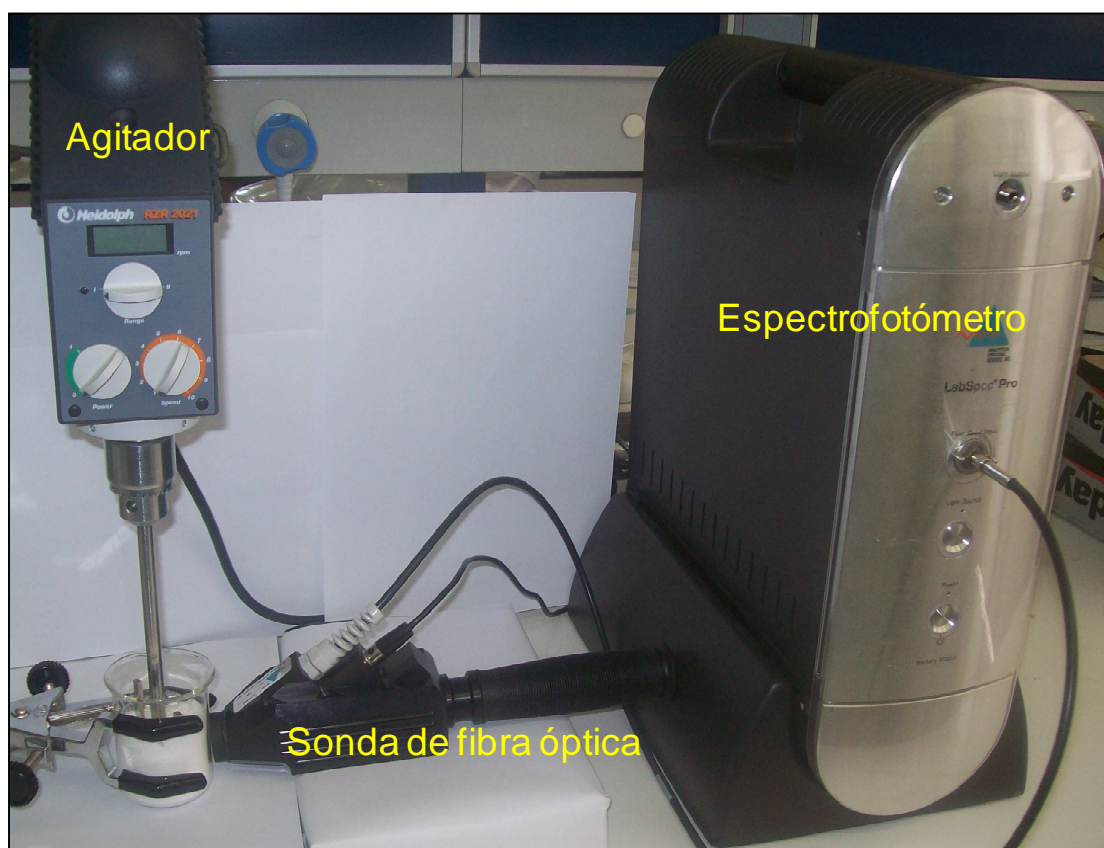


Figura 6.5 La fotografía muestra cómo se monitorizó el proceso de mezclado.

- **Espectrofotómetro NIR MB 160 DX FTNIR.**

Los espectros NIR para la comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman se registraron en un espectrofotómetro MB 160 DX FTNIR de transformada de Fourier (ABB Bomem, Quebec, Canadá) equipado con una fuente halógena de tungsteno y un detector de germanio. Los espectros se adquieren en el modo de absorbancia y se utilizó como referencia una placa de teflón de referencia (99% reflectante Spectralon, Labsphere Inc., North Sutton, EE.UU.) antes del registro de cada mezcla. Cada espectro fue una media de 16 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} , en el intervalo de $8500\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$. Para la

adquisición de los espectros, cada mezcla se colocó en el haz del accesorio muestral con un diámetro de muestreo de 20 mm (**Figura 6.1b**).

6.3.2. Espectroscopia Raman

- **Espectrófotometro Raman Rxn1**

Los espectros Raman para la comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman fueron registrados con un espectrómetro Raman Rxn1 (*Kaiser Optical Systems*, Ann Arbor, USA), equipado con un detector *Peltier-cooled* CCD (back-illuminated deep depletion design), el cual fue utilizado en combinación con una PhAT Probe Head (*Kaiser Optical Systems*, Ann Arbor, USA) con un espacio muestral de 3 mm de diámetro. Para supervisar el proceso de mezclado, la sonda fue colocada en posición vertical (**Figura 6.1a**). La sonda se posicionó lo más cerca posible del vial con la finalidad de obtener la máxima intensidad de la señal Raman, pero evitando el contacto con vial, para no alterar las rotaciones del mismo. El láser utilizado fue de diodo *Invictus* NIR a una longitud de onda de 785 nm. Se registraron 4 espectros por minuto, con una resolución de 5 cm^{-1} . Cada espectro fue la suma de 16 barridos con un tiempo de exposición de aproximadamente de 15 s, a un rango de $100\text{-}3425\text{ cm}^{-1}$, del cual se eligió como región de trabajo el rango $100\text{-}1919\text{ cm}^{-1}$, ya que esta región contiene toda la información de los compuestos presentes en la mezcla.

6.3.3. Preparación de comprimidos en el laboratorio

La preparación de comprimidos de paracetamol 1g en el laboratorio se realizó compactando alícuotas de muestras sintéticas mediante una prensa cilíndrica Perkin-Elmer 15.011 *press* con una sección de 132.7 mm^2 y un molde cilíndrico de 11 mm de diámetro como se describe en la sección 6.2.1.2 Granulados y comprimidos de paracetamol 1g.

6.3.4. Mezclador para sólidos

METODOLOGIA

Las muestras de laboratorio de paracetamol 1g y irbesartan 300 mg fueron homogenizadas en un mezclador de sólidos Túrbala T2C WAB *shaker mixer* y se han considerado homogéneas cuando dos registros sucesivos de las mezclas presentan espectros NIR idénticos. La mezcla de los componentes en polvo para la mezcla farmacéutica para el estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final se ha realizado en un vaso de precipitado de 100 mL en el que se introduce una varilla de agitación tipo ancora con un diámetro de giro de 45 mm unida a un agitador (Heidolph RZR 2021). La forma y dimensiones de la varilla aseguran la ausencia de espacios muertos en el vaso (**Figura 6.5**). Por otro lado, el mezclado de las muestras para la comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman, se realizó en un vial de 10 ml de volumen, el cual simuló un mezclador rotativo colocándolo de forma horizontal en un mini robot mezclador, controlado con un Controlador Lógico Programable, *PLC* (Lego Mindstorms, Billund, Dinamarca) (**Figura 6.1**).

6.3.5. Tamizadora

Los granulados de producción de paracetamol 1g. fueron tamizados con un equipo *Electromagnetic Sieve Shaker* modelo BA100-N de CISA Barcelona.

6.3.6. Métodos de referencia

A continuación se describen las características más relevantes de los métodos utilizados como referencia.

- **Pesada en balanza analítica:** el valor de la pesada en una balanza analítica de los principios activos y excipientes en las mezclas pulverulentas y de comprimidos de laboratorio se usó como valores de referencia en la construcción de los modelos de calibración.

- **Tamizado:** se determinó la distribución de tamaño de partícula y tamaño de partícula medio de los granulados de producción tomando alrededor de 10 g de cada granulado y tamizándolos en cinco fracciones de diferente tamaño de partícula. Se seleccionaron los cuatro tamices de 200, 300, 500, 1000 μm , además se recogió la fracción de granulado $<200 \mu\text{m}$ que atravesó todos los tamices. Cada una de las fracciones se pesó en una balanza analítica, obteniéndose así el porcentaje de muestra en cada tamiz; esta información se utilizó para obtener la curva de distribución de partículas. El tamaño de partícula medio fue calculado según la fórmula siguiente [6] (Ec. 6.3):

$$\text{Tamaño de partícula medio} = \frac{\text{Peso de la fracción} \times n^{\circ} \text{ tamaño de la partícula de la fracción}}{\text{Peso total}} \quad (\text{Ec. 6.3})$$

- **Determinación por HPLC**

Las determinaciones de los principios activos en paracetamol 1 g y Irbesartan 300 mg en granulados y/o comprimidos fueron realizados mediante el método de referencia en los laboratorios de KERNPHARMA SL (Terrassa, España) utilizando un cromatógrafo de HPLC Agilent 1200 con detector UV.

- **Determinación de irbesartan 300 mg.** Las determinaciones del contenido de API en las muestras de comprimidos de producción de irbesartan 300 mg, que se utilizaron para la validación de los modelos, se realizó por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV/VIS con las condiciones siguientes: columna de acero de una longitud de 25 cm, un diámetro interno de 4.6 mm y con un relleno Kromasil 100 C18 de 5 μm de tamaño de partícula, la fases móviles que se utilizaron fueron; Fase móvil A (FA): tampón 2.5/ACN(65:35,v/v) y Fase móvil B (FB): tampón 2.5/ACN (30/70,v/v) en gradiente, el flujo de 0.8 ml/min⁻¹ con un volumen de inyección 20 μl , con un tiempo del cromatograma de 35 minutos y la longitud de onda de detección a 275 nm.

- **Determinación de paracetamol 1g.** La determinación del contenido de API en las muestras de comprimidos de producción de paracetamol 1g, que se utilizaron para la validación del modelo, se realizó también por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV/VIS con las condiciones siguientes: columna de acero de una longitud de 25 cm, un diámetro interno de 4mm y con un relleno Spherisorb ODS-2, 5 μm , la fase móvil está constituida por una mezcla Metanol/ (agua/ác. Acético) (70: 30 v/v), el flujo de $1.0 \text{ ml}/\text{min}^{-1}$ con un volumen de inyección 25 μL , el tiempo del cromatograma no fue mayor a 10 minutos y la longitud de onda de la detección fue 280 nm.

6.4. Programas para la adquisición y tratamiento de los datos

La toma de datos de los espectros NIR así como su tratamiento para cada muestra fueron llevados a cabo con los siguientes programas informáticos.

- Programas creado para el control del espectrofotómetro NIR. Permite el registro de los espectros así como su visualización, aplicando los pretratamientos espectrales convencionales. Su entorno permite diseñar protocolos de análisis, tanto cualitativos como cuantitativos. Los programas utilizados en esta tesis son:
 - VISION v2.51 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA). Este programa es utilizado en el Espectrofotómetro *NIRSystems* 5000.
 - OPUS v6.5 (Bruker *Optics Inc.*, Billerica, Massachusetts, USA). Este programa es utilizado en el Espectrofotómetro BRUKER MPA.
 - INDICO PRO v5.6 (*Analytical Spectral Devices Inc.*, Boulder, CO). Este programa es utilizado en el Espectrofotómetro NIR Lab Spec@ Pro.
 - Grams 32 version 4.04 (ABB Bomem, Quebec, Canadá). Este programa es utilizado en el Espectrofotómetro NIR MB 160 DX FTNIR.
- El programa utilizado para la recopilación y transferencia de datos del espectrofotómetro Raman Rxn1 fue *HoloGRAMSTM data collection software*.

- UNSCRAMBLER v9.2-9.8 (Camo Process S.A., Trondheim, Norway). Software creado para el tratamiento de datos multivariantes y el diseño de experimentos. Este programa fue utilizado para el pretratamiento de datos espectrales, para esto se utilizó SNV, derivadas de Savitzky-Golay o Norris, suavizados, correcciones de línea base, etc. así tanto para el análisis cualitativo (PCA) como para el análisis cuantitativo (PCR, PLS o PLS2).
- MODDE v6.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Es un programa que se ha utilizado para desarrollar diseños de experimentos adecuados para la preparación de muestras de laboratorio. El programa incorpora diseños como factoriales completos o fraccionados, Plackett-Burman, D-óptimos, diseños de mezclas.

6.5. Métodos de análisis cualitativos

Son métodos que han sido utilizados para determinar el grado de similitud entre muestras que van a ser utilizados en un modelo de calibración (PCA) o para determinar la homogeneidad en un proceso de mezclado siguiendo la variación de intensidad de picos característicos o comparando los espectros consecutivos bien entre ellos o contra un espectro objetivo (espectro de una mezcla que se considera homogéneamente mezclado).

6.5.1. Variación de la intensidad de pico

Los espectros Raman se caracterizan por picos estrechos y, en muchos casos, se puede identificar picos selectivos para cada componente de la mezcla. Representándose un gráfico de la altura de los picos de las bandas Raman de los compuestos de interés en función del tiempo de mezclado para determinar la homogeneidad en la mezcla [7,8], después de la reducción de la variabilidad de la línea base.

6.5.2. Desviación estándar de un bloque móvil (MBSD)

METODOLOGIA

Método para determinar la homogeneidad durante un proceso de mezclado que consiste en el cálculo de la desviación estándar (Ec. 6.4), para cada longitud de onda de un bloque móvil de varios espectros consecutivos que se van moviendo un espectro cada vez a través de los espectros registrados en la monitorización del proceso de mezclado. En el estudio de monitorización del proceso de mezclado se eligió un bloque móvil de cinco espectros, y luego se calcula la media de los valores obtenidos para cada longitud de onda (Ec. 6.6) [9-11].

$$MBSD = \frac{\sum_{N=1}^N SD(X[1...k]_{wn})}{N} \quad (\text{Ec. 6.4})$$

$$SD(X[1 \dots k]_{wn}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X[i]_{wn} - \overline{X_{wn}})^2}{k-1}} \quad (\text{Ec. 6.5})$$

$$\overline{X_{wn}} = 1/k \sum_{i=1}^k X[i]_{wn} \quad (\text{Ec. 6.6})$$

Dónde:

N= Número de longitudes de onda escaneados.

X[i]_{wn} = Absorbancia individual a cada longitud de onda.

$\overline{X_{wn}}$ = Promedio de las absorbancias.

SD(X[1 ... k]_{wn}) = Desviación estándar

k = número de espectros en el bloque (tamaño de bloque)

6.5.3. Disimilaridad del promedio de un bloque móvil y un espectro objetivo (DMBA-TS)

Método para determinar la homogeneidad durante un proceso de mezclado que consiste en el cálculo de la diferencia de los valores obtenidos al promediar cinco espectros consecutivos que van moviéndose un espectro cada vez a través de los espectros registrados en la monitorización, contra un espectro objetivo (espectro de una mezcla

considerada homogénea con la concentración nominal del principio activo). Después se calcula la desviación estándar (Ec. 6.5), de los valores obtenidos para todas las longitudes de onda [11-13].

6.5.4. Disimilaridad de un espectro individual y el promedio de espectros objetivos (DIS-ATS)

Método para determinar la homogeneidad durante un proceso de mezclado que consiste en la ligera modificación del algoritmo (DMBA-TS) para hacer el cálculo de la diferencia de un espectro individual frente a un espectro obtenido del promedio de varios espectros tomados de una mezcla considerada homogéneamente mezclada con la concentración nominal del principio activo, después se calcula la desviación estándar (Ec. 5.5), de los valores obtenidos para cada longitud de onda [11-13].

6.5.5. Disimilaridad entre espectros (DIS)

Método para determinar la homogeneidad durante un proceso de mezclado que consiste en una diferencia entre dos espectros consecutivos a cada unidad de onda, después se calcula la desviación estándar de los valores obtenidos para todas las longitudes de onda [14].

6.5.6. Análisis en componentes principales (PCA)

Ha proporcionado información relevante y de interés para el desarrollo de los diferentes estudios que se han realizado por ser una técnica rápida de reducción de variables que permite visualizar en un espacio de dos o tres dimensiones cuán similares o diferentes son los grupos de espectros entre sí.

Los dos primeros *scores* nos ayuda a establecer el mejor pretratamiento espectral para la obtención de los modelos de calibración, así como asegurar que el conjunto de muestras registradas son representativas de la variabilidad global de la producción. Por otro lado, un PCA nos puede ayudar a determinar la homogeneidad de un mezclado, llevando a cabo en

una representación tridimensional de los *scores* de los espectros consecutivos obtenidos durante el proceso de mezclado del PC1, PC2 y PC3, donde cada punto en la gráfica es la representación de cada espectro.

Los espectros se distribuyen en la gráfica dependiendo de las variaciones que haya entre ellos. Los espectros más semejantes estarán más agrupados, lo que nos dará a entender que estos espectros fueron registrados en una etapa de la mezcla en que los componentes ya están correctamente mezclados [11-13,15-18].

6.5.7. Componentes principales- Análisis de la distancia de los *score* (PC-SDA)

Plantea una forma distinta de monitorear y determinar el punto final del proceso de mezclado. Este método combina dos metodologías descritas anteriormente y consiste en los cálculos de las distancias euclídeas entre los primeros PCA *scores* de cada espectro durante el tiempo. En nuestro caso, fueron suficientes los tres primeros *scores* para explicar más del 95 % de la varianza espectral.

El paso siguiente es la determinación de las desviaciones estándar de bloque móvil MBSD (ventana de diez espectros) de los valores sucesivos de las distancias, para estimar una ventana de tiempo durante la cual la variabilidad espectral de la mezcla se reduce a un mínimo, ya que una baja variabilidad espectral es un indicativo de una buena homogeneidad.

El siguiente paso es la elaboración de un modelo PCA con estos espectros con un intervalo de confianza de 95%, los espectros restantes forman parte del conjunto predicción que se analizan con este modelo. *Hotelling's statistics T²* se utiliza para monitorear y reportar la homogeneidad de la mezcla [19].

6.6. Métodos de análisis cuantitativos

En los trabajos desarrollados durante esta tesis se han empleado métodos de análisis cuantitativo con el fin de determinar parámetros físicos (tamaño de partícula medio,

distribución de tamaño de partícula y presión de compactación) y químicos (concentración de principios activos y excipientes) en las distintas etapas del proceso de fabricación de fármacos (polvos durante el proceso de mezclado, granulado, comprimido de producción). Estos métodos se basan en la utilización de modelos de calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS y PLS2). Para el modelo de distribución de tamaño de partícula se usó PLS2 para el resto de modelos se utilizó PLS. Para cada uno de los modelos se ensayaron los pretratamientos de SNV, 1ª y 2ª derivada de Savitzky Golay. El número de factores para todos los modelos se seleccionó a partir del valor estadístico de *Relative Standard Error* RSE (Ec. 4.7) o *Root Mean Squared Error of Prediction* RMSE (Ec. 4.8) seleccionando el modelo con menor valor de RMSE o RSE para el conjunto de predicción.

REFERENCIAS

1. European medicines agency. Guideline on specifications and control test on the finished product. June 1992. 3AQ11a.
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/3aq11aen.pdf>
2. ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. <http://www.ich.org>.
3. European medicines agency. Guideline on excipients in the dossier for application for marketing authorisation of a medicinal product. January 2008.
EMA/CHMP/QWP/396951/2006.<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/39695106enfin.pdf>
4. M. Blanco, M. Alcalà. Chapter 14: NIR spectroscopy in pharmaceutical analysis. In Process Analytical Technology. (2010) 2nd edition. Ed K. Bakeev.
5. M. Blanco, A. Peguero, Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method, Trends Anal. Chem. 29 (10) (2010) 1127-1136.
6. W. Mc-Cabe, J. Smith, "Operaciones Básicas de Ingeniería Química. (2010) Volumen II". Editorial Reverté, S.A.
7. T.R. De Beer, C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Vercruysse, A. Burggraeve, A. Lemos, L. Delattre, Y.V. Heyden, J.P. Remon, C. Vervaet, W.R. Baeyens, Raman spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for the in-line monitoring and understanding of a powder blending process, J. Pharm. and Biomed. Anal. 48 (2008) 772-779.
8. S. Debra, R. Hausmana, T. Cambron, A. Sakr, Application of Raman spectroscopy for on-line monitoring of low dose blend uniformity. Int. J. Pharm. 298 (2005) 80-90.
9. P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, P.K. Aldridge, Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part I. System development and control, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 551-559.

10. S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, P.K. Aldridge, On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 68 (3) (1996) 509-513.
11. S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, P.A. Hailey, Automated system for the online monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II. Qualitative approaches to blend evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285-1309.
12. F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D. L. Massart, S.S. Dive, P. Hailey, Monitoring powder blending by NIR spectroscopy, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 771-778.
13. R. De Maesschalck, F. Cuesta Sánchez, D.L. Massart, P. Doherty, P. Hailey, On-line monitoring of powder blending with near-infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 52 (5) (1998) 725-731.
14. M. Blanco, R. Gozález Bañó, E. Bertran, Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy, *Talanta* 56 (2002) 203-212.
15. D. J. Wargo, J. K. Drennen, Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1415-1423.
16. A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90(9) (2001) 1298-1307.
17. L. Nørgaard, M.T. Hahn, L.B. Knudsen, I.A. Farhat, S.B. Engelsen Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.
18. S. Virtanen, O. Antikainen, J. Yliruusi, Uniformity of poorly miscible powders determined by near infrared spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 108-115.
19. T. Puchert, C.-V. Holzhauser, J.C. Menezes, D. Lochmann, G. Reich, A new PAT/QbD approach for the determination of blend homogeneity: Combination of on-line NIRS

METODOLOGIA

analysis with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 173-18.

RESULTADOS Y

DISCUSIONES

RESULTADOS Y DISCUSIONES

7. Aplicaciones de NIR en la industria farmacéutica

A continuación se describen los resultados de una manera crítica de los trabajos realizados para determinar parámetros relevantes en cada una de las etapas del proceso de fabricación de comprimidos así como la optimización y aplicación de una nueva metodología para general un conjunto de muestras en la elaboración de modelos de calibrado.

7.1. Estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final

En este trabajo se realiza un estudio comparativo de diferentes técnicas cualitativas y cuantitativas para determinar el punto final del mezclado para hacer un análisis crítico de las ventajas y desventajas que presentan y establecer los criterios de selección más adecuados en diferentes situaciones prácticas.

En la **Tabla 7.1** se recogen los trabajos encontrados en la bibliografía con una breve descripción de los métodos de cálculo aplicados.

Se pueden distinguir dos grandes grupos: métodos cualitativos, que son más simples y fáciles de aplicar que los métodos cuantitativos, que son más complejos de aplicar pero que ofrecen información sobre los componentes de la mezcla. De estos trabajos hemos elegido un conjunto de métodos cualitativos por su utilización en varias publicaciones, su fácil aplicación en diferentes tipos de mezcla, facilidad de cálculo o su simplicidad. Entre los métodos cuantitativos, se eligió PLS por ser el más utilizado en calibraciones multivariadas en NIR.

Para realizar este estudio se propone estudiar el proceso de mezclado en una mezcla que ofrece dificultades para detectar el punto final del proceso de mezclado por el efecto de los siguientes factores: un API que es difícil de mezclar con los otros ingredientes de la

formulación presenta una concentración relativamente baja (<4 %) y presenta una relativamente baja absorptividad con respecto al resto de excipientes.

El estudio se realizó con una mezcla de seis componentes, un API, dos excipientes mayoritarios y tres minoritarios como se describe en la **sección 6.2.1.1 apartado Mezcla para el estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final.**

Para realizar el estudio se ha preparado un sistema de homogeneización en el laboratorio que se muestra en la **Figura 6.5** de la **sección 6.3.1 espectroscopia NIR**. El sistema es muy simple, pero adecuado para registrar los espectros en el tiempo en un proceso lento de mezclado que permita un mejor análisis de los resultados experimentales. Los espectros se registran de forma continua sin detener el agitador. El orden de llenado de componentes de la mezcla puede tener un importante impacto en la rapidez y eficacia del proceso de mezclado y por ello se ensayaron dos secuencias de adición de los componentes en polvo al vaso de mezclado.

Antes de los procesamiento de los datos, los espectros fueron corregidos para reducir efectos extraños no debidos a la mezcla (por ejemplo, diferencias en el tamaño de partícula) mediante el uso de tratamientos destinados a reducir la variabilidad física en las muestras. Los pretratamientos espectrales utilizados incluyen variable normal estándar (SNV) y primera derivada. El primero se usa para reducir la dispersión con los métodos cualitativos y la segunda, para aumentar las diferencias espectrales con el método cuantitativo. Las metodologías cualitativas y cuantitativas utilizadas en este estudio se eligieron por su amplia utilización en la bibliografía, así como por los buenos resultados obtenidos por estos. A continuación se discuten las cualidades y desventajas encontradas en cada uno de ellos para determinar el punto final del proceso de mezclado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.1 Métodos de espectroscopia NIR para determinar la homogeneidad de mezcla en polvo.

Método	Descripción y análisis de datos	Referencias	
Variación de la absorbancia	Variación de la absorción de un pico o promedio de picos de un componente.	[30]	
Desviación estándar	MBSD de los espectros. (*)	[4-6,8,17,19,34-36]	
	MBSD de los PC scores.	[36]	
	MBSD de intensidad pico específico para el componente.	[28,43]	
	DS de los espectros en función del tiempo.	[7,10]	
Disimilaridad	Promedio de los cuadrado de las diferencias de los espectros. (*)	[9]	
	Diferencia de los espectros contra un objetivo. (*)	[2,6,7]	
M É T O D O S C U A L I T A T I V O S	Distancia Euclídea	Distancia Euclídea entre espectros.	[7]
	Análisis de Chi-cuadrado	Consiste en variación agrupada de los valores de absorbancia a longitudes de onda individuales que se calcula como el promedio ponderado de las variaciones, donde los pesos son los grados de libertad. Una estadística de chi-cuadrado se calcula y se compara con un valor tabulado a 5% de nivel de confianza. Un valor alto para la estadística de Chi-cuadrado indica que las varianzas no son iguales.	[3]
	PCA (*)	Gráfico que muestra los componentes principales durante el proceso de mezcla.	[2,3, 6-8,16,25]
	PC-SDA(*)	Cálculo de distancias euclídea entre los scores de un PCA en un espacio multidimensional y la determinación de MBSD de las distancias de los scores sucesivos de los PC para estimar un intervalo de tiempo durante el cual la mezcla se considera homogénea.	[42]
	SIMPLISMA	Extracción de las variables puras y perfiles de concentración basados en un algoritmo que analiza la pureza de las variables en el conjunto de datos.	[1]
	BEST MBEST PC-MBEST	BEST desarrolla una estimación de la población total de la muestra, utilizando un pequeño conjunto de muestras conocidas (El producto conocido puede ser una sustancia pura o una mezcla de componentes). MBEST es un algoritmo que proporciona un test que usa múltiples pruebas espectrales para detectar muestras falsas (como subgrupos) dentro del espacio del límite de 3 veces la DS de un conjunto de entrenamiento. PC-PC MBEST utiliza los PC de un PCA para la compresión de datos antes de la realización de un MBEST.	[3,20,21]
	SIMCA	Herramienta para la clasificación de conjuntos de datos multivalentes. Los modelos de PC se generan para cada clase, seguidamente se comparan las características de cada clase con el conjunto de entrenamiento.	[20]
	NAS	Control del mezclado mediante pruebas de variación y de nivel de contenidos de API. El contenido de API se basa en el valor de NAS de los espectros NIR.	[23]

RESULTADOS Y DISCUSIONES

M É T O D O S C U A N T I T A T I V O S	Hidden Markov model	Método que consiste en una máquina de aprendizaje para determinar las diferencias entre los espectros.	[34]
	MLR	Algoritmos de calibración para determinar la concentración de los componentes usando los valores de intensidad a longitudes de onda seleccionadas.	[21,35]
	PCR	Al igual que en MLR se utiliza los <i>scores</i> obtenidos por el PCA como variables independientes para determinar la concentración de los componentes.	[21,35]
	NIPLS	Algoritmo para el cálculo de los primeros componentes del análisis en un PCA o PLS para determinar la concentración de los componentes.	[27]
	PLS(*)	Basado en la reducción de variables donde se realiza la descomposición de la matriz espectral al mismo tiempo que la matriz de la concentración del componente a determinar.	[10,11,13,15,16,17,21,22,24,25,33,34,35,36,37,38,39,40,41,43,44,45]
	PLS-DA	Consiste en una regresión PLS clásica, donde la variable de respuesta es una categórica (sustituida por el set de indicadores que describen las categorías), que expresa la pertenencia a una clase de las unidades estadísticas. Estos métodos requieren la construcción de un conjunto de calibración que incluye espectros representativos de mezclas homogéneas.	[36]
I M A G E N	NIR-CI(*)	Análisis de la distribución de los componentes presentes en la mezcla a través de una imagen NIR.	[8,12,14,18,29,31,32,42]

(*)Estos métodos o variantes de estos fueron usados en este trabajo.

Abreviaturas: API: principio activo farmacéutico; BEST: *Bootstrap Error-adjusted Single-sample Technique*; MBSD: *Moving Block Standard Deviation*; MBEST: *Modified Bootstrap Error-adjusted Single-sample Technique*; MLR: *Multiple Linear regression*; NAS: *Net Analyte Signal*; NIPLS: *PLS + Root Mean Square from Nominal Value*; NIR-CI: *Near Infrared Chemical Imaging*; PC: *Component Principal*; PCA: *Principal Component Analysis*; PLS: *Partial Least Square*; PLS-DA: *Partial Least Square Discriminant Analysis*; PC-MBEST: *Principal Component Modified Bootstrap Error-adjusted single-sample Technique*; PCR: *Principal Component Regression*; PC-SDA: *PC Score Distance Analysis*; DS: desviación estándar; SIMPLISMA: *Simple Interactive Self-modeling Mixture Analysis*; SIMCA: *Soft Independent Modeling of Class Analogies*.

7.1.1. Métodos cualitativos para la determinación de la uniformidad en el mezclado

Puesto que es bien sabido que el protocolo de llenado de componentes de la mezcla tiene un fuerte impacto en el rendimiento de la mezcla, se han realizado dos experimentos de mezcla de los componentes en polvo con diferentes secuencias de llenado del vaso de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

mezclado. En el primer procedimiento se añadieron al vaso de mezcla los excipientes A y B, se inició la agitación, luego el API y el resto de los excipientes minoritarios. En el segundo procedimiento se inició la mezcla de los excipientes minoritarios (C, D y E) y el API, después de unos minutos de agitación se añadieron los excipientes mayoritarios (A y B). No se observaron diferencias en la homogeneización debidas al orden de adición de los componentes; por lo tanto elegimos el primer procedimiento para las siguientes mezclas.

Se han monitorizado diferentes procesos de mezclado y los espectros registrados durante la mezcla se han tratado con los algoritmos descritos en la **sección 6.5. Métodos de análisis cualitativo**, con el objeto de establecer los más apropiados y precisos para la identificación del punto final de mezcla y menos sensibles a las oscilaciones propias producidas por el propio registro.

En este trabajo se propone la determinación de la desviación estándar instrumental (aplicando los diferentes cálculos de DS a los espectros registrados en un proceso de mezcla con una sustancia pura) con la finalidad de facilitar la detección del punto final de la mezcla. Esto nos permite estimar de una forma diferenciada la variabilidad del sistema instrumental de medida de la perteneciente al proceso de homogeneización.

La **Figura 7.1** muestra la aplicación de estos métodos al mismo proceso de mezclado y los gráficos de desviación estándar (DS) frente al tiempo. Muestran resultados diferentes en la determinación del tiempo final de mezclado y diferencias en el ruido de las medidas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

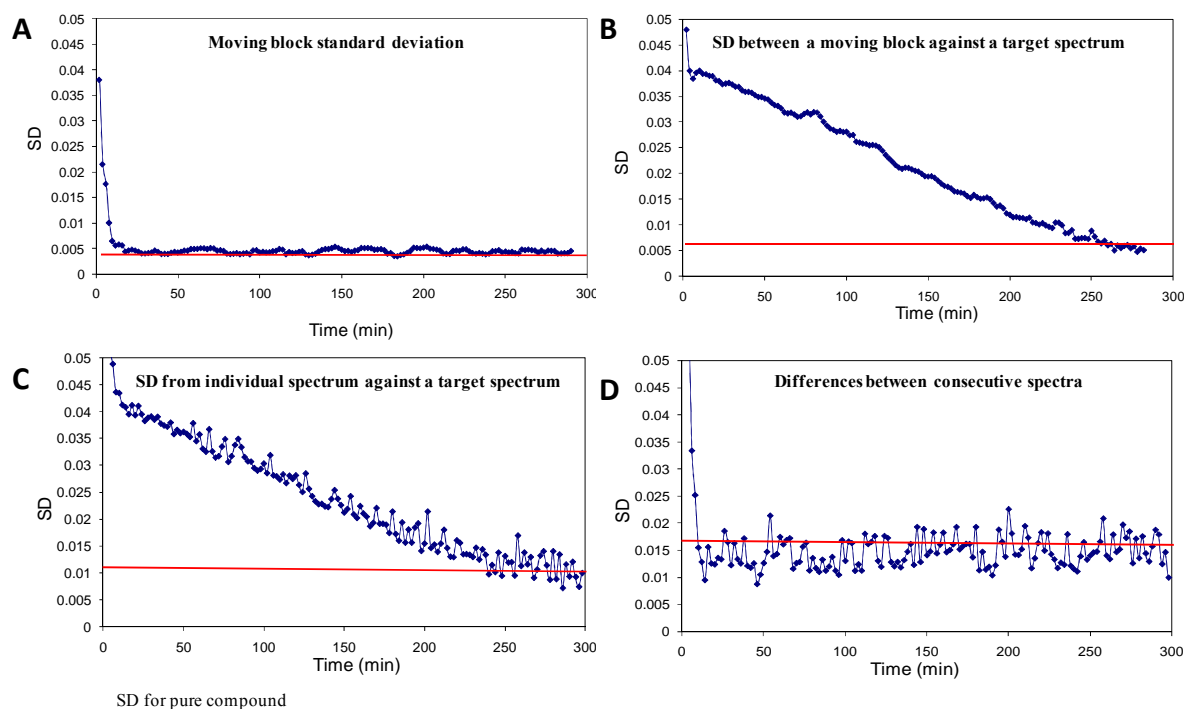


Figura 7.1 Evaluación de la homogeneidad del mezclado por cuatro métodos cualitativos. (A) MBSD, (B) DMBA-TS, (C) DIS-ATS y (D) DIS.

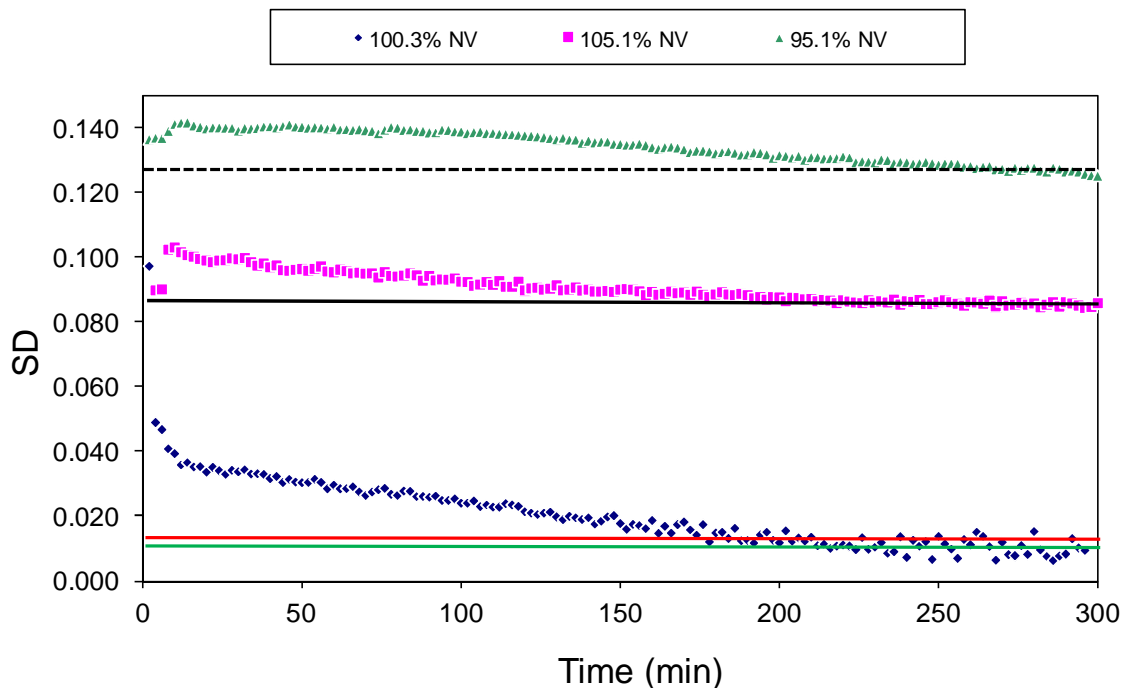
Se puede observar que los métodos de la desviación estándar de un bloque móvil (MBSD) y disimilaridad entre espectros consecutivos (DIS) presentan una disminución abrupta del valor de DS a los pocos minutos de iniciado el mezclado, lo que indica que estos métodos son poco sensibles e inadecuados para detectar el punto final del mezclado.

Este hecho se magnifica por la baja concentración (<4 % p/p) y la baja absorptividad del principio activo en comparación con los excipientes. Por otro lado, los resultados obtenidos por los métodos de disimilaridad del promedio de un bloque móvil y un espectro objetivo (espectro de una mezcla que se considera que ha alcanzado la homogeneidad) (DMBA-TS) y disimilaridad de un espectro individual y el promedio de registros de espectros objetivos (DIS-ATS) presentan un comportamiento diferente. Los gráficos revelaron que los valores de DS se acercaron de una forma gradual a los valores de una muestra pura y por tanto son resultados más acordes a los resultados obtenidos por la metodología cuantitativa, lo que nos da a entender que estos métodos son más adecuados que los anteriores para detección del punto final del mezclado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El método DMBA-TS mostró cambios más uniformes por el efecto de alisado obtenido al utilizar una ventana móvil de cinco espectros, lo que hace a este método menos sensible al ruido producido por el propio equipo. Además, este método proporciona una estimación de la concentración final de la mezcla, como se muestra la **Figura 7.2**, que ilustra el proceso de mezclado de tres mezclas que contienen una concentración de API de 95, 100 y 105 % del valor nominal.

Los valores de DS de una mezcla que ha llegado a la uniformidad de mezcla con una concentración de API del 100 % del valor nominal son muy cercanos a los valores límites (dados por el mezclado de una muestra pura) lo que nos da a entender que es una medida de la cercanía a la concentración nominal. Este método es muy simple y altamente sensible a la concentración de la API, por lo que se puede utilizar para estimar la cercanía a su valor nominal, sin embargo, no proporciona ninguna indicación acerca de si las desviaciones corresponden a valores por encima o por debajo de la concentración nominal.



- Promedio de los últimos 20 valores de DS para un muestra a 95.1% VN (0.128).
- ___ Promedio de los últimos 20 valores de DS para un muestra a 105.1% VN (0.085).
- ___ Promedio de los últimos 20 valores de DS para un muestra a 100.3% VN (0.010).
- ___ DS para un componente puro (0.011).

Tratamiento espectral: modo SNV en un rango de longitud de onda de 1100-2500 nm.

Figura 7.2 Aplicación del método DMBA-TS en el proceso de mezclado para 3 mezclas con diferentes concentraciones de API.

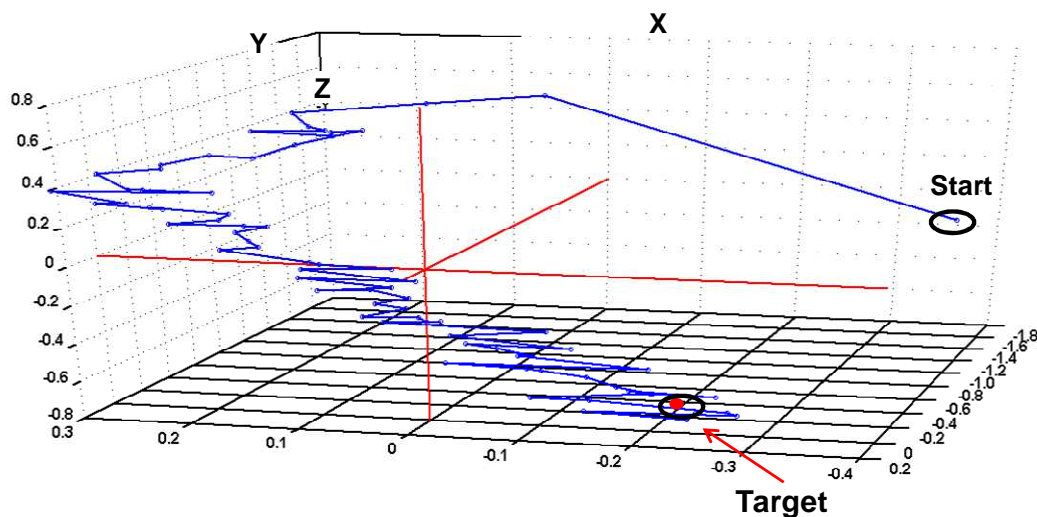
Los dos métodos MBSD y disimilaridad entre espectros consecutivos obviamente dan resultados falsos para detectar el punto final ya que lo hacen antes de tiempo. Zhang *et al.* (2009)[34] consideran que MBSD no es un método adecuado para cambios de concentraciones graduales y es sensible a los problemas de ruido. El ruido provoca una gran variación, sobre todo cuando el tamaño de la ventana es grande como en nuestro caso. Por el contrario, los métodos de DMBA-TS y DIS-ATS muestran resultados adecuados para identificar el punto final semejante al método cuantitativo.

La aplicación de estos métodos en el proceso de mezclado mostraron diferencias sustanciales en su capacidad para identificar el punto final en el proceso de mezclado. Por un lado, MBSD y DIS fueron incapaces de detectar con precisión la uniformidad de mezcla y su punto final debido a su baja sensibilidad a la poca variación espectral producida durante el seguimiento del proceso. Por otro lado, los métodos basados en DMBA-TS y DIS-ATS resultaron mucho más eficaces al respecto. Además DMBA-TS tiene adicionalmente la ventaja de que al comparar los espectros obtenidos durante la mezcla contra un espectro objetivo (espectro de una mezcla homogénea con las concentraciones nominales de la preparación farmacéutica), permite evaluar la similitud de los espectros con el espectro objetivo y determinar la proximidad de la mezcla a la concentración deseada.

Asimismo, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), ya que este método rápido permite hacer un análisis retrospectivo de datos, sin embargo, ya que la descomposición tiene que ser realizada con todo el conjunto de espectros recogidos durante el proceso de mezclado. Esto hace que no sea una técnica para aplicarse en línea siendo esta una desventaja. Esta técnica permite visualizar de una forma gráfica los espectros registrado durante el proceso de mezclado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se entiende que los espectros de una mezcla homogéneamente mezclada, serán muy similares y por ende estarán muy agrupados. La **Figura 7.3** es un diagrama de dispersión de los *scores* para los tres primeros componentes, que se utilizó para controlar el proceso y evaluar la cercanía con el valor objetivo (dada por una mezcla homogénea), y por lo tanto la uniformidad de mezcla. Los *scores* para los tres primeros componentes cambian gradualmente con el tiempo, pero demasiado lento para facilitar la identificación del punto final del proceso, lo que lo hace un método poco sensible para la mezcla utilizada en este estudio.



PC 1 (51% X - variance), PC 2 (20% Y-variance) PC 3 (8% Z-variance)

Muestra a 100.3 % del VN con tratamiento espectral modo SNV en un rango de longitud de onda de 1100-2500 nm.

Figura 7.3 Evaluación de los *scores* de un PCA para un proceso de mezclado.

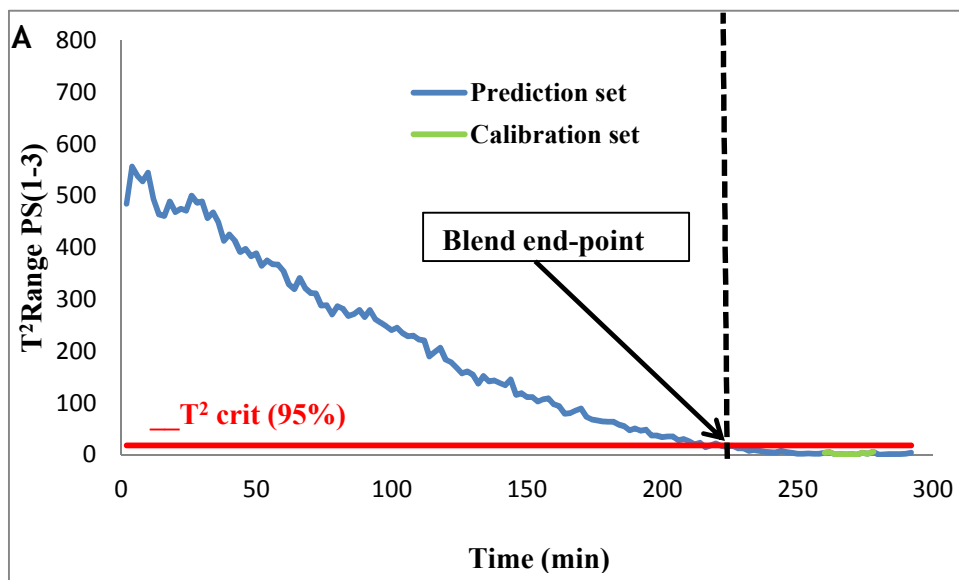
El último método cualitativo utilizado para monitorizar y determinar el punto final del proceso de mezclado fue PC Análisis de la distancia de los *scores* (PC-SDA). Este método tiene una ventaja importante sobre los otros métodos, esta es que determina estadísticamente cuál es el punto final de proceso de mezclado lo que nos indica con

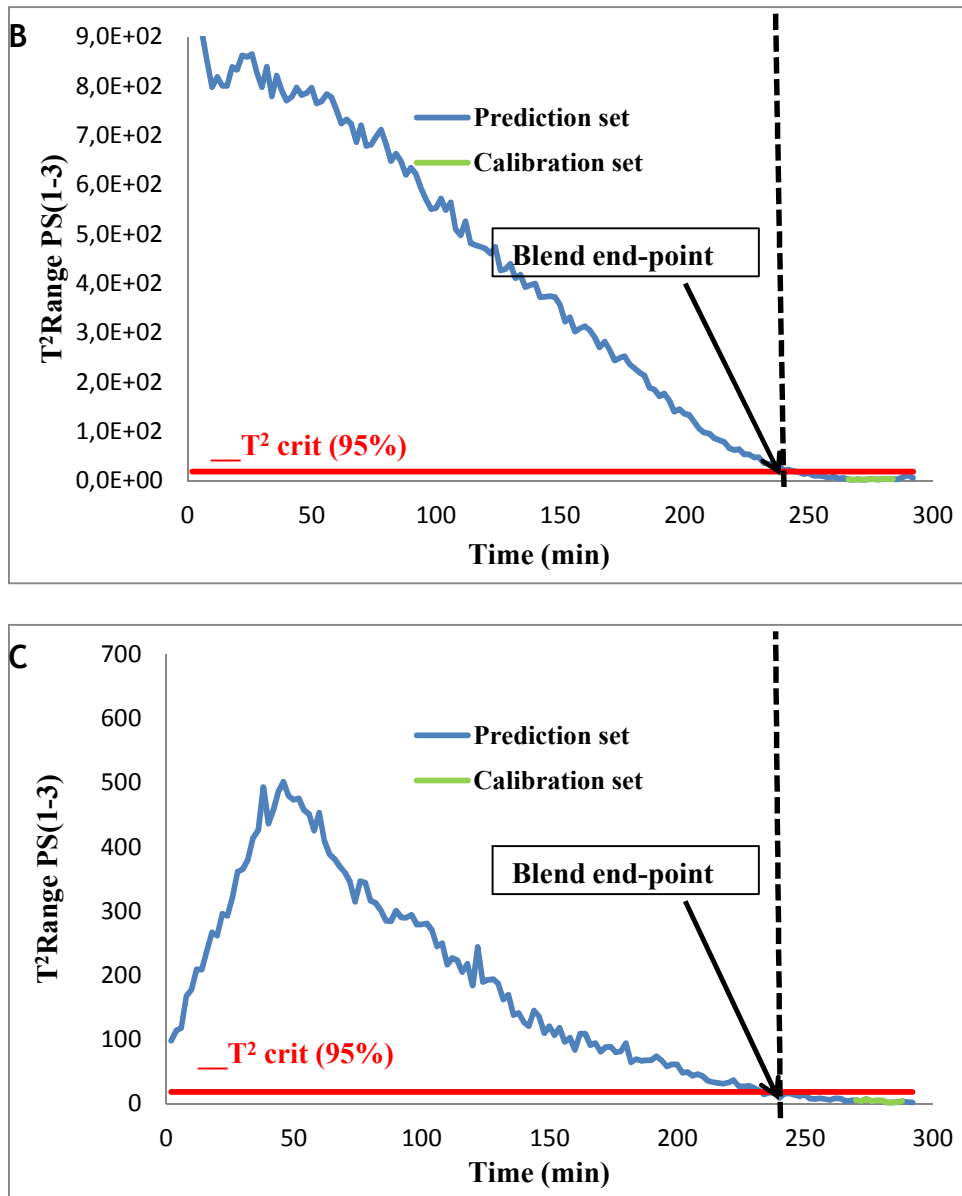
RESULTADOS Y DISCUSIONES

mayor seguridad cuando la mezcla es homogénea a diferencia de las otras metodologías, sin embargo presenta una desventaja semejante al PCA, que es un método retrospectivo.

La Figura 7.4 ilustra los gráficos de *Hotelling's T²* predichos para el proceso de homogeneización de tres mezclas. La determinación del valor límite de una desviación estándar aceptable de las distancias de los *scores* de un PCA se toma a partir de la desviación estándar de los *scores* en el momento en que los resultados se encuentran en el intervalo de confianza de 95%. Esto nos indica el punto final para el proceso de homogeneización.

Estos valores son similares a los obtenidos por el método cuantitativo para estas mismas muestras, lo que indica su capacidad para la correcta determinación del punto final en los procesos de mezcla.





Tratamiento espectral modo SNV en un rango de longitud de onda de 1100–2500 nm.

Figura 7.4 Aplicación de PC-SDA: grafico *Hotelling's T²* predicho para la determinación del punto final del mezclado (línea punteada) y el espacio de diseño propuesto (T^2 Crit. 95 %, línea sólida, rojo) en tres mezclas. (A) muestra a 100.3 % VN, (B) muestra a 105.4 %VN y (C) muestra a 95.8 % VN.

A pesar de los buenos resultados obtenidos por algunos de los métodos cualitativos aquí descritos, para determinar el punto final del proceso de mezclado estos solo nos permiten saber el tiempo necesario para que la mezcla se considere homogénea, pero en caso de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

haber habido algún error en la adición de alguno de los componentes de la mezcla esto solo será evidente con un método cuantitativo.

7.1.2. Método cuantitativo para la determinación de la uniformidad en el mezclado

Los métodos cuantitativos en este estudio no solo son utilizados para corroborar los resultados obtenidos por los métodos cualitativos, sino que además nos brindan valores de concentración de API en cada momento del mezclado. Se considera el punto final del mezclado cuando los valores de API son constantes.

Estos métodos son mucho más complejos debido a la necesidad de construir un modelo de calibración con el fin de predecir la concentración de la API a través del proceso de mezcla. El modelo PLS se ha construido con los espectros de la parte final del proceso de mezcla que pertenecen a seis procesos de mezclado en conjunto con diez de espectros obtenidos a partir de mezclas preparadas *ad hoc* que cubren un intervalo de concentración 90-110 % de la concentración nominal del API. Todos los espectros fueron procesados en el rango de longitud de onda de 1100-1731 y 1856-2500 nm y pretratados en primera derivada.

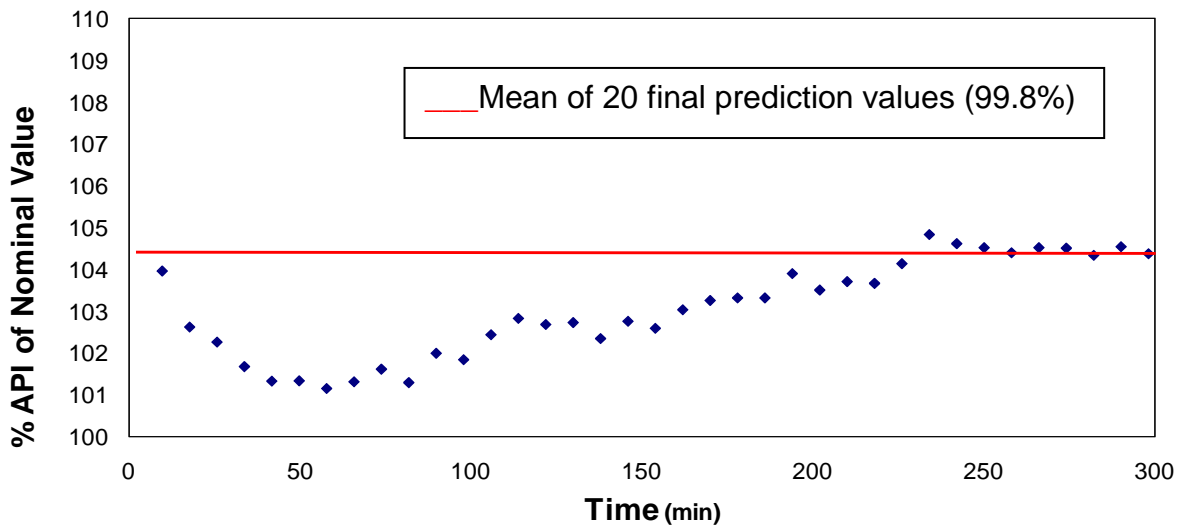
En la **Tabla 7.2** se recogen las características más relevantes del modelo desarrollado. Este modelo se aplicó a los espectros registrados durante el proceso de mezcla de diferentes mezclas con distintas concentraciones.

Tabla 7.2 Figuras de mérito de un modelo PLS para la determinación del API en un proceso de mezclado.

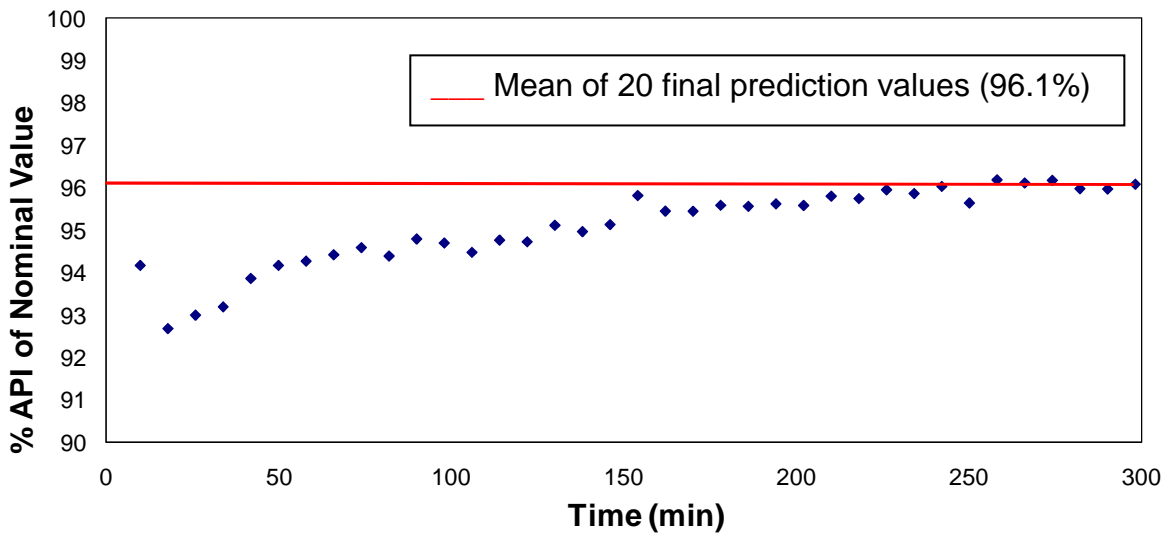
Parámetros	Polvo	
	Calibración	Predicción
Muestras	Laboratorio	Laboratorio
Pretratamiento	1ª derivada	
Rango (nm)	1100-1731, 1856-2500	
Concentración (% del valor nominal)	90-110	90-110
Factores	3	
Varianza explicada Y (%)	97.6	
Nº de muestras	16	60
RSEC/P (%)	1.0	1.0

RESULTADOS Y DISCUSIONES

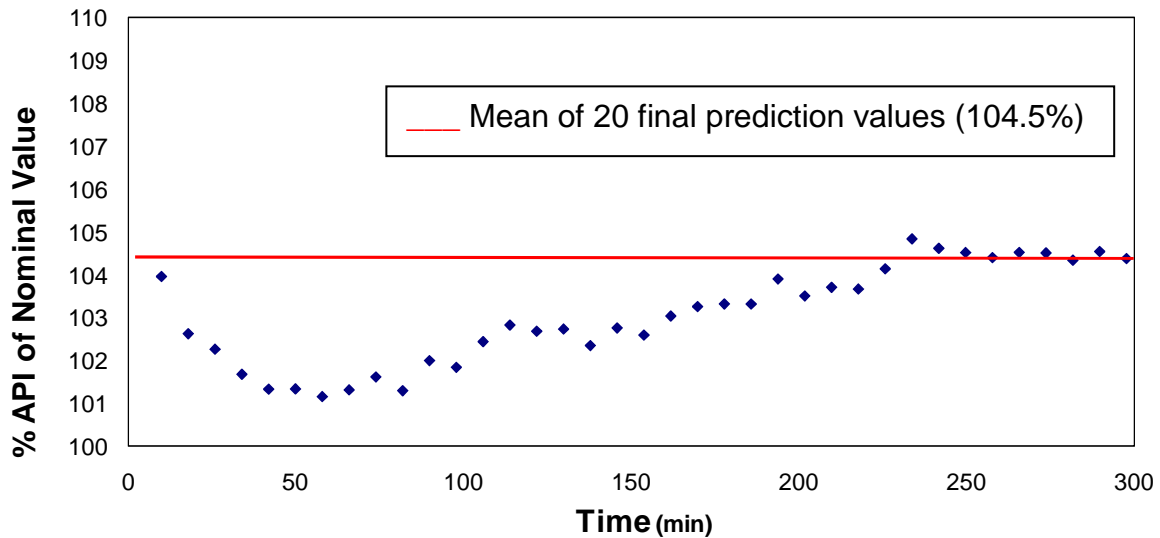
La **Figura 7.5** muestra las predicciones de concentración durante el proceso de mezclado para tres mezclas. El punto donde la concentración de la API es constante y fue considerado el punto final de cada proceso. Los tres procesos de mezcla con diferentes contenidos del API tuvieron el mismo comportamiento.



Muestra a 100.3 % VN.



Muestra a 95.8% VN.



Muestra a 105.4% VN.

Figura 7.5 Determinación de la API a través de proceso de mezcla aplicando el modelo PLS.

A pesar de la mayor complejidad del método cuantitativo PLS debido a la necesidad de construir un modelo de calibración para predecir la concentración del API a través del proceso de mezclado, este método nos brinda datos precisos, basados en la concentración del API durante el proceso de mezclado, que nos permiten establecer el punto final y la concentración de la mezcla cuando se considera homogénea.

Esta información permite realizar los cambios necesarios para corregir algún error a diferencia de los métodos cualitativos, que solo nos dan la opción de establecer el tiempo necesario para asegurar que la composición de la mezcla es homogénea y no nos dan información acerca de los componentes de la fórmula o sus concentraciones.

7.2. Comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman

El propósito de este trabajo fue comparar tres métodos los cuales se encuentran descritos en la sección 6.5 Métodos de análisis cualitativo para el análisis de los datos espectrales registrados durante el proceso de mezclado: variación de la intensidad de pico para

Raman, disimilaridad del promedio de un bloque móvil y un espectro objetivo (DMBA-TS) y Componentes principales-Análisis de la distancia de los *score* (PC-SDA), aplicándose estas dos últimas a los datos espectrales NIR y Raman. Un segundo objetivo fue la comparación de los resultados obtenidos por cada técnica de cara a facilitar la elección de la más adecuada para el proceso de mezclado utilizado. Para este estudio se preparó un sistema sencillo de mezclado en miniatura, el cual no tuvo como finalidad simular un proceso real de mezclado, sino más bien evaluar tanto los métodos quimiométricos y las técnicas vibracionales para un proceso de mezclado. En el estudio se realizó el mezclado de diferentes mezclas de ácido acetilsalicílico (AAS) como principio activo API, almidón y sacarosa como excipientes como se describe en la **sección 6.2.1.1 apartado Mezcla para la comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman**. Los espectros Raman y NIR fueron pretratados con el fin de corregir o minimizar las contribuciones espectrales debido a propiedades físicas de las muestras tales como tamaño de partícula, forma y compactación del polvo [30].

En el método de variación de intensidad de pico ha sido necesario de una reducción de las variaciones de la línea base, para este fin se aplicó distintos pretratamientos a los espectros de la mezcla (corrección de la línea base, 1ª y 2ª derivada) obteniéndose mejores resultados con la corrección de la línea base y para los métodos multivariados fue la primera derivada de Savitzky-Golay, con ventanas móviles de 21 y 43 puntos, para NIR y Raman respectivamente, y ajustada a un polinomio de segundo orden. Con este pretratamiento se reduce la relación señal/ruido y aumentan las diferencias espectrales, utilizándose el rango completo de los espectros.

A continuación se discute los resultados obtenidos al aplicar estos métodos tanto en los espectros obtenidos por NIR y por Raman.

7.2.1. Variación de la intensidad de pico para Raman

La **Figura 7.6** muestra los espectros NIR y Raman de los componentes puros y de una mezcla. En el espectro NIR de una mezcla (mezcla nº5), se observa una gran semejanza al excipiente mayoritario, lo cual impide la identificación de las bandas correspondientes a los otros componentes presentes en la mezcla, con la excepción de las bandas a 5200 cm^{-1} y 4750 cm^{-1} correspondientes al almidón y la sacarosa respectivamente; por lo cual es necesario realizar un análisis multivariante para poder seguir la evolución del mezclado. En cambio, cuando se observa los espectros Raman, es fácil la elección de picos característicos para cada compuesto en la mezcla, debido a que los espectros presentan picos aislados y bien diferenciados, cuyas intensidades están relacionadas con la concentración de los compuestos presentes en la mezcla. Por esta razón es más fácil aplicar una técnica univariante para el seguimiento del proceso de mezclado como es la estimación directa de la variación de las alturas de los picos. Los picos seleccionados por ser los más separados y diferenciados para los compuestos de la mezcla fueron alrededor de 1607 cm^{-1} para AAS (pico correspondiente al anillo aromático del benceno [46]), 849 cm^{-1} para la sacarosa (pico correspondiente a sus enlaces C-H [47]) y a 480 cm^{-1} para el almidón (pico correspondiente a los enlaces C-O y C-C-C). Para su fácil identificación, estos picos se encuentran marcados con un asterisco en la **Figura 7.6b**.

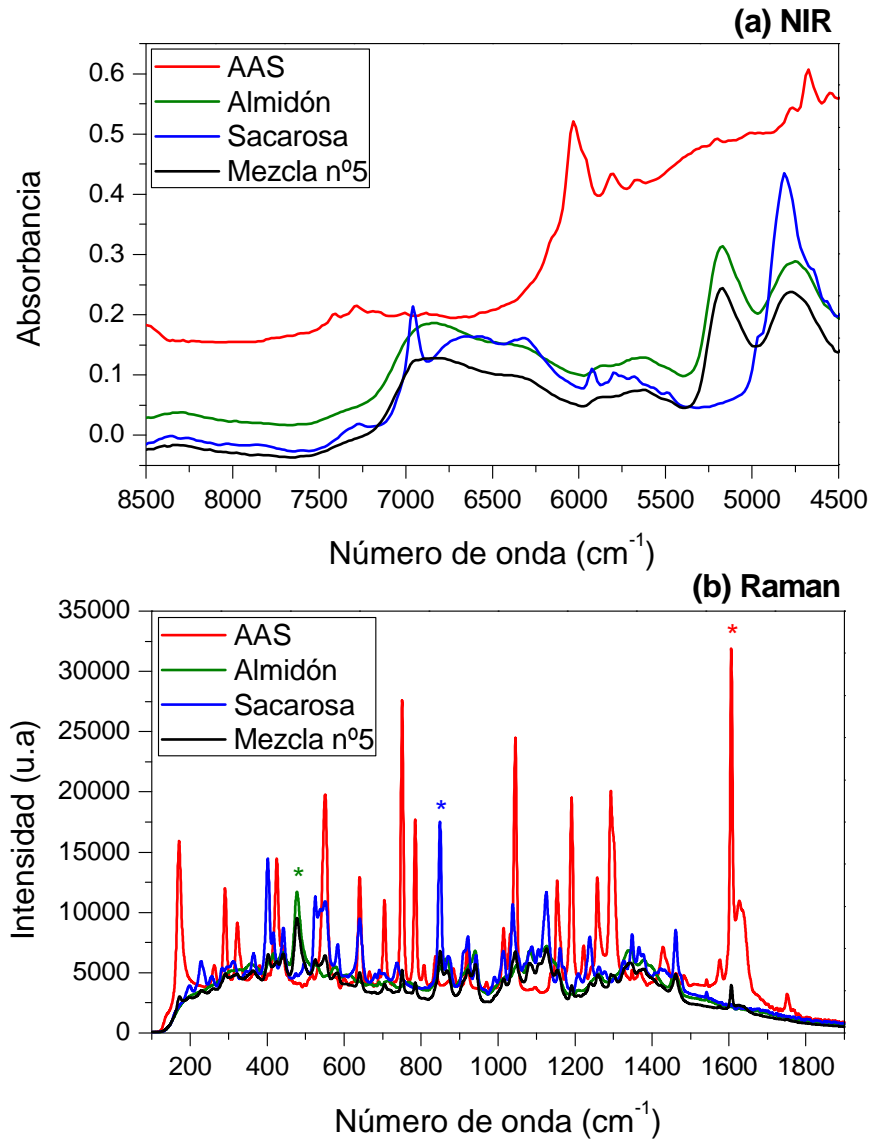


Figura 7.6 Espectros (a) NIR y (b) Raman, de una muestra de mezcla seleccionada. Los picos característicos para cada componente de la mezcla están marcados con asteriscos en el espectro Raman.

La **Figura 7.7** muestra el gráfico de la variación de la intensidad de los picos de los tres componentes de la mezcla (mezcla n°5); se observa un incremento de la altura de los picos de los compuestos minoritarios (AAS y sacarosa). Este incremento de la intensidad de las bandas de los componentes minoritarios va asociado al aumento de la intensidad del componente mayoritario a medida que aumenta la homogeneidad de la mezcla. Consideramos que la mezcla es homogénea cuando los valores de la altura de los picos

RESULTADOS Y DISCUSIONES

alcanzan un valor constante, o tienen variaciones mínimas, para todos los componentes. Sin embargo, cuando se observan individualmente cada una de las curvas, se observan saltos erráticos de los valores obtenidos; esto es en parte debido a la incertidumbre en la medición y en parte a la reducida área de la que se obtiene la información espectral y que dificulta la detección del punto final del mezclado (**Figura 7.7**), este tipo de problemas también fueron reportados por Svensson *et al.* [48], ellos observaron que el uso de métodos multivariantes como PCA y PLS dieron mejores resultados que los métodos univariantes reduciendo las oscilaciones de los resultados y permitiendo ver el punto final del mezclado con más claridad.

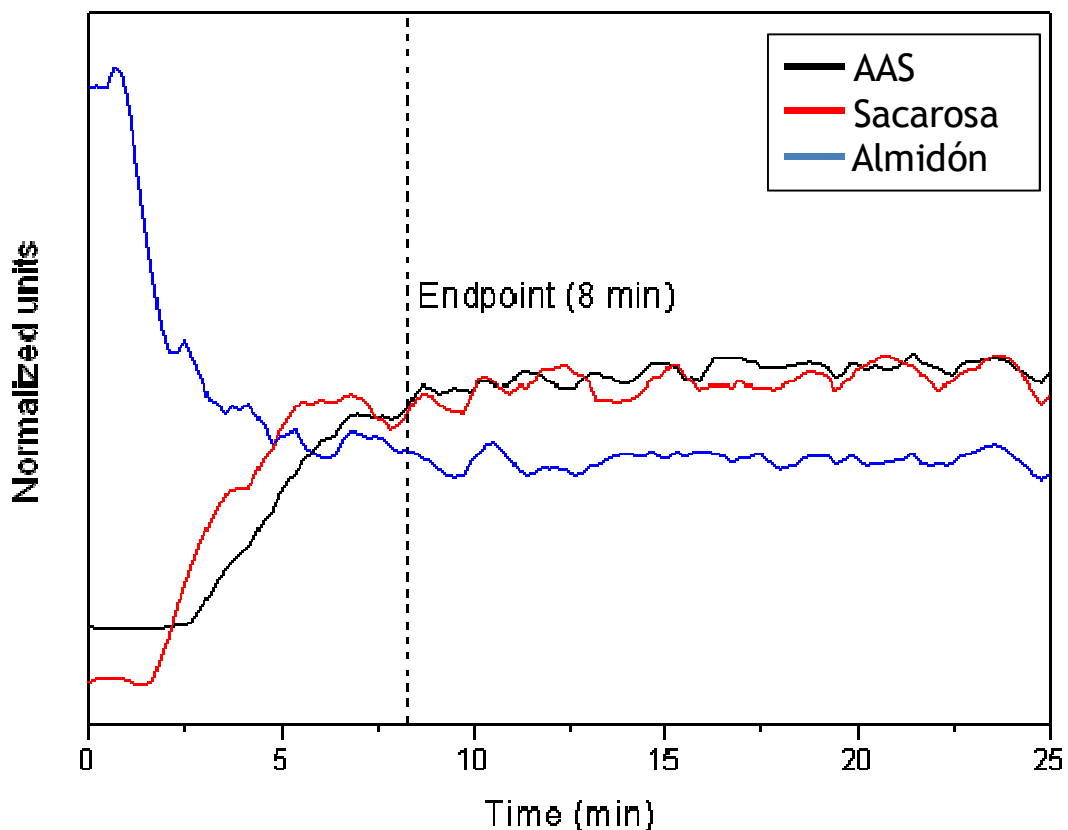


Figura 7.7 Efecto de la altura de pico en función del tiempo de mezclado por Raman (mezcla n°5) .

7.2.2. Metodos multivariantes

En cuanto a los métodos multivariantes empleados, DMBA-TS y PC-SDA, estos ya han demostrado ser útiles para una correcta determinación del punto final del mezclado en estudios anteriores [6,7,42,49], utilizando únicamente la espectroscopia NIR. El DMBA-ST presenta la cualidad de ser un método sencillo y que permite hacer el seguimiento de la homogeneidad durante el mezclado, ya que no necesita que se finalice el proceso para analizar los datos; además permite obtener información relacionada con la concentración, porque los espectros de mezcla se comparan con un espectro objetivo (espectro con la concentración nominal de cada uno de los componentes). Este método exige preparar una mezcla con la concentración objetivo y asumiendo su correcta homogeneidad (espectro objetivo).

Por otro lado, el método PC-SDA presenta la ventaja de determinar estadísticamente el punto final del proceso de mezcla, lo que en consecuencia garantiza una mayor seguridad en la elección del punto final del mezclado. En este caso es necesario hacer un PCA del conjunto de datos y elaborar un modelo, sin embargo la necesidad de elaborar un modelo no impide la posibilidad de poder hacer un seguimiento del proceso de mezclado en tiempo real, ya que un modelo elaborado con un número representativo de mezclas con la concentración nominal de los componentes de la mezcla puede ser utilizado para hacer el seguimiento de otras mezclas en tiempo real y al mismo tiempo detectar variaciones en la concentración [34].

Estos dos métodos multivariantes fueron evaluados para cada técnica espectroscópica, utilizando los algoritmos descritos anteriormente. La **Tabla 7.3** resume los tiempos finales de mezclado obtenidos por los dos métodos evaluados, tanto para NIR como Raman. Como se observa los promedios de los tiempos finales fueron iguales, excepto para DMBA-ST en NIR donde se obtuvo, en general, tiempos finales de mezclado superiores que los obtenidos con Raman, Se aplicó un test-t para muestras emparejadas, encontrándose que existes diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las dos técnicas

RESULTADOS Y DISCUSIONES

espectroscópicas utilizando DMBA-TS, dado la significación de la prueba, podemos afirmar que estas diferencias no parecen que sea debido al azar, sino a las características de los equipos utilizados y al “*set-up*” del mezclado en sí. Esto pudo influir en los espectros obtenidos y en su variabilidad, ya que el montaje del proceso de mezclado simula un mezclador de tambor rotatorio, donde mayormente el proceso de mezclado se produce a lo largo del vial, mezclándose más rápidamente la sección más exterior cercana a las paredes del vial y más lentamente parte interna [50-51]. Por otro lado, al realizar el análisis con el test-t de los resultados utilizando PC-SDA no se encontró diferencia significativa entre los puntos finales obtenidos con NIR y Raman, siendo un indicativo que este método no se ve influenciado por la técnica utilizada para llevar a cabo la monitorización. Esto demuestra la capacidad de este método para determinar correctamente el punto final en los procesos de mezcla en ambas técnicas.

Al comparar el método de variación de intensidad de pico con los métodos multivariantes utilizados en este estudio, se observó que los resultados son muy semejantes (**Tabla 7.3**), sin embargo, la determinación de punto final es difícil con este método por los saltos erráticos de los valores obtenidos a diferencia de los métodos multivariantes que reducen las variaciones de los resultados y ofrecen un límite para determinar con precisión el punto final del mezclado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.3 Comparación del punto final de mezclado obtenido (en minutos) por los métodos quimiométricos empleados.

Mezcla	Intensidad de pico		DMBA-TS		PC-SDA	
	Raman		Raman	NIR	Raman	NIR
1	9		7	10	8	8
2	8		7	9	7	9
3	12		5	11	9	8
4	13		8	12	11	8
5	9		7	11	6	6
6	9		9	12	9	12
7	9		10	11	9	10
8	14		12	7	9	6
9	9		13	12	9	9
10	9		9	15	9	13
11	9		9	11	9	10
Promedio	10		9	11	9	9
DS	2.0		2.3	2.0	1.3	2.2
t _{obs}			2.38		0.55	
t _{crit}			2.23		2.23	

DS: Desviación estándar

A modo de ejemplo, la **Figura 7.8** muestra una comparación visual de los perfiles de homogeneidad, versus el tiempo de mezclado, para los métodos evaluados y las dos técnicas utilizadas. Los perfiles corresponden a dos experimentos con la misma concentración (mezcla nº 5). Al aplicar el método DMBA-TS (**Figura 7.8a**), se observó un valor de punto final de mezclado diferente para NIR a los obtenidos por Raman, esto es debido a las características de los equipos utilizados y al mezclado en si, como ya se comentó anteriormente. La **Figura 7.8b** muestra la aplicación de la segunda técnica utilizada (PC-SDA), tanto para la espectroscopia NIR como Raman. La **Figura 7.8b** muestra los valores de la estadística T^2 de Hotelling para un proceso de homogeneización en función del tiempo, donde cuando los resultados caen dentro del intervalo de confianza del 95%, es indicativo del punto final para el proceso. En este método se utiliza los espectros con una menor variabilidad espectral para establecer un límite donde se considera la mezcla homogénea a diferencia de lo que se hace con el método DMBA-TS donde el límite está relacionado con la variabilidad instrumental, ya que se obtiene a partir del seguimiento del mezclado de un compuesto puro donde las variaciones solo pueden deberse a las oscilaciones del instrumento (SDPC) [49].

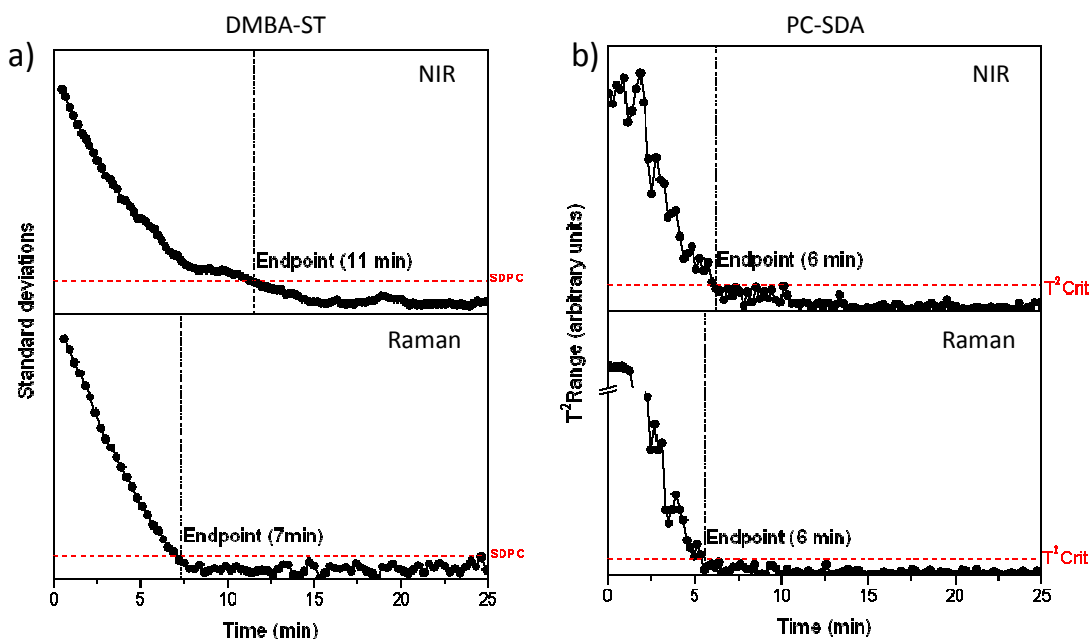


Figura 7.8 (a) Seguimiento del proceso de mezcla por DMBA-ST, donde SDPC es la desviación estándar para el compuesto puro. (b) Aplicación de PC-SDA: Gráficos *Hotelling's T²* Predichos para la determinación del punto final del mezclado (línea punteada de color negro) y el espacio de diseño propuesto (T^2 Crit. 95 %, línea punteada de color rojo), tanto para la espectroscopia NIR y Raman (mezcla n°5).

7.3. Determinación de parámetros críticos en dos etapas (granulación y compresión) de la fabricación de comprimidos farmacéuticos

7.3.1. Determinación de tamaño de partícula en granulados

Con el objeto de mejorar la eficiencia del proceso productivo y asegurar una alta calidad del producto final es necesario un control del tamaño medio de partícula así como de la distribución del tamaño de partícula, pues un tamaño y distribución adecuados mejoran las características físicas de los comprimidos obtenidos a partir de estos granulados (dureza, desintegración, peso promedio, etc.).

Las muestras de granulados utilizadas en el estudio han sido recogidas en un intervalo de dos años, lo que nos permite tener muestras con una distribución temporal de tamaños de partícula y, por tanto, muy adecuadas para conocer su comportamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la **Figura 7.9** se recogen los espectros NIR de cada una de las fracciones obtenidas por el proceso de tamizado, que muestra el desplazamiento del espectro producido por el aumento del tamaño de partícula. Se ha ensayado la construcción de un modelo PLS2 para determinar la distribución de tamaños de partícula.

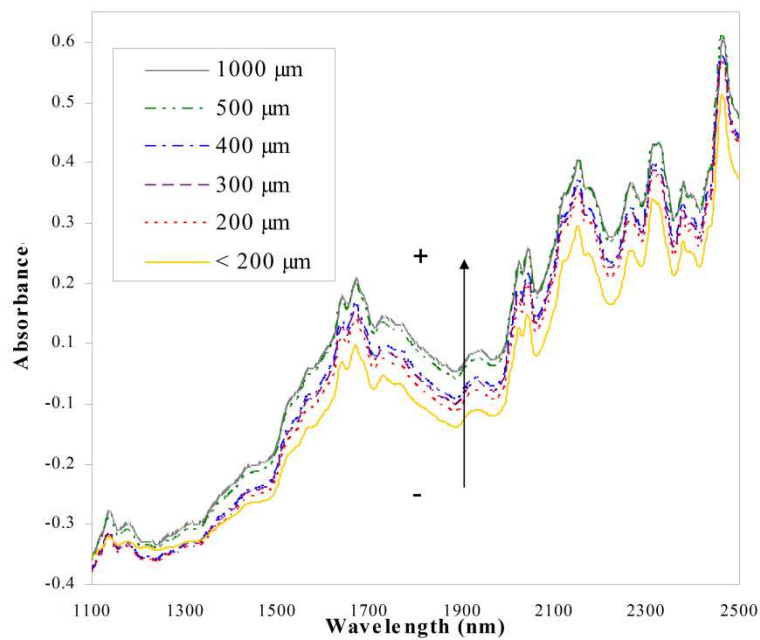


Figura 7.9 Espectros en absorción de muestras con diferente tamaño de partícula.

El PLS2 nos permite correlacionar la matriz de datos espectrales con más de una variable, obteniendo un único modelo de calibración para predecir los diferentes tamaños de partícula [52]. Se trabajó con un rango de longitudes de onda de 1100-2500 nm. El modelo con mayor capacidad predictiva se obtuvo en segunda derivada (**Tabla 7.4**).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.4 Figuras de mérito de un modelo PLS2 y PLS para la determinación del tamaño de partícula en granulados.

	Distribución de tamaño de partícula		Tamaño de partícula medio	
	Calibración	Predicción	Calibración	Predicción
Muestras	Producción		Producción	
Pretratamientos	2 ^a derivada		1 ^a derivada	
Rango (nm)	1110-2488		1110-2488	
Rango de valores	0-1000 μm			
Algoritmo	PLS2		PLS	
Factores	5		5	
Varianza explicada Y (%)	97.2		99.5	
Nº de muestras	12	6	13	8
RSEC/P (%)	2.7	7.5	1.0	6.2

Conocer la distribución del tamaño de partícula nos permite determinar el grado de heterogeneidad del granulado y el rango de tamaños de partícula presentes en el granulado, partículas mayores a 250 μm y una distribución estrecha de tamaño de partícula permite que el granulado tenga una buena fluidez [53].

En la **Figura 7.10** se observa cómo las curvas de predicción se ajustan correctamente a las curvas obtenidas por el método de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

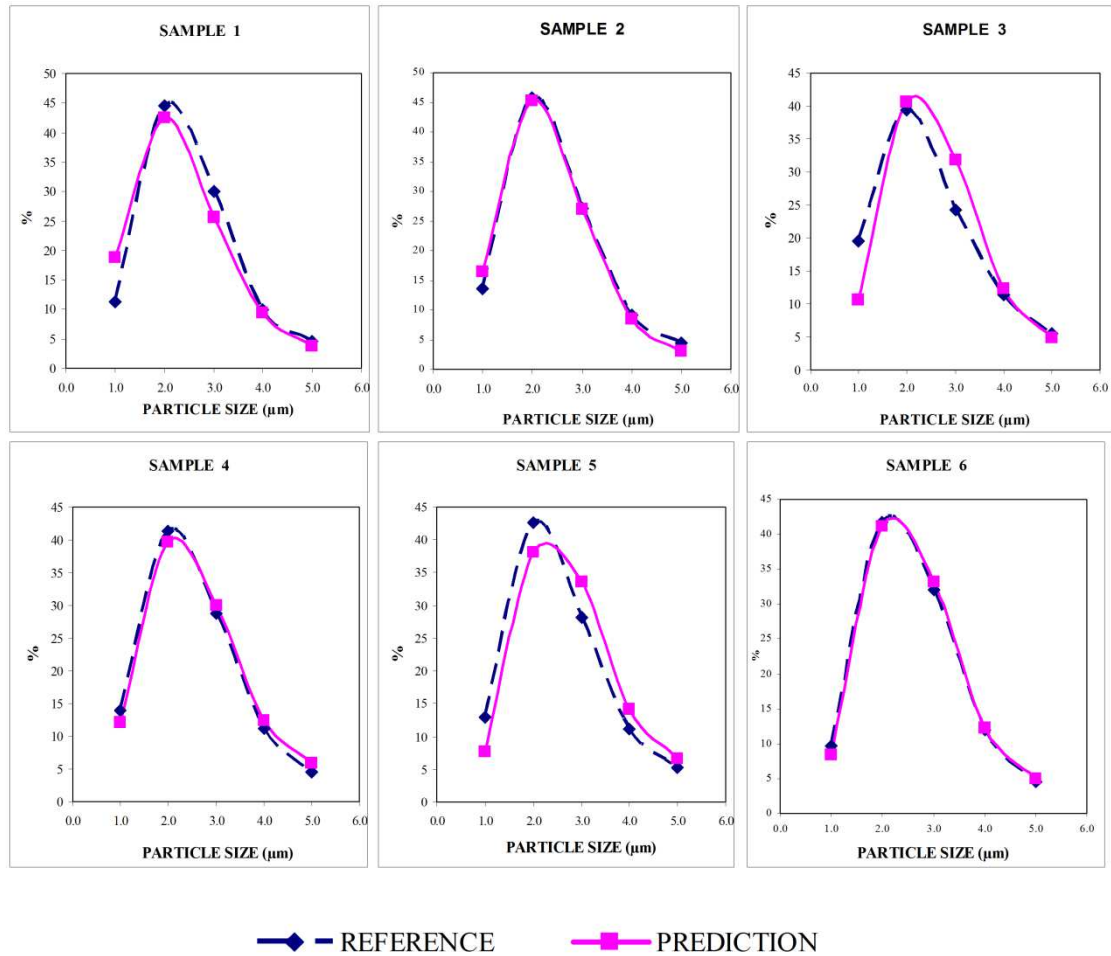


Figura 7.10 Curvas de distribución de tamaño de partícula para muestras de diferentes granulados obtenidas aplicando modelos de calibración PLS2.

También se ha preparado un modelo PLS para determinar el tamaño de partícula medio utilizando el rango completo de longitudes de onda (1100-2500 nm); el modelo con mejor capacidad predictiva es el de primera derivada y sus características se muestran en la **Tabla 7.4**, donde se han comparado los valores de tamaño de partícula medio obtenidos con los modelos PLS y PLS2 (media de los valores predichos del tamaño de partícula de cada fracción) con respecto al valor teórico mediante la aplicación del test t para datos apareados. El test-t demuestra que no existen diferencias significativas entre ambos métodos con respecto al valor de referencia para un nivel de significación del 95 % (**Tabla 7.5**).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.5 Determinación de tamaño de partícula medio en granulados (comparación de los modelos de calibración PLS y PLS2).

	Distribución de tamaño de partícula (PLS2)	Tamaño de partícula (PLS)	Referencia de tamaño de partícula medio (μm)	PLS 2 para distribución de tamaño de partícula	PLS para tamaño de partícula
Muestras	Tamaño de partícula medio (μm)	Predicción del tamaño de partícula medio (μm)		Residual	
1	684	683	623	-61	-60
2	676	704	648	-28	-56
3	599	668	672	72	4
4	606	654	633	27	-20
5	557	573	626	69	53
6	583	614	597	14	-17
			Promedio de residuales	15.7	-16.02
			s	52.86	41.71
			n	6	6
			t _{exp}	0.73	0.94
			t _{crit*}	2.57	2.57

* t crítica ($\alpha= 0.05$, 5 grados de libertad)

7.3.2. Determinación de API en granulados

Para la construcción de los modelos de calibración para granulados se han seleccionado un conjunto de muestras que cubren el rango de concentraciones del principio activo entre el 80% y el 111 % respecto al contenido nominal de paracetamol.

Previamente a la construcción del modelo de calibración para API en los granulados, se realizó un PCA con las muestras de granulados de laboratorio y los de producción para evaluar el grado de semejanza de las muestras entre sí, definir las fuentes de variabilidad más importantes y, finalmente, seleccionar un conjunto de muestras adecuado para desarrollar el modelo de calibración.

En la **Figura 7.11** se muestra un gráfico de dispersión de los scores de los dos primeros factores que conjuntamente explican el 94 % de la variabilidad total. Las muestras de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

laboratorio cubren un amplio rango de valores del primer *score*, mientras que las muestras de producción están agrupadas en un clúster central en el gráfico que muestra la gran semejanza entre ellas con un valor del primer *score* muy semejante al de las muestras de laboratorio de concentración nominal de API.

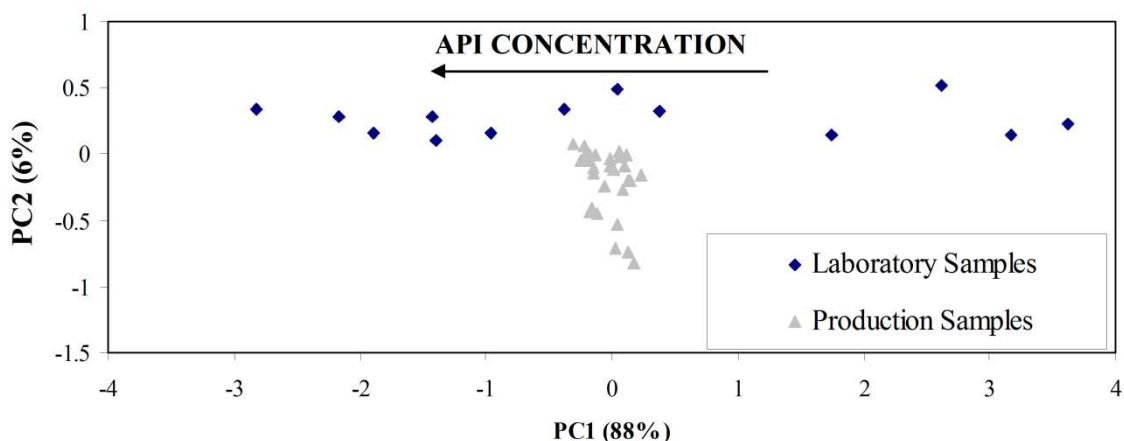


Figura 7.11 Gráficos de los *scores* de un PCA a partir de muestras de granulados.

Debido a la semejanza entre las muestras de laboratorio y de producción, como demuestra el gráfico de dispersión de *score*, se decidió que el conjunto de calibración estuviera constituido únicamente por muestras de laboratorio y las muestras de producción formaran el conjunto de validación.

Se ensayaron varios pretratamientos espectrales en la elaboración de modelo de cuantificación del contenido de paracetamol en granulado, obteniéndose los mejores resultados con un modelo en SNV con dos factores PLS. La eliminación de las zonas alrededor de 1440 y 1940 nm, correspondientes a la absorción de los grupos OH, asociados con el contenido de agua de la muestra; proporciona un modelo más simple y con mejor capacidad predictiva.

En la **Tabla 7.6** se recogen los parámetros más relevantes del modelo seleccionado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.6 Parámetros relevantes de los modelos PLS para la determinación de API en granulados de paracetamol 1g.

	Granulado		
	Calibración	Predicción	
Muestras	Laboratorio	Laboratorio	Producción
Pretratamiento	SNV		
Rango (nm)	1550-1800,2050-2400		
Concentración (% etiqueta de producto)	80.0-111.0	80.0-111.0	95.0-105.0
Factores	2		
Varianza explicada Y (%)	99.5		
Nº de muestras	14	8	33
RSEC/P (%)	0.78	1.53	2.95

Un correcto valor de la concentración del API durante esta etapa del proceso de producción de los comprimidos permitirá asegurar la concentración del API en las siguientes etapas y en el producto final o bien realizar una corrección de la misma antes de seguir el proceso.

7.3.3. Determinación de presión de compactación en comprimidos

La presión de compactación es un parámetro que afecta a la desintegración, a la disolución del comprimido y a su dureza.

Las pruebas de desintegración y disolución de un fármaco son una aproximación a la biodisponibilidad y es necesario que la curva de liberación del API sea la misma en todos los lotes y esta depende directamente de la presión de compactación de los comprimidos. Por otro lado, es necesario que el comprimido tenga la dureza apropiada para ser manipulado sin que se afecte su integridad.

Los comprimidos de laboratorio preparados a una concentración de API $\pm 5\%$ respecto al valor nominal y en un rango de presiones comprendidas entre 74 y 370 MPa se dividieron en tres grupos, según la presión de compactación.

La **Figura 7.12** muestra cómo la presión de compactación aplicada en la preparación de los comprimidos produce un desplazamiento de los espectros NIR.

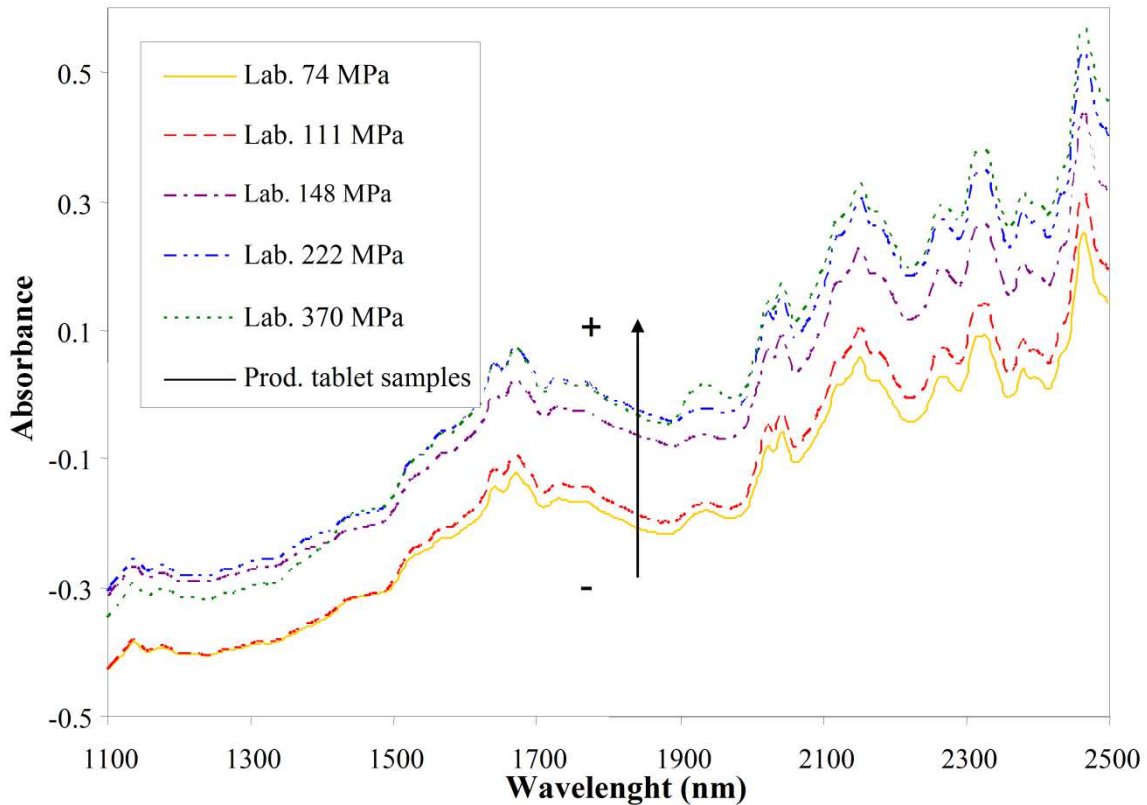


Figura 7.12 Espectros en Absorbancia de muestras de laboratorio y comprimidos de producción a diferente presión de compactación.

En la **Figura 7.13** se muestra el gráfico de dispersión de los scores de un PCA de comprimidos de laboratorio, de muestras en polvo y de comprimidos de producción. Se aprecia que la mayor fuente de variabilidad (PC1, 85 % de la varianza espectral) está asociada a la presión de compactación, mientras que el 2º componente (10% de la varianza explicada) recoge la variabilidad debida a las diferencias entre comprimidos de producción y laboratorio [54].

La **Figura 7.13** indica que las muestras de producción quedan comprendidas en el rango de 148 a 221 MPa de las muestras de laboratorio, lo cual nos induce a pensar que la presión de compactación de los comprimidos de producción se encuentra en ese rango.

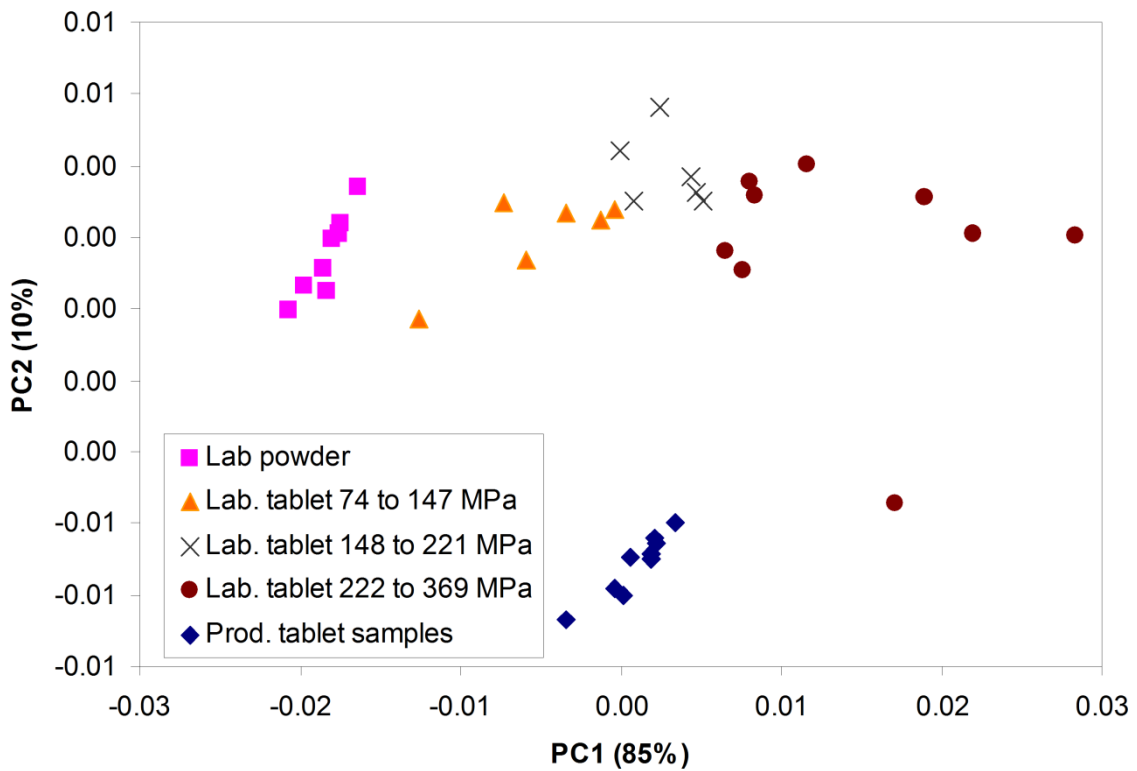


Figura 7.13 Gráfico de *scores* de un PCA para muestras de laboratorio (polvo y comprimidos) y comprimidos de producción.

Se ha construido un modelo para determinar la presión de compactación de los comprimidos usando estas muestras de laboratorio. Los parámetros más relevantes del modelo se recogen en la **Tabla 7.7**. No se dispone de valores de referencia de la presión de compactación para validar el modelo; el único dato disponible es el intervalo de trabajo de la máquina de compactación que está comprendido entre 195-215 MPa.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.7 Determinación de la presión de compactación en comprimidos.

Presión de compactación			
Muestras	Calibración	Predicción	
	Laboratorio	Laboratorio	Producción
Pretratamientos	1ª derivada		
Rango (nm)	1110-2488		
Rango de valores	74-370 MPa		172-223 MPa
Algoritmo	PLS		
Factores	4		
Varianza explicada Y (%)	99.0		
Nº de muestras	16	10	90
RSEC/P (%)	3.5	8.6	*

* Los valores de referencia no están disponibles para el cálculo RSEP.

El modelo construido se ha utilizado en la predicción de la presión de compactación de noventa comprimidos de producción correspondientes a nueve lotes: se ha obtenido una media 201 MPa y con valores en el rango de 172 a 223 MPa.

La **Figura 7.14** muestra el gráfico de control de las presiones de compactación predichas para cada comprimido, donde observamos las fluctuaciones de presión de compactación de las muestras. Los valores se distribuyen aleatoriamente alrededor de un valor central (el promedio de los datos) y tan solo dos comprimidos tienen una presión de compactación fuera del límite definido por el valor medio $\pm 2 \sigma$.

El diagrama de control de los valores individuales es efectivo para controlar desviaciones y tendencias a partir de valores individuales y se puede deducir que el proceso de compactación está bajo control.

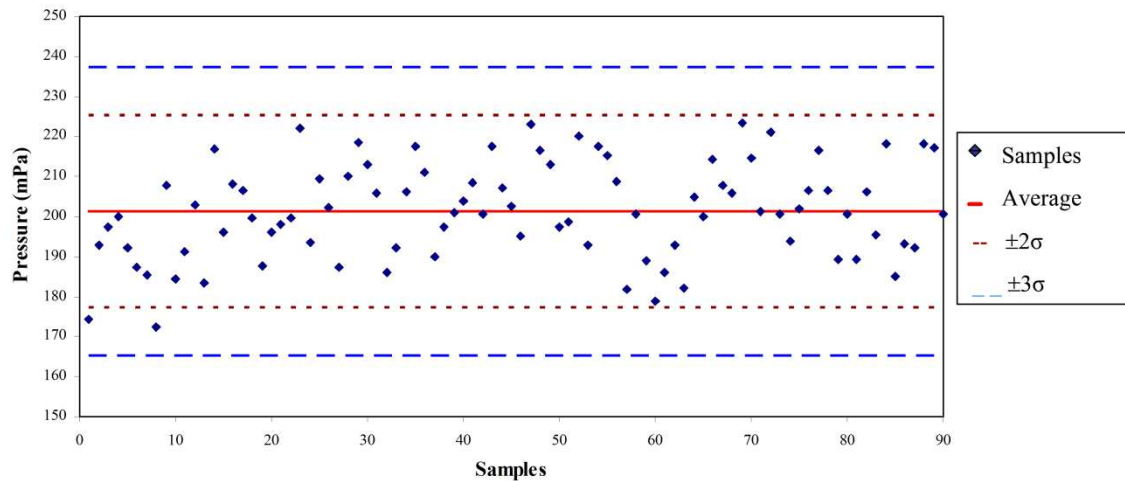


Figura 7.14 Gráficos de control de presión de compactación para comprimidos de producción.

7.3.4. Determinación de API en comprimidos

Para la elaboración del modelo para comprimidos se han seleccionado un conjunto de muestras de laboratorio que cubren el rango de concentraciones del principio activo entre el 80% y el 111% respecto al contenido nominal de paracetamol, compactados a una presión de entre 195 y 215 MPa.

En la construcción del modelo para comprimidos se sigue el mismo esquema realizado para granulados en la sección **5.2.2 determinación de API en granulados**. A diferencia del modelo de granulados, el gráfico de dispersión de *score* del PCA indica diferencias entre las muestras de laboratorio y las de producción para comprimidos, por lo que el conjunto de calibración se selecciona tomando ambos tipos.

El conjunto de validación está formado por muestras de laboratorio y de producción. Los mejores resultados se obtienen con un modelo en primera derivada con tres factores PLS (Tabla 7.8). El rango espectral seleccionado es 1100-1885 y 2000-2500 nm en donde tampoco se incorpora la zona alrededor de 1940 nm por el motivo descrito anteriormente. No se realizó la eliminación de la zona alrededor de los 1440 nm porque no produjo mejoras en el modelo. Un correcto valor de la concentración del API durante esta etapa

RESULTADOS Y DISCUSIONES

del proceso de producción de los comprimidos permitirá asegurar la concentración del API en el producto final o bien realizar una corrección de la misma antes de seguir el proceso.

Tabla 7.8 Parámetros relevantes de los modelos PLS para la determinación de API en comprimidos de paracetamol 1g.

Comprimidos			
	Calibración	Predicción	
Muestras	Laboratorio y producción	Laboratorio	Producción
Pretratamiento	1ª derivada		
Rango (nm)	1100-1885,2000-2500		
Concentración (% etiqueta de producto)	80.0-111.0	80.0-111.0	95.0-105.0
Factores	3		
Varianza explicada Y (%)	99.5		
Nº de muestras	18 + 5	24	22
RSEC/P (%)	0.65	0.78	0.81

7.3.5. Validación del método para cuantificación del API en comprimidos

El método NIR propuesto para la determinación del API (paracetamol) en comprimidos fue validado en conformidad con las guías ICH [55] y las directrices de la EMA (ICH, 1994) [56]. Con este fin, se ha evaluado la selectividad, linealidad, exactitud, precisión (repetitividad y precisión intermedia) y robustez. La robustez del método se evaluó analizando muestras recogidas durante un periodo de seis meses. La aplicación de un test-t para datos emparejados con una significancia al 95% de confianza, sobre las diferencias entre los espectros NIR y los valores HPLC reveló que los resultados de los dos métodos no muestran diferencias significativas entre ellos.

Los resultados del estudio de validación del método se muestran en la **Tabla 7.9**.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.9 Parámetros de la validación para la determinación de API en comprimidos de producción.

	Parámetros	Resultado
Linealidad	n	20
	Rango de concentración(% del valor nominal)	80-111%
	Ordenada de origen	3±4
	Pendiente	0.98±0.04
	R	0.992
Exactitud	n	6
	Promedio de los residuales (% del valor nominal)	0.08
	s	7.2
	t _{exp}	0.27
	t _{crit}	2.571
Repetitividad	Promedio NIR (% del valor nominal)	97.3
	CV %	0.1
Precisión intermedia	ANOVA	
	Día (3)	
	F _{exp}	3
	F _{crit}	19
	Analista (2)	
	F _{exp}	0.3
	F _{crit}	18.5
	s	0.1
CV %	0.1	
Robustez	n	26
	Promedio de residuales	0.41
	s	1.12
	t _{exp}	1.89
	t _{crit}	2.06

7.4. Optimización y aplicabilidad de una nueva metodología basada en la obtención del espectro proceso

En la aplicación de las técnicas de calibración multivariable sobre datos de espectroscopia NIR, la selección de un adecuado grupo de muestras para crear el conjunto de calibración es un factor de suma importancia.

En este trabajo se estudia la aplicación y optimización de una nueva metodología para incorporar la variabilidad física producida durante el proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos, basada en la obtención del espectro proceso. Este espectro

contiene los cambios espectrales causados por los distintos tratamientos aplicados a la mezcla de componentes durante el proceso de fabricación.

El método consiste en la adición de un conjunto de espectros proceso (espectros obtenidos por cálculo de la diferencia entre los espectros de comprimidos de producción y espectros de mezclas de laboratorio con la misma concentración nominal) al conjunto de mezclas de laboratorio para producir el conjunto de calibración, como una forma de incorporar los cambios físico producidos durante cada etapa del proceso de producción de comprimidos. Con el fin de seleccionar el mejor modelo de calibración, se definieron dos objetivos en este estudio. Por un lado, establecer la influencia de los pretratamientos espectrales para la obtención del espectro proceso y para la construcción de los modelos de calibración y, por otro lado, determinar el coeficiente multiplicador (m) a aplicar en los espectros proceso para asegurar que se incluya la variabilidad del proceso en el modelo de calibración. La herramienta utilizada para la selección del conjunto de muestras que constituirán el conjunto de calibración fue el análisis de componentes principales (PCA). Para lograr estos objetivos se sistematiza una nueva metodología para la preparación de los conjuntos de calibración que se utilizarán para la determinación de API y de los excipientes en comprimidos de irbesartan. La calidad de esta metodología se ha confirmado aplicándola a comprimidos de paracetamol para el análisis de API y excipientes. En este trabajo se establece una metodología para elaborar modelos de calibración robustos y sencillos para la determinación de los diferentes componentes en el proceso productivo de fármacos, los pasos se describen a continuación:

7.4.1. Construcción de los conjuntos y modelos de calibración

Para preparar un buen conjunto de calibración es importante asegurar que incluya la variabilidad química de la producción y la que introducen los diferentes procesos a que se someten las muestras. Esto se consigue con un conjunto de mezclas de laboratorio en polvo preparadas de acuerdo con un diseño D-óptimo que cubren el rango de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

concentraciones deseado para cada componente y que a la vez minimizan la colinealidad entre los valores de concentración.

La **Tabla 7.10** muestra la correlación de concentración de las muestras preparadas para irbesartan. Hay que destacar que los coeficientes de correlación entre las concentraciones de los componentes de mayor concentración (Lactosa, Avicel pH 102 y API) fueron inferiores al 0.50 entre ellos, pero no puede reducirse la colinealidad de los componentes minoritarios (su rango de concentraciones nominales va desde 1.5 al 3 %).

Tabla 7.10 Coeficientes de correlación entre la concentración de los diferentes componentes de las mezclas de laboratorio de irbesartan 300 mg.

Coeficiente de correlación	Irbesartan	Lactosa	Avicel pH 102	PVP 25	Croscarmelosa sódica	Aerosil 200	Estearil fumarato de sodio
Irbesartan	1	–	–	–	–	–	–
Lactosa	0.32	1	–	–	–	–	–
Avicel pH 102	0.23	0.20	1	–	–	–	–
PVP 25	-0.99	-0.39	-0.29	1	–	–	–
Croscarmelosa sódica	-0.99	-0.40	-0.28	0.99	1	–	–
Aerosil 200	-0.99	-0.38	-0.29	1.00	0.99	1	–
Estearil fumarato de sodio	-0.99	-0.40	-0.28	0.99	1.00	0.99	1

La variabilidad física del proceso de producción se introduce en la calibración a través de la aplicación de la metodología del espectro proceso, que consiste en sumar los espectros proceso (**Sp**) a los espectros de las mezclas de laboratorio preparadas según el diseño descrito en la sección **6.2.2.2 Espectro proceso** [57].

Como puede observarse en la **Figura 7.15**, en la que se comparan el espectro de un comprimido de producción con el de una mezcla en polvo de la misma concentración para

RESULTADOS Y DISCUSIONES

todos los componentes del comprimido, hay un desplazamiento del espectro, además de un ligero cambio en la intensidad de las bandas causado por los cambios físicos durante el proceso productivo (granulación y compactación). Las diferencias entre los espectros de muestras de producción y de las mezclas de laboratorio se reducen al sumar el S_p al espectro de unas mezclas de laboratorio [58].

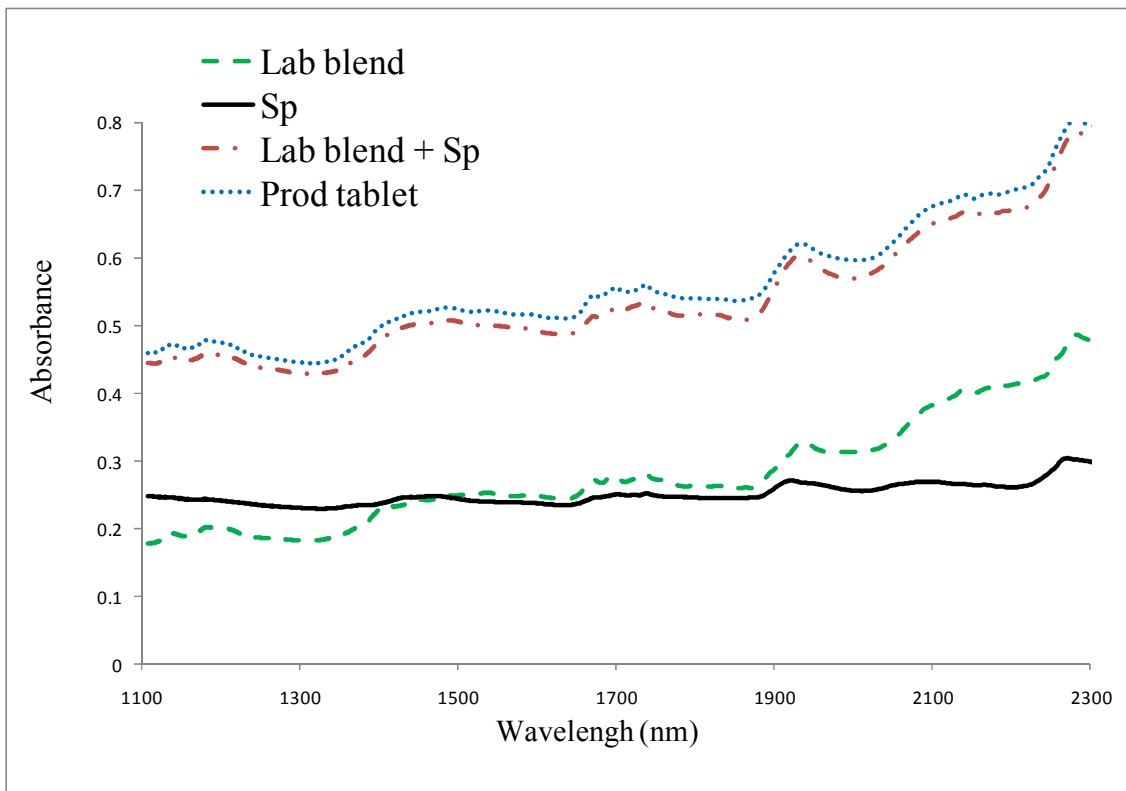


Figura 7.15 Espectros en absorbancia de una mezcla de laboratorio, comprimidos de producción, espectro proceso (S_p) y mezcla de laboratorio + S_p en irbesartan 300 mg.

El espectro de proceso no es único, sino que depende de las muestras seleccionadas para su cálculo, ya que cada comprimido de producción tiene una contribución distinta de los factores que causan la variabilidad del proceso. Por ello, para establecer la matriz de espectros de proceso se calculan varios espectros de proceso, usando varias muestras de producción con el objeto de asegurar que las diferentes magnitudes de variabilidad de las muestras estén representadas en estos espectros. A pesar de esto, es difícil asegurar que

el conjunto de muestras registradas sean representativas de la variabilidad global de la producción.

Un gráfico de dispersión de los *scores* de los dos primeros PC (**Figura 7.16**) nos muestra que los espectros de las mezclas de laboratorio a los cuales se les ha adicionado el Sp (matriz **St.red.**) son más semejantes a las muestras de producción.

La **Figura 7.16A** muestra que las mezclas de laboratorio se encuentran alejadas de las muestras de producción, en contraste con la **Figura 7.16B**, donde las **Sconc. +Sp** (espectros de mezclas de laboratorio a los que se adicionado los espectros procesos) se encuentran formando un conjunto con los comprimidos de producción. Esto indica que con la adición de los espectros proceso a las muestras en polvo de laboratorio se incorpora gran parte de la variabilidad del proceso.

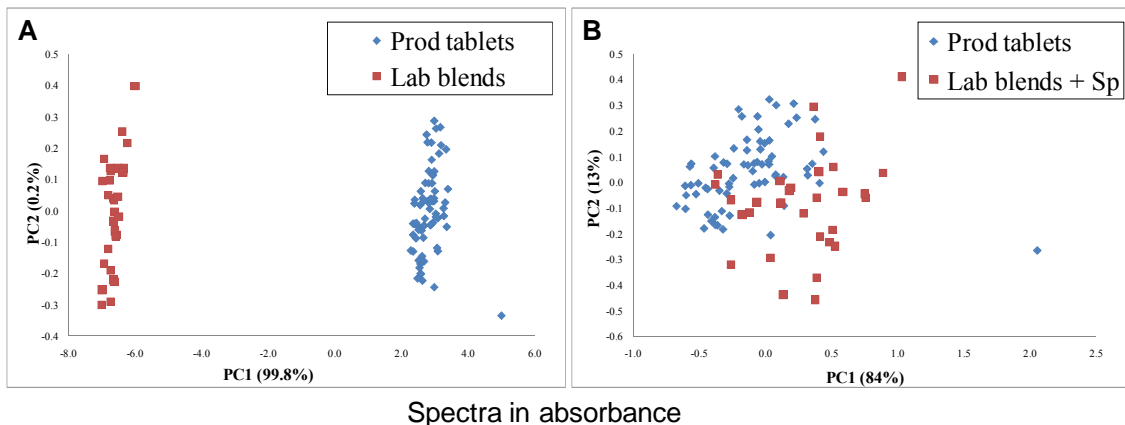


Figura 7.16 Gráfico de dispersión de *scores* de un PCA de espectros en absorbancia en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm para: (A) mezclas de laboratorio y comprimidos de producción (B) mezclas de laboratorio + Sp y comprimidos de producción.

7.4.2. Influencia de los pretratamientos

Con el objeto de establecer el mejor pretratamiento espectral para la obtención de los modelos de calibración, se ha realizado un gráfico de dispersión de los *scores* de un PCA

RESULTADOS Y DISCUSIONES

de los $S_{t,red.}$ y los comprimidos de producción en absorbancia, SNV, 1ª y 2ª derivada en el rango de 1100-2300 nm.

Se puede observar que los grupos de mezclas de laboratorio para todos los pretratamientos incluyen casi totalmente las muestras de producción, lo que permite inferir que las muestras de **St.red.** incorporan gran parte de la variabilidad de proceso e indica que cualquiera de los pretratamientos puede ser adecuado para la construcción del modelo. Para verificarlo se han elaborado modelos PLS en absorbancia y con cada uno de los pretratamientos. Los resultados se muestran en la **Tabla 7.11**. Se puede observar que el modelo construido solamente con mezclas de laboratorio (**Sconc.**), sin la inclusión de los espectros de proceso (**Sp**), dan lugar a errores importantes a pesar de la baja intensidad de los **Sp**. Al comparar los valores de RMSEC/P de los modelos con mezclas de Laboratorio+Sp (**St.red.**), se deduce que todos los modelos dan resultados de predicción razonables, sin embargo, el modelo más sencillo y con mejor capacidad predictiva fue el construido en 1ª derivada. Este pretratamiento será usado en la determinación del factor multiplicado (**m**) a utilizar.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.11 Parámetros relevantes de los modelos PLS construidos a partir de mezclas de laboratorio y mezclas de laboratorio + Sp para la cuantificación de irbesartan (API) en modo absorbancia y con diferentes pretratamientos en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm.

Pretratamientos espectrales	Muestras de calibración	Factores PLS	Varianza explicada (%)	Calibración	Predicción
				RMSEC	RMSEP
1ª derivada	Mezclas de laboratorio (Sconc.)	4	99.0	0.70	8.07
Absorbancia	Mezclas de Laboratorio+Sp (St.red.)	4	97.3	1.14	3.07
SNV	Mezclas de Laboratorio+Sp (St.red.)	4	98.0	0.97	2.88
1ª derivada	Mezclas de Laboratorio+Sp (St.red.)	3	97.7	1.17	1.53
2ª derivada	Mezclas de Laboratorio+Sp (St.red.)	3	97.8	1.10	1.75

Muestras de calibración: 20 mezclas de laboratorio (Rango de concentración entre 46.4-69.6 % p/p), Muestras de predicción: 10 lotes (10 comprimidos son analizados en cada lote).

Al ensayar la obtención de los Sp, antes y después de aplicar los pretratamiento espectrales, se ha podido comprobar que no hay ninguna diferencia en los espectros y en los modelos construidos; independientemente del momento en que se realiza el pretratamiento. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los espectros proceso obtenidos en SNV. Los espectros proceso obtenidos en absorbancia y aplicando después SNV dan lugar a un mayor espectro proceso a causa del autoescalado que supone este pretratamiento.

Para el resto de los pretratamientos, los modelos obtenidos cambiando el orden de realización del mismo no producen resultados distintos. Esto indica que el orden en que se practica el pretratamiento no aporta ventajas ni peores resultados.

7.4.3. Aumento de la variabilidad de las muestras de calibración

En la **Figura 6.16B** y **Figura 6.17A** (equivalente a la **Figura 6.16B** pero con los espectros en 1ª derivada) se puede observar que las muestras de producción no están completamente incluidas en el grupo constituido por **St.red.**, lo que indica que la variabilidad de las muestras de producción no está totalmente representada en estas muestras. Para resolverlo hemos decidido ampliar esta variabilidad multiplicando el espectro proceso por un factor (*m*) próximo a la unidad que amplíe esta variabilidad.

Se ha utilizado el análisis en componentes principales (PCA) para establecer el valor del coeficiente multiplicador (*m*) que asegura la inclusión de los espectros de las muestras de producción dentro del conjunto definido por los espectros **Sconc.** adicionados de los espectros proceso multiplicados por el factor *m*.

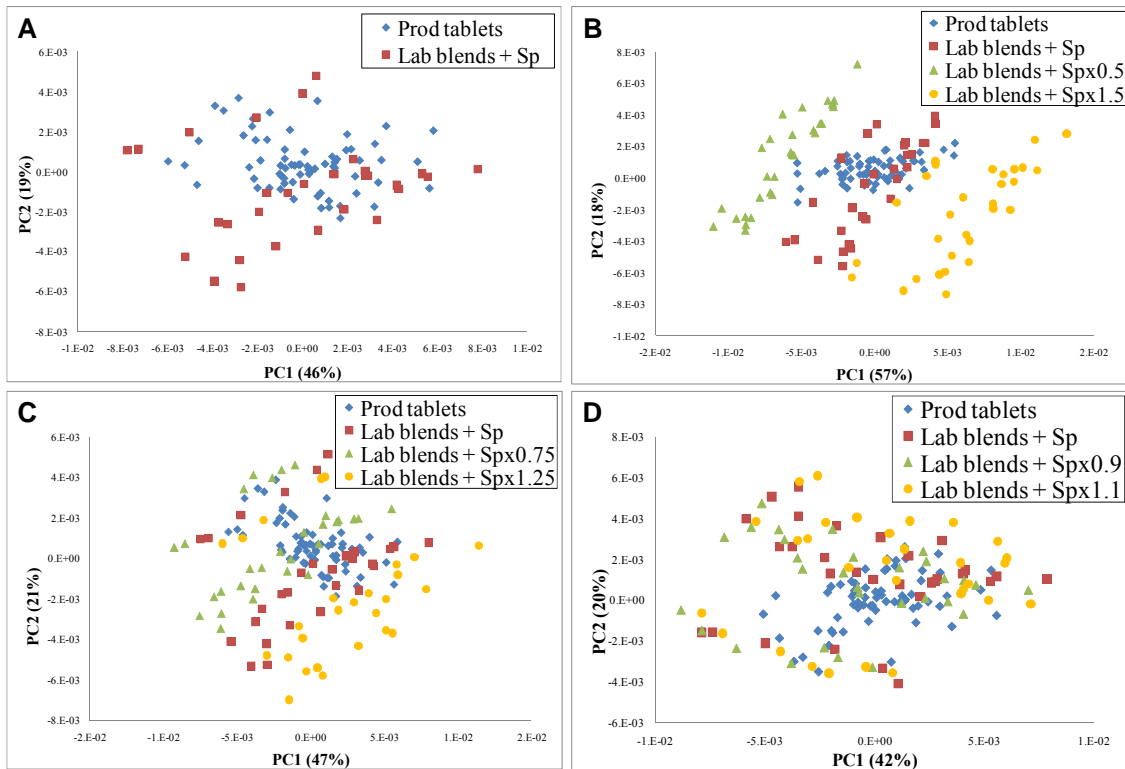
Se han empleado los gráficos de dispersión de los *score* de un PCA para hacer un análisis exploratorio de las mezclas de laboratorio modificadas con el *extended process variability matrix* (**Sconc. + m.Sp = St.ext.**) y los comprimidos de producción para seleccionar los factores multiplicadores (*m*) más idóneos para obtener un grupo de espectros **Sconc. + m.Sp** que incorporen la variabilidad de las muestras de producción.

La **Figura 7.17** muestra los gráficos de dispersión de los *scores* de 4 PCA donde se han obtenido espectros de mezclas de laboratorio con los espectros de proceso multiplicados con los siguientes factores *m*: 0.5; 1.5, 0.75;1.25, 0.9;1.1 en 1ª derivada en el rango de 1100-2300 nm.

En la **Figura 7.17A** se puede apreciar que la **St.ext.** no incluye todas las muestras de producción. Por otro lado, en la **Figura 7.17B** se aprecia que las mezclas de laboratorio con los factores multiplicadores (*m*) de 0.5;1.5 están muy alejadas de las muestras de producción. En la **Figura 7.17C** se multiplicó por un factor menor 0.75;1.25, donde se logra que las mezclas de laboratorio estén más próximas a las de producción, sin embargo, las muestras con el factor 1.25 quedan por debajo y alejadas de las de producción. En la

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Figura 7.17D se multiplicó con un factor de 0.9;1.1, donde se observa que las mezclas de laboratorio están más próximas a las de producción.



Tratamiento espectral: 1ª derivada en un rango de longitud de onda de 1100-2300 nm.

Figura 7.17 Gráficos de dispersión de los scores de 4 PCA para comprimidos de producción y mezclas de laboratorio a los que se les ha añadido *reduced* o *extended process variability matrix*. Valor de factor multiplicador (m): (A) 1, (B) 0.5;1.5, (C) 0.75;1.25, (D) 0.9;1.1.

Estas observaciones se confirman con las figuras de mérito de los modelos PLS construidos (Tabla 7.12), donde se observa que el modelo PLS más simple (menor número de factores) y con valores de RMSEP menores se obtuvieron con los coeficientes 0.9 y 1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.12 Figuras de mérito para los modelos PLS construidos a partir de *reduced* y *extended total variability matrix* para cuantificación de irbesartan (API)

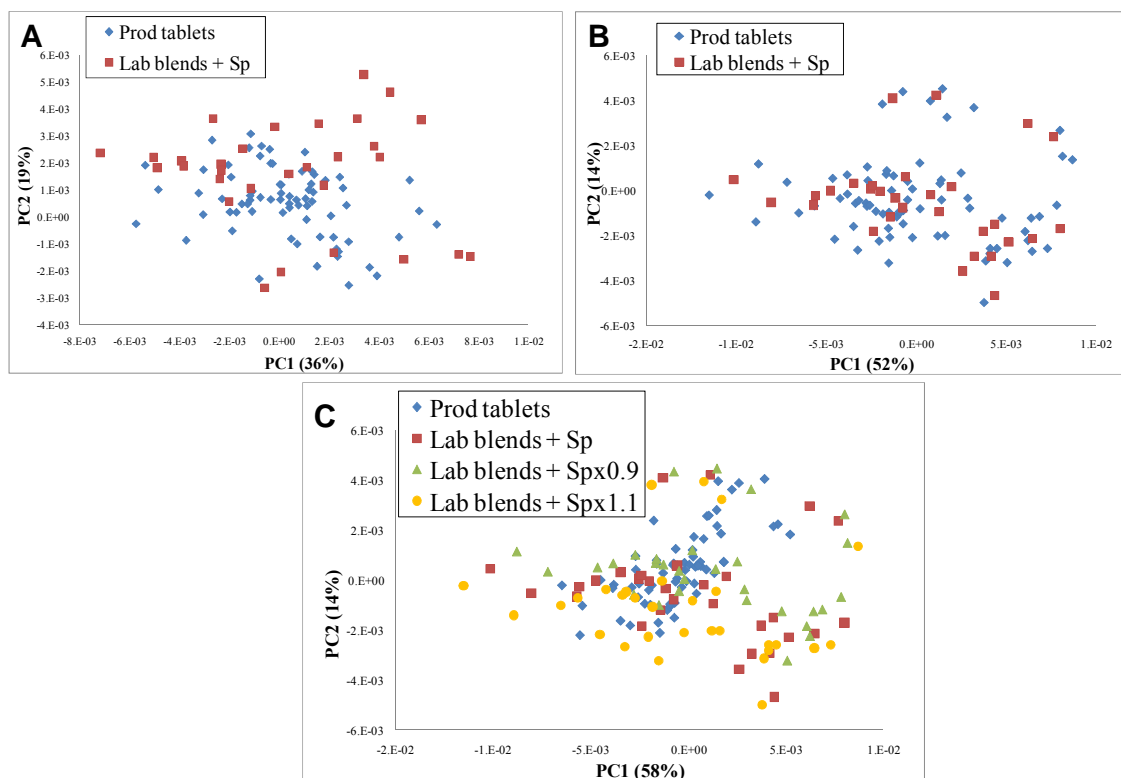
Muestras para calibración	Factor multiplicador (<i>m</i>)	Factores PLS	Varianza explicada (%)	Calibración		Predicción
				Nº de muestras	RMSEC	RMSEP
<i>Reduced total variability matrix</i>	1	4	98.0	20	0.97	2.88
<i>Extended total variability matrix</i>	0.5;1.5	5	97.9	60	1.01	1.67
	0.75;1.25	4	97.7	60	1.07	1.58
	0.9;1.1	3	97.7	60	1.17	1.53

Muestras de calibración con un rango de concentración de 46.4-69.6 % p/p, muestras de predicción: 10 lotes (10 comprimidos son analizadas por cada lote) en 1ª derivada en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm

Se ha realizado un estudio complementario para confirmar la bondad de la metodología propuesta, consistente en usar la matriz de variabilidad de los espectros de proceso (**Sp**) con distinto número, 5 **Sp** y 15 **Sp**, de espectros proceso.

La **Figura 7.18** muestra tres gráficos de dispersión de los scores de los PC. En la **Figura 7.17A**, el conjunto de los espectros de **Sconc. + Sp** (número de **Sp** = 5) no logra incluir todas las muestras de producción. En la **Figura 7.17B**, obtenida con (número de **Sp** = 15), se muestra una mejor inclusión de las muestras de producción y, finalmente, en la **Figura 7.17C**. que incluye muestras con factores *m* de 0.9 y 1.1, el conjunto incluye perfectamente todas las muestras de producción.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



Tratamiento espectral: 1ª derivada en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm.

Figura 7.18 Gráficos de dispersión de los scores de tres PCAs para comprimidos de producción y mezclas de laboratorio a las que se les ha añadido *reduced process variability matrix*: (A) cinco espectros proceso, (B) quince espectros proceso (C), cinco espectros proceso a los que se les añadió *extended process variability matrix* ($m= 0.9:1.1$).

La **Tabla 7.13** recoge las figuras de mérito de los tres modelos construidos con estas muestras y los resultados confirman plenamente las indicaciones de los gráficos de dispersión de *scores*. Los mejores modelos son los que incluyen la mayor variabilidad sin que aumente significativamente la complejidad de los mismos. La aplicación de un factor m así como el uso de un número mayor de Sp , amplían la variabilidad de las muestras de calibración, también mejoran la calidad de los resultados en la predicción de las muestras de producción. Sin embargo, el uso de un número mayor de Sp conduce a un mayor consumo de tiempo, por la necesidad de registrar más muestras y, en cambio, la utilización del factor m consigue los mismos efectos de forma más económica.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 7.13 Figuras de mérito para los modelos PLS construidos a partir de diferentes número de espectro proceso (S_p) para cuantificación de irbesartan (API).

Muestras para calibración	N° S_p	Factores multiplicadores (m)	Factores PLS	Varianza explicada (%)	Calibración		Predicción
					N° muestras	RMSEC	RMSEP
<i>Reduced process variability matrix</i>	5	1	3	98.2	20	0.92	2.09
	15	1	3	97.5	20	1.10	0.94
<i>Extended process variability matrix</i>	5	0.9;1.1	3	98.4	60	1.17	1.53

Muestras de calibración con un rango de concentración de 46.4-69.6 % p/p, muestras de predicción: 10 lotes (10 comprimidos son analizadas por cada lote) en 1ª derivada en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm

7.4.4. Determinación de API y excipientes con el método del espectro proceso

- **Determinación de excipientes**

Para demostrar la elevada capacidad que esta metodología tiene, se han construidos modelos de calibración PLS para el resto de componentes de la formulación. Para la construcción de los modelos se han utilizado los mismos espectros empleados para el modelo de API (irbesartan) y las concentraciones de los distintos excipientes de las mezclas de laboratorio.

En la **Tabla 4.14** se recogen los parámetros más relevantes de los diferentes modelos construidos; merece destacarse el elevado número de factores PLS necesarios para los modelos de lactosa y avicel que, con concentraciones relativamente elevadas, necesitan diez y nueve factores, respectivamente. Este hecho se explica por la elevada correlación entre los espectros de estos dos excipientes. También puede observarse que los modelos requieren pretratamientos espectrales distintos para obtener los mejores modelos. Los

RESULTADOS Y DISCUSIONES

resultados de la **Tabla 7.14** muestran una buena concordancia con los valores nominales de concentración de estos excipientes de los que no se disponen de sus concentraciones reales ya que no se requiere su análisis en las formulaciones.

Tabla 7.14 Modelos PLS para la determinación de excipientes en irbesartan comprimidos usando la *extended total variability matrix*.

Componentes	Valores especificados por el fabricante (% p/p)	Factores PLS	Pretratamientos	Varianza explicada (%)	Predicción		
					Promedio (% p/p)	Conc. rango (% p/p)	DS
Lactosa	19.76	10	2 ^a derivada	99.8	19.3	18.1-21.2	0.9
Avicel pH 102	10.97	9	2 ^a derivada	97.6	10.9	9.6-12.5	0.9
PVP 25	2.96	5	1 ^a derivada	97.9	3.5	2.4-4.0	0.5
Croscarmelosa sódica	2.67	5	1 ^a derivada	99.1	3.2	2.2-3.6	0.4
Estearil Fumarato de Sodio	2.57	5	1 ^a derivada	99.1	2.8	2.4-3.2	0.3
Aerosil 200	1.78	5	1 ^a derivada	97.4	2.1	1.4-2.4	0.3

Muestras de calibración con un rango de concentración entre 46.4-69.6 % p/p, muestras de predicción: 10 lotes (10 comprimidos son analizadas por cada lote) en 1^a derivada en el rango de longitud de onda de 1100-2300 nm

Esto constituye un ejemplo de la capacidad de la metodología propuesta. Al no disponer de las concentraciones reales de los componentes, no podemos dar el RMSEP; pero los valores de desviación estándar son buenos indicativos de la calidad de los resultados conseguidos.

El objetivo de construir estos modelos no es determinar la concentración de los excipientes porque sean parámetros de interés, sino demostrar que la metodología propuesta permite su determinación, sin necesidad de preparar un nuevo conjunto de muestras y, por tanto, aplicarla en aquellos casos en los que la determinación sea de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

- **Determinación de API y excipientes en comprimidos de paracetamol 1g.**

La metodología del espectro proceso se ha aplicado al análisis de comprimidos de producción de paracetamol 1g. En esta formulación, el API y el almidón de maíz son los componentes mayoritarios con un 89.8 y 8.7 % p/p, respectivamente.

Debido a la elevada concentración de estos dos componentes, no es posible realizar un diseño experimental de las mezclas de laboratorio para reducir la correlación entre las concentraciones así y todo, los modelos PLS construidos son simples, solo son necesarios tres factores y presentan una buena capacidad predictiva (ver **Tabla 7.15**). En cambio, los modelos PLS para povidona y ácido esteárico, que se encuentran en proporciones relativamente bajas, son más complejos y necesitan cinco y siete factores PLS, respectivamente.

Tabla 7.15 Figura de mérito de los modelos PLS para la determinación de paracetamol (API) y excipientes usando *extended total variability matrix*.

Componentes	Factores PLS	Varianza explicada (%)	Calibración		Predicción			
			Conc. rango (% p/p)	RMSEC	Conc. rango (% p/p)	RMSEP	Promedio (%p/p)	SD
Paracetamol	3	99.4	72-100	0.67	86.6-88.3	0.91	87.5	0.9
Almidón de maíz	3	98.8	0-25	0.70	10.3-12.0	-	11.1	0.4
Acido esteárico	7	97.4	0-2	0.11	0.1-0.9	-	0.4	0.2
Povidona	5	98.0	0-4	0.19	0.2-1.0	-	0.6	0.2

Las muestras de predicción consistieron en 52 comprimidos individuales en el modo de primera derivada en el rango de longitud de onda de 1100-2500 nm.

Esta mayor complejidad se explica por la semejanza de los espectros (ver **Figura 7.19**), la baja concentración y la elevada correlación entre los espectros del ácido esteárico y la povidona (coeficiente de correlación de 0.97), que influye en la bondad de los modelos. Sin

RESULTADOS Y DISCUSIONES

embargo, ambos modelos presentan valores de desviación estándar inferiores a 0.25 (ver **Tabla 7.15**).

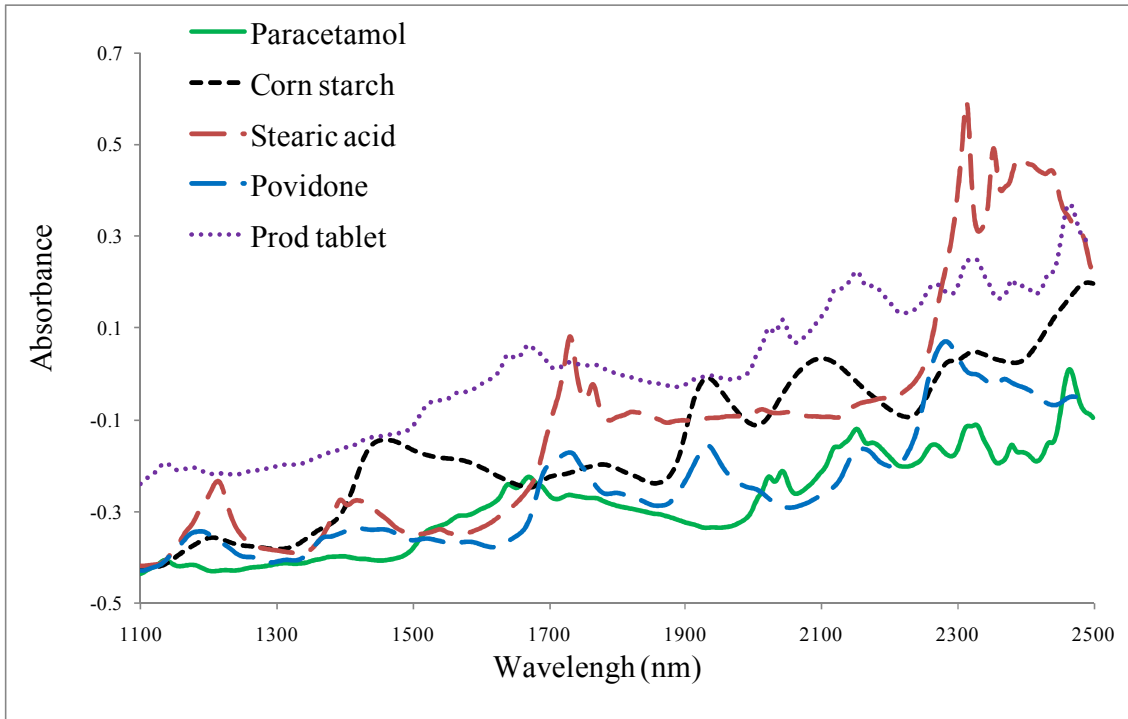


Figura 7.19 Espectros NIR de comprimidos de producción, paracetamol (API) y excipientes (almidón de maíz, povidona y ácido esteárico).

Estos resultados demuestran las bondades de esta nueva metodología y su aplicabilidad en distintos tipos de comprimidos para determinar el API y los excipientes presentes en el comprimido.

REFERENCIAS

1. C. Vervaet, J.P. Remon. Continuous granulation in the pharmaceutical industry, *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 3949-3957.
2. F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D. L. Massart, S.S. Dive, P. Hailey, Monitoring powder blending by NIR spectroscopy, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 771-778.
3. D.J. Wargo, J.K. Drennen, Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1415-1423.
4. P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, P.K. Aldridge, Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part I. System development and control, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 551-559.
5. S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, P.K. Aldridge, On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 68 (3) (1996) 509-513.
6. S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, P.A. Hailey, Automated system for the online monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II. Qualitative approaches to blend evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285-1309.
7. R. De Maesschalck, F. Cuesta Sánchez, D.L. Massart, P. Doherty, P. Hailey, On-line monitoring of powder blending with near-infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 52 (5) (1998) 725-731.
8. A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90 (9) (2001) 1298-1307.
9. M. Blanco, R. Gozález Bañó, E. Bertran, Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy, *Talanta* 56 (2002) 203-212.
10. M. Popo, S. Romero-Torres, C. Conde, R.J. Romañach, Blend uniformity analysis using stream sampling and near infrared spectroscopy, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 3 (2002) 1-11.

11. O. Berntsson, L-G. Danielsson, B. Lagerholm, S. Folestad, Quantitative in-line monitoring of powder blending by near infrared reflection spectroscopy, *Powder Technol.* 123 (2-3) (2002) 185-193.
12. R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, A.S. Hussain, Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 3 (2002) 1-17.
13. N.H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, S. Reynolds, A homogeneity study using NIR spectroscopy: Tracking magnesium stearate in Bohle Bin-Blender, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 29 (6) (2003) 679-687.
14. E.N. Lewis, L.H. Kidder, E. Lee, NIR chemical imaging as a process analytical tool, *Innov. Pharm. Technol.* 17 (2006) 107-111.
15. W. Li, G.D. Worosila, Quantitation of active pharmaceutical ingredients and excipients in powder blends using designed multivariate calibration models by near-infrared spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 213-219.
16. L. Nørgaard, M.T. Hahn, L.B. Knudsen, I.A. Farhat, S.B. Engelsen Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1261-1270.
17. D. Ely, S. Chamrathy, M.T. Carvajal, An investigation into low dose blend uniformity and segregation determination using NIR spectroscopy. *Colloids Surf., A* 288 (2006) 71-76.
18. O. Svensson, K. Abrahamsson, J. Engelbrektsson, M. Nicholas, H. Wikstrom, M. Josefson, An evaluation of 2D-wavelet filters for estimation of differences in textures of pharmaceutical tablets, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 84 (2006) 3-8.
19. A.S. El-Hagrasy, F. D'Amico, J.K. Drennen, A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part I: D-optimal design for characterization of powder mixing and preliminary spectral data evaluation, *J. Pharm. Sci.* 95 (2) (2006a) 392-406.

20. A.S. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, J.K. Drennen, A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part II. Qualitative near-infrared models for prediction of blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006b) 407-421.
21. A.S. El-Hagrasy, J.K. Drennen, A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part III. Quantitative near-infrared calibration for predicting of blend homogeneity and characterization of powder mixing kinetics, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 422-434.
22. A.S. El-Hagrasy, S.Y. Chang, S. Kiang, Evaluation of risk and benefit in the implementation of near-infrared spectroscopy for monitoring of lubricant mixing. *Pharm. Dev. Technol.* 11 (2006c) 303-312.
23. E.T.S. Skibsted, H.F.M. Boelens, J.A. Westerhuis, D.T. Witte, A.K. Smilde, Simple assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near infrared reflectance probe and control charts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 26-35.
24. W. Li, M.C. Johnson, R. Bruce, H. Rasmussen, G.D. Worosila, The effect of beam size on real-time determination of powder blend homogeneity by an online near infrared sensor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 711-717.
25. S. Virtanen, O. Antikainen, J. Yliruusi, Uniformity of poorly miscible powders determined by near infrared spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 108-115.
26. F. J. Muzzio, M. Llusa, C. L. Goodridge, N. H. Duong, E. Shen, Evaluating the mixing performance of a ribbon blender, *Powder Technol.* 186 (2008) 247-254.
27. Z. Shi, R.P. Cogdill, S.M. Short, C.A. Anderson, Process characterization of powder blending by near-infrared spectroscopy: blend end-points and beyond, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 738-745.
28. J.J. Moes, M.M. Ruijken, E. Gout, H.W. Frijlink, M.I. Ugwoke, Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: blend

- uniformity, content uniformity and coating thickness measurements, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108-11.
29. H. Ma, C. A. Anderson, Characterization of Pharmaceutical Powder Blends by NIR Chemical Imaging, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3305-3320.
30. L.J. Bellamy, A. Nordon, D. Littlejohn, Real-time monitoring of powder mixing in a convective blender using non-invasive reflectance NIR spectrometry, *Analyst.* 133 (2008) 58-64.
31. W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging, *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 369-373.
32. A. Mehrotra, F. J. Muzzio, Comparing mixing performance of uniaxial and biaxial bin blenders, *Powder Technology* 196 (2009) 1-7.
33. Y. Sulub, B. Wabuye, P. Gargiulo, J. Pazdan, J. Cheney, J. Berry, A. Gupta, R. Shah, H. Wu, M. Khan, Real-time on-line blend uniformity monitoring using near-infrared reflectance spectrometry: a non-invasive off-line calibration approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48-54.
34. H. Zhang, Z. Jiang, J.Y. Pi, H.K. Xu, R. Du, On-line monitoring of pharmaceutical production processes using Hidden Markov Model. *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1487-1498.
35. H. Wu, M. Tawakkul, M. White, M.A. Khan, Quality-by-design (QbD): an integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends, *Int. J. Pharm.* 372 (2009) 39-48.
36. I. Storme-Paris, I. Clarot, S. Esposito, J.C. Chaumeil, A. Nicolas, F. Brion, A. Rieutord, P. Chaminade, Near InfraRed Spectroscopy homogeneity evaluation of complex powder blends in a small-scale pharmaceutical preformulation process, a real-life application, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 189-198.
37. M. Cruz Sarraguça, J. Almeida Lopes, Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 204-210.

38. J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, A. Nagi, Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development, *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 23-32.
39. C.V. Liew, A.D. Karande, P.W.S. Heng, In-line quantification of drug and excipients in cohesive powder blends by near infrared spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 386 (2010) 138-148.
40. A.U. Vanarase, M. Alcala, J.I. Jerez Rozo, F.J. Muzzio, R.J. Romanach, Real-time monitoring of drug concentration in a continuous powder mixing process using NIR spectroscopy, *Chem. Eng. Sci.* 65 (2010) 5728-5733.
41. A.D. Karanda, C.V. Liew, P.W. Heng, Calibration sampling paradox in near infrared spectroscopy: a case study of multi-component powder blend. *Int. J. Pharm.* 395 (2010) 91-97.
42. T. Puchert, C.-V. Holzhauser, J.C. Menezes, D. Lochmann, G. Reich, A new PAT/QbD approach for the determination of blend homogeneity: Combination of on-line NIRS analysis with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 173-18.
43. W. Momose, K. Imai, S. Yokota, E. Yonemochi, K. Terada, Process analytical technology applied for end-point detection of pharmaceutical blending by combining two calibration-free methods: Simultaneously monitoring specific near-infrared peak intensity and moving block standard deviation, *Powder Technol.* 210 (2011) 122-131.
44. Y. Sulub, M. Konigsberger, J. Cheney, Blend uniformity end-point determination using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration, *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 55 (2011) 429-434.
45. D.M. Koller, A. Posch, G. Hörl, C. Voura, S. Radl, N. Urbanetz, S.D. Fraser, W. Tritthart, F. Reiter, M. Schlingmann, J.G. Khinast, Continuous quantitative monitoring of powder mixing dynamics by near-infrared spectroscopy, *Powder Technol.* 205 (2011) 87-96.

46. C.Voura, A.E. Posch, G. Hörl, D.M. Koller, S.D. Fraser, F. Reiter, W.Tritthart, J.G. Khinast, Robust Monitoring of Pharmaceutical Manufacturing Operations Based on Combined NIR and Raman Spectroscopy, 2010, <http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2010/122.html>
47. L.J. Silveira, L. Marmo Moreira, V.G.B. Conceição, H.L. Casalechi, I.S. Muñoz, F. Fernandes da Silva, M.A.S.R. Silva, R. Aparecido de Souza, M.T.T. Pacheco, Determination of sucrose concentration in lemon-type soft drink by dispersive Raman spectroscopy, *Spectroscopy* 23 (2009) 217-226.
48. O. Svensson, M. Josefson, F.W. Langkilde, Reaction monitoring using Raman spectroscopy and Chemometrics, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 49 (1999) 49-66.
49. M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, J. Cruz, Critical evaluation of methods for end-point determination in pharmaceutical blending processes, *Anal. Methods*, 4 (2012) 2694-2703.
50. A. Santomaso, M. Olivi, P. Canu, Mechanisms of mixing of granular materials in drum mixers under rolling regime, *Chemical Engineering Science* 59 (2004) 3269-3280.
51. D.R. Van Puyvelde, B.R. Young, M.A. Wilson, S.J. Schmidt, Experimental determination of transverse mixing kinetics in a rolling drum by image analysis, *Powder Technology* 106 (1999) 183-191.
52. M. Blanco, A. Peguero, An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: comparison of PLS2 and ANN models, *Talanta* 77 (2008) 647-651.
53. L.X. Liu, I. Marziano, A.C. Bentham, J.D. Litster, E.T. White, T. Howes, Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders, *Int. J. Pharm.* 362 (2008) 109-117.
54. M. Blanco, M. Alcala, Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: a contribution to process analytical technologies, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353-359.

55. ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, <http://www.ich.org/ich5q.html>.
56. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, February 2003, Note for Guidance, EMEA/CVMP/961/01, CPMP/QWP/ 3309/01. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf>.
57. M. Blanco, A. Peguero, Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method, *Trends Anal. Chem.* 29 (10) (2010) 1127-1136.
58. M. Blanco, A. Peguero, Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (1) (2010) 59-65.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

8. Conclusiones

De los estudios realizados durante esta tesis para la aplicación de la espectroscopia NIR para la determinación de parámetros críticos en la fabricación de comprimidos en la industria farmacéutica, se extraen las siguientes conclusiones. Las mostramos a continuación, ordenadas según los trabajos a los que pertenecen:

1. En el estudio crítico de varios métodos para la monitorización del mezclado y determinación del punto final:
 - Este trabajo compara la capacidad de determinar el punto final del mezclado aplicando diferentes metodologías para asegurar la homogeneidad de la mezcla en los procesos de control de mezclado de sólidos, con el fin de facilitar a la industria farmacéutica la elección del método más adecuado.
 - Se observan diferencias en la capacidad para identificar el punto final del proceso. Esto supone un avance, ya que facilita la elección del método más adecuado a utilizar para determinar el punto final para los procesos de mezclado, atendiendo a la sensibilidad del método y a su facilidad de implementación.
 - Este estudio ha permitido confirmar que los métodos cualitativos de desviación estándar de un bloque móvil (MBSD) y el basado en la desviación estándar de la diferencia entre dos espectros consecutivos (DIS) son incapaces de detectar con precisión el punto final del mezclado, a diferencia de los basados en la disimilaridad del promedio de un bloque móvil contra un espectro de una mezcla homogénea (espectro objetivo) (DMBA-TS) y la disimilaridad frente a un espectro individual. Una ventaja adicional fue observada en el método DMBA-TS, que permite obtener información relacionada con la concentración, porque los espectros de la mezcla se comparan con el espectro objetivo (espectro de una

CONCLUSIONES

mezcla homogénea con la concentración nominal de cada uno de los componentes). Este método requiere preparar esta mezcla con la concentración objetivo y asumiendo su correcta homogeneidad.

- El método PCA ha demostrado ser poco sensible para detectar el punto final del proceso de mezclado, a diferencia del método PC-SDA que resultó ser una mejora significativa frente a la utilización del gráfico de dispersión de scores de un PCA. El método PC-SDA presenta la ventaja de determinar estadísticamente el punto final del proceso de mezcla, lo que en consecuencia garantiza una mayor seguridad en la elección del punto final del mezclado.
 - El método cuantitativo, basado en un modelo PLS para la determinación del API para el total de los espectros registrados durante el proceso de mezclado, es siempre un buen procedimiento para determinar el punto final del mezclado y la concentración final en la mezcla. Este es probablemente el método más adecuado, pero requiere mucho tiempo y esfuerzo la elaboración del modelo.
 - Al comparar los métodos cualitativos y cuantitativos, se puede decir que los métodos cualitativos son de fácil implantación por su sencillez y por la no necesidad de un método de referencia, pero hay que cuidar la elección del método capaz de detectar los cambios espectrales de los compuestos que se mezclan, como se hizo en este estudio.
2. Comparación de métodos quimiométricos para la evaluación del tiempo final del mezclado mediante el uso de espectroscopia NIR y Raman:
- El estudio ha demostrado que ambas técnicas espectroscópicas (NIR y Raman) son adecuadas para la determinación del punto final de mezclado aplicando métodos multivariantes para la detección del punto final de mezclado.
 - La espectroscopia Raman también permite la aplicación de un método univariante (mediante la elección de un número de onda apropiado), pero el punto final es

CONCLUSIONES

difícil de encontrar debido a la reducida variación de la absorbancia que tiene lugar durante el mezclado.

- Al comparar los resultados de la aplicación de los métodos multivariantes utilizados en este estudio a ambos tipos de espectros se observan resultados distintos para DMBA-TS y PC-SDA. Una explicación de estas diferencias podría atribuirse a la diferente superficie irradiada en cada una de las dos técnicas. Sin embargo, el método PC-SDA ofreció resultados correctos de tiempo final de mezclado, independientemente de la técnica espectroscópica utilizada.
3. En el estudio de la determinación de parámetros críticos en dos etapas (granulación y compresión) de la fabricación de comprimidos farmacéuticos:
- La determinación de la distribución de tamaños de partícula en granulados intermedios, a través un modelo PLS2, permite conocer de forma más completa las características granulométricas del producto intermedio y así asegurar un mayor calidad.
 - El modelo PLS construido para la determinación de API en los granulados de producción usando únicamente muestras de laboratorio, permite realizar la determinación rápida del API en esta fase de la producción y realizando una correcta predicción de las muestras de producción. Esto facilita y simplifica extraordinariamente la construcción de modelos y mejora la exactitud de los resultados a razón de que los resultados de referencia se obtienen por la pesada de los componentes. No es necesario aplicar un método de referencia para el análisis de las muestras, permitiendo a la espectroscopia NIR ser utilizada como una técnica instrumental absoluta, sin necesidad de aplicar métodos analíticos de referencia.
 - Se ha demostrado la capacidad de la espectroscopia NIR en la determinación de presión de compactación de comprimidos finales, como una importante simplificación no destructiva de esta determinación que a la vez permite asegurar el cumplimiento de otras características asociadas a este parámetro.

CONCLUSIONES

- La determinación de la concentración de API en comprimidos finales mediante un modelo PLS constituye un método rápido de análisis que constituye un control del producto previo a su liberación. La validación del mismo, siguiendo las guías ICH, demuestra la idoneidad del mismo como un método alternativo a los convencionales (HPLC).
4. Optimización y aplicabilidad de una nueva metodología basada en la obtención del espectro proceso:
- Se han estudiado los factores que pueden afectar a la calidad de los resultados obtenidos por aplicación de modelos construidos mediante el espectro de proceso.
 - Se comprobó que la aplicación de pretratamientos espectrales (SNV o derivadas) no constituyen un inconveniente en la aplicación de esta metodología, aunque no se puede establecer *a priori* el pretratamiento más adecuado para un modelo determinado.
 - Se determinó que la aplicación de un coeficiente multiplicador para los espectros de proceso permite ampliar la variabilidad del conjunto de calibración y, consiguientemente, la calidad de los modelos PLS, sin necesidad de incrementar el trabajo experimental. La utilización de los gráficos de dispersión de *score* de un PCA constituye una herramienta muy adecuada para establecer el valor del factor multiplicador.
 - Se comprobó que la utilizar un mayor número de espectros proceso conduce a modelos de calibración más robustos, lo que unido a una elección adecuada del coeficiente multiplicador, da lugar a modelos sencillos y con reducidos de errores de predicción.

Las metodologías desarrolladas en la tesis aportan soluciones a situaciones reales de la industria farmacéutica y han demostrado de forma satisfactoria como la espectroscopia NIR puede ser una herramienta para el control de parámetros físicos y químicos del

CONCLUSIONES

proceso de fabricación de comprimidos, obteniendo adecuadas capacidades predictivas. Se demuestra que los modelos desarrollados en estos trabajos son susceptibles de ser utilizados en rutina facilitando la determinación de atributos críticos durante el proceso de fabricación de comprimidos.

La experiencia y conocimiento adquirido durante el estudio de las distintas etapas del proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos, constituye una sólida base para la aplicación a nuevos procesos más complejos.

ANEXOS

ANEXOS

9. Artículos publicados

9.1. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy.

9.2. NIR analysis of pharmaceutical samples without reference data. Improving the calibration.

9.3. Critical evaluation of methods for end-point determination in pharmaceutical blending processes.

**Controlling individual steps in the production
process of paracetamol tablets by
use of NIR spectroscopy**

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical
Analysis**

51 (2010) 797-804



Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy

M. Blanco*, R. Cueva-Mestanza, A. Peguero

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2009
Received in revised form
24 September 2009
Accepted 24 September 2009
Available online 2 October 2009

Keywords:

Particle size distribution
Compaction pressure
API determination
Near infrared spectroscopy
Quality control

ABSTRACT

Various physical and chemical parameters of interest to the pharmaceutical industry were determined by NIR spectroscopy with a view to assessing the potential of this technique as an effective, expeditious alternative to conventional methods for this purpose. To this end, the following two steps in the production process of tablets containing 1 g of paracetamol were studied: (1) intermediate granulation, which was characterized in terms of Active Principle Ingredient (API) content, average particle size and particle size distribution and (2) manufactured tablet, which was examined in relation to compaction pressure and API content of the tablets. The ultimate aim was to identify critical attributes of the process influencing the quality of the end-product. Based on the results, a new method for determining the API in the end-product was developed and validated for its quality control.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Quality in a drug is assured by careful execution of every single step in its production process and optimization of any factors potentially affecting it. Determining some physical and chemical parameters of pharmaceutical interest over a production process can help one obtain useful information about its evolution and consistency. In fact, such parameters can provide a “snapshot” of the process at any time and allow one to act timely on it if necessary. This approach to the production process departs from the traditional strategies of the pharmaceutical industry, which has led US Food and Drug Administration (FDA) to propose the initiative PAT (Process Analytical Technology) involving the incorporation of new technologies to drug production in order to both improve the quality of end-products and cut manufacturing costs [1]. The yield of a production process can be adversely affected by the need to analyze large numbers of samples in order to assure quality in the end-product; in fact, the analyses involved are usually sluggish and expensive. The need to perform massive analyses detracts from industrial productivity, increases costs and reduces benefits. In order to circumvent these shortcomings and acquire a sound knowledge about each step of a production process, in this work we developed a Near-Infrared (NIR) analytical method as an alternative to traditional choices (UV/VIS, HPLC) for drug samples. Near

infrared spectroscopy (NIRS) is an expeditious, user-friendly, non-destructive, reliable, flexible technique, which facilitates its use both in the laboratory and for controlling/monitoring individual steps of a production process. At present, NIRS is widely used to determine a number of physical and chemical quality-related parameters in a wide variety of materials. Its qualitative and quantitative potential in this respect is widely documented [2–7].

A tablet production process requires strict control of each individual step in it (reception of the raw material, blending, granulation, sieving and tableting).

Granulation increases the product particle size in order to facilitate uniform feeding to the pressing machines and reproducible filling of the tablet matrix. This results in uniform compaction of the product particles and ensures uniformity in tablet weight and constancy in the physico-mechanical properties (hardness, friability) of the product.

The fluidity of a powdered or granulated material depends on its average particle size, particle size distribution, particle shape, surface roughness and moisture content. As a rule, fine particles with a high surface area-to-mass ratio are more cohesive than are coarser particles. Thus, particles larger than 250 μm can usually flow relatively freely; by contrast, powders consisting of particles smaller than 10 μm are cohesive and scarcely fluid [8]; for this reason, the pharmaceutical industry usually employs granulates with a narrow size distribution (i.e. little variability in particle size with respect to its average value) [9,10].

By pressing powders or previously granulated substances, particles are brought very close to one another. Tablets must possess

* Corresponding author. Tel.: +34 93 58 1367; fax: +34 93 58 1367.
E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

an adequate hardness (diametral breakage strength) in order to withstand mechanical shock from handling during production, packaging, distribution and usage [11]. Pressing extremely reduces the efficient surface of a drug, which can affect the dissolution rate of the API. The disintegration rate of a tablet depends on various mutually related factors including the nature of the drug it contains and its concentration, and the solvent, binder, disaggregant, lubricant, wetting agent and compaction pressure used [12]. Tablet hardness is influenced by surface area, cohesive strength, particle size distribution and moisture content, among other factors [13]. Based on the foregoing, particle size and compaction pressure are two essential pieces of information with a view to assuring quality in pharmaceutical products in as much as they have a direct impact on API bioavailability.

In addition to controlling the above-described factors, the pharmaceutical industry must determine the API content of each product in the intermediate steps of the process and also, unavoidably, in the end-product.

Some authors have studied individual factors during a specific step of a production process [14–18]; none, however, seems to have established their influence on the quality of the end-product. The primary aim of this work was to assess the potential of NIR spectroscopy for determining quality in the end-product from the physical and chemical parameters most strongly influencing it with a view to acquiring a comprehensive knowledge about the process as a whole and any critical points potentially affecting its outcome. The study was conducted in two parts. In the first, the use of NIR spectroscopy to quantify the API in granulates, and establishes their particle size distribution and average particle size, was examined. In the second, the potential of this technique for predicting the compaction pressure of tablets was assessed and the ensuing method for quantifying APIs validated.

2. Experimental

2.1. Tablet production process

The tablet production process studied involves the following steps, depicted in Fig. 1: weighing of the API and excipients (wei), mixing (mix), granulation (gra), drying (dry), sieving (sie) and tableting (tab). The product consists of uncoated white oblong

tablets 20 mm long \times 7 mm wide with a groove on one side and a nominal weight of 1111 mg that are pressed at 195–215 MPa.

2.2. Production samples

Production granulates and tablets consisted of the API (paracetamol, 898 mg/g), pregelatinized starch (87 mg/g) as major excipient, and stearic acid (5 mg/g) and povidone (10 mg/g) as minor excipients.

2.3. Laboratory samples

A total of 26 mixtures were prepared by weighing appropriate amounts of the formulation ingredients spanning API concentrations from 80 to 111%. The nominal paracetamol content (898 mg/g). ICH recommends a calibration range between 80 and 120% of nominal value. In this case the upper limit cannot reach because the 111% concentration represented pure paracetamol. The high content in API and low contents in the two minor excipients precluded using an experimental design to facilitate the preparation of samples with a low correlation between concentrations. The component mixtures were blended in a solid mixer for 30 min to ensure homogeneity.

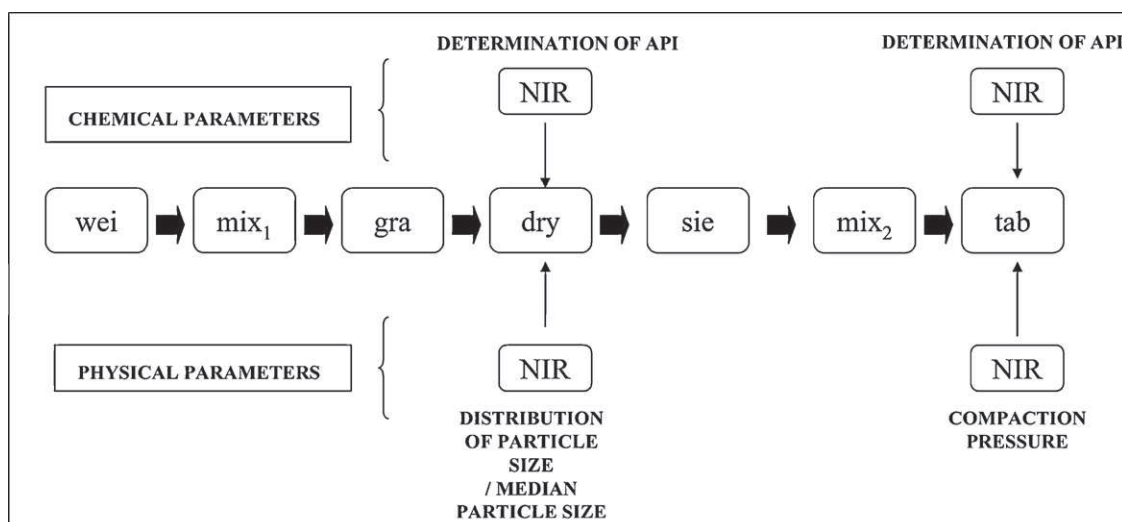
Laboratory granulates were prepared from powder mixtures, which were sprayed with water, blended with a spatula to obtain granules and dried in a vacuum stove at 60 °C for 3 h. Finally, the dry granules were ground in a mortar to a particle size similar to that of production granulates.

The granulate samples were used to obtain laboratory tablets. To this end, an amount of ca. 1 g of powdered sample was compacted at 195–215 MPa on a Perkin–Elmer press.

In parallel, laboratory-made tablets were prepared from production granulate that was overdosed or underdosed to $\pm 5\%$ around the nominal API content and pressed at 74–370 MPa.

2.4. Particle size distribution

An amount of ca. 10 g of each granulate was sieved to obtain 5 fractions of different particle size (<200, 200, 300, 500 and 1000 μm) in order to determine the average size and distribution of particles. Each fraction was weighed in an analytical balance in



wei= weighed, mix=mixed, gra=granulation, dry=dried, sie= sieving, tab= compressed into tablet, NIR measurements (symbolized with NIR boxes).

Fig. 1. Overview of a manufacturing process for tablets.

order to calculate the proportion of sample passing through each sieve and obtain the particle distribution curve for the product. The average particle size was calculated from the following expression [19]:

$$\text{Average particle size} = \frac{\text{weight fraction} \times \text{particle size fraction}}{\text{total weight}}$$

2.5. Hardware and software

Laboratory samples were blended in a Turbula T2C WAB shaker mixer and pressed on a Perkin–Elmer 15.011 cylindrical press with a cross-sectional area of 132.7 mm². Production granulates were sieved through a BA100-N electromagnetic sieve shaker from CISA (Barcelona, Spain).

Near infrared spectra were recorded on a NIRSystems 6500 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Springs, MD) equipped with a Rapid Content Analyser (RCA) module and governed via the software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems.

PCA, PLS and PLS2 models were constructed by using the software Unscrambler v. 9.2 from Camo Process (Trondheim, Norway).

2.6. Determination of API concentrations

The API concentration in each laboratory sample was obtained from the weights of its components. The API contents of the production tablets and granulated samples were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/VIS detection, using a steel column 25 cm long × 4 mm ID packed with Spherisorb ODS-2 resin of 5 μm particle size, a mobile phase consisting of 70:30 (v/v) methanol/aqueous acetic acid flowing at 1.0 mL min⁻¹, an injected volume of 25 μL a maximum chromatographic run time of 10 min and a detection wavelength of 280 nm.

2.7. Recording of NIR spectra

Near infrared spectra were recorded at 2 nm intervals over the wavelength range 1100–2500 nm. Each spectrum was the average of 32 scans. The reference spectrum was obtained from the ceramic plate supplied with the instrument.

The spectra for the powders and granulates were obtained by placing the samples in a glass cell with a circular section around 3 cm of diameter. Two spectra per sample were recorded, with turnover between recordings, in order to obtain an average spectrum.

The spectra for the production tablets were recorded by direct measurement on the spectrophotometer quartz window; the entire sample is illuminated by the radiation beam and hence its analysis area corresponds to its cross-section. Each tablet was turned 90° to obtain a second spectrum for the opposite side which was averaged with the first. The spectra for the laboratory tablets were recorded identically.

2.8. Processing of NIR data

A calibration set and a prediction set incorporating spectral and parameter variability were constructed. The spectral data were subjected to various treatments including SNV, and first and second derivatives as obtained by using the Savitzky–Golay algorithm with an 11-point moving window and a second-order polynomial.

The quantitation models for granulates, production tablets, compaction pressure and average particle size were constructed by using the PLS algorithm. We intent use only samples from laboratory for the calibration set while the validation set is only constituted by production samples. Two types of model validation

were performed: an internal validation using leave-one-out cross-validation for building of the model and an external validation using a production set of samples. The model for particle size distribution was based on PLS2. PLS2 models can be used for to calibrate and then predict simultaneously a set of variables (useful with variables strongly correlated); in this study a PLS2 model was used for determination of the percentages of 5 fractions of each particle size (distribution size) in the granules. The optimum number of factors for each model was taken to be that resulting in the lowest possible relative standard error (RSEC for calibration and RSEP for prediction), defined as:

$$\text{RSEC, RSEP(\%)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{\text{REF}} - Y_i^{\text{NIR}})^2}{\sum_{i=1}^m Y_i^{\text{REF}^2}} \times 100}$$

where m is the number of samples, and Y_i^{REF} and Y_i^{NIR} are the concentrations obtained with the reference and NIR method, respectively.

3. Results and discussion

The aim of this work was to develop an effective method for checking product quality by determining various parameters in different steps of the paracetamol production process, which starts with the granulate mixture and ends with the final control of the tablets. The specific steps studied were granulation and tableting, which were examined in terms of API content, particle size distribution and average particle size of the granulate, and compaction pressure of the tablets.

3.1. Determination of API contents in granulates and tablets

The calibration models for granulates and tablets were constructed from a set of samples spanning API contents from 80 to 111% the nominal value for paracetamol in the studied formulation. Fig. 2 shows the absorbance spectrum for a granulated, tablet, API and excipient majority (Gluten-free pregelatinized corn starch).

Prior to constructing the calibration model for the API in the granulates, the results for laboratory and production granulates were subjected to PCA in order to assess the similarity of the two types of samples with a view to selecting an appropriate set to develop the model. Fig. 3 shows the scatter plot of the scores for the first two PCs, which jointly accounted for 94% of the total variance.

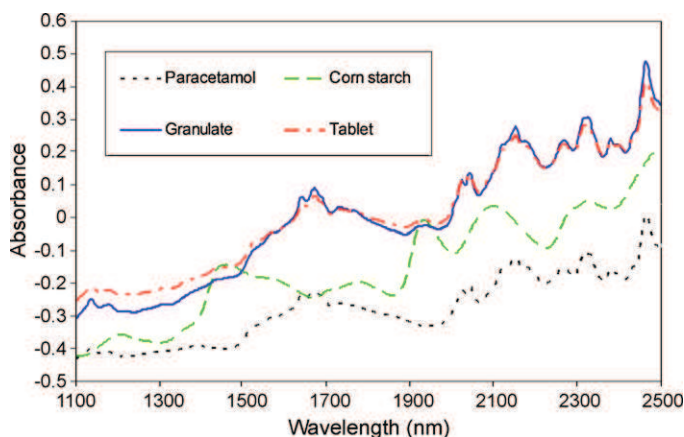


Fig. 2. NIR spectra for granulate, tablet, API (paracetamol) and excipient majority (corn starch).

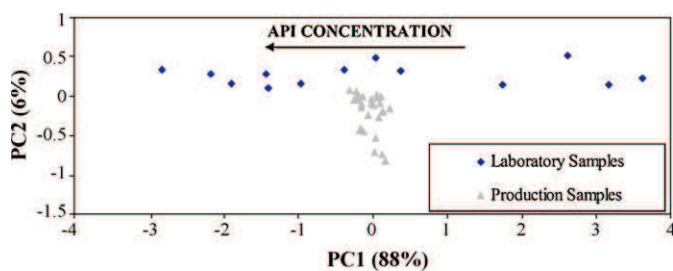


Fig. 3. PCA scores plot for granulated samples.

The laboratory samples spanned a broad range of values for PC1; on the other hand, the production samples clustered in the centre of the graph which is suggestive of close similarity between them and exhibited PC1 values very similar to that for the laboratory samples containing the nominal API concentration.

The similarity between the laboratory and production granulated samples revealed by the scatter plot of the scores led us to use a calibration set consisting solely of laboratory samples and a validation set containing production samples alone. The model for quantifying paracetamol in the granulate was established by testing various spectral treatments of which that based on SNV with two PLS factors was found to provide the best results. Excluding the regions around 1440 and 1940 nm, which correspond to the absorption of OH and are thus associated to moisture in the sample, provided a much simpler model with an improved predictive ability. Table 1 shows the figures of merit of the model.

The model for quantifying the API in tablets was developed in the same manner. Since the scatter plot for the PCA scores was suggestive of differences between the laboratory and production tablet samples, the calibration set was constructed with both, and so was the validation set. The best results were obtained with a spectral derivative treatment and 3 PLS factors (Table 1). The spectral ranges examined were 1100–1885 and 2000–2500 nm and thus excluded the zone around 1940 nm for the above-described reason. Not using the zone around 1440 nm resulted in no further improvement, however.

Accurately determining the API concentration at this step of the tablet production process can help assure the desired API content in the end-product or any required corrections in this respect to be made before the process is allowed to proceed.

3.2. Determination of the compaction pressure

The compaction pressure affects the hardness and ease of disintegration and dissolution of tablets. Pharmaceutical disintegration and dissolution tests provide a measure of API bioavailability. The compaction pressure also influences the API release rate, which should be identical across production batches. In addition, tablets should be hard enough to preserve their integrity during handling.

Table 1

Relevant parameters of the models for PLS determination of API in granulated and tablet samples.

Samples	Granulated			Tablet		
	Calibration	Prediction		Calibration	Prediction	
		Laboratory	Laboratory		Production	Laboratory and production
Pre-treatment	SNV			1st derivative		
Range (nm)	1550–1800	2050–2400		1100–1885	2000–2500	
Concentration (%label claim)	80.0–111.0	80.0–111.0	95.0–105.0	80.0–111.0	80.0–111.0	95.0–105.0
Factors	2			3		
Explained Variance Y (%)	99.5			99.5		
Samples	14	8	33	18+5	24	22
RSEC/P (%)	0.78	1.53	2.95	0.65	0.78	0.81

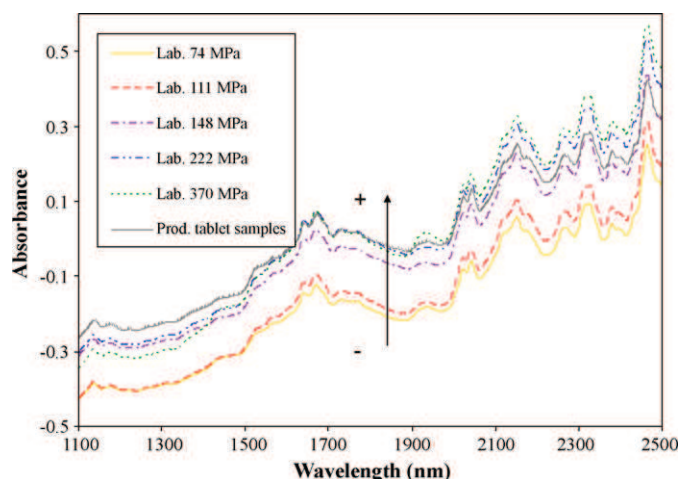


Fig. 4. Absorbance spectra for different compaction pressure of laboratory and production tablet samples.

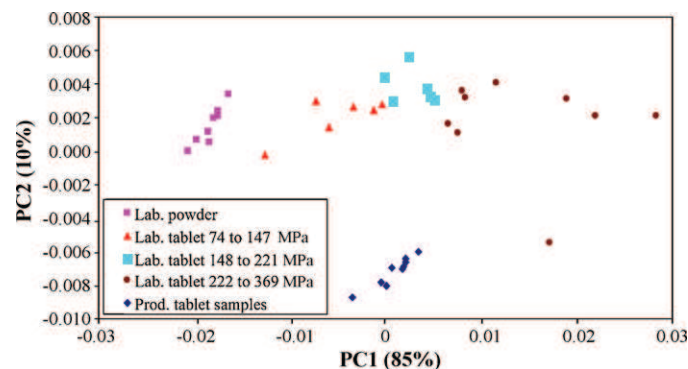


Fig. 5. PCA scores plot for laboratory samples (powder and compressed) and production tablets.

Laboratory tablets containing API concentrations $\pm 5\%$ around the nominal content and pressed at 74–369 MPa were split into three groups according to compaction pressure. As can be seen from Fig. 4, the pressure used to prepare the tablets caused a shift in the NIR bands. Fig. 5 is a scatter plot of the PCA scores for laboratory tablets, powder samples and production tablets. As can be seen, the compaction pressure was the strongest individual source of variability, PC1, which accounted for 85% of the total variance. On the other hand, the second component (PC2), which accounted for 10% of the total variance, represented differences between production and laboratory tablets [11]. As can also be seen, the production samples fell within the 148–221 MPa range for the laboratory samples, which suggests that the compaction pressure for the production tablets lay in that range.

Table 2
Main figures for determination of physical parameters in granulated and tablet samples.

Samples	Compaction pressure			Particle size distribution		Average particle size	
	Calibration	Prediction		Calibration	Prediction	Calibration	Prediction
	Laboratory	Laboratory	Production	Production		Production	
Pre-treatment	1st derivative			2nd derivative		1st derivative	
Range (nm)	1110–2488			1110–2488		1110–2488	
Range of value	74–370 MPa			172–223 MPa		0–1000 μm	
Algorithm	PLS			PLS2		PLS	
Factors	4			5		5	
Explained Variance Y (%)	99.0			97.2		99.5	
Samples	16	10	90	12	6	13	8
RSEC/P (%)	3.5	8.6	^a	2.7	7.5	1.0	6.2

^a Not reference value is available to calculate RSEP.

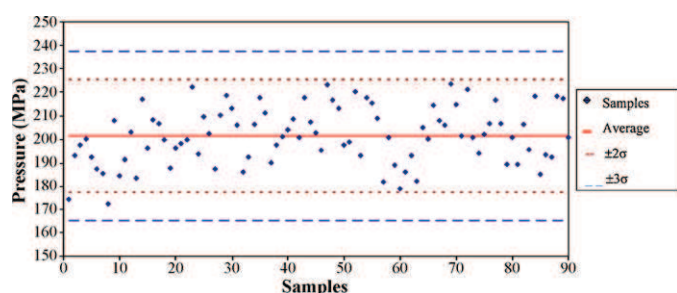


Fig. 6. Control chart of compaction pressure for production tablet.

The compaction pressure for the tablets was determined by using a model constructed from laboratory samples. Table 2 shows the figures of merit of the model. No reference values for the compaction pressure were available with a view to validating the model; the sole information available for this purpose being the operating range of the press: 195–215 MPa. The ensuing model was used to predict the compaction pressure for 90 production tablets from 9 different batches and provided values from 172 to 223 MPa (average, 201 MPa).

Fig. 6 is the control plot for the predicted compaction pressure for each tablet. As can be seen, there were differences between individual tablets. In any case, pressure values clustered randomly around a central one (the average compaction pressure) and only 2 tablets had a pressure outside the range defined by the average value $\pm 2\sigma$.

Control plots provide an effective tool for controlling deviations and trends from individual values and confirming that the compaction process is under control.

Table 3
Determination of average particle size in granulated samples (comparison of PLS and PLS2 calibration models).

Samples	Particle size distribution (PLS2)	Median particle size (PLS)	Particle Size reference (μm)	PLS2 to particle size distribution Residual	PLS to average particle size Residual
	Average particle size (μm)	Prediction of average particle size (μm)			
1	684	683	623	-61	-60
2	676	704	648	-28	-56
3	599	668	672	72	4
4	606	654	633	27	-20
5	557	573	626	69	53
6	583	614	597	14	-17
			Average residual	15.7	-16.02
			s	52.86	41.71
			n	6	6
			t_{exp}	0.73	0.94
			$t_{\text{crit}}^{\text{a}}$	2.57	2.57

^a t critical ($\alpha = 0.05$, 5 degrees of freedom).

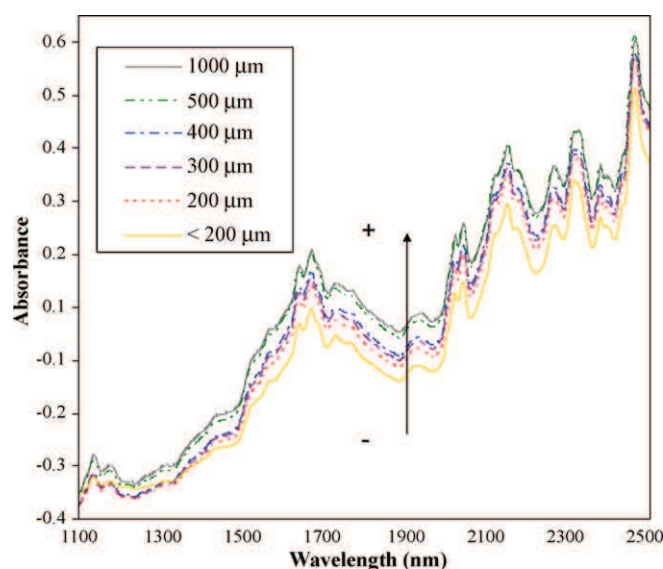


Fig. 7. Absorbance spectra of different particle size samples.

3.3. Determination of particle size distribution and average particle size

Ensuring efficiency in the production process and a high quality in the end-product entails controlling the average particle size and particle size distribution of the product. In fact, an appropriate particle size ensures acceptable physical properties (hardness, disintegration, average weight) in the product.

Table 4
Validation parameters of API determination in production tablets.

	Parameter	Result
Linearity	<i>n</i>	20
	Concentration range (% of nominal value)	80–111%
	Intercept	3 ± 4
	Slope	0.98 ± 0.04
	<i>R</i>	0.992
Accuracy	<i>n</i>	6
	Average difference (% of nominal value)	0.08
	<i>s</i>	0.72
	<i>t</i> _{exp}	0.27
	<i>t</i> _{crit}	2.571
Repeatability	Mean NIR (% of nominal value)	97.3
	CV%	0.1
Intermediate pre- ci- sion	ANOVA	
	Day (3)	
	<i>F</i> _{exp}	3
	<i>F</i> _{crit}	19
	Analyst (2)	
	<i>F</i> _{exp}	0.3
	<i>F</i> _{crit}	18.5
	<i>s</i>	0.1
	CV%	0.1
	Robustness	<i>n</i>
Average residual		0.41
<i>s</i>		1.12
<i>t</i> _{exp}		1.89
<i>t</i> _{crit}		2.06

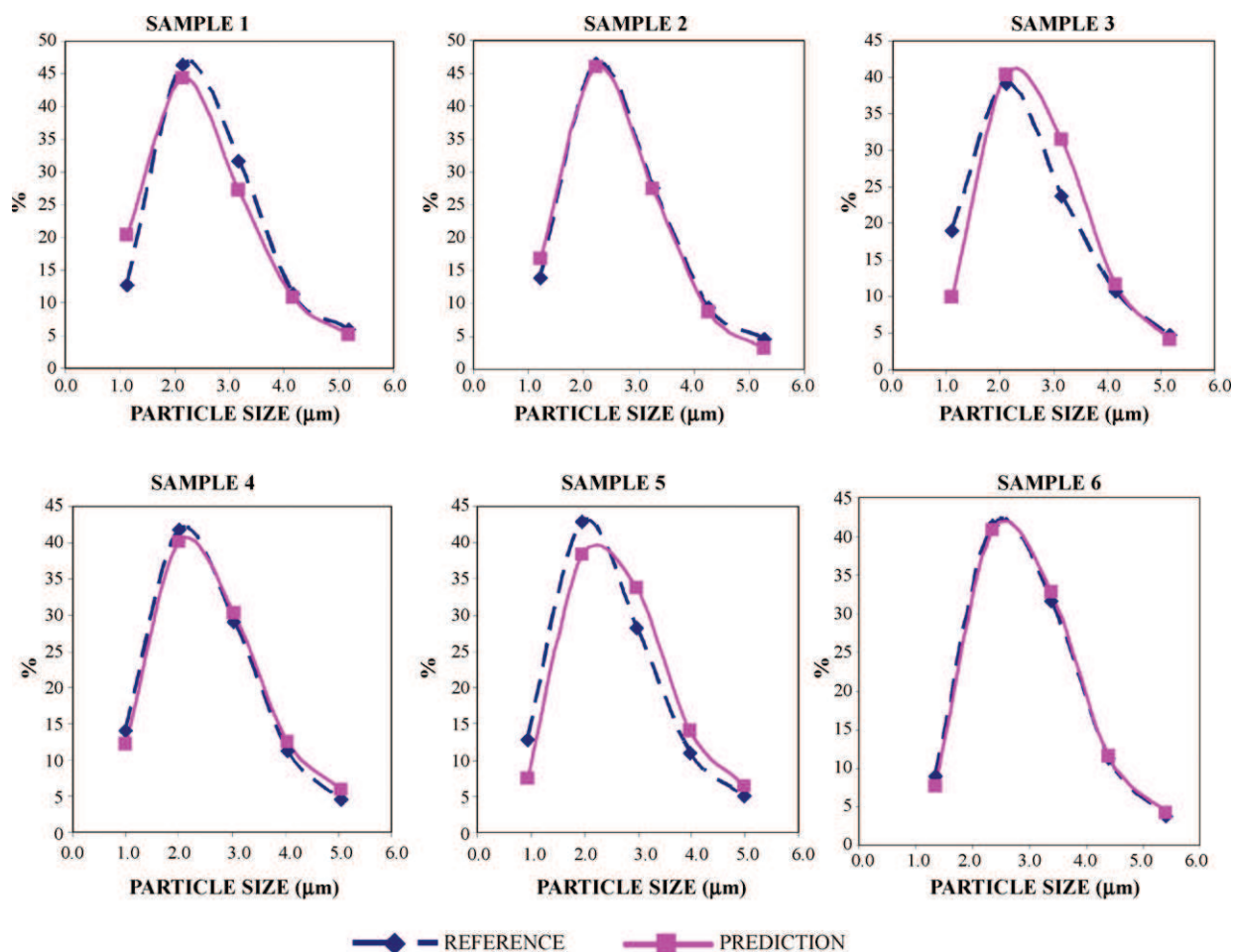


Fig. 8. Particle size distribution curves for different granulated samples obtained applying PLS2 calibration models.

The granulate samples studied were collected over a period of 2 years. This ensured a broad enough temporal distribution and hence good representativeness in the samples.

Fig. 7 shows the NIR spectrum for each sieving fraction. As can be seen, the bands shifted with increase in particle size. Particle size distribution was determined by using a PLS2 model. The PLS2 algorithm allows one to correlate the spectral data matrix with more than one variable and predict various particle sizes with a single calibration model [20]. The selected wavelength range was 1100–2500 nm and the model with the highest predictive ability one based on a second-derivative spectral treatment (Table 2).

The particle size distribution of a product is a measure of granulate heterogeneity and also of the particle size range it spans; particles larger than 250 μm but distributing closely around the average size are acceptably fluid [8]. As can be seen from Fig. 8, the predicted curves fitted those obtained from the reference values quite closely.

Another PLS model was constructed to determine the average particle size by using the whole wavelength range (1100–2500 nm). The best choice as regards predictive ability was a first-derivative model (see Table 2). A comparison of the average particle sizes provided by the PLS and PLS2 models with the theoretical value was made via a paired *t*-test. Based on the results, there were no significant differences in performance between the two models at a significance level $\alpha < 0.05$ (see Table 3).

3.4. Validation of the proposed method for quantifying the API in paracetamol tablets

The proposed NIR method for determining paracetamol (API) in tablets was validated in accordance with the ICH [21] and EMEA guidelines (ICH, 1994) [22]. This involved assessing the selectivity, linearity, accuracy, precision (as repeatability and intermediate precision) and robustness of the method. “The selectivity of a NIR method is established across the identification of the pharmaceutical preparation using spectral libraries constructed with spectra of the preparation and the possible confusions: excipients and other similar preparations. The identification of the preparation is a previous step for quantification of its API content”.

Robustness was assessed by analyzing samples collected over a period of 6 months. A paired *t*-test at the 95% confidence level on the differences between the NIR and HPLC values revealed the absence of significant differences between the proposed and reference methods.

Table 4 shows the validation results for the proposed method.

4. Conclusions

This study testifies to the usefulness of NIR spectroscopy for assessing quality in a pharmaceutical product by determining various chemical and physical properties in several steps of the production process.

By using two different PLS calibration models to determine the API in intermediate granulates and the end-product one can control individual steps and the overall process before the product is released. The proposed model for determining the API in granulated samples require no production samples was used in content of API determinations with results not significantly different from those provided by the reference (HPLC) method. This can dramatically facilitate the development of effective prediction models and improve their accuracy since reference values can be obtained simply by weighing, without the need to use any special technique. The validation results obtained by applying the ensuing method to finished production tablets in accordance with

the ICH guidelines testifies, these results show that this method is an effective alternative to conventional (HPLC) choices for this purpose.

The PLS2 model used to determine particle size distribution provides a more comprehensive knowledge of the particle size-related properties of the intermediate product, which facilitates assurance of an increased quality and uniformity in the physical properties (average weight, dissolution rate) of the tablets.

Using a NIR model to predict the compaction pressure of tablets provides a simplified, non-destructive alternative which additionally ensures fulfillment of other requirements associated to this variable.

All models used here produce results comparable to those obtained by the reference method and are thus potentially useful for routine analyses with a view to controlling critical points in the production of tablets and avoiding non-conforming batches and the need for re-processing as a result.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project CTQ2006-12923. Rubén Cueva also wishes to acknowledge additional support from the Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

References

- [1] American Food Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance, American Food and Drug Administration, 2004, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm042450.htm>.
- [2] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, D. Serrano, Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets, *Analyst* 123 (1998) 2307–2312.
- [3] R.P. Cogdill, C.A. Anderson, J.K. Drennen, Using NIR spectroscopy as an integrated PAT tool, *Spectroscopy* 19 (2004) 104–109.
- [4] J. Parris, C. Airiau, R. Escott, J. Ryzak, R. Crocombe, Monitoring API drying operations with NIR, *Spectroscopy* 20 (2005) 34–42.
- [5] B. Swarbrick, B. Grouta, J. Noss, The rapid, at-line determination of starch content in sucrose-starch blends using near-infrared reflectance spectroscopy; a process analytical technology initiative, *J. Near Infrared Spectrosc.* 13 (2005) 1–8.
- [6] Y. Roggo, C. Roeseler, M. Ulmschneider, Near infrared spectroscopy for qualitative comparison of pharmaceutical batches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 777–786.
- [7] Y. Dou, Y. Sun, Y.Q. Ren, P. Ju, Y.L. Ren, Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 543–549.
- [8] L.X. Liu, I. Marziano, A.C. Bentham, J.D. Litster, E.T. White, T. Howes, Effect of particle properties on the flowability of ibuprofen powders, *Int. J. Pharm.* 362 (2008) 109–117.
- [9] T. Närvänen, T. Lipsanen, O. Antikainen, H. Räikkönen, J. Yliuusi, Controlling granule size by granulation liquid feed pulsing, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 132–138.
- [10] J. Rantanen, E. Rasanen, J. Tenhunen, M. Kansakoski, J.-P. Mannermaa, J. Yliuusi, In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near infrared sensor: an evaluation of particle size and binder effects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 271–276.
- [11] M. Blanco, M. Alcalá, Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: a contribution to process analytical technologies, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353–359.
- [12] M. Aulton, E. Aulton, Farmacia. La Ciencia del diseño de las formas farmacéuticas, second ed., Elsevier, Madrid, 2004.
- [13] H. Tanabe, K. Otsuka, M. Otsuka, Theoretical analysis of tablet hardness prediction using chemometric near-infrared spectroscopy, *Anal. Sci.* 23 (2007) 857–862.
- [14] K.M. Morisseau, C.T. Rhodes, Near-infrared spectroscopy as a non-destructive alternative to conventional tablet hardness testing, *Pharm. Res.* 14 (1997) 108–111.
- [15] J.H. Cho, P.J. Gemperline, P.K. Aldridge, S.S. Sekulic, Effective mass sampled by NIR fiber-optic reflectance probes in blending processes, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 303–310.

- [16] J. Rantanen, O. Antikainen, J.-P. Mannermaa, J. Yliruusi, Use of the near-infrared reflectance method for measurement of moisture content during granulation, *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 209–217.
- [17] M. Andersson, S. Folestad, J. Gottfries, M.O. Johansson, M. Josefson, K.-G. Wahlund, Quantitative analysis of film coating in a fluidized bed process by in-line NIR spectrometry and multivariate batch calibration, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2099–2108.
- [18] Y.C. Feng, C.Q. Hu, Construction of universal quantitative models for determination of roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate in tablets from different manufacturers using near infrared reflectance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 373–384.
- [19] W. Mc-Cabe, J. Smith, *Operaciones Básicas de Ingeniería Química*, Second Ed., Reverté, Buenos aires, 1977.
- [20] M. Blanco, A. Peguero, An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: comparison of PLS2 and ANN models, *Talanta* 77 (2008) 647–651.
- [21] ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, <http://www.ich.org/ich5q.html>.
- [22] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, February 2003, Note for Guidance, EMEA/CVMP/961/01, CPMP/QWP/ 3309/01. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf>.

**NIR analysis of pharmaceutical samples
without reference data: Improving the
calibration**

Talanta

85 (2011) 2218-2225



NIR analysis of pharmaceutical samples without reference data: Improving the calibration

M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, A. Peguero

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-01893 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2011

Received in revised form 13 July 2011

Accepted 23 July 2011

Available online 29 July 2011

Keywords:

Calibration set

Process variability matrix

Near infrared spectroscopy

Calibration without reference data

PLS calibration

ABSTRACT

Using an appropriate set of samples to construct the calibration set is crucial with a view to ensuring accurate multivariate calibration of NIR spectroscopic data. In this work, we developed and optimized a new methodology for incorporating physical variability in pharmaceutical production based on the NIR spectrum for the process. Such a spectrum contains the spectral changes caused by each treatment applied to the component mixture during the production process. The proposed methodology involves adding a set of process spectra (*viz.* difference spectra between those for production tablets and a laboratory mixture of identical nominal composition) to the set of laboratory samples, which span the wanted concentration range, in order to construct a calibration set incorporating all physical changes undergone by the samples in each step of the production process. The best calibration model among those tested was selected by establishing the influence of spectral pretreatments used to obtain the process spectrum and construct the calibration models, and also by determining the multiplying factor m to be applied to the process spectra in order to ensure incorporation of all variability sources into the calibration model. The specific samples to be included in the calibration set were selected by principal component analysis (PCA). To this end, the new methodology for constructing calibration sets for determining the Active Principle Ingredients (API) and excipients was applied to Irbesartan tablets and validated by application to the API and excipients of paracetamol tablets. The proposed methodology provides simple, robust calibration models for determining the different components of a pharmaceutical formulation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Near infrared spectroscopy has become a widely used tool in the pharmaceutical industry for a variety of purposes ranging from the determination of the API in end-products to the monitoring of the different steps of a pharmaceutical process. During the pharmaceutical process, a mixture of the different components of the formulation is subjected to operations including granulation, drying, pressing and coating, all of which introduce some variability in the spectra for production samples in relation to those for a sample obtained simply by mixing the formulation ingredients. Such variability precludes the use of the same model to determine any parameter such as the API concentration, an excipient concentration or some physical property (*e.g.* particle size, compaction pressure) in the pharmaceutical preparation. As a result, accurately determining each target parameter requires constructing an appropriate calibration model, which is a slow, difficult task [1].

Introducing process analytical technology (PAT) in a pharmaceutical process entails determining some parameters in order to establish the critical quality attributes for the process or its product. This is usually accomplished by using a fast-response technique such as NIR or Raman spectroscopy. Constructing accurate models

for pharmaceutical processes requires using a simple, fast, flexible methodology for this purpose [2].

The greatest difficulty in developing a robust analytical model is constructing a representative calibration set. In fact, the samples to be included in the calibration set should span a wide enough concentration range to enable the prediction of samples with abnormal concentrations and meet the ICH guidelines as regards maximum ranges; also, they should encompass the whole physical and chemical variabilities of the production process [3]. In order to meet the former requirement, the ICH guidelines [4] recommend using a range $\pm 20\%$ around the nominal value to determine the API; also, correlation between components in the calibration samples should ideally be as low as possible.

Physical variability in production samples arises from differences in density, particle size, granulation and compaction, among other factors, which result in differences in light trajectory and scatter that in turn lead to spectral dissimilarities [5]. Because even small differences can have a strong impact, incorporating them into the calibration model is crucial with a view to obtaining acceptable predictions.

The previous requirements are essential in order to construct effective calibration sets [6]; also, the more similar the calibration samples and those to be predicted (*viz.* production samples) are, the

Table 1
Concentration correlation coefficients of the different components in Irbesartan laboratory blends.

Correlation coefficients	Irbesartan	Lactose	Avicel pH 102	PVP 25	Croscarmellose sodium	Aerosil 200	Sodium stearyl fumarate
Irbesartan	1	–	–	–	–	–	–
Lactose	0.32	1	–	–	–	–	–
Avicel pH 102	0.23	0.20	1	–	–	–	–
PVP 25	–0.99	–0.39	–0.29	1	–	–	–
Croscarmellose sodium	–0.99	–0.40	–0.28	0.99	1	–	–
Aerosil 200	–0.99	–0.38	–0.29	1.00	0.99	1	–
Sodium stearyl fumarate	–0.99	–0.40	–0.28	0.99	1.00	0.99	1

better will be the predictions. Fulfillment of these requirements can be ensured by using a number of methods [7–14]. Some tablet production variables including grain size [1,8,9], compaction pressure [1,11], tablet shape [5] and coating [17] influence the NIR spectrum for the product and should therefore be considered in constructing a multivariate calibration model to determine the API content. Recently, Blanco et al. [15] proposed a new method for incorporating physical variability in a pharmaceutical production process into the set of calibration spectra via a calculated process spectrum. The process spectrum is the difference spectrum between that for the sample at an intermediate stage of the process (mixture, granulate, core) or its final stage (tablet) and a powder mixture of identical composition. The differences calculated for several production samples are expressed as a set of mathematical vectors defining variability in the production process. This is the so-called “process variability matrix”, which is added to the matrix containing the set of NIR spectra for several powder mixtures spanning the desired range of API concentrations in order to obtain the spectral matrix for the calibration set. The spectrum for a calibration sample is the sum of the weighted contributions of the different sample components (laboratory-made samples in our case) and that of the production process (*i.e.* the process spectrum).

Usually, the number of available process spectra is small and may not contain the whole variability in the production samples. Under such conditions, the variability included in the process variability matrix can be increased by multiplying the process spectra by an empirical coefficient m to obtain an expanded set: the extended process variability matrix. The sum of the spectral matrix for the laboratory powder samples – which contains chemical variability – and the extended process variability matrix – which contains physical variability introduced by the different steps of the production process – provides the extended total variability matrix – which contains both physical and chemical variabilities in the process, and is used to construct the calibration model. A poor selection of samples for the calculation of process spectra can introduce systematic errors in the prediction of production samples [15].

In this work, we developed a methodology for selecting the most suitable empirical coefficient m to be used in calculating the extended variability matrix and assessed the effect of spectral treatments used to obtain the process spectrum on the simplicity of the ensuing calibration model and its predictive ability.

2. Experimental

2.1. Production samples

The pharmaceutical products studied were 100 tablets of Irbesartan 300 mg and 52 tablets of Paracetamol 1 g, both from Laboratorios KernPharma. Irbesartan 300 mg is commercially available as uncoated white cylindrical tablets containing Irbesartan (59.29 wt%) as API; lactose (19.76 wt%) and Avicel pH 102 (10.97 wt%) as major excipients; and PVP 25 (2.96 wt%), Croscarmellose sodium (2.67 wt%), sodium stearyl fumarate (2.57 wt%) and Aerosil 200[®] (1.78 wt%) as minor excipients. The paracetamol 1 g tablets

were also white and uncoated, and contained Paracetamol (89.90 wt%) as API; pre-gelatinized starch (8.70 wt%) as major excipient; and stearic acid (0.50 wt%) and Povidone (1.00 wt%) as minor excipients.

2.2. Laboratory samples

The pure components of Irbesartan 300 mg tablets were used to prepare a total of 30 laboratory samples consisting of accurately weighed amounts of the powdered ingredients spanning a concentration range $\pm 20\%$ around the nominal API content as per the ICH guidelines [4]. The sample set was established by using a D-optimal design in order to minimize correlation between concentrations (see Table 1).

Similarly, the pure components of Paracetamol 1 g tablets were used to prepare a total of 26 mixtures spanning a concentration range from 80 to 111% the nominal API content (898 mg/g) in the commercial tablets, the latter value corresponding to pure paracetamol. Such a high API concentration and low excipient concentrations precluded using an experimental design to prepare a sample set with low correlated concentrations.

All samples were made by weighing the required amounts of each component on an analytical balance. The mixtures were homogenized in a solid mixer and assumed to be homogeneous when they gave two identical consecutive NIR spectra. All concentrations were expressed as percentages of the total weight of each pharmaceutical preparation.

2.3. Instrumentation and software

Laboratory samples were homogenized in a Turbula T2C WAB shaker mixer. The NIR spectra for the Irbesartan and Paracetamol laboratory samples and tablets were recorded on a Bruker MPA Fourier Transform spectrophotometer equipped with an integrating sphere and a rotary module furnished with a cast of the same shape and size as the tablets. The instrument was governed via the software Opus v. 6.5.

The D-optimal design was developed with the software Modde v.6.0 from Umetrics.

All spectra were processed and multivariate models were constructed by using The Unscrambler v. 9.8 from Camo.

2.4. Recording of NIR spectra

The NIR reflectance spectra for the samples were recorded over the range 12 500–3750 cm^{-1} (800–2666 nm) with a maximum spectral resolution of 2 cm^{-1} and an accuracy of 0.3 nm. Each spectrum was the average of 32 scans.

Powder samples were held in vials for direct placement on the autosampler window. Each sample was used to record two spectra, with turnover between the two, for averaging.

The spectra for Irbesartan tablets were recorded in cylindrical casts, and those for Paracetamol tablets in oblong casts, which were directly placed on the autosampler. Each sample was used to record

two spectra and their average used to predict the component concentrations.

2.5. Preparation of the calibration–validation set

The process spectrum (S_p , which contained the contributions of granulation and pressing), was calculated as

$$S_p = S_T - S_{ref} \quad (1)$$

where S_T is the spectrum for the production sample (tablet) and S_{ref} that for a laboratory powder sample containing the same API and excipient concentrations as the production sample. Calculations were based on the data for 5 tablets from as many production batches of Irbesartan 300 mg and 10 of Paracetamol 1 g. The 5 Irbesartan and 10 Paracetamol process spectra thus obtained contained the spectral variability introduced by the production process. These spectra constituted the reduced process variability matrix, $S_{p,red}$, for the production steps, which was added to the spectral matrix for laboratory samples of known concentration in order to obtain the reduced total variability matrix, $S_{t,red}$.

$$S_{t,red} = S_{conc} + S_{p,red}$$

The number of process spectra used was small; also, they might not contain the whole variability of the production process. In order to increase the variability in S_p , we used a multiplying factor ranging from 1.5 to 0.5; specifically, we used the values 0.5; 1.5, 0.75; 1.25 and 0.91; 1.1. This not only increased the number of process spectra, but also the variability spanned by the new set of process spectra, which constituted the extended process variability matrix, $S_{p,ext}$. This new spectral set was randomly added to the spectra for laboratory powder samples spanning an API concentration range $\pm 20\%$ around the nominal value for the Irbesartan formulation, and 80–111% for the Paracetamol formulation:

$$S_{t,ext} = S_{conc} + S_{p,ext} \quad (2)$$

where $S_{t,ext}$ is the spectral matrix with the desired process variability and concentration range for calibration, S_{conc} that for the laboratory powder samples and $S_{p,ext}$ the extended process variability matrix. The spectral set $S_{t,ext}$ constituted the extended total variability matrix, which was subjected to various treatments such as SNV and derivation prior to construction of the calibration model [16].

2.6. Reference values

The reference values for the laboratory-made samples were obtained from the weights of the formulation components.

The API content of the Irbesartan 300 mg production samples used to validate the models was determined by HPLC–UV/Vis under the following conditions: a steel column 25 cm long \times 4.6 mm i.d. packed with Kromasil 100 C₁₈ in 5 μ m particle size; a mobile phase consisting of 65:35 (v/v) buffer at pH=2.5/acetonitrile (A) and 30:70 (v/v) buffer at pH=2.5/acetonitrile (B), and used in a gradient regime at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹; an injected volume of 20 μ L; a chromatographic run time of 35 min and a detection wavelength of 275 nm.

The API content of the Paracetamol 1 g production tablets used to validate the model was also determined by HPLC–UV/Vis, using a steel column 25 cm long \times 4 mm i.d. packed with Spherisorb ODS-2 in 5 μ m particle size; a 70:30 (v/v) methanol/(water/acetic acid) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ as mobile phase; an injected volume of 25 μ L; a chromatographic run time never exceeding 10 min and a wavelength of 280 nm for detection.

2.7. Construction of calibration models

The spectra constituting the extended total variability matrix were used to develop PLS calibration models. Previously, the spectra were subjected to various treatments including SNV, and first and second derivatives, using the Savitzky–Golay algorithm with a 11-point window and fitting to a second-order polynomial in all cases.

The calibration model was constructed by using the PLS model with the number of factors leading to the lowest RMSE, it was calculated from:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{NIR} - Y_i^{REF})^2}{n}}$$

As determined from a plot of RMSE vs number of factors, Y_i^{NIR} being the API content predicted by the model, Y_i^{REF} that provided by the reference method (weighing or HPLC) and n the number of samples.

3. Results and discussion

Constructing an effective calibration set is crucial with a view to obtaining accurate predictions with multivariate models based on NIR spectroscopy; developing a new method involving calculation of the process spectrum requires a thorough study of the variables influencing its performance. To this end, we used various methods to obtain the process spectrum with a twofold purpose, namely: (a) to establish the effect of spectral treatments in constructing calibration models and obtaining the process spectrum and (b) to incorporate as much variability in the production samples as possible in order to ensure goodness of the model, which entailed determining the multiplying factor m to be applied to the process spectrum in order to ensure the inclusion of production samples in the calibration set.

A good calibration set should include chemical variability in the production process and also variability derived from each sample processing step. This can be accomplished by using a series of laboratory mixtures prepared in accordance with a D-optimal design and spanning the desired concentration range for each component with minimal collinearity between concentrations. Table 1 shows the concentration correlation in the laboratory-made Irbesartan samples. As can be seen, the correlation coefficients between the concentrations of the major components (Lactose, Avicel pH 102 and the API) were all less than 0.50; this precluded reducing collinearity between the minor components, which spanned the concentration range 1.5–3%.

Physical variability in the process was incorporated into the calibration model by using the process spectrum methodology, which involved combining the process spectra (S_p) with those for laboratory samples prepared as described above. As can be seen from Fig. 1, which compares the spectrum for a production sample with that of a powder mixture of identical concentration in each ingredient, the former exhibited a shift and slightly different band intensities as a result of physical changes during the production process (granulation and compaction); the differences, however, were reduced by adding the spectrum for a laboratory sample to S_p [5]. The process spectrum is not unique; rather, it is a function of the samples used in its calculation since each production process has a different contribution of the factors introducing variability in it. Therefore, the matrix of process spectra is obtained from several process spectra for different production samples in order to ensure that the varying magnitudes of sample variability are included. In any case, it is rather difficult to ensure that the set of samples used to record the process spectra will be representative of the overall variability in the production process.

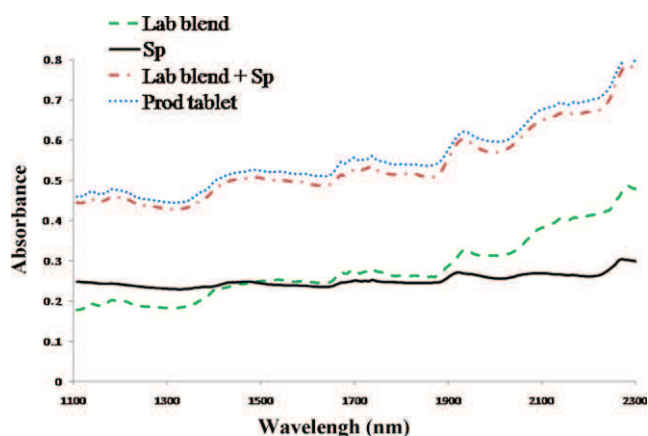


Fig. 1. Absorbance spectra of a laboratory blend, Irbesartan 300 mg production tablet, spectrum process (S_p) and laboratory blend + S_p .

A scatter plot of the scores for the first two PCs (Fig. 2) revealed that the spectra for laboratory samples combined with S_p (matrix $S_{t,red}$) were more similar to the production samples. As can be seen from Fig. 2A, the laboratory mixtures departed from the production samples; by contrast, the combination of the spectra for the laboratory samples and the process spectra ($S_p + S_{conc} = S_{t,red}$) clustered with the production tablets (Fig. 2B), which suggests that adding process spectra to laboratory-made samples ensures the incorporation of a sizeable fraction of variability in the process.

3.1. Influence of spectral treatments

The best spectral treatment for obtaining the calibration models was identified from a scatter plot of the PCA scores for $S_{t,red}$ and production tablets subjected to the SNV, first-derivative

and second-derivative treatments over the wavelength range 1100–2300 nm. The clusters of laboratory samples for all spectral treatments included virtually all production samples (Fig. 3A shows this sample distribution for first derivative spectra and that are similar for different pre-treatments); therefore, the samples in $S_{t,red}$ incorporated most of the variability in the production process and any of the above spectral treatments could in theory be used to construct the calibration model. This was confirmed by constructing PLS models from spectra subjected to each treatment. The model constructed from laboratory mixtures alone (S_{conc}) (i.e. including no process spectra, S_p) resulted in large prediction errors for the production samples despite the low intensity of the S_p bands (see Table 2). A comparison of the RMSEC/P values for the models including $S_{t,red}$ revealed that all models provided reasonably accurate predictions; however, the simplest, best predictive model was that obtained with the first-derivative spectral treatment, which was thus adopted to determine the optimum multiplying factor, m .

Using the different spectral treatments to obtain S_p resulted in no difference in the ensuing models irrespective of the time of application. This was not the case with the process spectra subjected to SNV; in fact, the S_p models constructed from SNV-treated absorbance spectra provided increased bands by effect of the autoscaling involved in the SNV treatment.

With the other spectral treatments, altering the application sequence made no difference, which suggests that the point of application of the treatment has no effect on the goodness of the results.

3.2. Increasing the variability of calibration samples

As can be seen from Figs. 2 and 3A – which corresponds to first-derivative spectra – the production samples were not completely included in the $S_{t,red}$ cluster; therefore, variability in the production samples was not completely represented in these samples. This problem was solved by increasing the initial variability (specifically,

Table 2

Relevant parameters of the PLS models constructed from laboratory blends and laboratory blends + S_p for quantifying the Irbesartan (API). Effect of different pre-treatments over the wavelength range 1100–2300 nm.

Spectral pre-treatment	Calibration samples	PLS factors	Explained variance (%)	Calibration	
				RMSEC	Prediction RMSEP
1st derivative	Lab blends	4	99.0	0.70	8.07
Absorbance	Lab blends + S_p	4	97.3	1.14	3.07
SNV	Lab blends + S_p	4	98.0	0.97	2.88
1st derivative	Lab blends + S_p	3	97.7	1.17	1.53
2nd derivative	Lab blends + S_p	3	97.8	1.10	1.75

Calibration samples: 20 laboratory blends (concentration range of 46.4–69.6%, w/w), prediction samples: 10 batches (10 tablets are analyzed in each batch).

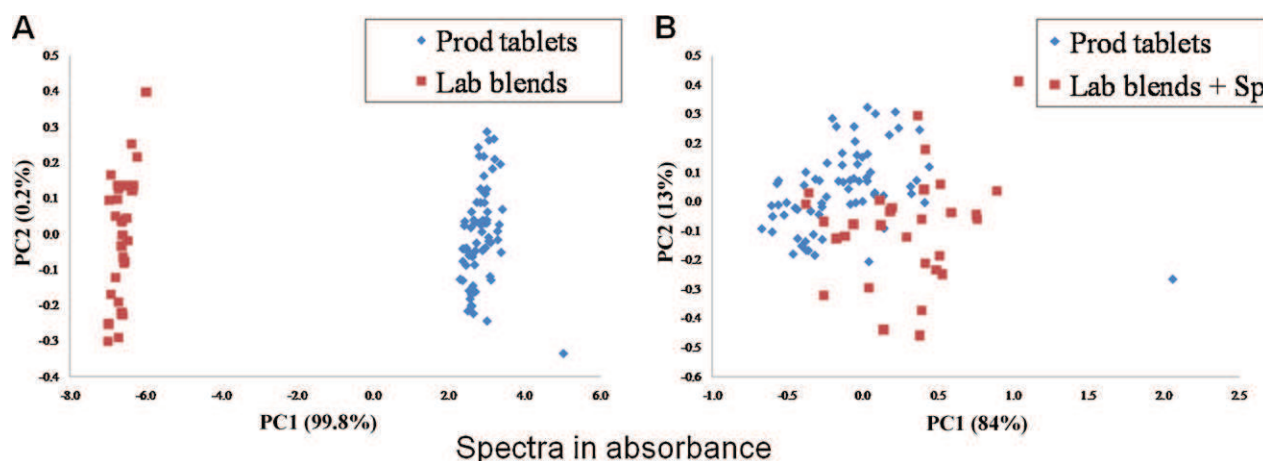
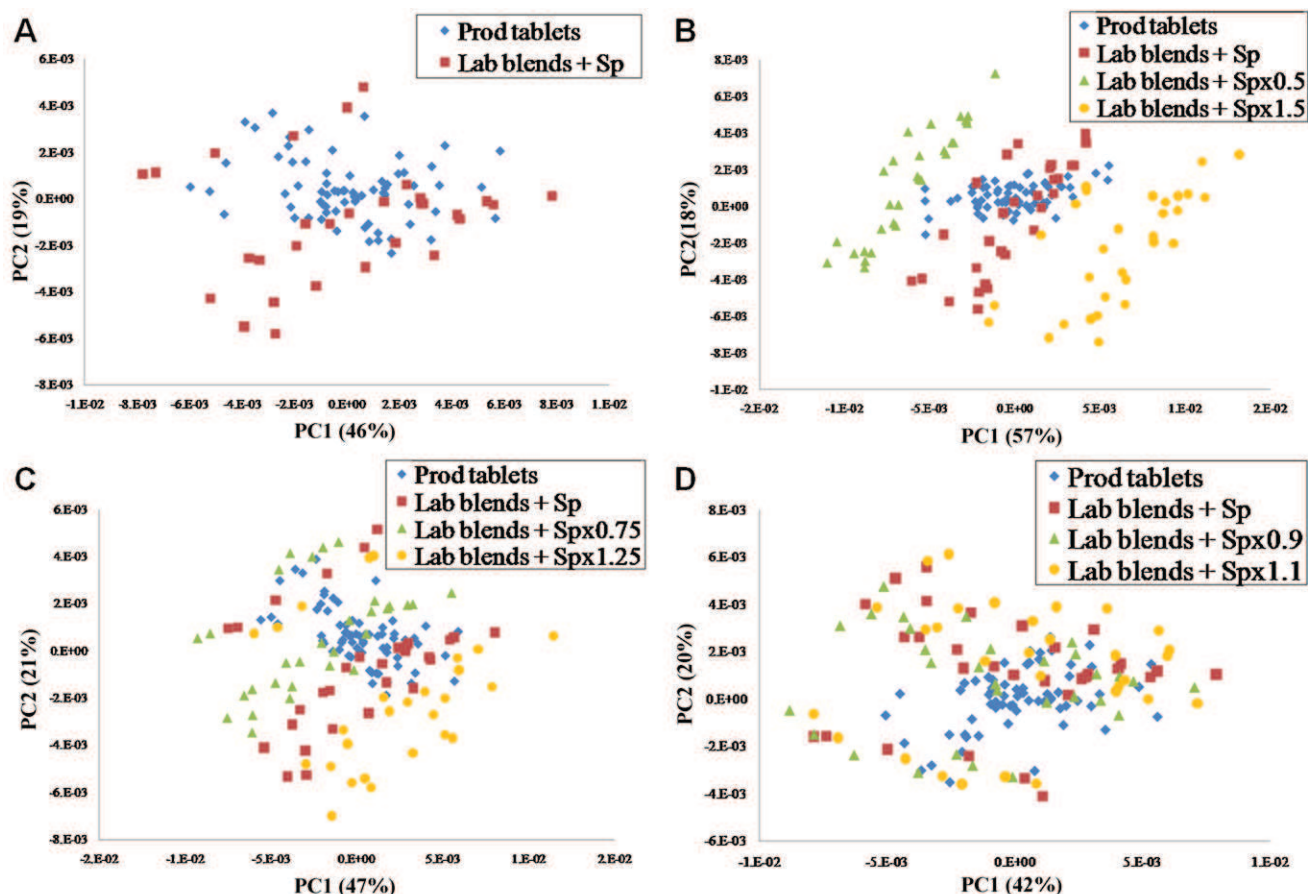


Fig. 2. Scatter plot of PCA scores from absorbance spectra over the wavelength range 1100–2300 nm for: (A) Laboratory blends and production tablets and (B) Laboratory blends + S_p and production tablets.



Spectral treatment: 1st derivative mode over the wavelength 1100–2300 nm.

Fig. 3. Scatter plot of PCA scores for production tablets and laboratory blends added reduced or extended process variability matrix. Value of Multiplicative factors (m): (A) 1, (B) 0.5; 1.5, (C) 0.75; 1.25, (D) 0.9; 1.1.

by multiplying the process spectrum by a near-unity factor m). We used principal component analysis (PCA) to determine the specific m value ensuring inclusion of the spectra for all production samples in the cluster of S_{conc} combined with the products of the process spectra by m .

We used a scatter plot of PCA scores to explore the spectra for laboratory samples modified with the extended process variability matrix ($S_{\text{conc}} + mS_{\text{p}} = S_{\text{t,ext}}$) and production tablets in order to select the most suitable m values with a view to constructing a set of spectra $S_{\text{conc}} + mS_{\text{p}}$ incorporating the whole variability in the production samples. Fig. 3 shows the scatter plots for four PCAs on combinations of spectra for laboratory samples with process spectra multiplied by the m values 0.5;1.5, 0.75;1.25 and 0.9;1.1; the spectra were subjected to the first-derivative treatment over the wavelength range 1100–2300 nm. As can be seen, $S_{\text{t,ext}}$ failed to include all production samples (Fig. 3A); also, the laboratory sam-

ples whose spectra were applied an m value of 0.5;1.5 departed considerably from the production samples (Fig. 3B) and those with an m value less than 0.75;1.25 fell closer to them (Fig. 3C), but those whose spectra were multiplied by $m = 1.25$ fell below and distant from the production samples. Finally, using an m factor of 0.9;1.1 led to the laboratory samples falling closer to the production samples (Fig. 3D). These results were confirmed by the figures of merit of the ensuing PLS models (Table 3). As can be seen, the PLS model obtained with $m = 0.9;1.1$ was the simplest (i.e. that using the smallest number of factors) and also that resulting in the smallest RMSEP.

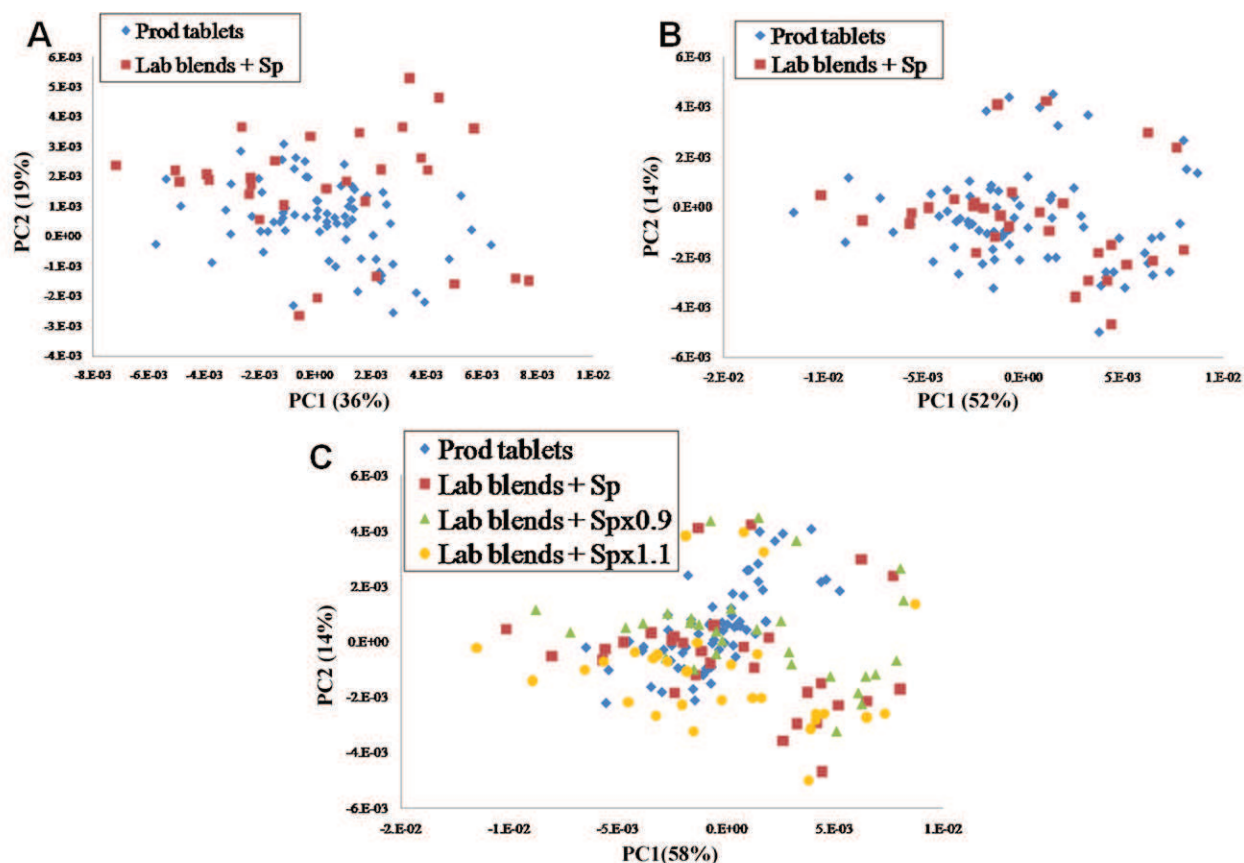
The goodness of the proposed methodology was further confirmed by using a variability matrix containing a variable number of process spectra (5 and 15). Fig. 4 shows three scatter plots for the PC scores. As can be seen, the cluster $S_{\text{conc}} + S_{\text{p}}$ ($\#S_{\text{p}} = 5$) failed to include all production samples (Fig. 4A), that constructed from

Table 3

Figures of merit for PLS models constructed from reduced and extended total variability matrix for Irbesartan (API) determination.

Samples for calibration	Multiplicative factors (m)	PLS factors	Explained variance (%)	Calibration		Prediction
				No. samples	RMSEC	RMSEP
Reduced total variability matrix	1	4	98.0	20	0.97	2.88
Extended total variability matrix	0.5; 1.5	5	97.9	60	1.01	1.67
	0.75; 1.25	4	97.7	60	1.07	1.58
	0.9; 1.1	3	97.7	60	1.17	1.53

Calibration samples with concentration range 46.4–69.6% (w/w). Prediction samples: 10 batches (10 tablets are analyzed in each batch) using 1st derivative mode over the wavelength range 1100–2300 nm.



Spectral treatment: 1st derivative mode over the wavelength 1100–2300 nm.

Fig. 4. Scatter plot of PCA scores for production tablets and laboratory blends added reduced process variability matrix: (A) 5 process spectra, (B) 15 process spectra (C) 5 process spectra added extended process variability matrix ($m=0.9:1.1$).

Table 4

Figures of merit for PLS models constructed with different quantity of spectra process (S_p) for quantifying Irbesartan tablets.

Samples for calibration	No. S_p	Multiplicative factor (m)	PLS factors	Explained variance (%)	Calibration		Prediction
					No. samples	RMSEC	RMSEP
Reduced process variability matrix	5	1	3	98.2	20	0.92	2.09
	15	1	3	97.5	20	1.10	0.94
Extended process variability matrix	5	0.9; 1.1	3	98.4	60	1.17	1.53

Calibration samples with concentration range 46.4–69.6% (w/w). Prediction samples: 10 batches (10 tablets are analyzed in each batch) using 1st derivative mode over the wavelength range 1100–2300 nm.

15 S_p included more (Fig. 4B), and that obtained with an m factor of 0.9;1.1 included virtually all (Fig. 4C). Table 4 shows the figures of merit of the three models; as can be seen, the results confirmed the conclusions drawn from the scores plots. Thus, the best models were those encompassing the greatest variability with-

out significantly increasing the complexity of the treatment. Also, using a multiplying factor and an increased number of S_p to expand the variability of the calibration samples led to better predictions of the production samples. However, using an increased number of process spectra entailed recording more spectra and detracted

Table 5

PLS models for excipients determination in Irbesartan tablets using the extended total variability matrix.

Components	Manufacturer's specification value (% w/w)	PLS factors	Pre-treatment	Explained variance (%)	Prediction ^a		
					Mean (% w/w)	Conc. range (% w/w)	S.D.
Lactose	19.76	10	2nd derivative	99.8	19.3	18.1–21.2	0.9
Avicel pH 102	10.97	9	2nd derivative	97.6	10.9	9.6–12.5	0.9
PVP 25	2.96	5	1st derivative	97.9	3.5	2.4–4.0	0.5
Croscarmellose sodium	2.67	5	1st derivative	99.1	3.2	2.2–3.6	0.4
Sodium stearyl fumarate	2.57	5	1st derivative	99.1	2.8	2.4–3.2	0.3
Aerosil 200	1.78	5	1st derivative	97.4	2.1	1.4–2.4	0.3

^a Prediction samples: 10 batches (10 tablets are analyzed in each batch). Wavelength range 1100–2300 nm.

Table 6

Figures of merit of PLS models for paracetamol (API) and excipients determination using extended total variability matrix.

Components	PLS factors	Explained variance (%)	Calibration		Prediction			
			Conc. range (% w/w)	RMSEC	Conc. range (% w/w)	RMSEP	Mean (%w/w)	S.D.
Paracetamol	3	99.4	72–100	0.67	86.6–88.3	0.91	87.5	0.9
Corn starch	3	98.8	0–25	0.70	10.3–12.0	–	11.1	0.4
Stearic acid	7	97.4	0–2	0.11	0.1–0.9	–	0.4	0.2
Povidone	5	98.0	0–4	0.19	0.2–1.0	–	0.6	0.2

Prediction set consisted in 52 individual tablets; models in 1st derivative mode over a wavelength range 1100–2500 nm.

from expeditiousness, whereas using the multiplying factor led to similarly good results in a shorter time.

3.3. Determination of the excipients

The high predictive ability of the proposed methodology was confirmed by constructing PLS models for the other formulation components. Such models were established from the same spectra used for the API (Irbesartan) and excipient concentrations in the laboratory mixtures. Table 5 shows the figures of merit of the different models. Worth special note here is the large number of PLS factors required by the models for Lactose (10) and Avicel (9), even at relatively high concentrations. This can be ascribed to the strong correlation between their spectra. The models required different spectral treatments for optimal performance. The results of Table 5 are quite consistent with the nominal concentrations of these two excipients, the actual contents of which in the formulation are unknown because their analysis is usually not required. This testifies to the capabilities of the proposed methodology. Not knowing the actual concentrations of these excipients precluded calculation of their RMSEPs; however, their standard deviations are suggestive of the quality of their quantitation.

The primary aim of constructing these models was not to determine the concentrations of the excipients as target parameters, but rather to show that the proposed methodology affords their quantitation, if desired, without the need to prepare a new set of samples.

3.4. Analysis of paracetamol tablets

The proposed methodology was used to analyze paracetamol production tablets containing the API (89.8 wt%) and maize starch (8.7 wt%) as major components. The high concentration of both precluded the use of an experimental design based on laboratory samples to reduce correlation between concentrations. Even so, the PLS models obtained were simple (only three factors) and exhibited good predictive ability (see Table 6). On the other hand, the PLS

models for Povidone and stearic acid, which are present in relatively low proportions, were more complex (5 and 7 factors, respectively) owing to the similarity of their spectra (Fig. 5), the low concentration of the two excipients and the high correlation between their spectra ($r = 0.97$). In any case, both models had standard deviations less than 0.25 (Table 6).

4. Conclusions

The study conducted in this work demonstrates the usefulness of the proposed methodology, based on the obtainment of a process spectrum that is used to construct a calibration set incorporating the variability in a pharmaceutical production process in the form of a process variability matrix. As shown here, the proposed methodology is compatible with the application of an SNV or derivative spectral treatment, but the most suitable treatment for each specific model cannot be established beforehand. Using a multiplying factor on process spectra expands the variability of the calibration set, and hence the quality of the ensuing PLS models, without additional experimental work. Also, a PCA scores plot provides a highly useful tool for determining the optimum value of the multiplying factor. Using an increased number of process spectra leads to more robust calibration models; this, together with an appropriate choice of the multiplying factor, provides simple models giving small prediction errors. This paper provides the keys and tools needed to use the proposed methodology as an alternative choice for constructing a calibration set incorporating variability in a production process with a view to quantifying any API and excipients with acceptable predictive ability in any type of pharmaceutical formulation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project CTQ2009-08312 and to KernPharma (Terrassa, Spain) for kindly supplying the samples. R.C. wishes to acknowledge additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

References

- [1] M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, A. Peguero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (4) (2010) 797–804.
- [2] M. De Beer, A. Burggraef, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, *Int. J. Pharm.* (2011), doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.012.
- [3] European Medicines Agency. Guideline on Specification and Control Test on the Finished Product, June 1992. 3 AQ11a. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003368.pdf.
- [4] ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Methodology: Text and Methodology, 2005. http://bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf.
- [5] M. Blanco, A. Peguero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (1) (2010) 59–65.
- [6] M. Blanco, M. Alcalà, in: K. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, 2nd ed., 2010, pp. 463–491.
- [7] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, N. Pou, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (5) (2000) 534–539.
- [8] A.J. O'Neil, J. Andrew, D. Roger, A.C. Moffat, *Analyst* 123 (11) (1998) 2297–2302.
- [9] A.J. O'Neil, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst* 124 (1) (1999) 33–36.

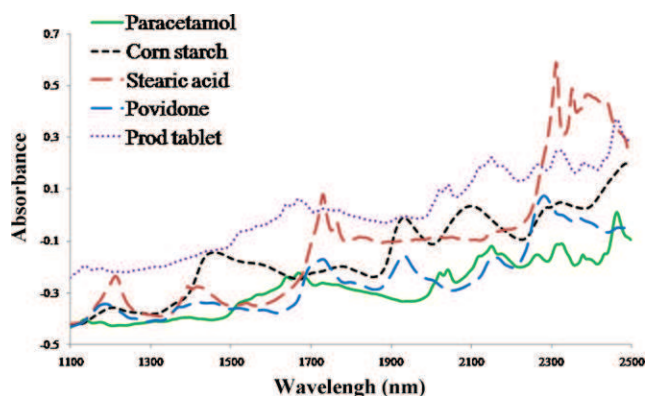


Fig. 5. NIR spectra for production tablet, Paracetamol (API) and excipients (Corn starch, Povidone and Stearic acid).

- [10] M. Alcalà, M. Blanco, M. Bautista, J.M. González, J. Pharm. Sci. 99 (1) (2010) 336–345.
- [11] M. Blanco, M. Alcalà, J. Pharm. Sci. 95 (10) (2006) 2137–2144.
- [12] J.J. Moes, M.M. Ruijken, E. Gout, Int. J. Pharm. 357 (1–2) (2008) 108–118.
- [13] J.D. Kirsch, J.K. Drennen, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (10) (1995) 1273–1281.
- [14] S.H. Tabasi, R. Fahmy, D. Bensley, C. O'Brien, S.W. Hoag, J. Pharm. Sci. 97 (9) (2008) 4052–4066.
- [15] M. Blanco, A. Peguero, Trends Anal. Chem. 29 (10) (2010) 1127–1136.
- [16] A. Candolfi, R. De Maesschalck, D. Jouan-Rimbaud, P.A. Hailey, D.L. Massart, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1) (1999) 115–132.
- [17] M. Römer, J. Heinämäki, C. Strachan, N. Sandler, J. Yliruusi, AAPS PharmSciTech 9 (4) (2008) 1047–1053.

**Critical evaluation of methods for end-point
determination in pharmaceutical
blending processes**

Analytical Methods

4 (2012) 2694-2703

Critical evaluation of methods for end-point determination in pharmaceutical blending processes

Marcelo Blanco,^{*a} Ruben Cueva-Mestanza^a and Jordi Cruz^b

Received 13th April 2012, Accepted 15th June 2012

DOI: 10.1039/c2ay25379h

This paper compares existing approaches to the monitoring of pharmaceutical blending processes and the detection of their end-point by use of near infrared spectroscopy (NIRS). To this end, we examined homogenization in a pharmaceutical mixture containing a relatively low concentration (<4%) of an API that exhibits low absorption in the NIR region and is difficult to blend with excipients. The end-point of the process (*viz.* where a uniform distribution of the API in the mixture was reached) was determined by using various qualitative and quantitative spectral treatments for comparison. The results revealed the capabilities of different spectral treatments for establishing blend homogeneity, which can be especially useful with a view to optimizing their industrial use. API distribution uniformity in the final blend was confirmed by near infrared chemical imaging (NIR-CI) analysis.

1. Introduction

Solid dosages, which constitute the most frequently prescribed type of pharmaceutical formulation, consist of homogeneous mixtures of ingredients endowing the end-product with the desired characteristics. Blending is a crucial step in the production of solid drugs; also, it is a complex process influenced by a number of variables including the characteristics of the blending vessel, the operating conditions of the blender and the physical properties of the mixture components. Zhou *et al.* (2003)⁵⁰ studied the effects of stirring rate, particle size, fraction volume and particle density on particle segregation in binary mixtures. They found the mixing index to be influenced by particle size and density, and the efficiency of the mixing process to considerably decrease with increasing differences in these two properties. The pharmaceutical industry produces a large number of formulations containing substances in different particle sizes and a small amount of the active pharmaceutical ingredient (API)—which considerably hinders homogenization of the blend.

The influence of the previous factors on mixture homogeneity has turned mixing into a key unit operation in the production of solid dosage forms and also into a critical quality attribute (CQA) affecting product safety and efficiency.⁵¹ In fact, inefficient mixing can lead to an increased variability in the final dosage form and pose a risk on patients' health.

Ensuring dosing uniformity in pharmaceutical formulations requires thorough blending of the mixture of ingredients, which is usually confirmed by analysing samples withdrawn at preset

times during the process. Sampling while blending is a source of problems derived from the risk of segregation or contamination of the mixture.

The content of Active Pharmaceutical Ingredient (API) in a blend is usually determined chromatographically or spectroscopically from a solution of the mixture; these techniques, however, are slow and can delay crucial decisions about a process. Very often, it takes longer to confirm blending uniformity (*i.e.* the end-point of the process) than to blend the mixture. There is thus a need for a fast method allowing blending uniformity to be checked without the need to alter the sample and hence to obtain crucial, timely information to optimize and expedite a pharmaceutical production process. Near infrared spectroscopy (NIRS) is an effective choice for this purpose since it requires no sample treatment and can provide real-time information about processes. Unlike conventional methods of analysis, NIRS is fast, non-invasive and provides useful information about the physical and chemical properties of samples; also, it affords on-line measurements. These features have led a number of researchers to use it to detect the exact point where uniformity is reached in a mixing process. Most often, pharmaceutical mixing processes are monitored by using an NIR instrument to record spectra that are treated with appropriate algorithms to identify the point where the mixture can be deemed homogeneous. Table 1 lists selected methods for this purpose and provides a brief description for each. The qualitative methods are simple to use, whereas the quantitative methods are more complex but provide information about the mixture composition.

Qualitative methods (*e.g.* those based on intensity changes in the NIR band for one component,^{27,42} dissimilarity^{1,5,6,8} or the Euclidean distance between spectra⁶) estimate the difference between two spectra recorded during the process. Worth special

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: marcel.blanco@uab.es; Fax: +34 93 5811367; Tel: +34 93 5811367

^bEscola Universitària Salessiana de Sarrià, Passeig Sant Joan Bosco, 74, 08017 Barcelona, Spain

Table 1 Methods of NIR spectroscopy for the homogeneity of powder blending

	Method	Description and data analysis	References	
Qualitative methods	Variation of absorbance Standard deviation	Variation of absorbance of a peak or average of peaks for a component	29	
		MBSD of spectra ^a	3–5,7,16,18,33–35	
	Dissimilarity	MBSD of PC scores		35
		MBSD of specific NIR peak intensity for component		27,42
		SD of spectra at different time		6,9
		Mean square of differences of spectra ^a		8
	Euclidean distance	Differences spectra against a target ^a		1,5,6
		Euclidean distance between spectra		6
	Chi-square analysis	The pooled variance of the absorbance values at individual wavelengths is calculated as the weighted average of the variances, where the weights are the degrees of freedom. A chi-square statistic is then calculated and compared to a tabulated value for significance at the 5% level. A significant value for the chi-square statistic indicates that the variances are not equal		2
		Plot shows principal components of the blending process		
PCA ^a PC-SDA ^a	Calculation of Euclidean distances between PCA scores in a multidimensional space and determination of MBSD of successive PC scores distances to estimate a time-window during blending		1,2,5–7,15,24	
	Extracts pure variables and concentration profiles based on an algorithm that looks at the purity of variables in the dataset		41	
SIMPLISMA	The BEST develops an estimate of the total sample population using a small set of known samples (the known product is either a pure substance or a mixture of components). The MBEST algorithm provides a test that uses multiple test spectra to detect false samples (as subclusters) well within the three SD limit of a training set. The PC-MBEST used PC of PCA for data compression prior to conduction of modified BEST		1	
BEST MBEST PC-MBEST	Powerful tool for the classification of multivariate datasets. PC models are generated for each class, followed by comparing the characteristics of each class to the training set		2,19,20	
Quantitative methods	SIMCA	Blending monitoring by testing the variation and the level of the API content. The API content is based on the NAS value of NIR spectra	19	
		A machine learning method to determine differences between spectra	22	
	NAS	Calibration algorithms to determine the concentration of components using intensity values at selected wavelengths	33	
		Similar to MLR in which the scores obtained by PCA are used as independent variables to determine the concentration of components	20,34	
	Hidden Markov model MLR	Algorithm for computing the first few components in a PC or PLS analysis to determine the concentration of components	20,34	
		Based on reduction of variables where the matrix spectral decomposition is performed simultaneously with the matrix of the concentration of component to determine	26	
	PCR	Consists of a classical PLS regression where the response variable is a categorical one (replaced by the set of dummy variables describing the categories) expressing the class membership of the statistical units. Such methods require building a calibration set that includes spectra representative of homogeneous blends	9,10,12,14,15,16,20,21,23,24,32,33,34,35,36,37,38,39,40,43,44	
	NIPLS	Analysis of the distribution of components within blend through a NIR image	35	
	PLS ^a			
	PLS-DA			
NIR-CI ^a				

^a Methods or variants of these methods used in this study.

note in this category are the methods based on moving block standard deviation (MBSD), which usually rely on calculating the standard deviation for consecutive blocks of spectra moving over time:^{3–5,7,16,18,33–35} either the average standard deviation of difference of spectra^{6,9} between PC scores³⁵ or a statistic such as chi-square. Although these methods usually provide good results, Wargo and Drennen² found bootstrap techniques to be highly sensitivity relative to chi-square calculations for evaluating mixing homogeneity.

A number of authors have used chemometric methods such as principal component analysis (PCA)^{5–7,15,24,37} in this context (*e.g.* by plotting the score for the first PC against time and assuming homogeneity to be reached when such a score levels off).^{5,37} Other methods plot the first PCs for different spectra recorded during the mixing process,^{5–7,15,24} the end-point of the process being signalled by clustering of the results. Still other methods plot the first two PCs for replicate target blends (*i.e.* mixtures that are assumed to be homogeneous) and mixtures of variable composition; the fact that the target blends cluster separately from all others allows homogeneity to be identified.⁵

Puchert *et al.* (2011) proposed a new approach called “principal component score distance analysis” (PC-SDA).⁴¹ This method establishes a time window where spectral variability in the blend is lower than a preset threshold value and uses reliable statistics to determine the mixing end-point. El-Hagrasy *et al.* (2006)¹⁹ developed two pattern recognition methods based on SIMCA and the Principal Component Modified Bootstrap Error-adjusted Single-sample Technique (PC-MBEST) to predict blend homogeneity under conditions of variable moisture, mixing rate and ingredient concentrations.

Quantitative methods determine the API and/or excipients during a mixing process and analyse their changes over time. To this end, they use a variety of multivariate chemometric algorithms including partial least squares (PLS),^{9,10,12,14–16,21,23,25,31–34,36–40,43,44} principal component regression (PCR),^{20,34,37} multivariate linear regression (MLR),^{20,34,37} NIPALS (which monitors the first factors of PCA or PLS)²⁶ and PLS discriminant analysis (PLS-DA).³⁵ Skibsted *et al.*²² proposed a method to calculate the net analyte signal (NAS) that requires no additional reference analysis, but only the use of a well-mixed batch as a “golden standard”. Zhang *et al.*³³ proposed the so-called “Hidden Markov method” to determine the end-point and concentrations of components during the mixing process. The method proved more reliable, robust and transparent in identifying the blending end-point than did the traditional MBSD method. The availability of such a large number of methods for end-point detection in blending processes makes choosing the most appropriate for each purpose a difficult task.

Recently developed chemical imaging techniques are highly attractive in this context as they provide not only spectral data, but also additional, spatial information within a short analysis time. The analytical potential of near infrared chemical imaging (NIR-CI) has aroused much interest in the pharmaceutical industry, which requires solid, robust methods for deriving quality information about product homogeneity at different stages of production processes.^{7,11,13,17,28,30}

Hammond and Clarke⁵² used NIR-CI to identify mixing problems typically leading to poor powder flow or tablet stickiness and fracture. In 2002, Lyon *et al.*¹¹ compared the ability of

NIR-CI and NIRS to assess the degree of mixing in tablet samples. They found NIRS to have a limited ability to assess drug homogeneity in the end-product and NIR-CI to allow the assessment of small areas of concentrated components in tablets. Also, they found physical and chemical anomalies with little effect in the bulk tablet to go undetected by conventional NIRS but not by NIR-CI. Li *et al.*³⁰ succeeded in detecting API agglomeration during mixing with NIR-CI and Puchert *et al.*⁴¹ used NIR-CI to confirm that the whole mixture was homogeneous (*i.e.* the API and excipients were uniformly distributed throughout) and compared the results obtained in the determination of the mixing end-point with those provided by PC-SDA. The ability to assess the quality of a pharmaceutical end-product and blending homogeneity during its production (*i.e.* to obtain information about the concentration and distribution of its components) is a major advantage of NIR-CI with a view to improving product quality and process productivity.

A wide variety of methods based on the previous principles are currently available for monitoring blending in pharmaceutical mixtures and identifying its end-point under different conditions (segregation, particle size, density, cohesion); however, no critical study has as yet been conducted with a view to evaluating the potential of the techniques used for these purposes. An error in identifying the mixing end-point is known to place the quality of the end-product at risk. This led us to conduct a comparative study of the different qualitative and quantitative techniques available for detecting the end-point in order to assess their usefulness and facilitate selection of the most appropriate choice for each particular purpose. To this end, we studied mixing in a blend the end-point of which may be elusive to NIR spectroscopy. Thus, the mixture contained an API present at a low concentration (less than 4 wt%), not easily blending with the other components and exhibiting a low absorptivity relative to the excipients. The results were expected to provide a more comprehensive picture of the advantages and disadvantages of each technique with a view to facilitating their selection for mixing monitoring by the pharmaceutical industry.

2. Materials and methods

2.1. Hardware and software

The mixing process was conducted in a cylindrical glass vessel 4.55 cm of inner diameter and about 100 mL in volume into which an R1330 Anchor Stirring Stainless Steel paddle (stirrer diameter, shaft diameter and shaft length 45, 8 and 350 mm, respectively) was inserted and connected to a Heidolph RZR 2021 stirrer. The shape and dimensions of the rod ensured the absence of void spaces in the vessel.

Reflectance spectra for the mixture were acquired with a LabSpec® Pro NIR spectrophotometer from ASD, Inc. (Boulder, CO, USA) that was governed *via* the software Indico Pro. v. 5.6. The instrument was equipped with a Model A 122300 fibre-optic probe and used a ceramic plate as a reference. Near infrared spectra were recorded at 1 nm intervals over the wavelength range 1000–2500 nm. Each spectrum was the average of 32 scans. The spectrophotometer was coupled to the blending vessel *via* a fibre-optic probe held in the horizontal position. Fig. 1 depicts the experimental set-up.

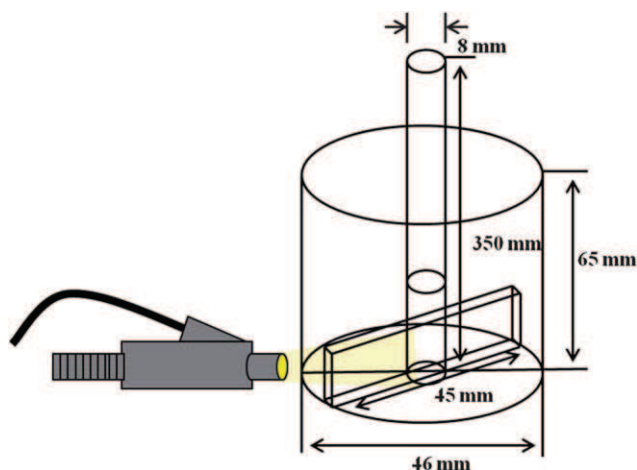


Fig. 1 Assembly used in the monitoring of the blending processes.

Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS) models were constructed with the software Unscrambler v. 9.8 from Camo Process (Trondheim, Norway).

Hyperspectral images were obtained with a RODA-25 focal plane imaging NIR spectrometer (Think Spectrally, Valencia, Spain) equipped with a 320×256 pixel MCT detector. Spectra were recorded at 7 nm intervals over the wavelength range 1200–2400 nm.

Under the operating conditions used, each pixel recorded an area of $100 \times 100 \mu\text{m}$; therefore, the overall image was 32.0×25.6 mm in size. Samples were lit by 4 halogen lamps placed at an angle of 45° around them. Acquiring a reflectance image for the whole wavelength range took about 2 min. The camera was calibrated *via* a graphical user interface (GUI) developed in MATLAB code (MATLAB v 7.0, The MathWorks, Natick, MA, USA).

Images of 6 samples containing a variable proportion of API from 90 to 110%, the nominal value were acquired with the camera's bundled software and processed with the MCR-ALS algorithm in MATLAB, using the MCR-ALS Graphic User-Friendly Interface 1.0.0.⁴⁹

2.2. Blend components and mixtures

The pharmaceutical formulation studied contained a nominal concentration of finasteride (API) of 3.3 wt%; 50 wt% lactose (A) and 27 wt% and Avicel® (B) as major excipients; and sodium dodecyl sulphate (C), sepistab (D) and primojel (E) (less than 25 wt% in combination) as minor excipients. The formulation components were added in different sequences to the blending vessel. Laboratory blends were prepared by mixing the components, also in different sequences, with the stirrer working at 45 rpm.

A total of 12 blending processes were monitored, using an API concentration in the mixtures of 90–110% the nominal content in the formulation. Spectra from 6 final blends and 10 purposely prepared mixtures were used to construct the PLS calibration model, and those for the other 6 to assess spectral treatments and predict the API concentration during the blending process.

2.3. Recording of NIR spectra

The blending process was monitored *via* NIR reflectance spectra recorded at regular intervals without stopping blending and supplemented with others for the individual components. Spectra were recorded with a resolution of 1 nm over the range 1000–2500 nm, using a light source 20 mm in diameter at 2 min intervals for 300 min.

Fig. 2 shows the spectra for the mixture, API and two major excipients. Note the low absorption of the API across the spectrum and the absence of characteristic bands facilitating its monitoring.

Based on the volume irradiated by the beam of an NIR probe, we estimated that each spectrum (the average of 32 scans) collected information from approximately 4% of the total mass of mixture during the mixing process.

Differences in particle size between blend components caused baseline shifts in the spectra. In order to reduce variability associated with physical properties of the blend, the spectra were subjected to various treatments including (a) standard normal variate (SNV), and (b) first and second derivative with the Savitzky–Golay algorithm, using an 11-point moving window and fitting to a second-order polynomial.^{12,18}

2.4. NIR imaging

The recording of NIR images was preceded by calibration of the instrument with six AP-0200-NIR standards of 99, 80, 40, 20, 10 and 0.2% reflectance from FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD, USA). Hyperspectral images were obtained by placing each powder blend in a cylindrical glass cell *ca.* 3.8 cm in diameter, and gently pressing the sample surface with a metal disc to obtain a flat surface and a sample thickness of *ca.* 5 cm in the absence of voids. Six spectra from as many blend samples, and those for the pure components, were recorded at 7 nm intervals over the range 1200–2100 nm. A working area of 150×150 pixels spanning a useful surface area of 15×15 mm was used. Each hyperspectral image was a data cube $X (M \times N \times \lambda)$, where M and N denote spatial dimensions and λ spectral information.

The 3D data structure of the images required unfolding the matrix into a 2D version amenable to spectral treatment or

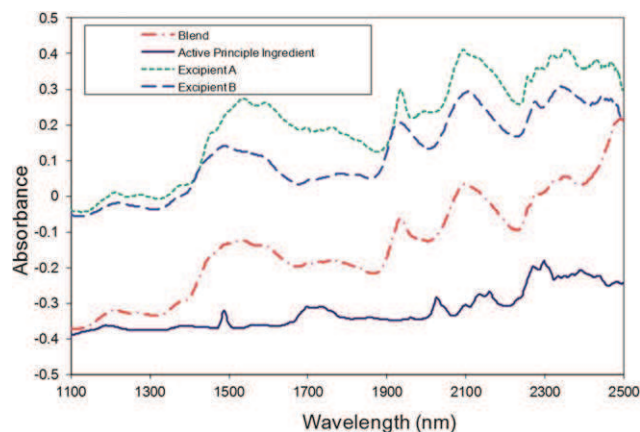


Fig. 2 NIR absorbance spectra for powder blend, API and two major excipients.

application of calibration models. The treatments used included the standard normal variate (SNV) and Savitzky–Golay smoothing with an 11-point window and fitting to a second-order polynomial.

2.5. Application of the MCR-ALS algorithm to images

The Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) algorithm^{45,46} was used to resolve the unfolded matrix X ($MN \times \lambda$) into a product of two, namely: C ($MN \times A$) and S^T ($A \times \lambda$) containing concentration profiles and spectral profiles, respectively, for each component A :

$$X = CS^T + E \quad (1)$$

where E ($MN \times \lambda$) is the experimental error matrix. The ALS optimization process was stopped when the difference in lack of fit (% LOF) between two consecutive iterations fell below a user-defined threshold value, e denoting each mn^{th} element in the residual matrix E and x each mn^{th} element in X . The LOF threshold value should be selected in terms of spectral noise:

$$\% \text{LOF} = 100 \times \frac{\sqrt{\sum_m^M \sum_n^N e_{mnl}^2}}{\sqrt{\sum_m^M \sum_n^N x_{mnl}^2}} \quad (2)$$

where e_{mnl} and x_{mnl} denote each point in the residuals and original 3D matrix, respectively. One widely used criterion here is to stop iterations when the difference between two consecutive LOF values falls below 0.1%.^{47–49}

Other typical restrictions in the MCR processing of hyper-spectral images include

(a) non-negativity in concentration or spectral profiles, which requires all concentration profiles to be positive; and

(b) closure, which requires the mass balance at each pixel to remain constant.

In order to facilitate convergence of the ALS algorithm, the unfolded matrix was augmented with initial estimates consisting of the spectra for the pure components: 50 for the API and another 50 for each major excipient (A and B).^{47,48}

2.6. Methods for evaluating blending uniformity

We chose several straightforward, easily implemented, widely used methods for evaluating blending uniformity among the large number currently available for this purpose. The qualitative methods used were based on SD calculations (with or without a moving window), dissimilarity or PCA; and the quantitative method selected was PLS, which is the commonest choice for NIR multivariate calibration.

2.6.1. Qualitative methods. The first method used was based on the Moving Block Standard Deviation (MBSD)^{3–5} and involved calculating the standard deviation for each wavelength of a block consisting of several consecutive spectra recorded during monitoring of the mixing process and moving one spectrum at a time over the spectral range. We used a mobile block of 5 spectra and then calculated the average at each wavelength (eqn (3)).

Another algorithm used calculates the difference between the moving block average as compared to a spectrum considered to represent homogeneity (the target spectrum) (DMBA-TS);^{1,5,6} to this end, it calculates the difference in the average of a block of 5 consecutive spectra recorded during the monitoring process that is moved one spectrum at a time over the spectral range against a target spectrum (*viz.* the spectrum for a mixture assumed to be homogeneous and containing the nominal concentration of API). Then, the averaged standard deviation of the values obtained at all wavelengths is estimated. The original algorithm was modified slightly to calculate the standard deviation of the difference of a single spectrum from the average of several spectra for a homogeneous mixture containing the nominal concentration of API. This method provides a measure of dissimilarity between an individual spectrum and an average set of scans for a mixture assumed to have reached homogeneity (averaged target spectra) (DIS-ATS).^{1,5,6}

We also estimated the dissimilarity between consecutive spectra (DIS)⁸ by calculating the difference between two consecutive spectra at each wavelength and then the standard deviation of the differences at all wavelengths.

Eqn (4) was used to calculate SD in the previous methods.

$$\text{MBSD} = \frac{\sum_{i=1}^N \text{SD}(X[1, \dots, k]wn)}{N} \quad (3)$$

$$\text{SD}(X[1, \dots, k]wn) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X[i]wn - \overline{Xwn})^2}{k-1}} \quad (4)$$

$$\overline{Xwn} = 1/K \sum_{i=1}^k X[i]wn \quad (5)$$

In these equations, N is the number of scanned wavelengths (data points) in each spectrum, $X[i]wn$ the individual absorbance at each wavelength, \overline{Xwn} the average absorbance, $\text{SD}(X[1, \dots, k]wn)$ the standard deviation and k the number of spectra in the block (*i.e.* block size).

We also used Principal Component Analysis (PCA)^{1,2,5–7,15,24} on the grounds of its facilitating the reduction of variables and hence allowing one to visualize how similar or different spectral groups are in a space of 2 or 3 dimensions. Mixture homogeneity was assessed *via* two- or three-dimensional scattering plots of the PCA scores for consecutive spectra obtained during the mixing process. Spectra distributed according to likeness in the chart, with similar spectra clustering together in a common group.

The Score Distance Analysis method on PC (PC-SDA) combines the previous two methodologies and involves calculating the Euclidean distance between the spectra in the PC space during the time of mixing. Constructing a PCA model from these spectra and implementing Hotelling's T^2 statistic⁴¹ allow one to detect whether it falls within or outside the confidence limit; the time at which the spectral scores fall into the 95% confidence interval signals the blending end-point.

2.6.2. Quantitative methods. One alternative to the above-described qualitative methods involves monitoring the API concentration during blending *via* a PLS model that is applied to spectra recorded during the process. Our model was built for a

range spanning API contents of 90–110% the nominal value, using spectra recorded at mixture homogeneity in 6 process samples and 10 laboratory samples specially prepared to construct the model. The concentration range was relatively narrow but was not expanded since it coincided with that expected for the samples.

Table 2 shows the figures of merit of the model, which was constructed by cross-validation, using first-derivative spectra.

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the laboratory blending system used, which was very simple but suitable for monitoring spectra during a slow mixing process facilitating accurate analysis of the experimental results. Spectra were recorded in a continuous manner without stopping the stirrer.

Prior to processing, spectra were corrected for extraneous effects not due to blending (*e.g.* differences in particle size), using treatments intended to reduce physical variability in the samples. The spectral treatments used included the Standard Normal Variate (SNV) and the first derivative. The former was used to reduce scattering in the qualitative methods and the latter to increase spectral differences in the quantitative method.

The sequence in which mixture components are introduced in a blender is known to strongly affect the blending efficiency. We conducted two blending experiments with powder mixtures the components of which were added in different sequences to the mixing vessel in order to find whether the addition sequence influenced the outcome of the process. The procedures used were as follows: (1) excipients A and B were added to the mixing vessel, stirred and kept for several minutes, and the API and the other minor excipients were then added; (2) a mixture of the minor excipients (C, D and E) and the API was stirred for a few minutes and the major excipients (A and B) were then added. No differences in mixture homogeneity between the two addition sequences were observed; therefore, we chose to use the former procedure in subsequent tests.

3.1. Qualitative methods for determining blending uniformity

Various blending processes were monitored and spectra were recorded during the process with different algorithms. As noted earlier, some authors have used SD as the mixing monitoring parameter, but none has established a threshold allowing the

end-point of the process to be established. In this work, we used the instrumental SD as obtained by applying various computation algorithms to spectra recorded during mixing with a pure substance to facilitate detection of the mixing end-point. This allowed us to discriminate variability in the instrumental measuring system from that in the homogenization process.

Fig. 3 illustrates the application of these methods to the same blending process and the SD *versus* time plots used to determine the blending end-point as well as the differences in the time needed to reach it and those in noise in the measurements. As can be seen, the MBSD and DIS methods exhibited an abrupt fall in SD within minutes of mixing, which indicates that they are scarcely sensitive and hence useless to detect the mixing end-point; this adverse effect was worsened by the low concentration (<4%, w/w) and absorptivity of the API relative to the excipients. The results obtained with DMBA-TS and DIS-ATS were much better. Thus, the plots revealed that the SD values approached in a step-by-step manner the corresponding SD value for a pure sample; also, the results were more consistent. Therefore, these two methods are more effective for the intended purpose than the previous ones.

The DMBA-TS method exhibited uniform changes by the effect of smoothing with a moving window of 5 spectra making it less sensitive to spectral noise. Also, it provided an estimate of the final concentration of the mixture (see Fig. 4, which illustrates the mixing process for three blends containing 95, 100 and 105% of the API nominal concentration). The SD value for a mixture that has reached uniformity at a concentration of 100% the nominal API content was very close to the threshold value, which was determined from a pure sample; therefore, SD was an effective measure of the closeness to the nominal content. This method is very simple and highly sensitive to the API concentration; therefore, it can be used to estimate the closeness of the nominal value. However, it provides no indication as to whether deviations correspond to values above or below the nominal concentration. Both MBSD and DIS can obviously detect false (premature) end-points. According to Zhang *et al.* (2009),³³ MBSD is unsuitable for dealing with gradual changes in concentration and is sensitive to spectral noise. By contrast, DMBA-TS and DIS-ATS are similarly accurate to the quantitative method in identifying the mixing end-point.

The previous algorithms lend themselves readily to application to any type of pharmaceutical blend and require no additional

Table 2 Figures of merit of the PLS model for API determination in the blending process

Parameters	Powder	
	Calibration	Prediction
Samples	Laboratory	Laboratory
Pre-treatment	1 st derivative	
Range (nm)	1100–1731, 1856–2500	
Concentration (% of nominal value)	90–110	90–110
Factors	3	
Explained variance <i>Y</i> (%)	97.6	
Samples	16	60
RSEC/P (%)	1.0	1.0

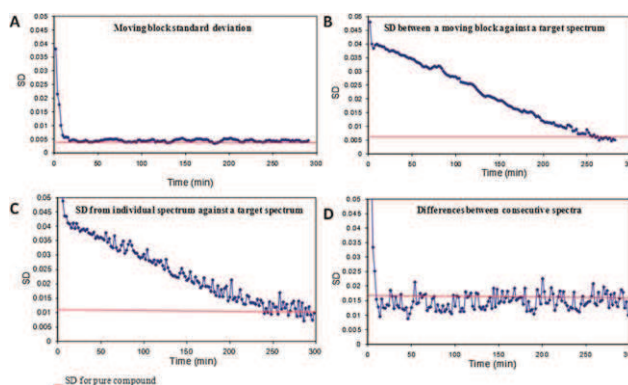


Fig. 3 Blending homogeneity evaluation using four qualitative methods. (A) MBSD, (B) DMBA-TS, (C) DIS-ATS and (D) DIS.

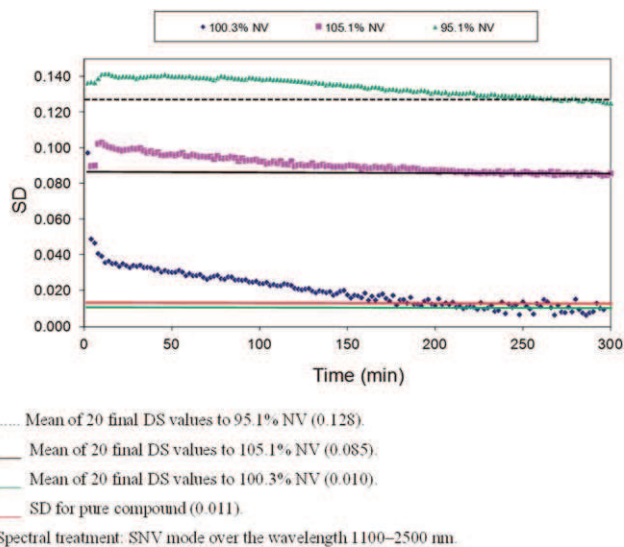
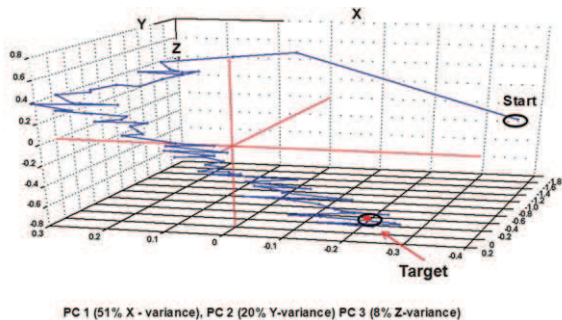


Fig. 4 Application of the method DMBA-TS in blending processes for three different API concentrations.

information to evaluate mixture homogeneity. However, they have the disadvantage that they allow one to determine the time needed to ensure composition homogeneity but provide no information about the components of the mixture or their concentrations. This problem can be lessened by comparing the spectra obtained during the mixing process against a target spectrum (*viz.* the spectrum for a homogeneous mixture with the nominal concentration of each component); the similarity of the mixing spectra to the target spectrum is thus evaluated to assess the closeness of the mixture to the target concentration. Another drawback of these methods is their low sensitivity to slight spectral changes when the mixture approaches homogeneity, which is likely to cause errors in detecting the blending end-point. As can be seen from Fig. 5, dispersion in the PCA scores for the first three components (Fig. 5) varied gradually over time, but too slowly to enable identification of the end-point of the process, which made it a scarcely sensitive method for our mixture. Although this is a fast method affording retrospective analysis of the results, it requires the storage of all spectra recorded during the process, which makes it unsuitable for on-line use.

An improved version of this method, PC-SDA, has a major advantage over other methods; thus, it determines the mixing

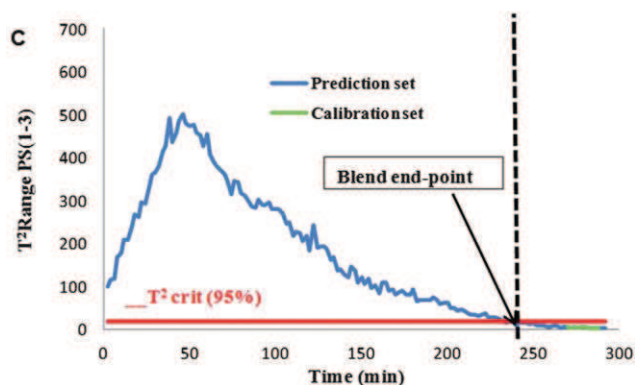
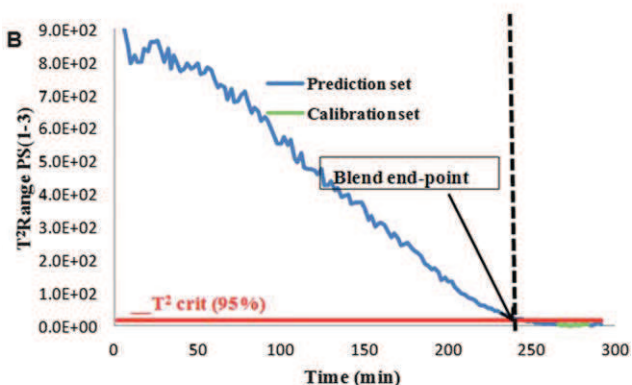
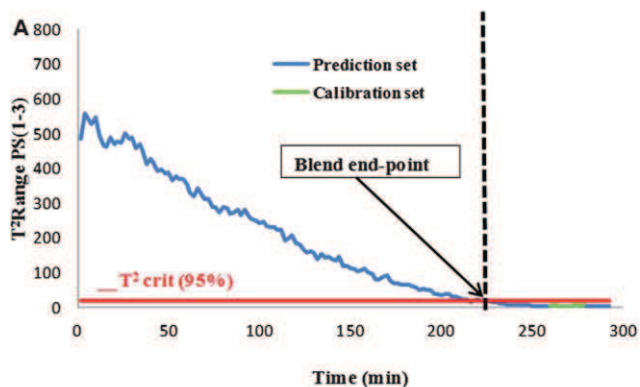


Sample to 100.3% NV with spectral treatment SNV mode over the wavelength 1100–2500 nm.

Fig. 5 Evolution of the scores from a PCA for a blending process.

end-point statistically and hence more accurately; like PCA, however, it is a retrospective method.

Fig. 6 shows the predicted Hotelling's T^2 values for three homogenization processes as a function of time. A threshold value for an acceptable standard deviation of distances between PC scores (*viz.* the standard deviation for the time at which scores fell into the 95% confidence interval) was used to identify the mixing end-point. Such a value was similar to that obtained with the quantitative method as applied to the same samples, which testifies its ability to accurately determine the end-point of a mixing process.



Spectral treatment SNV mode over the wavelength 1100–2500 nm.

Fig. 6 Application of PC-SDA: predicted Hotelling's T^2 plot for the determination of end-point blending (dashed line) and the proposed design space (T^2 Crit. 95%, solid line, green) in three blends. (A) sample to 100.3% NV, (B) sample to 105.4% NV and (C) sample to 95.8% NV of API.

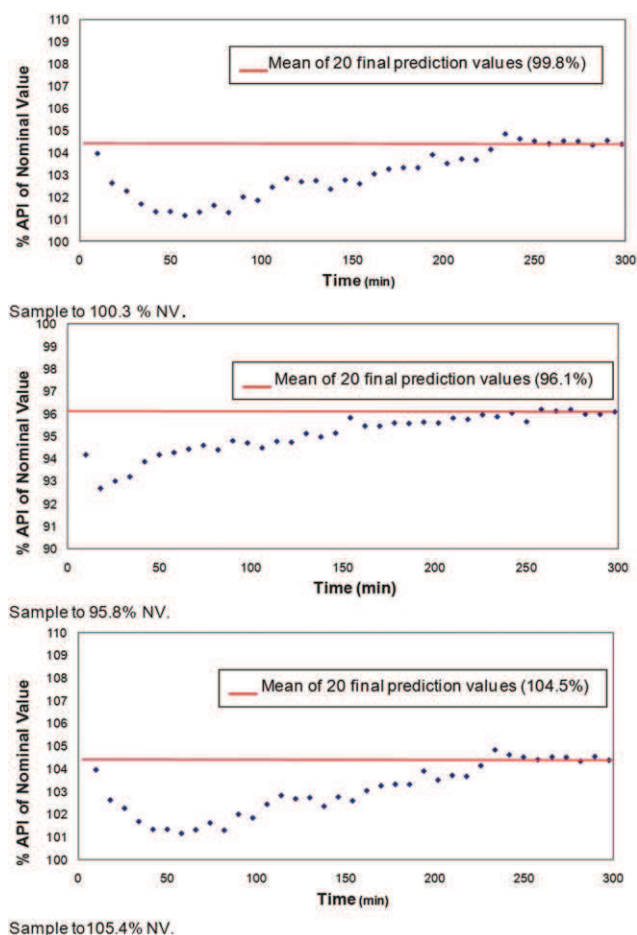


Fig. 7 API determination across the blending process by applying the PLS model.

Despite their good results, some of the qualitative methods used here only allowed us to determine the time needed for a mixture to reach homogeneity in its composition; therefore, a quantitative method will be required if some error is made in adding any of the mixture components.

3.2. Quantitative method for determining blending uniformity

The quantitative method developed in this work not only allowed us to confirm the results of the qualitative methods, but also provided API concentration values at each point in the process, which facilitated detection of the mixing end-point—this was

assumed to be reached when the API values levelled off. PLS is no doubt the most widely used calibration method. Our PLS model was constructed from spectra recorded at the end of the mixing process of six blends and ten additional spectra from specially prepared mixtures spanning an API concentration range of 90–110% the nominal content. The model encompassed the wavelength ranges 1100–1731 and 1856–2500 nm and used first-derivative spectra and 3 latent variables (LVs).

Table 2 shows the figures of merit of the PLS model and Fig. 7 shows the predicted concentrations provided during mixing of three different blends. The point where the API concentration became constant in each process was considered to be its end-point.

All mixing processes exhibited an identical evolution irrespective of the API concentration.

The quantitative method is complicated by the need to construct a calibration model to predict the API concentration but provides sufficient information to accurately detect the end-point of the process and the associated API content in the homogeneous mixture.

In summary we can say PLS is the best method, with conventional spectra, but is also the most laborious and complicated and requires highly skilled staff for their preparation, but not for its execution. Qualitative methods are very simple, easy to apply (do not require qualified staff) and with sufficient quality (for methods recommended in this study) results for its implementation on-line.

3.3. Determination of blending uniformity by NIR imaging

The NIR-CI technique was used to record images for 6 samples containing a variable proportion of API from 90 to 110% the nominal value, as well as for the pure API, the individual excipients and their mixture (placebo). All samples were obtained at the end of the blending process, once the blend was assumed to be homogeneous.

Quantitative information was derived by using the MCR-ALS algorithm under the concentration non-negativity and closure restrictions.^{45–48,50} The spectra for the API and two major excipients (A and B) were used to augment the matrix in order to facilitate application of the ALS algorithm.

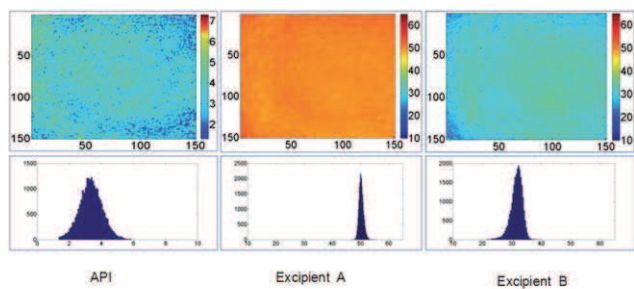
The best results were obtained by using the spectra for the API and placebo as starting information and augmenting the unfolded matrix with a further 50 spectra for the API in order to facilitate convergence.

Table 3 shows the average predictions obtained from each of the six images for powder blends of variable concentration; as

Table 3 Prediction values for final spectra belonging to 6 mixtures using NIR-CI and PLS models

Blend	Concentration (% NV)	Chemical imaging concentration (% NV)	Difference	Conventional PLS model concentration (% NV) ^a	Difference
m7	100.3	103.6	3.3	99.8	−0.5
m8	90.7	92.5	1.8	88.9	−1.8
m9	98.3	97.9	−0.4	100.2	1.9
m10	107.3	107.5	0.2	106.8	−0.5
m11	95.8	97.0	1.2	96.1	0.3
m12	105.4	103.9	−1.5	104.5	−0.9

^a Mean of 20 final prediction values.



Spectral treatment SNV and Savitzky–Golay smoothing with a 7-point over the wavelength 1200–2100 nm. Sample to 100.3 % NV of API.

Fig. 8 Concentration maps and histograms for the API and two major excipients (A and B) as obtained with the MCR-ALS augmented matrix.

can be seen, all were consistent with the weight-based calculated values.

These results are of a high quality, especially if one considers the low API content of the powder blend and the use of chemical images, which are noisier than conventional NIR spectra and more difficult to process than those obtained at low concentrations.

The API concentration maps and histograms were both consistent with a uniform distribution of the API on the blend surface. By way of example, Fig. 8 illustrates the distribution of the API and two major excipients in one of the powder samples; the graph confirms the narrow distribution of the API content (colour uniformity in the map distribution) and the similarity between the histograms of the concentration maps (narrow curve for the value *versus* concentration frequency distribution). The increased width of the curve for the API can be ascribed to the concentration scale used and that of the histogram for excipient B to an increased difficulty to homogenize it.

The NIR-CI technique provides not only chemical information about the API and excipients, but also spatial information about their distribution. This enables the evaluation of the degree of mixing of pharmaceutical formulations,¹¹ which is crucial and highly useful as a supplement to conventional information. Chemical imaging allowed us to confirm the accuracy of the conventional NIR results.⁴¹

4. Conclusions

The qualitative methods used here, based on the standard deviation (SD) between spectra, are straightforward and easy to implement; also, they require no additional information to detect the end-point of a mixing process. However, they have the disadvantage that they allow one to determine the time needed for a mixture to reach homogeneity but not the mixture composition at that point. This shortcoming can be lessened by comparing spectra recorded during mixing with a target spectrum (DMBA-TS) in order to assess the closeness of the mixture concerned to the API nominal concentration. The MBSD and DIS methods used are poorly sensitive and can provide an inaccurate indication of the mixing end-point. Subjecting spectra recorded during the mixing process to PCA had previously provided good results; this approach, however, proved poorly sensitive towards detecting the mixing end-point here. The PC-SDA method substantially improved on the PCA results and

enabled accurate detection of the end-point. Also, a model constructed from data for a given process can be used for accurate end-point detection in other homogenization processes.

The quantitative method uses a PLS model to determine the API from the body of spectra recorded during the mixing process and provides an accurate indication not only of the closeness to the end-point, but also of the API concentration in the final, homogeneous mixture. This is probably the most suitable method for the intended purpose, but is much more labour-intensive than the qualitative methods.

Finally, the NIR-CI method is highly suitable for identifying the end-point of mixing as it provides highly accurate spatial and spectral information about the process. Also, it requires using no model, but only the spectra for the different components, to determine the API and excipients.

This study can be a major breakthrough for the pharmaceutical industry since it provides the means to select the most suitable method for determining the end-point of blending processes; in fact, not all available methods are equally sensitive or easy to implement. This paper is intended to help compare the ability of available methodologies for monitoring powder blending, which can be very useful with a view to facilitating decisions about their adoption by the pharmaceutical industry.

Abbreviations

API	Active pharmaceutical ingredient;
BEST	Bootstrap error-adjusted single-sample technique;
MBSD	Moving block standard deviation;
MBEST	Modified bootstrap error-adjusted single-sample technique;
MLR	Multiple linear regression;
NAS	Net analyte signal;
NIPLS	PLS + root mean square from nominal value;
NIR-CI	Near infrared chemical imaging;
PC	Principal component;
PCA	Principal component analysis;
PLS	Partial least square;
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis;
PC-MBEST	Principal component modified bootstrap error-adjusted single-sample technique;
PCR	Principal component regression;
PC-SDA	PC score distance analysis;
SD	Standard deviation;
SIMPLISMA	Simple interactive self-modeling mixture analysis;
SIMCA	Soft independent modeling of class analogies.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research in the framework of Project CTQ2009-08312. Also, they wish to thank KernPharma (Terrassa, Spain) for kindly supplying the samples. Ruben Cueva acknowledges additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

Notes and references

- 1 F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D. L. Massart, S. S. Dive and P. Hailey, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1995, **352**, 771–778.
- 2 D. J. Wargo and J. K. Drennen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 1415–1423.
- 3 P. A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver and P. K. Aldridge, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 551–559.
- 4 S. S. Sekulic, H. W. Ward, D. R. Brannegan, E. D. Stanley, C. L. Evans, S. T. Sciacolino, P. A. Hailey and P. K. Aldridge, *Anal. Chem.*, 1996, **68**(3), 509–513.
- 5 S. S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty and P. A. Hailey, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 1285–1309.
- 6 R. De Maesschalck, F. Cuesta Sánchez, D. L. Massart, P. Doherty and P. Hailey, *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**(5), 725–731.
- 7 A. S. El-Hagrasy, H. R. Morris, F. D'Amico, R. A. Lodder and J. K. Drennen, *J. Pharm. Sci.*, 2001, **90**(9), 1298–1307.
- 8 M. Blanco, R. Gozález Bañó and E. Bertran, *Talanta*, 2002, **56**, 203–212.
- 9 M. Popo, S. Romero-Torres, C. Conde and R. J. Romañach, *AAPS PharmSciTech*, 2002, **3**, 1–11.
- 10 O. Berntsson, L.-G. Danielsson, B. Lagerholm and S. Folestad, *Powder Technol.*, 2002, **123**(2–3), 185–193.
- 11 R. C. Lyon, D. S. Lester, E. N. Lewis, E. Lee, L. X. Yu, E. H. Jefferson and A. S. Hussain, *AAPS PharmSciTech*, 2002, **3**, 1–17.
- 12 N. H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans and S. Reynolds, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2003, **29**(6), 679–687.
- 13 E. N. Lewis, L. H. Kidder and E. Lee, *Innovations Pharm. Technol.*, 2006, **17**, 107–111.
- 14 W. Li and G. D. Worosila, *Int. J. Pharm.*, 2005, **295**, 213–219.
- 15 L. Nørgaard, M. T. Hahn, L. B. Knudsen, I. A. Farhat and S. B. Engelsens, *Int. Dairy J.*, 2005, **15**, 1261–1270.
- 16 D. Ely, S. Chamartny and M. T. Carvajal, *Colloids Surf., A*, 2006, **288**, 71–76.
- 17 O. Svensson, K. Abrahamsson, J. Englbretsson, M. Nicholas, H. Wikstrom and M. Josefson, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2006, **84**, 3–8.
- 18 A. S. El-Hagrasy, F. D'Amico and J. K. Drennen, *J. Pharm. Sci.*, 2006, **95**(2), 392–406.
- 19 A. S. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez and J. K. Drennen, *J. Pharm. Sci.*, 2006, **95**, 407–421.
- 20 A. S. El-Hagrasy and J. K. Drennen, *J. Pharm. Sci.*, 2006, **95**, 422–434.
- 21 A. S. El-Hagrasy, S. Y. Chang and S. Kiang, *Pharm. Dev. Technol.*, 2006, **11**, 303–312.
- 22 E. T. S. Skibsted, H. F. M. Boelens, J. A. Westerhuis, D. T. Witte and A. K. Smilde, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **41**, 26–35.
- 23 W. Li, M. C. Johnson, R. Bruce, H. Rasmussen and G. D. Worosila, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **43**, 711–717.
- 24 S. Virtanen, O. Antikainen and J. Yliruusi, *Int. J. Pharm.*, 2007, **345**, 108–115.
- 25 F. J. Muzzio, M. Llusa, C. L. Goodridge, N. H. Duong and E. Shen, *Powder Technol.*, 2008, **186**, 247–254.
- 26 Z. Shi, R. P. Cogdill, S. M. Short and C. A. Anderson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **47**, 738–745.
- 27 J. J. Moes, M. M. Ruijken, E. Gout, H. W. Frijlink and M. I. Ugwoke, *Int. J. Pharm.*, 2008, **357**, 108–111.
- 28 H. Ma and C. A. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 3305–3320.
- 29 L. J. Bellamy, A. Nordon and D. Littlejohn, *Analyst*, 2008, **133**, 58–64.
- 30 W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool and R. Bruce, *Int. J. Pharm.*, 2008, **350**, 369–373.
- 31 A. Mehrotra and F. J. Muzzio, *Powder Technol.*, 2009, **196**, 1–7.
- 32 Y. Sulub, B. Wabuye, P. Gargiulo, J. Pazdan, J. Cheney, J. Berry, A. Gupta, R. Shah, H. Wu and M. Khan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 48–54.
- 33 H. Zhang, Z. Jiang, J. Y. Pi, H. K. Xu and R. Du, *J. Pharm. Sci.*, 2009, **98**, 1487–1498.
- 34 H. Wu, M. Tawakkul, M. White and M. A. Khan, *Int. J. Pharm.*, 2009, **372**, 39–48.
- 35 I. Storme-Paris, I. Clarot, S. Esposito, J. C. Chaumeil, A. Nicolas, F. Brion, A. Rieutord and P. Chaminade, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **72**, 189–198.
- 36 M. Cruz Sarraguça and J. Almeida Lopes, *Vib. Spectrosc.*, 2009, **49**, 204–210.
- 37 J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh and A. Nagi, *Int. J. Pharm.*, 2009, **382**, 23–32.
- 38 C. V. Liew, A. D. Karande and P. W. S. Heng, *Int. J. Pharm.*, 2010, **386**, 138–148.
- 39 A. U. Vanarase, M. Alcala, J. I. Jerez Roza, F. J. Muzzio and R. J. Romanach, *Chem. Eng. Sci.*, 2010, **65**, 5728–5733.
- 40 A. D. Karanda, C. V. Liew and P. W. Heng, *Int. J. Pharm.*, 2010, **395**, 91–97.
- 41 T. Puchert, C.-V. Holzhauer, J. C. Menezes, D. Lochmann and K. Ghosh, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2011, **78**, 173–182.
- 42 W. Momose, K. Imai, S. Yokota, E. Yonemochi and K. Terada, *Powder Technol.*, 2011, **210**, 122–131.
- 43 Y. Sulub, M. Konigsberger and J. Cheney, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **55**, 429–434.
- 44 D. M. Koller, A. Posch, G. Hörl, C. Voura, S. Radl, N. Urbanetz, S. D. Fraser, W. Tritthart, F. Reiter, M. Schlingmann and J. G. Khinast, *Powder Technol.*, 2011, **205**, 87–96.
- 45 A. De Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault and M. Maeder, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 70–79.
- 46 A. De Juan and R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 163–176.
- 47 J. Cruz, M. Bautista, J. M. Amigo and M. Blanco, *Talanta*, 2009, **80**, 473–478.
- 48 J. M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. MasPOCH, J. Coello and M. Blanco, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 696–713.
- 49 J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan and R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2005, **76**, 101–110.
- 50 Y. C. Zhou, A. B. Yu and J. Bridgwater, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2003, **78**, 187–193.
- 51 S. Adam, D. Suzzi, C. Radeke and J. G. Khinast, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2011, **42**, 106–115.
- 52 F. Clarke, *NIR Microscopy: Utilization from Research through to Full-scale Manufacturing*, Presentation No. 6 at the European Conference on Near infrared Spectroscopy, Heidelberg, Germany, 2003.