

5. Influencia del método utilizado para preparar las muestras del conjunto de calibración en un método en el infrarrojo próximo^a

^a Trabajo publicado bajo el título "Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses" en *The Analyst*, **126**, 1129-1134, 2001.

5.1. INTRODUCCIÓN

La utilización de la técnica NIR con fines cuantitativos implica llevar a cabo una calibración previa que, dada la complejidad de la señal, debe realizarse utilizando técnicas de calibración multivariable¹. Uno de los aspectos más delicados del proceso de calibración es el diseño y preparación de un conjunto de muestras adecuado. En general, todas las muestras de producción presentan un contenido de principio activo o de excipientes muy próximo al valor nominal, lo que imposibilita disponer de un conjunto de muestras que cubra un intervalo de concentración lo suficientemente amplio para desarrollar la calibración. Para extender el margen de concentraciones se pueden utilizar diferentes estrategias:

- Preparar muestras en una planta piloto²⁻¹⁰.
- Preparar en el laboratorio muestras sintéticas, por pesada de los distintos componentes puros del fármaco en el intervalo de concentración definido por el fabricante¹¹⁻²¹.
- Infra- y sobre- dosificar muestras de distintos lotes de producción con pequeñas cantidades de excipientes o de principio activo hasta conseguir el intervalo de concentración adecuado²²⁻²⁸.

Obviamente, el modo en que se registre el espectro NIR depende de la naturaleza de las muestras. Así, recientemente han empezado a aparecer aplicaciones en que los comprimidos se analizan directamente por transmitancia^{6-8,10}. En este caso, la calibración sólo puede hacerse a partir de comprimidos preparados en planta piloto. Con todo, la aplicación más frecuente es que se registren los espectros de reflectancia de muestras previamente pulverizadas. En este caso es factible cualquiera de las alternativas descritas anteriormente.

La preparación de las muestras en una planta piloto permite que éstas sean más parecidas a las de producción, pero es una de las menos utilizadas puesto que en muchas ocasiones no existe la posibilidad de fabricar lotes de producción a medida de las necesidades, a la vez que supone un elevado coste para obtener un conjunto muy limitado de muestras.

Las muestras sintéticas presentan como principal ventaja la facilidad con la que es posible conseguir las distintas concentraciones de analito, pero tiene como inconveniente que el proceso de laboratorio es muy diferente al utilizado en producción, por lo que las

características físicas de las muestras preparadas serán diferentes de las de producción. Estas muestras permiten cubrir un intervalo de concentración adecuado. Sin embargo, no constituyen un buen conjunto de calibración, ya que no son representativas de las fuentes de variación propias de la fabricación. La manera de solventar este problema es preparar un calibrado mixto, compuesto por muestras sintéticas y muestras de diferentes lotes de producción¹⁵.

El procedimiento de infra- y sobre- dosificar muestras de producción convierte el proceso de extensión del intervalo de concentración en una tarea más laboriosa y delicada, pero presenta la ventaja que la variabilidad aportada por las características físicas de las muestras puede ser menor que en el caso anterior. Análogamente al caso anterior, la capacidad predictiva mejora si se incorporan muestras de producción a la matriz de calibración²⁴.

Como ya se ha comentado anteriormente, una vez establecido un nuevo protocolo de análisis es necesario que sea validado para que sea aceptado y se pueda utilizar en análisis de rutina garantizando la calidad de los resultados. La falta de normativas oficiales válidas para este tipo de métodos obliga a que los laboratorios farmacéuticos adapten las normativas generales a las necesidades particulares. Así pues, diferentes autores han propuesto distintos enfoques para validaciones de métodos NIR^{4,14,26,29,30}.

En este capítulo se compara el uso de muestras sintéticas con el de dopadas en la matriz de calibración para la cuantificación de un principio activo minoritario. Se discute cómo el método de calibración afecta a la validación del procedimiento.

5.1.1. Aplicación de la espectroscopia NIR al análisis farmacéutico: antecedentes

En la tabla 5.1 se recogen, ordenadas por año de publicación, las aplicaciones de la espectroscopia NIR al análisis cuantitativo de principios activos y/o excipientes en preparados farmacéuticos encontradas en la bibliografía hasta el momento de publicación del artículo, en el año 2001. Se puede observar la evolución de dicha técnica a lo largo del tiempo, tanto por lo que respecta al tipo de muestra analizada como al método de calibración utilizado. Así, en las primeras citas las sustancias analizadas son líquidos, geles o granulados, fácilmente analizables con los módulos disponibles hasta ese momento, utilizando muestras sintéticas para llevar a cabo el proceso de calibración. En el año 1990

empiezan a analizarse los comprimidos, los cuales son molturados para poder ser analizados por reflectancia. Desde este momento coexisten las tres metodologías mencionadas para preparar la muestras de calibración. A partir del año 1993 los comprimidos se analizan tanto en su forma intacta como en su forma molturada, apareciendo incluso en la bibliografía artículos donde se comparan los dos tipos de análisis, comprimido molturado y comprimido intacto, discutiéndose también qué modo de medida (reflectancia o transmitancia) es el más factible para llevar a cabo el análisis de la muestra⁶⁻⁸.

En lo que concierne al método de calibración utilizado, se puede observar que el PLSR se empieza a utilizar a partir del año 1993. Calibrar mediante MLR tiene la ventaja de la sencillez matemática de la técnica, a pesar que la selección del conjunto de longitudes de onda a utilizar puede resultar problemática y laboriosa. El método PLSR es más complejo matemáticamente, pero representa una alternativa de calibración más potente que permite la resolución de muestras más complejas.

Por lo que respecta al pretratamiento espectral utilizado, la derivación es uno de los más usados, dado que proporciona resultados aceptables que son comparables a otros pretratamientos más complejos^{9,20}.

Tabla 5.1. Aplicaciones de la espectroscopía NIR a la determinación de principios activos y/o excipientes.

Referencia	Muestra	Analito	Modo medida	Tipo muestra	Método	Tipo
				calibración	Calibración	Pretratamiento
13 (1987)	Líquido	Fenazona 4g Lidocaína 1g Etanol 24g Glicerol 70.9g Tiosulfato sódico 0.1g	Transflectancia	Sintéticas	MLR	Absorbancia
12 (1987)	Polvo	SC-25469	Reflectancia	Sintéticas	MLR	Absorbancia
11 (1989)	Gel Granulado	Ketoprofeno 2.5, 33%	Reflectancia	Sintéticas	MLR	-
25 (1990)	Comprimido molturado	Clorhidrato de ranitidina 53.5%	Reflectancia	Dopadas + producción	MLR	-
24 (1991)	Polvo	Cefalexina ácida Cefuroxima sódica	Reflectancia	Dopadas + producción	MLR	-
27 (1993)	Granulado Comprimido molturado	Ácido ascórbico 16.7, 22.9, 40%	Reflectancia	Dopadas + producción	PLSR SMLR	1 Derivada
5 (1993)	Comprimido	-	Reflectancia	Planta piloto + producción	PLSR	-
28 (1994)	Preparación	Dimaleato de pirisudanol	Reflectancia	Dopadas + producción	PLSR	1 Derivada
23 (1995)	Granulado Comprimido molturado	Axetilo de cefuroxima 66.8%	Reflectancia	Dopadas + producción	MLR PLSR	Absorbancia Derivadas
2 (1995)	Comprimido	-	Reflectancia	Planta piloto	MLR	2 Derivada
3 (1995)	Comprimido	Aciclovir	Reflectancia	Planta piloto + producción	PCR, MLR, PLSR	2 Derivada

Tabla 5.1.(continuación) Aplicaciones de la espectroscopía NIR a la determinación de principios activos y/o excipientes.

Referencia	Muestra	Analito	Modo medida	Tipo muestra calibración	Método Calibración	Tipo Pretratamiento
22 (1996)	Granulado Comprimido molturado	Hidrocloruro de ranitidina 55.8%	Reflectancia	Dopadas + producción	MLR	Absorbancia
8 (1996)	Comprimido	Succinato de metoprolol 47.5mg/tableta	Reflectancia / transmitancia	Planta piloto	PLSR	MSC 2 Derivada
17 (1996)	Comprimido molturado	Bromuro otilonio 408mg/g Celulosa microcristalina 344mg/g Almidón maíz 111mg/g Carboximetilalmidón 101mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	1 Derivada 2 Derivada
18 (1997)	Comprimido molturado	Gemfibrocilo 600-627mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR PCR	Absobancia 1 Derivada 2 Derivada SNV
20 (1997)	Preparación	Gemfibrocilo 587-650mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	2 Derivada
21 (1997)	Comprimido molturado	Miocamicina 640mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción Dopadas + producción	PLSR	1 Derivada
6 (1998)	Comprimido Comprimido molturado	Ácido acetilsalicílico 14.9, 17.4, 8.7%	Reflectancia / transmitancia	Planta piloto	PLSR	2 Derivada
9 (1998)	Comprimido	Paracetamol 84.175%	Reflectancia	Planta piloto + producción	PLSR	1 Derivada

Tabla 5.1.(continuación) Aplicaciones de la espectroscopía NIR a la determinación de principios activos y/o excipientes.

Referencia	Muestra	Analito	Modo medida	Tipo muestra	Método	Tipo
				calibración	Calibración	Pretratamiento
19 (1998)	Granulado Comprimido molturado Comprimido	Gemfibrocilo 810mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	2 Derivada
4(1999)	Comprimido	Paracetamol 84.175% m/m	Reflectancia	Planta piloto + producción	MLR	SNV + 2 derivada
10 (1999)	Comprimido	Paracetamol 84% m/m	Transmitancia	Planta piloto + producción	PLSR	1 Derivada
7 (1999)	Comprimido molturado Comprimido	Diphenhydramine 16% m/m	Reflectancia / transmitancia	Planta piloto + producción	PLSR	Absobancia
26 (1999)	Granulado Comprimido molturado	Miocamicina 200,555,645mg/g	Reflectancia	Dopadas + producción	PLSR	1 Derivada 2 Derivada
14 (1999)	Granulado	Lactato ferroso dihidratado 770mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	1 Derivada
15 (1999)	Granulado Comprimido	Gemfibrocilo 755mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	1 Derivada
16 (2000)	Comprimido Comprimido laqueado	Gemfibrocilo 751, 810 mg/g	Reflectancia	Sintéticas + producción	PLSR	2 Derivada

MLR: regresión lineal múltiple; PLSR: regresión parcial por mínimos cuadrados, SMLR: regresión lineal múltiple paso a paso; PCR: regresión en componentes principales; MSC: corrección del efecto multiplicativo de la dispersión; SNV: variable normal estándar.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Instrumentación y software

El registro de los espectros se ha llevado a cabo con el espectrofotómetro NIRSystem 6500 equipado con el módulo de fibra óptica, el cual está controlado por el software Vision versión 2.22. El software NSAS, versión 3.52, se empleó para calcular la segunda derivada de los espectros NIR.

El registro de los espectros UV-Visible utilizados en el método de referencia se ha efectuado con el espectrofotómetro Diode-Array Hewlett Packard HP8452A.

Para molar la muestra de producción se ha usado un molinillo de cuchillas Turmix Mill y para homogeneizar las muestras sólidas preparadas en el laboratorio se ha empleado un agitador TURBULA tipo T2C de WAB.

La regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) se ha llevado a cabo con el programa UNSCRAMBLER versión 7.5.

El pretratamiento de la corrección ortogonal de la señal (OSC)³¹ de los espectros se ha realizado en MATLAB versión 5.3. Las rutinas OSC utilizadas fueron desarrolladas en nuestro grupo de investigación.

5.2.2. Descripción de las muestras de producción

El preparado farmacéutico estudiado se presenta en forma de comprimido laqueado, con un contenido de principio activo de 96mg/g. Además el preparado también contiene un excipiente mayoritario, con un valor nominal de 530mg/g, y otros excipientes minoritarios.

Se disponía de 30 muestras del preparado pertenecientes a 30 lotes de producción.

Como solamente el principio activo absorbe en la región UV-Visible, se utilizó el método UV-Visible descrito en la Farmacopea Británica³² como método de referencia para su determinación en las muestras de producción.

5.2.3. Preparación de las muestras de laboratorio

El intervalo de concentración de las muestras de producción se extendió siguiendo dos estrategias. Por un lado, se prepararon por pesada 28 muestras sintéticas que contenían cantidades variables tanto del principio activo como de los tres excipientes del preparado. Para reducir al máximo la posible correlación entre analito y excipientes, 20 de estas muestras se prepararon de forma que se fijaron 5 niveles de concentración de principio activo (nominal, $\pm 12\%$, $\pm 25\%$) y, a cada nivel de concentración, 4 niveles distintos de concentración de excipientes, siguiendo un diseño factorial fraccionado(2^{3-1}). Las 8 muestras restantes se prepararon de manera que presentaran concentraciones intermedias tanto de analito como de excipientes. Por otro lado, se prepararon 13 muestras dopadas adicionando a una cantidad conocida de muestra de producción, previamente molidurada, cantidades variables o de principio activo o de excipientes. Para reducir la correlación entre el contenido de principio activo y excipiente, las muestras infradosificadas se prepararon mediante adición aleatoria de diferentes mezclas de excipientes. El margen de concentración del principio activo fue también de un $\pm 25\%$ respecto al valor nominal.

Todas las muestras preparadas en el laboratorio se homogeneizaron en la turbula, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo tres, punto 3.2.3.

5.2.4. Registro de los espectros NIR

Todas las muestras de producción se molieron antes de registrar el espectro NIR, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo anterior, punto 4.2.4.

Cada muestra se registraba por triplicado en el intervalo espectral 1100-2498nm, utilizando un promedio de 32 scans para cada espectro, siguiendo el mismo protocolo. Para cálculos posteriores se usaba el espectro promedio de los tres replicados.

En la figura 5.1 se muestra el espectro promedio de absorbancia de una muestra de producción molida, del principio activo y del excipiente mayoritario.

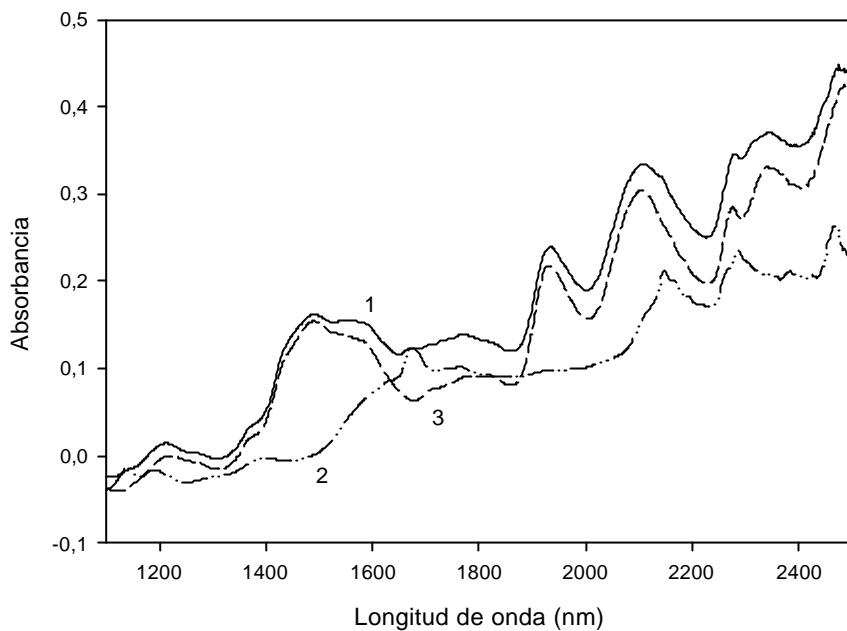


Figura 5.1. Espectros NIR de absorbancia de (1) muestra de producción, (2) principio activo y (3) excipiente mayoritario.

5.2.5. Procesado de los datos

Todos los modelos de calibración se obtuvieron utilizando el algoritmo PLS¹ y se construyeron por cross-validation, usando tantos segmentos como muestras contenía el conjunto de calibración. El número de componentes principales se determinó como el mínimo por el que el sumatorio del cuadrado de los residuales (PRESS) no difería significativamente del valor mínimo del PRESS³³.

Se ensayaron distintos pretratamientos espectrales. La segunda derivada se calculó usando el software NSAS con un segmento de 20. La variable normal estándar (SNV) se determinó en una hoja de cálculo y se transfirió al programa Unscrambler para los cálculos posteriores.

El pretratamiento OSC puede conducir fácilmente a una solución de sobreajuste, por lo que es importante controlar el número de variables latentes internas y el número de factores OSC. En nuestro caso se utilizó un factor OSC y 2 variables latentes internas.

Para mostrar la calidad de los resultados se utilizó el error estándar relativo de predicción RSEP (%)³⁴.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Desarrollo del método de cuantificación

En un sistema mixto de calibración un punto previo importante es el número de muestras a utilizar. Por un lado, las muestras de producción tienen que asegurar que se cubre el máximo de la variabilidad normal del proceso de fabricación y, por otro, las muestras preparadas en el laboratorio han de extender el intervalo de concentración y asegurar la variabilidad en la concentración del analito. La selección de las muestras de producción puede hacerse a partir de un análisis en componentes principales (PCA), escogiendo las muestras que presentan la máxima variabilidad en la gráfica del primer score frente al segundo¹⁴. En cuanto al intervalo de concentración de las muestras de laboratorio existen diferentes opiniones, pero se considera aceptable cubrir un intervalo de un \approx 20-25% del valor nominal.

El número total de muestras del conjunto de calibración es variable. Los requerimientos analíticos indican que ha de ser un número suficiente para representar la variabilidad total prevista, proveniente tanto del proceso de producción como de la concentración del analito; por otro lado, los requerimientos de estabilidad del modelo indican que ha de haber un número mínimo de muestras por componente significativo. Aunque, obviamente, el número es función del problema estudiado, se ha sugerido un mínimo de tres muestras por componente³⁵, si bien se recomienda una relación de 5³⁵ o 6³⁶.

En análisis farmacéutico, las muestras de calibración han de prepararse especialmente, lo que implica un cierto coste y, consecuentemente, es conveniente utilizar un número pequeño. Con la idea de estimar el número mínimo de muestras de calibración necesarias, una vez seleccionado el conjunto de muestras de producción se estudió la capacidad predictiva de distintos modelos, modificando el número de muestras sintéticas utilizadas para ampliar el intervalo de concentración del analito, desde un máximo de 20 hasta un mínimo de 4 (una por cada nivel de concentración de principio activo distinto al nominal). En la selección de estas 4 muestras se tuvo también en cuenta que correspondiesen a niveles distintos de excipientes. Se concluyó que no existían diferencias

significativas entre los distintos modelos, por lo que los datos que se muestran en este trabajo corresponden al modelo más simple. El número total de muestras de este conjunto de calibración fue de 14 (10 de producción más las 4 sintéticas), lo que teniendo en cuenta que el número de factores significativo de los modelos fue de 3 o 4, nos aproxima a esa relación 3:1, sugerida como mínima por Kramer³⁵.

Definido el número de muestras a utilizar se prepararon los dos conjuntos de calibración, formados por 10 muestras de producción y por 4 muestras adicionales, sintéticas (C1) o dopadas (C2). En la figura 5.2 se representan las muestras de producción en el espacio de los dos primeros componentes del PCA, indicando las que se escogieron para formar parte del conjunto de calibración. Para evaluar la capacidad predictiva de los modelos se disponía de 3 sets de predicción: uno formado por 10 muestras sintéticas (S1), otro formado por 9 muestras dopadas (D1) y un tercero formado por 20 muestras de producción (P1).

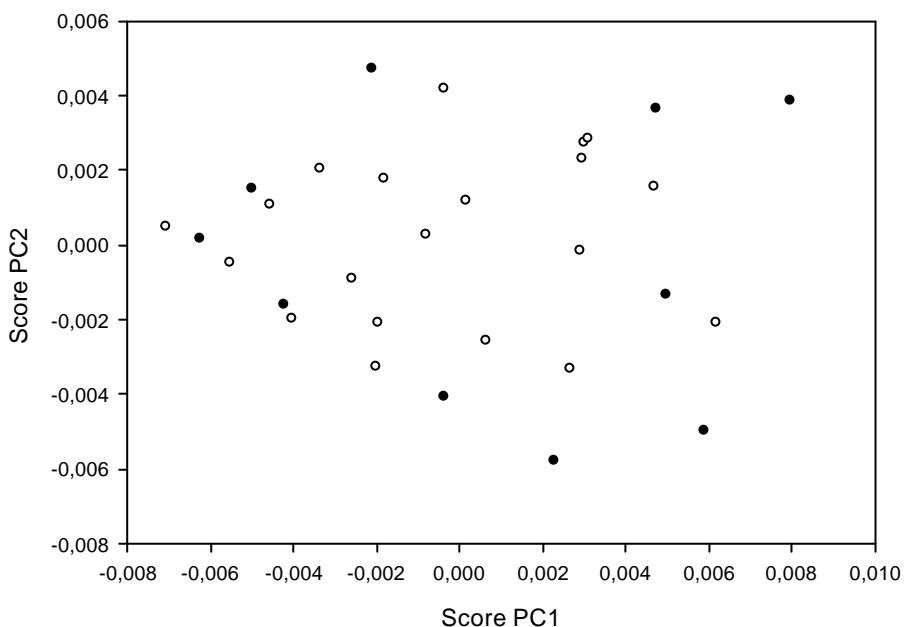


Figura 5.2. Representación del primer score frente al segundo en el análisis en componentes principales de las muestras de producción. (●) Muestras de calibración. (○) Muestras de predicción.

Una vez se seleccionaron los distintos conjuntos de muestras, se ensayaron diferentes modelos PLSR, utilizando diferentes pretratamientos espectrales. Se utilizó únicamente el intervalo espectral 1100-1800nm, eliminando la zona de 2200-2498nm debido al mayor ruido asociado al espectro y la zona alrededor de 1900nm donde existe una banda de absorción del agua.

En la tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes modelos estudiados utilizando los pretratamientos espectrales más habituales. Se escogió como mejor modelo aquel que presentaba el menor valor del error estándar relativo de calibración (RSEC) y que usaba un número menor de componentes. Como se puede observar, los mejores resultados, en ambos casos, se obtuvieron cuando se utilizaba como pretratamiento espectral la segunda derivada. Además, estos modelos de calibración, son también los que presentan una mejor capacidad predictiva de las muestras de producción, con valores de RSEP% en los dos casos del 1.5%.

Tabla 5.2. Error estándar relativo calculado para los conjuntos de calibración y predicción utilizando diferentes modelos de calibración.

Pretratamiento espectral	Componentes PLS	RSEC	RSEP (P1)
<i>Conjunto de calibración: muestras sintéticas + producción</i>			
Absorbancia	5	1.1 ^a	2.2
2 ^a derivada	4	0.7 ^a	1.5
SNV	4	1.1 ^a	3.8
<i>Conjunto de calibración: muestras dopadas + producción</i>			
Absorbancia	5	0.7 ^b	2.0
2 ^a derivada	4	0.6 ^b	1.5
SNV	3	1.2 ^b	3.2

^aC1. ^bC2

En la figura 5.3 se representan los errores relativos individuales para cada muestra, observándose un comportamiento muy parecido para los dos modelos. Para confirmar la semejanza de los resultados se realizó un test t de diferencias³⁷, tanto entre los resultados obtenidos de los modelos con muestras dopadas y sintéticas entre sí, como entre éstos y los valores de referencia. En todos los casos los valores de t encontrados fueron inferiores a los tabulados, confirmando, con un 95% de nivel de confianza, la ausencia de diferencias significativas tanto con los valores de referencia como entre ambos procedimientos de calibración.

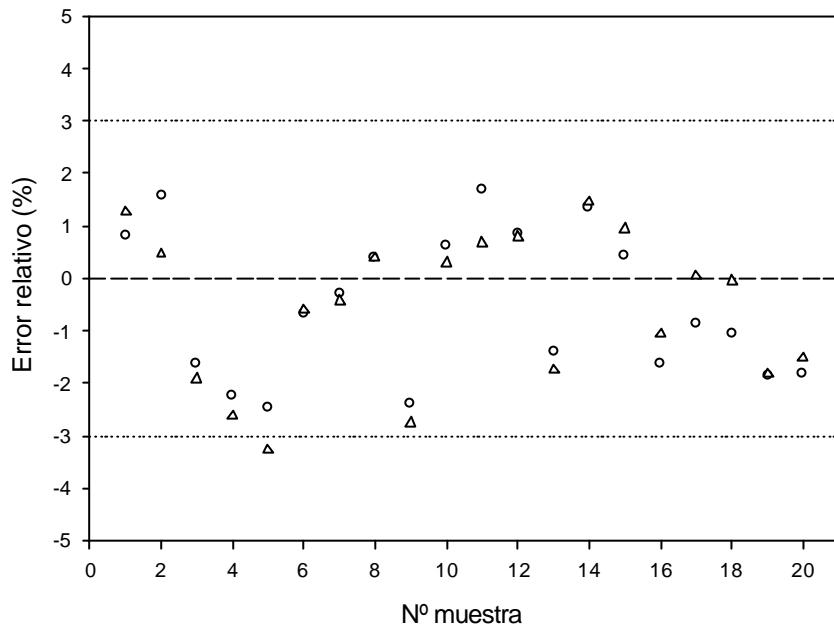


Figura 5.3. Error relativo de predicción frente al número de muestra de producción. (Δ) Errores con la calibración con muestras dopadas. (○) Errores con la calibración con muestras sintéticas.

5.3.2. Evaluación de la linealidad de los métodos de cuantificación

La validación de un procedimiento analítico implica la evaluación de un conjunto de parámetros: repetitividad, precisión intermedia, exactitud, linealidad y robustez³⁸.

Como se ha comentado en el capítulo 3, en una calibración NIR el estudio de la linealidad es especialmente problemático. A diferencia de las calibraciones univariadas, donde la linealidad se evalúa mediante la representación de la señal analítica frente a la concentración de analito, en un procedimiento NIR ésta se evalúa representando los valores encontrados por NIR frente a los encontrados por el método de referencia. Si en esta representación se obtiene una recta con pendiente unidad y ordenada en el origen cero, se asume que el método propuesto es lineal y no está sujeto a errores sistemáticos o de matriz respecto al intervalo de concentración estudiado.

La evaluación de la linealidad es un parámetro importante, ya que demuestra que el modelo no sólo cuantifica bien las muestras de producción cuyo contenido real coincide con el definido por las especificaciones del fármaco, sino también todas aquellas muestras cuyo contenido difiere de él, tanto si están dentro de los márgenes tolerados ($\pm 5\%$ del valor de especificación)³⁹, como ligeramente por encima. El margen de concentración queda necesariamente prefijado, ya que no es posible cuantificar muestras fuera del intervalo cubierto en la calibración.

Debido a que en una metodología NIR la muestra se mide directamente en forma sólida, no existe la posibilidad de preparar muestras de contenido variable a partir de una disolución patrón. Así pues, es necesario que las muestras empleadas para comprobar la linealidad sean muestras de laboratorio, ya sean muestras sintéticas o muestras dopadas.

En la figura 5.4 se muestra el efecto que tiene en la evaluación de la linealidad el tipo de muestras utilizadas en la etapa de calibración. En la figura 5.4a se observa la representación de los valores NIR frente a los valores de referencia tanto para las muestras sintéticas como para las dopadas, utilizando el modelo de calibración con muestras dopadas. Se distinguen claramente dos rectas. Mientras que la predicción de las muestras dopadas determina un recta con pendiente unidad y ordenada en el origen cero, la predicción de las muestras sintéticas con el mismo modelo de calibración define una línea recta cuya pendiente y ordenada en el origen son considerablemente diferentes de uno y cero respectivamente. En cambio, en la figura 5.4b se observa la situación opuesta, cuando en la matriz de calibración se utilizan las muestras sintéticas. Así pues, cuando las muestras de laboratorio preparadas para el estudio de la linealidad tienen el mismo origen que las utilizadas para preparar la matriz de calibración (sintéticas-sintéticas; dopadas-dopadas) se obtienen rectas de pendiente unidad y de ordenada en el origen cero. Por el contrario, cuando éstas tienen origen diferente (sintéticas-dopadas), a pesar de que se observa una relación lineal, se aprecia una diferencia sistemática entre los valores NIR y los de referencia.

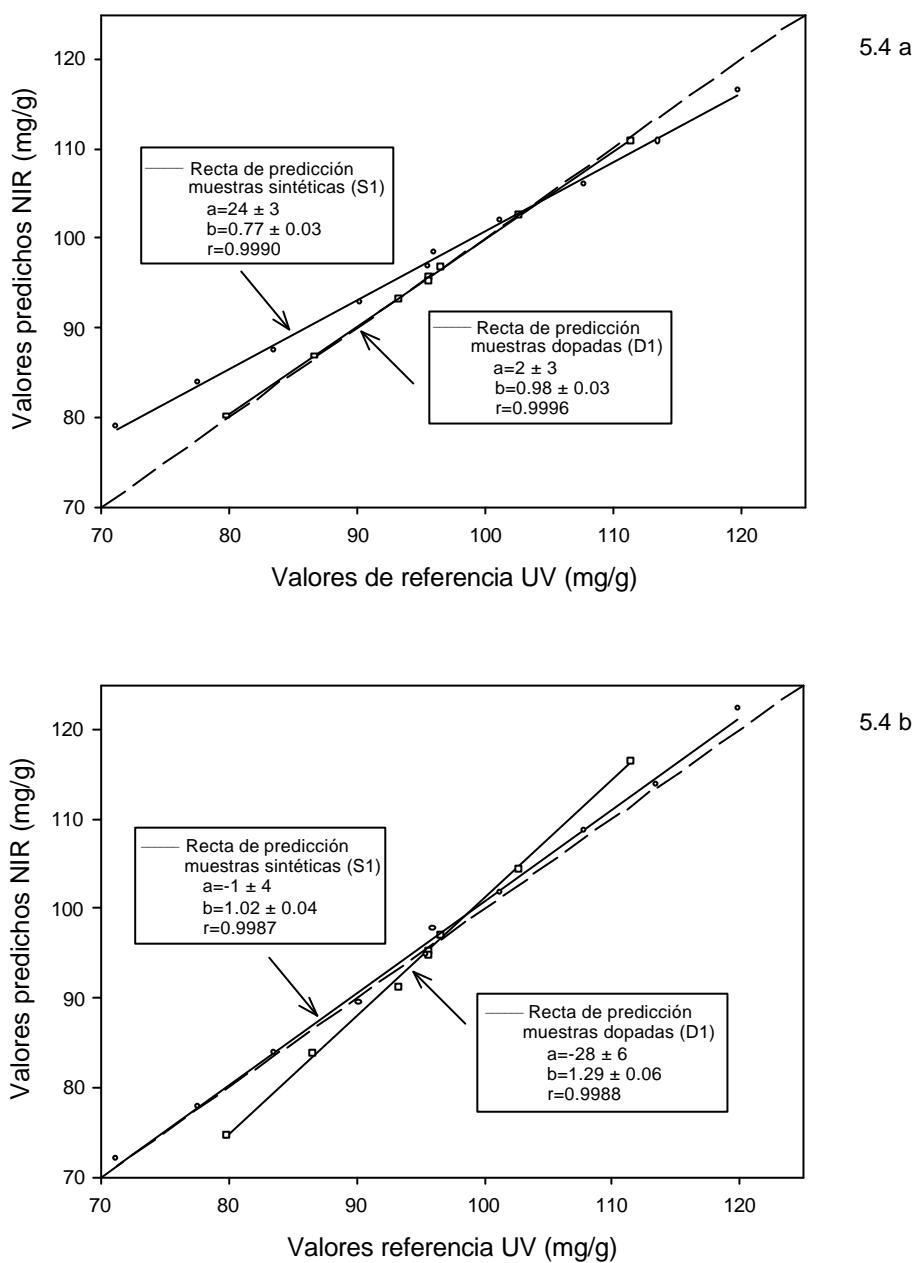


Figura 5.4. Cuantificación de los dos conjuntos de muestras de predicción preparadas en el laboratorio con los dos modelos de calibración establecidos y comparación con la recta unidad (línea punteada). (a) Calibración con muestras dopadas. (b) Calibración con muestras sintéticas.

Con el fin de estudiar el origen de este diferente comportamiento se realizó un PCA de los espectros de 2^a derivada de todas las muestras. En el gráfico del primer score frente al segundo (figura 5.5) se observa que el primer componente principal (que explicaba el 95% de la variabilidad espectral) agrupa a las muestras por su origen, mientras que el segundo está relacionado con la concentración del analito. Al comparar los espectros medios de los diferentes tipos de muestras (figura 5.6) se puede observar que no existen diferencias significativas entre las muestras dopadas y las muestras de producción. Sin embargo, los espectros medios de las muestras sintéticas y las muestras de producción muestran perfiles parecidos, pero también diferencias apreciables en la intensidad de las bandas, así como una pequeña diferencia espectral alrededor de 1700 nm, que se atribuyó a la absorción de la laca, presente en el preparado pero que no se introdujo en las muestras sintéticas. Se comprobó que la presencia o no de esta zona espectral en los modelos de calibración no afectaba para nada a los resultados.

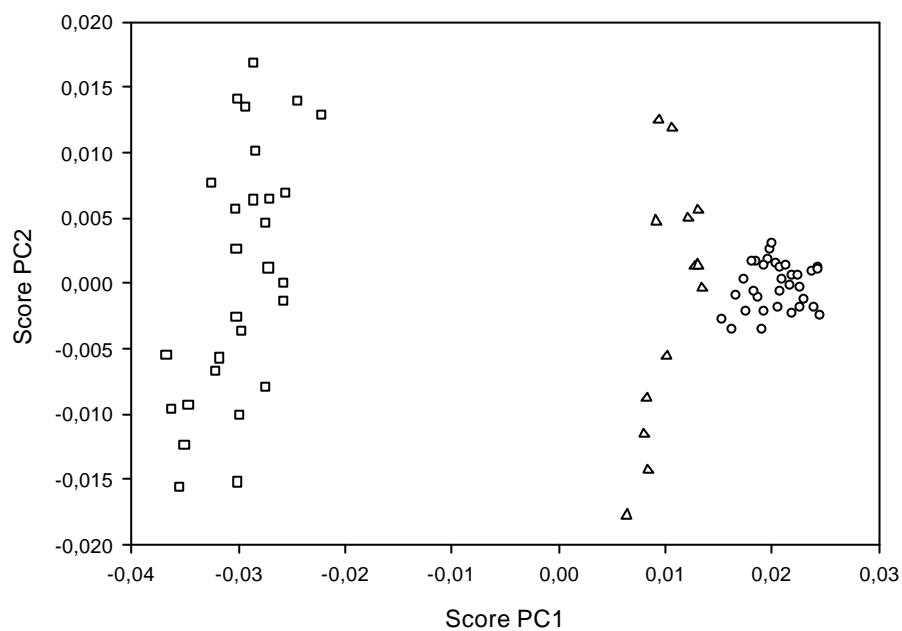


Figura 5.5. Representación del primer score frente al segundo en el análisis en componentes principales de las muestras sintéticas (□), dopadas (△) y de producción (○).

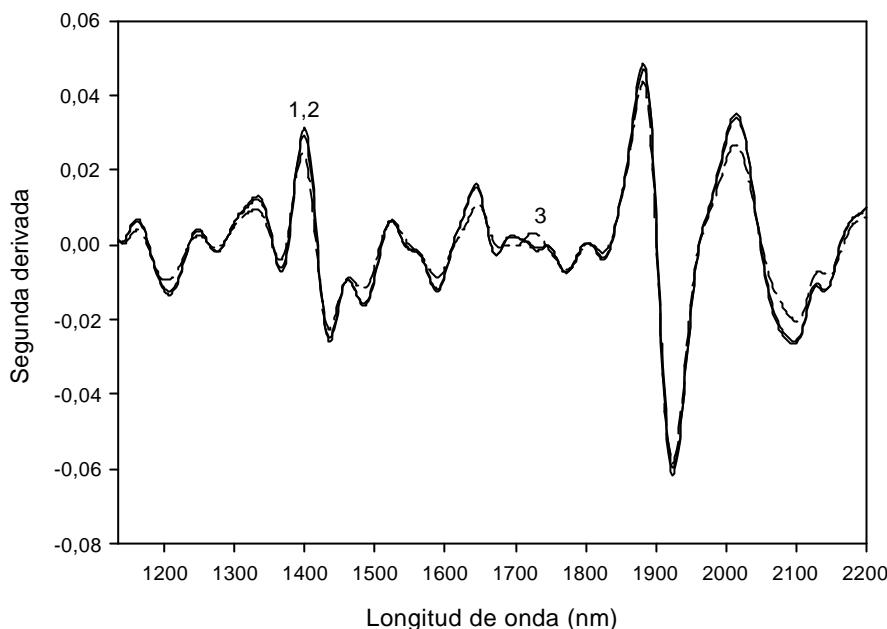


Figura 5.6. Espectro medio en segunda derivada de (1) muestra de producción, (2) muestra dopada y (3) muestra sintética.

La diferencia espectral encontrada entre los distintos tipos de muestras se puede atribuir al diferente scattering, producto de las diferentes características físicas entre ellas.

El hecho de que la diferencia entre orígenes se encuentre en el PC1, y de forma prácticamente ortogonal a la variabilidad debida a la concentración de analito, sugirió la posibilidad de eliminar este efecto, o bien eliminando de la matriz de datos espectrales la información contenido en él, o bien utilizando como pretratamiento espectral el OSC³¹.

En la tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos con ambas alternativas. Como se puede observar, los valores del error estándar relativo son del mismo orden que los obtenidos utilizando los pretratamientos convencionales y se mantiene el error sistemático al predecir las muestras dopadas a partir de una calibración con muestras sintéticas y viceversa.

Tabla 5.3. Error estándar relativo calculado para los conjuntos de calibración y predicción, y parámetros de regresión (95% nivel confianza) en la representación NIR vs referencia para el conjunto de muestras dopadas D1.

Pretratamiento espectral	Componentes PLS	RSEC	RSEP (P1)	Ordenada origen	Pendiente	Coeficiente correlación
<i>Conjunto de calibración: muestras sintéticas + producción</i>						
2 ^a derivada ^a	3	1.1 ^b	1.5	-28±9	1.30±0.09	0.9971
OSC	4	1.3 ^b	2.3	-24±11	1.21±0.11	0.9947
<i>Conjunto de calibración: muestras dopadas + producción</i>						
2 ^a derivada ^a	3	0.6 ^c	1.5	1±5	0.99±0.05	0.9984
OSC	4	0.7 ^c	2.1	9±3	0.91±0.04	0.9991

^a matriz de datos reconstruida a partir del PCA eliminando la información contenida en el primer componente principal. ^b C1. ^c C2.

5.4. CONCLUSIONES

Las muestras de laboratorio, que permiten extender el estrecho intervalo de concentración que presentan las muestras de producción, se pueden preparar mediante dos estrategias: muestras dopadas y muestras sintéticas. Ambas estrategias proporcionan resultados comparables en la predicción de muestras reales de producción. Sin embargo, también es necesario cuantificar correctamente muestras cuyo contenido no se corresponda exactamente con el contenido definido por las especificaciones del preparado. Esta capacidad se evalúa mediante el análisis de la linealidad en la validación del procedimiento, utilizando muestras de laboratorio. Se ha demostrado que para obtener evaluaciones correctas de la linealidad es necesario que estas muestras de laboratorio se hayan preparado de la misma manera que las muestras utilizadas para construir la matriz de calibración.

Es obvio, por tanto, que existen ciertas diferencias entre los dos tipos de muestras de laboratorio que no permite su utilización de forma indistinta. Por otra parte, ningún

pretratamiento espectral de los estudiados permite disminuir esta diferenciación. Dado que se ha demostrado que las muestras dopadas son las más parecidas a las muestras reales de producción, parece razonable sugerir la utilización de éstas tanto para desarrollar el modelo de calibración como para validarla.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

1. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
2. D. Jouan- Rimbaud, M.S. Khots, D.L. Massart, I.R. Last, K.A. Prebble, *Anal Chim Acta*, **315**, 257, 1995.
3. D. Jouan- Rimbaud, B. Walczak, D.L. Massart, I.R. Last, K.A. Prebble, *Anal Chim Acta*, **304**, 285, 1995.
4. A.D. Trafford, R.D. Jee, A.C. Moffat, P. Graham, *Analyst*, **124**, 163, 1999.
5. B.F. MacDonald, K.A. Prebble, *J Pharm Biomed Anal.*, **11**, 1077, 1993.
6. P. Merckle, K.A. Kovar, *J Pharm Biomed Anal.*, **17**, 365, 1998.
7. P. Corti, G. Ceramelli, E. Dreassi, S. Mattii, *Analyst*, **124**, 755, 1999.
8. J. Gottfries, H. Depui, M. Fransson, M. Jongeneelen, M. Josefson, F.W. Langkilde, D.T. Witte, *J Pharm Biomed. Anal.*, **14**, 1495, 1996.
9. A. Eustaquio, P. Graham, R.D. Jee, A.C. Moffat, A.D. Trafford, *Analyst*, **123**, 2303, 1998.
10. A. Eustaquio, M. Blanco, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Anal. Chim. Acta*, **383**, 283, 1999.
11. P. Corti, E. Dreassi, C. Murratzu, G. Corbini, L. Ballerini, S. Gravina, *Pharm. Acta Helv.*, **64**, 140, 1989.
12. R. Gimet, A. T. Luong, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **5**(3), 205, 1987.
13. P. Dubois, J.R. Martínez, P. Levillain, *Analyst*, **112**, 1675, 1987
14. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. MasPOCH, *J. Pharm. Sci.*, **88**(5), 551, 1999.
15. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. MasPOCH, *Anal. Chim. Acta*, **392**, 237, 1999.
16. M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. González, D. Serrano, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**, 139, 2000.

17. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *Anal. Chim. Acta*, **333**, 147, 1996.
18. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **5**, 67, 1997.
19. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, D. Serrano, *Analyst*, **123**, 2307, 1998.
20. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 240, 1997.
21. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *Analyst*, **122**, 761, 1997.
22. E. Dreassi, G. Ceramelli, P. Corti, P.L. Perruccio, S. Lonardi, *Analyst*, **121**, 219, 1996.
23. E. Dreassi, G. Ceramelli, L. Savini, P. Corti, P.L. Perruccio, S. Lonardo, *Analyst*, **120**, 319, 1995.
24. P. Corti, E. Dreassi, G. Ceramelli, S. Lonardi, R. Viviani, S. Gravina, *Analisis*, **19**, 198, 1991.
25. P. Corti, E. Dreassi, G. Corbini, S. Lonardi, R. Viviani, L. Mosconi, M. Bernuzzi, *Pharm. Acta Helv.*, **65**, 28, 1990.
26. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. Maspoch, *Analyst*, **124**, 1089, 1999.
27. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *Talanta*, **40**, 1671, 1993.
28. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, E. Russo, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 183, 1994.
29. A.C. Moffat, A.D. Trafford, R.D. Jee, P. Graham, *Analyst*, **125**, 1341, 2000.
30. H. Mark, G.E. Ritchie, R.W. Roller, E.W. Ciurczak, C. Tso, S.A. MacDonald, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 251, 2002.
31. S. Wold, H. Antti, F. Lindgren, J. Öhman, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **44**, 175, 1998.
32. British Pharmacopoeia 1993, H M Stationery Office, Londres, 1993.
33. D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
34. M. Otto, W. Wegscheider, *Anal. Chem.*, **57**, 63, 1985.
35. R. Kramer, *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York, 1998.

36. *Standard Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis*, American Society for Testing and Materials, E-1655-97, Philadelphia, PA, 1997.
37. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, Ellis Horwood, Londres, 1988.
38. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures Methodology* International Conference on Harmonization, 1996.
39. Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, Vol 1: Legislación Farmacéutica, Comisión Europea, Dirección General III-Industria Productos Farmacéuticos y cosméticos, Bruselas, 1998.

6. Influencia de la heterogeneidad del tamaño de partícula en una calibración en el infrarrojo próximo

6.1. INTRODUCCIÓN

El tamaño de partícula de fármacos y excipientes constituye una propiedad de gran importancia para la industria farmacéutica, por sus repercusiones en los procesos tecnológicos y en las características biofarmacéuticas. El tamaño y su distribución pueden influir en diversos aspectos como propiedades organolépticas, uniformidad de contenido, velocidad de absorción, velocidad de disolución, etc¹. Por ejemplo, en fármacos escasamente hidrosolubles, una disminución del tamaño de partícula puede aumentar la velocidad de disolución, por lo que cuando la solubilidad es un factor limitante del proceso de absorción, ésta puede ser sensiblemente mejorada mediante una disminución de la magnitud granulométrica.

Existen numerosos métodos para determinar el tamaño de partícula de productos farmacéuticos: ópticos, mecánicos, gravitacionales, osmóticos, de adsorción o conductimétricos, entre otros. Sin embargo, estos métodos presentan la desventaja que las muestras generalmente se tienen que analizar fuera del área de producción, con la consecuente pérdida de tiempo y retrasos en el proceso de fabricación. Este problema se puede solventar mediante la utilización de la espectroscopia en el infrarrojo próximo, ya que el tamaño de partícula es uno de los parámetros físicos que más afectan al espectro NIR. Cuanto mayor es el tamaño de partícula de una muestra, más intensa es la absorbancia medida²⁻⁴, de forma que, en algunos casos, la variación en el espectro debida al tamaño de partícula es más importante que la debida a la composición de las muestras⁵. Así pues, diversos autores utilizan esta propiedad para determinar cuantitativamente el tamaño de partícula de preparados farmacéuticos y/o excipientes^{4,6-9}.

Sin embargo, dado que la absorbancia de una muestra depende de su tamaño de partícula y la reproducibilidad del espectro disminuye al aumentar el tamaño de partícula², en análisis químico cuantitativo es necesario minimizar su efecto, para poder asegurar la precisión y exactitud de los resultados. En la bibliografía se han encontrado dos vías para minimizar el efecto del tamaño de partícula¹⁰: bien modificar matemáticamente el espectro^{8,9,11,12}, bien molturar las muestras a un tamaño de partícula determinado^{2,8}.

En este capítulo se estudia la influencia de la heterogeneidad del tamaño de partícula en la reproducibilidad espectral. Igualmente, se evalúa cómo afecta el número de espectros promediados en la obtención de un espectro representativo de la muestra, tanto desde un punto de vista espectral como cuantitativo.

6.2. EXPERIMENTAL

6.2.1. Instrumentación y software

El registro de los espectros NIR se ha llevado a cabo con el espectrofotómetro NIRSystem 6500 equipado con el módulo RCA (Rapid-Content Analyser), el cual está controlado por el software Vision versión 2.22.

La regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) se ha realizado con el programa UNSCRAMBLER versión 7.6.

Para molturar las muestras de producción se ha usado un molinillo de cuchillas Turmix Mill y para homogeneizar las muestras sólidas preparadas en el laboratorio se ha empleado un agitador TURBULA tipo T2C de WAB.

6.2.2. Descripción de las muestras de producción

El preparado farmacéutico estudiado, Sucramal[®], se presenta en forma de granulado, con una distribución de tamaños de partícula como la que se muestra en la figura 6.1, y con un contenido en principio activo, sucralfato, de 16.7%. Además, el preparado contiene un excipiente mayoritario, sorbitol, con un valor nominal de 82.8% y otros dos excipientes, sacarina y aroma de vainilla, muy minoritarios.

Como se puede observar en la figura 6.1, el fármaco presenta gran heterogeneidad de tamaños de partícula (una media del 37.5% del producto tiene un tamaño superior a 500 μ m, mientras que una media del 19% tiene un tamaño inferior a 300 μ m) a la vez que también existe una heterogeneidad, dentro de un mismo tamaño de partícula, de un lote de producción a otro, heterogeneidad que no es tan marcada al tamizar diferentes fracciones de un mismo lote de producción (figura 6.2).

Se disponía de 36 muestras del preparado pertenecientes a 17 lotes de producción, y de 2 muestras de sucralfato, 2 de sorbitol y 1 de cada excipiente minoritario.

En la figura 6.3 se muestra la distribución de tamaños de partícula para una muestra de producción, para el principio activo y para el excipiente mayoritario.

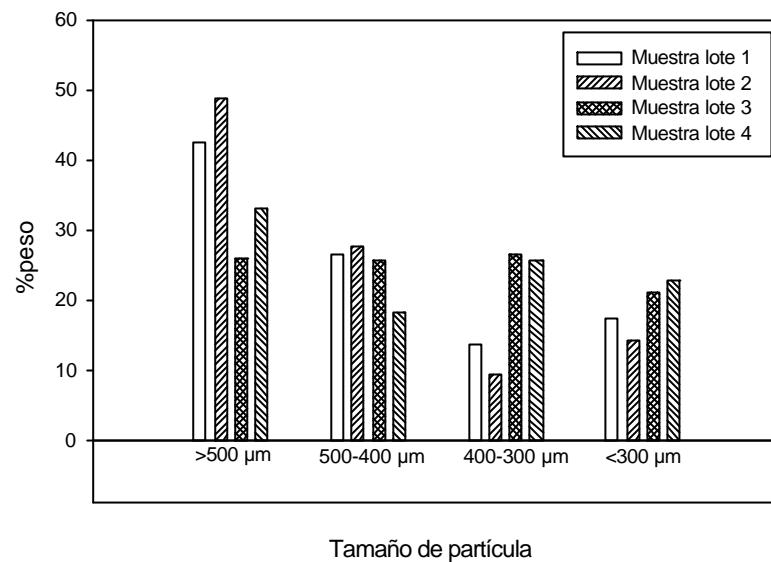


Figura 6.1. Distribución de tamaños de partícula de 4 lotes diferentes de muestras de producción.

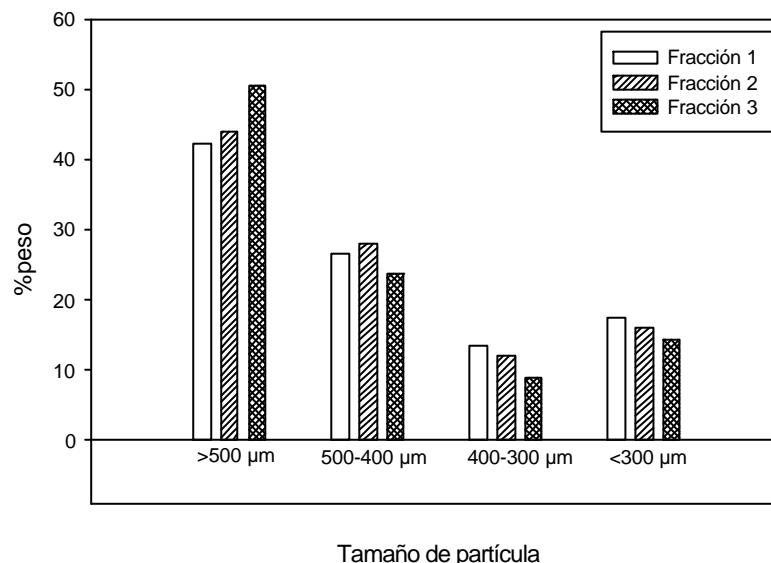


Figura 6.2. Distribución de tamaños de partícula de 3 fracciones diferentes de una muestra de producción.

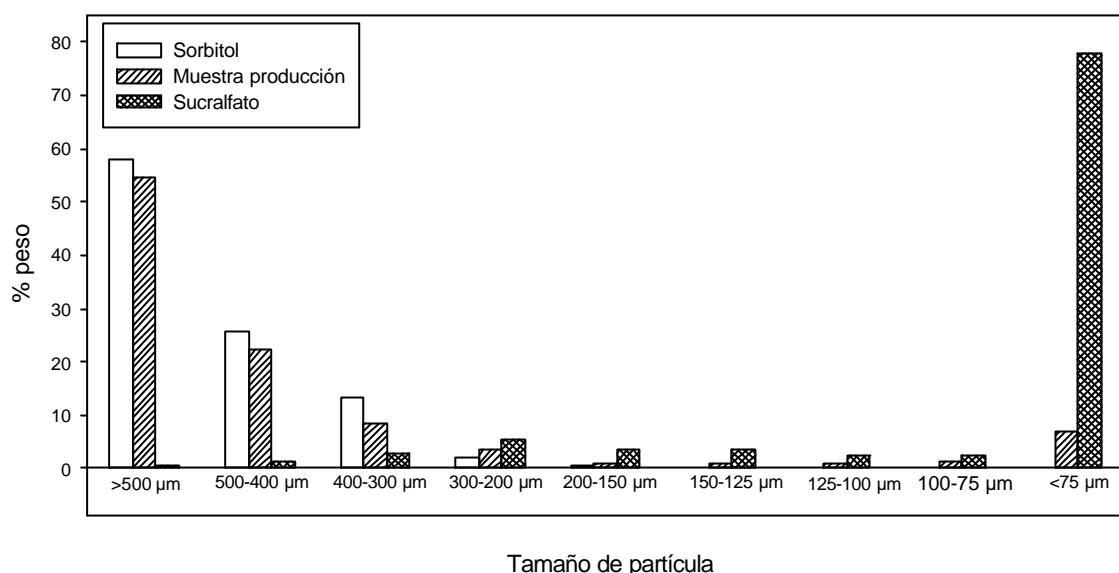


Figura 6.3. Distribución de tamaños de partícula de una muestra de producción, del sucralfato y del excipiente mayoritario.

6.2.3. Preparación de las muestras de laboratorio

Para extender el estrecho margen de concentración que presentaban las muestras de producción fue necesario preparar muestras en el laboratorio, las cuales se obtuvieron por pesada de distintas cantidades de sorbitol y sucralfato, y una cantidad constante de la mezcla sacarina-aroma de vainilla.

El contenido de sucralfato se varió de forma regular en un intervalo de concentraciones de aproximadamente $\pm 25\%$ del valor nominal, disponiendo de 2 muestras por nivel de concentración de principio activo, muestras que fueron tanto preparadas como registradas en el espectrofotómetro NIR en días diferentes. Por un lado se prepararon 26 muestras, a 13 niveles de concentración, a partir del sorbitol original. Por otro, se prepararon 30 muestras, a 15 niveles de concentración, a partir del sorbitol molturado

Para reducir el tamaño de partícula del sorbitol, se molturaron 25g durante 15 segundos, tamizando posteriormente la muestra molturada para asegurar que tenía un tamaño de partícula inferior a 200 μm. En caso contrario, se volvía a molturar la alícuota con

tamaño superior hasta conseguir que la mayoría de la muestra pasara por el tamiz. En la figura 6.4 se puede observar como el sorbitol molido y el sucralfato presentaban una distribución de tamaños de partícula más parecida que originalmente.

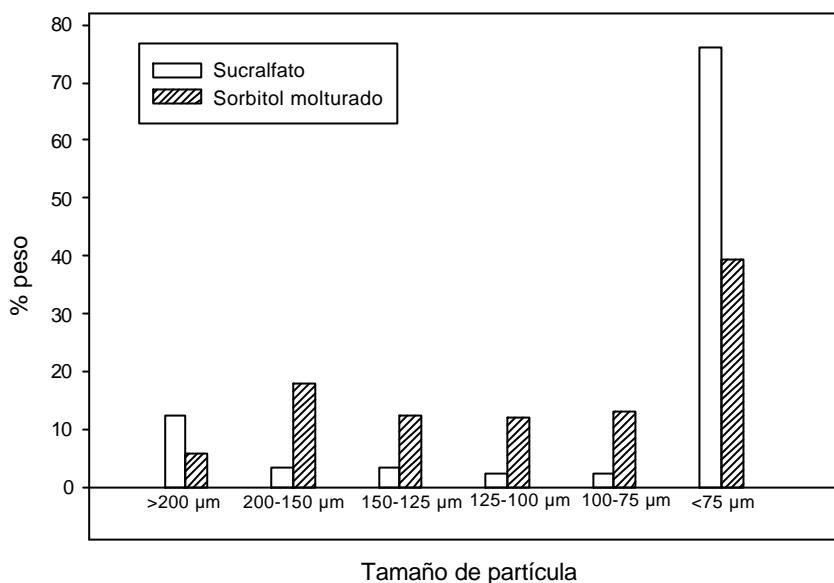


Figura 6.4. Distribución de tamaños de partícula del sorbitol molido y del sucralfato.

6.2.4. Método de referencia

El control del contenido de principio activo en el preparado farmacéutico se llevó a cabo mediante la determinación de aluminio contenido en el sucralfato. El sucralfato descrito en el registro farmacéutico de Sucramal® está definido con un contenido de aluminio del 17.0%. Dado que el preparado contiene un 16.7% de sucralfato, el contenido nominal de aluminio en el producto final es de un 2.83%, es decir, 28.3mg/g.

Para determinar el contenido de aluminio en las muestras de producción se siguió el procedimiento descrito por A.I.Vogel¹³. Para ello, 0.6g de Sucramal® se disolvían en 40ml de HCl 1M (el medio ácido es necesario para liberar el aluminio del sucralfato¹⁴). Se agitaba durante 15 minutos en un agitador magnético y 5 minutos en un baño de ultrasonidos, para asegurar la completa disolución del preparado. A la solución obtenida se le añadían 15ml de

EDTA 0.1M y se ajustaba el pH entre 7 y 8 mediante NH₃conc. La solución resultante se calentaba durante unos pocos minutos, para asegurar la completa complejación del aluminio. Se enfriaba a temperatura ambiente y se valoraba con una solución estándar de ZnCl₂ 0.1M utilizando como indicador negro de Eriocromo T (NET).

Al analizar por este método las diferentes alícuotas obtenidas en la tamización de las diferentes muestras de producción (figura 6.1), se observó que el contenido de aluminio no era homogéneo entre todos los tamaños de partícula, sino que las partículas con tamaño grande tenían un contenido de aluminio bajo, mientras que las de tamaño pequeño presentaban un contenido de aluminio elevado (tabla 6.1). De estos datos, juntos con los mostrados en la figura 6.3, se concluyó que las partículas grandes eran ricas en sorbitol, mientras que las partículas pequeñas eran ricas en sucralfato.

Tabla 6.1. Valores de cuantificación de aluminio en los diferentes tamaños de partícula obtenidos en la tamización de distintas muestras de producción.

Muestra	>500 μm	500-400 μm	400-300 μm	<300 μm
Lote 1	5.1mg/g	6.5 mg/g	13.1 mg/g	125.3 mg/g
Lote 3	3.4mg/g	4.7 mg/g	6.8 mg/g	101.7 mg/g
Lote 4	5.3mg/g	3.3mg/g	6.8 mg/g	91.3 mg/g

6.2.5. Registro de los espectros NIR

Debido a la gran heterogeneidad de la muestra tanto en tamaños de partícula como en contenido de principio activo entre cada uno de ellos, uno de los problemas que se planteó desde un primer momento fue cómo se tenía que proceder para obtener un espectro NIR representativo. En la bibliografía se encontró que para ello es necesario promediar varios espectros NIR^{15,16}. Por tanto, de cada muestra se registraron 15 espectros en el intervalo espectral 1100-2498, utilizando para cada espectro un promedio de 32 scans. Para medir los 15 espectros se procedió de la siguiente manera: se realizaba el espectro referencia (cubeta vacía), registrando posteriormente tres espectros de la misma muestra, llenando y vaciando la cubeta entre cada medida. En la cubeta, la muestra se compactaba con una pieza metálica de su mismo diámetro interior, depositándola encima de la misma sin realizar ningún tipo de presión. Se volvía a realizar un espectro de la referencia,

volviéndose otra vez a medir un triplicado de la misma muestra. Y así sucesivamente hasta registrar 5 triplicados de cada muestra, obteniéndose un total de 15 espectros.

En la figura 6.5 se muestran los 15 espectros, en segunda derivada, de una muestra de producción. Se puede observar una gran variabilidad en las intensidades de las bandas, debida, básicamente, a la heterogeneidad de tamaños de partícula. Con el fin de reducir esta variabilidad, se decidió molar las muestras de producción. Para ello, 15g de muestra se moltaban en un molinillo durante 15 segundos. En este caso, la variabilidad en las intensidades de bandas de los diferentes espectros era mucho menor (figura 6.6).

En la figura 6.7 se muestra el espectro promedio en absorbancia de una muestra de producción molurada, del sucralfato y del sorbitol molurado.

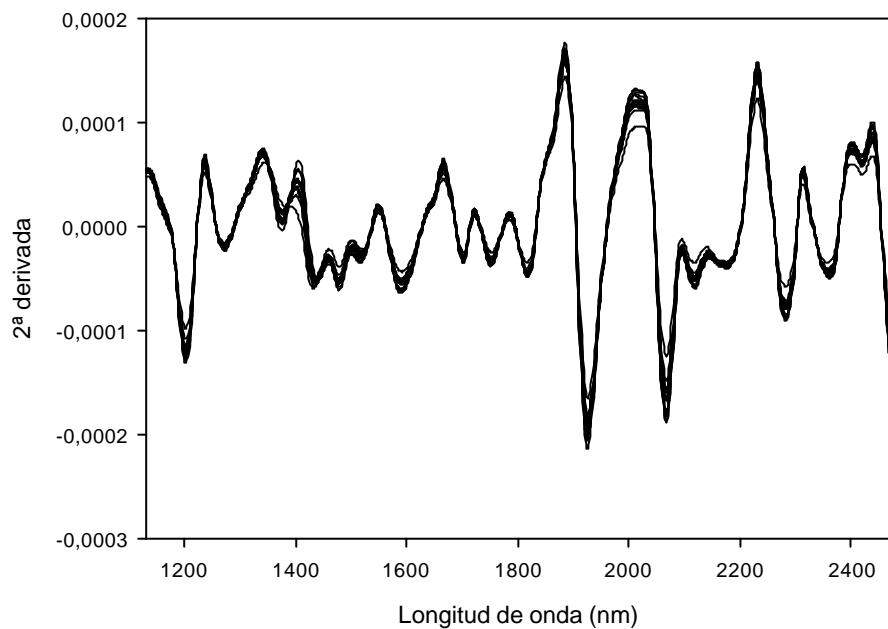


Figura 6.5. Representación de la segunda derivada de 15 espectros NIR de una muestra de producción sin molurar.

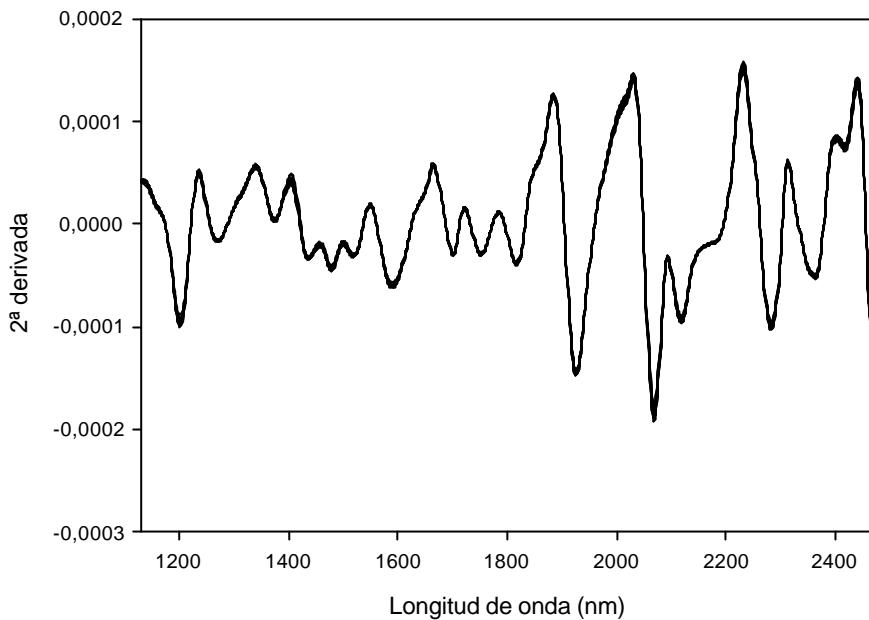


Figura 6.6. Representación de la segunda derivada de 15 espectros NIR de una muestra de producción molturada.

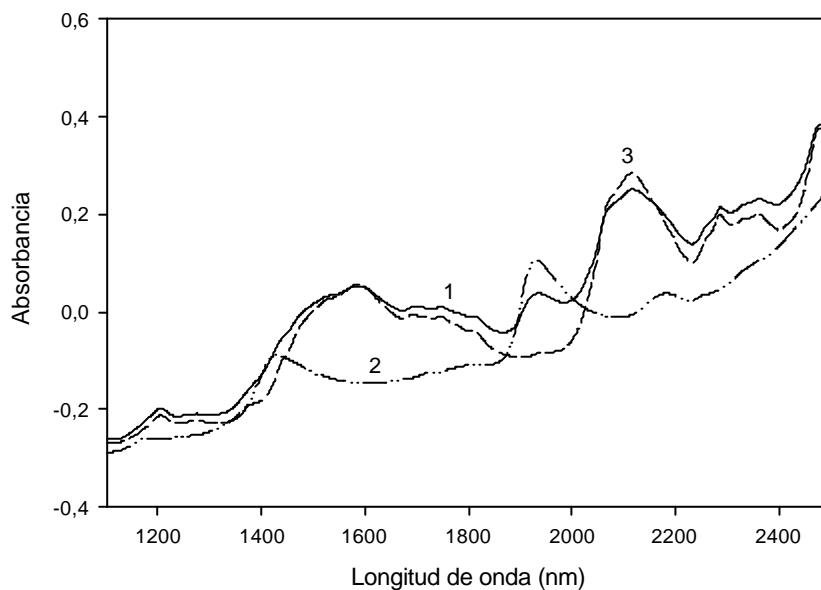


Figura 6.7. Espectros NIR de absorbancia de (1) muestra de producción molturada, (2) del sucralfato y (3) del sorbitol molturado.

6.2.6. Procesado de los datos

Todos los modelos de calibración se obtuvieron utilizando el algoritmo PLS¹⁷ y se construyeron por cross-validation, usando tantos segmentos como muestras contenía el conjunto de calibración. El número de componentes principales se determinó como el mínimo por el que el sumatorio del cuadrado de los residuales (PRESS) no difería significativamente del valor mínimo del PRESS¹⁸.

Se utilizó como pretratamiento espectral la segunda derivada, la cual se obtuvo aplicando el algoritmo Savitzky-Golay con una ventana de 31 puntos y ajustando un polinomio de segundo grado.

Para mostrar la calidad de los resultados se utilizó la raíz cuadrada del error cuadrático medio, RMSE.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Molturación y número de espectros promediados

En primer lugar se realizó un estudio en el que se comprobó el efecto del número de espectros promediados en la obtención de un espectro representativo de la muestra. Para ello se compararon las diferencias espectrales entre los espectros de segunda derivada obtenidos utilizando un número distinto de espectros promediados. Como de cada muestra se registraron 15 espectros, en 5 bloques de tres replicados, se determinó la diferencia espectral media obtenida utilizando espectros promediados de bloques enteros, es decir, el espectro promedio de 6 espectros con el de 3, el de 9 con el de 6, el de 12 con el de 9 y el de 15 con el de 12. Si esta diferencia espectral media obtenida era del orden de la obtenida al comparar los espectros de ruido, se consideraba que los espectros obtenidos eran representativos de la muestra. Se utilizaron los espectros de segunda derivada para minimizar los efectos de scattering.

Para calcular la diferencia espectral media se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{diferencia espectral media} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^j (\bar{x}_i^n - \bar{x}_i^m)^2}{j}} \quad (6.1)$$

donde \bar{x}_i^n es la absorbancia del espectro promedio de n espectros a la longitud de onda i , \bar{x}_i^m es la absorbancia del espectro promedio de m espectros a la longitud de onda i y j es el número de longitudes de onda.

En la figura 6.8 se muestra cómo varía la diferencia espectral en función del número de espectros promediado, tanto para las muestras de producción sin molturar como para las molturadas. Así como al comparar el espectro promedio de 3 espectros con el espectro promedio de 6 se obtienen diferencias medias superiores a las obtenidas al comparar los espectros de ruido en un orden de magnitud (valor medio para el ruido $\sim 2.3e-7$), al comparar espectros promedios de 6 o más espectros, se obtienen diferencias medias del mismo orden en todos los casos y, además, del mismo orden que las del ruido, sobre todo para las muestras molturadas.

Para determinar la diferencia espectral media del ruido, se procedió de la siguiente manera: se registraba el espectro referencia (cubeta vacía), registrando posteriormente dos espectros de la misma referencia. Se calculaba la diferencia espectral media utilizando la expresión 6.1, siendo en este caso \bar{x}_i^n y \bar{x}_i^m los dos espectros de la referencia.

Realizando el mismo estudio con las muestras sintéticas preparadas en el laboratorio (figura 6.9) se llegó a la misma conclusión.

En general, el hecho de que una muestra presente heterogeneidades puede comportar dos tipos de problema¹⁹. Por un lado, el muestreo, ya que se tiene que garantizar que la fracción de muestra que se toma para realizar el análisis es representativa de toda la muestra. Por otro, el análisis, pues se debe asegurar que el resultado del mismo también es representativo de la muestra.

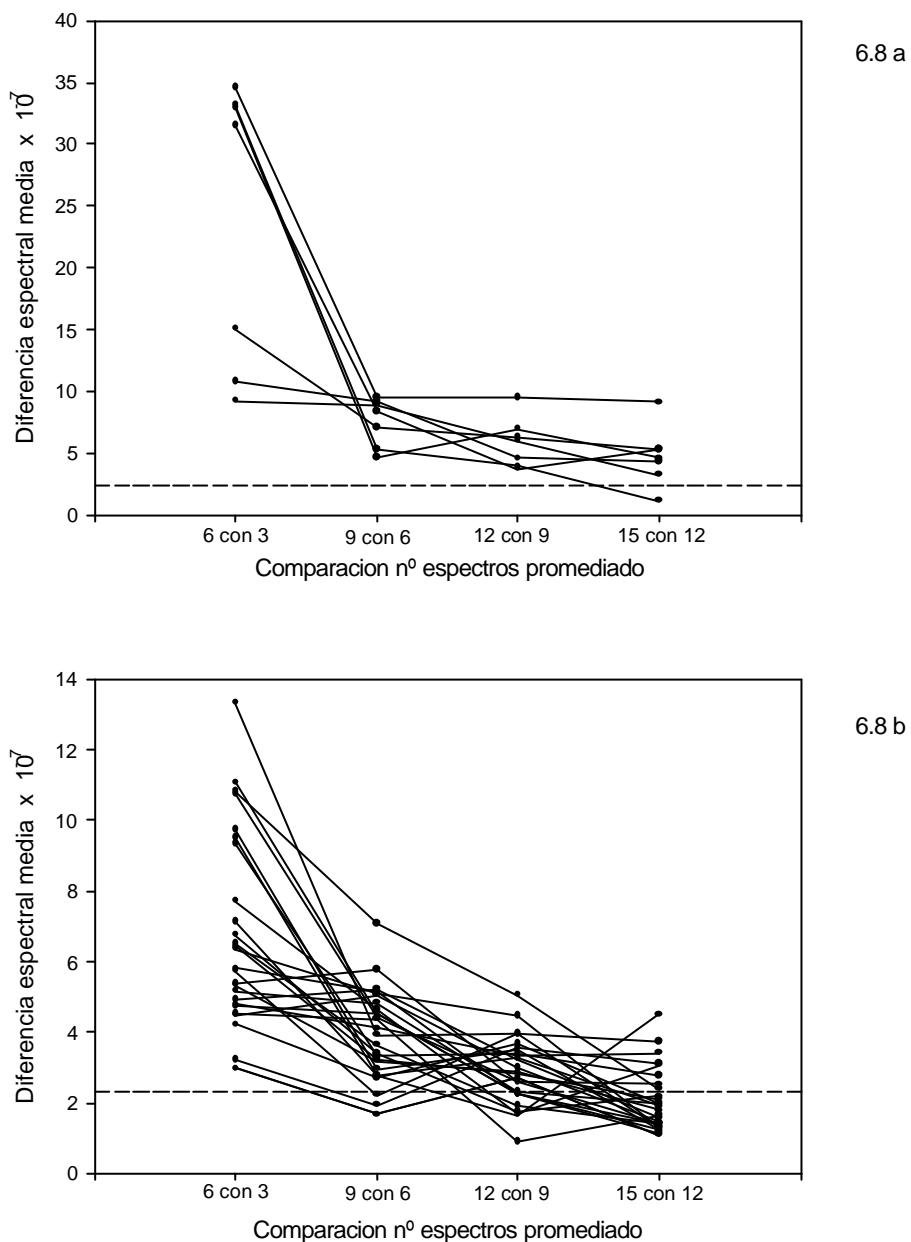


Figura 6.8. Estudio de la evolución de la diferencia espectral media para las diferentes muestras de producción en función del número de espectros promediados. (a) Muestras originales. (b) Muestras moliduradas. La línea punteada muestra la diferencia espectral media para el ruido

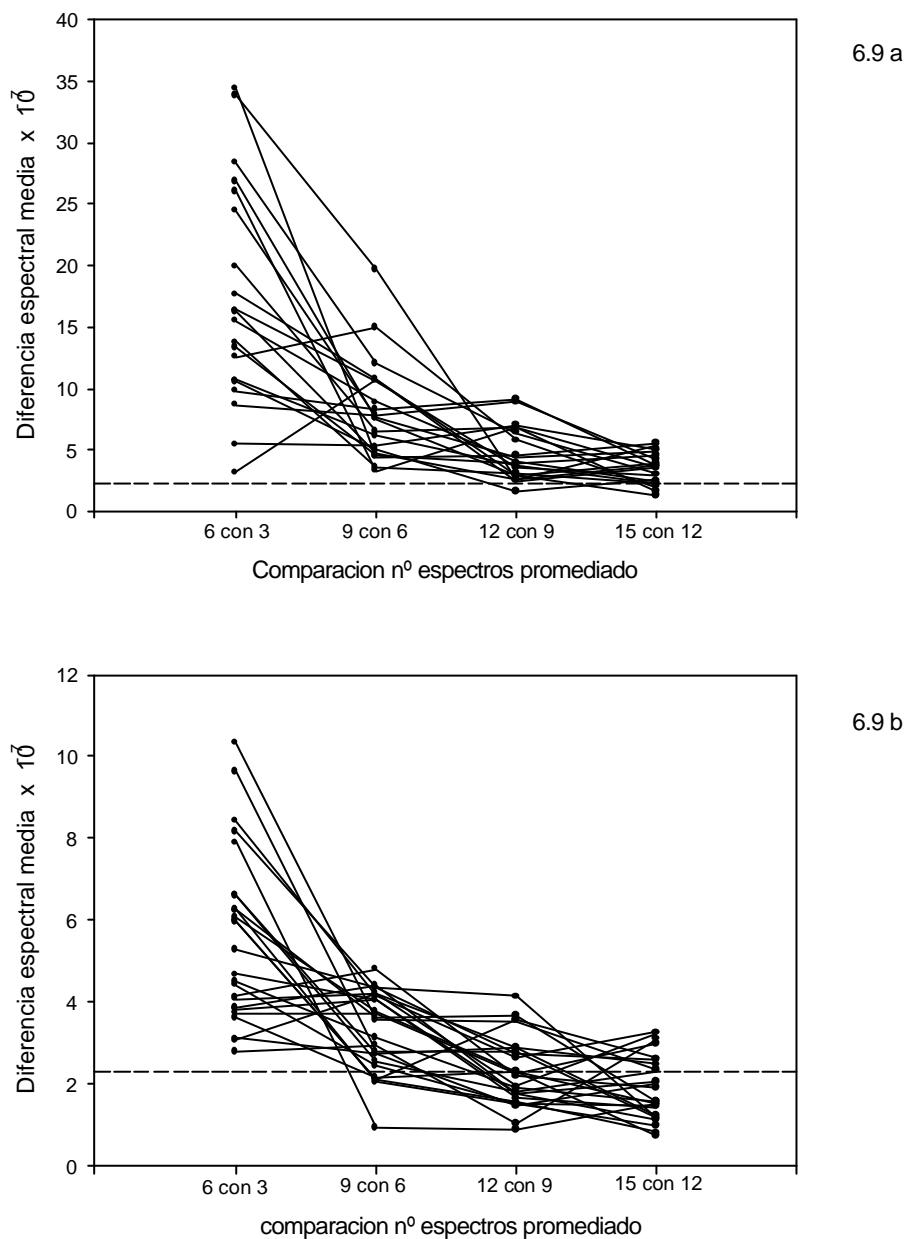


Figura 6.9. Estudio de la evolución de la diferencia espectral media para las diferentes muestras sintéticas en función del número de espectros promediados. (a) Muestras con sorbitol no molturado. (b) Muestras con sorbitol molturado. La línea punteada muestra la diferencia espectral media para el ruido

En la bibliografía se ha encontrado que la heterogeneidad de tamaños de partícula, además de causar problemas de reproducibilidad espectral², puede introducir no linealidades al llevar a cabo análisis cuantitativo^{15,20}. Por otra parte, a medida que aumenta el número de espectros promediados se produce una disminución del ruido espectral.

A modo de resumen de las figuras vistas anteriormente, en la figura 6.10 se muestra la evolución de la diferencia espectral media en todas las muestras, tanto sintéticas como de producción y tanto molturadas como sin molturar, en función del número de espectros promediados. Se observa que el hecho de molturar las muestras, disminuyendo así la heterogeneidad de tamaños de partícula, provoca una disminución de las diferencias entre espectros. Asimismo, al promediar un mayor número de espectros se consigue reducir estas diferencias. Con todo, en este caso concreto, promediar 6 espectros parece una buena manera de obtener un correcto espectro representativo de la muestra.

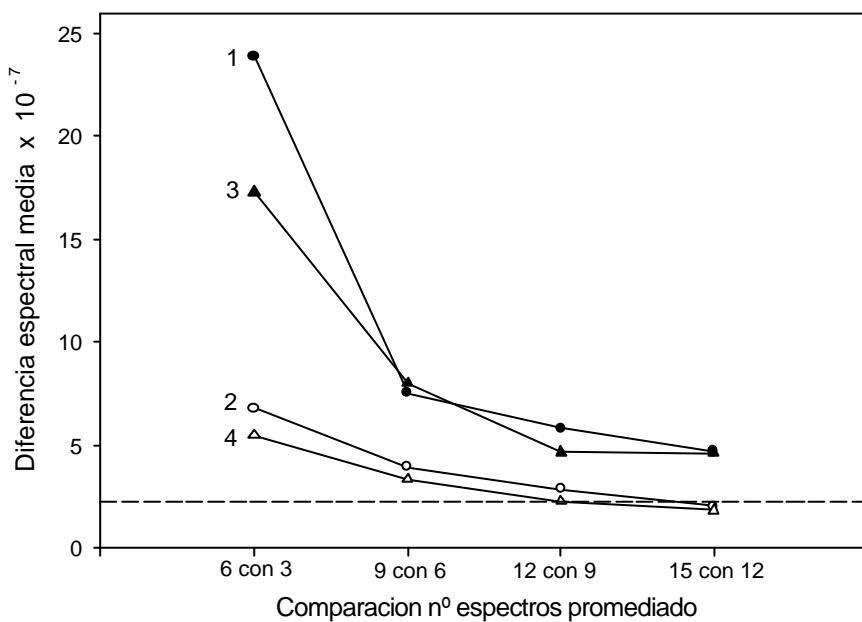


Figura 6.10. Estudio de la evolución de la diferencia espectral media, en función del número de espectros promediados, para todas las muestras de producción sin molturar (1), de producción molturadas (2), sintéticas con sorbitol no molturado (3) y sintéticas con sorbitol molturado (4). La línea punteada muestra la diferencia espectral media para el ruido

6.3.2. Desarrollo del método de cuantificación

6.3.2.1. Estudio previo con muestras sintéticas

En primer lugar, se compararon las capacidades predictivas de modelos desarrollados, por un lado, con muestras con tamaños de partícula diferentes y, por otro, con muestras con tamaños de partícula similares. Para ello se usaron únicamente las muestras sintéticas. Así pues, se disponía de dos conjuntos de calibración: uno con 26 muestras sintéticas preparadas con el sorbitol no molido (C1) y otro con 26 muestras sintéticas preparadas con el sorbitol molido (C2). Se utilizó el espectro promedio de los 15 registrados, para asegurar que éste era representativo de la muestra, así como el pretratamiento espectral segunda derivada y el intervalo de longitudes de onda 1130-2470nm. En ambos modelos se escogió como número óptimo de componentes principales tres.

En la figura 6.11 se muestran las calibraciones obtenidas con ambos tipos de muestras. Como se puede observar, los parámetros de la recta de calibración con muestras que presentan heterogeneidad de tamaños de partícula son considerablemente peores que los de la calibración con muestras que presentan homogeneidad de tamaños de partícula. En este último caso los resultados NIR obtenidos son más parecidos a los valores de referencia, similitud que se refleja con valores RMSEC más pequeños, intervalos de confianza de los parámetros de la recta obtenida al representar el valor NIR frente al valor de referencia más pequeños y valor del coeficiente de correlación más próximo a la unidad.

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio se decidió trabajar únicamente con las muestras con tamaños de partícula similares.

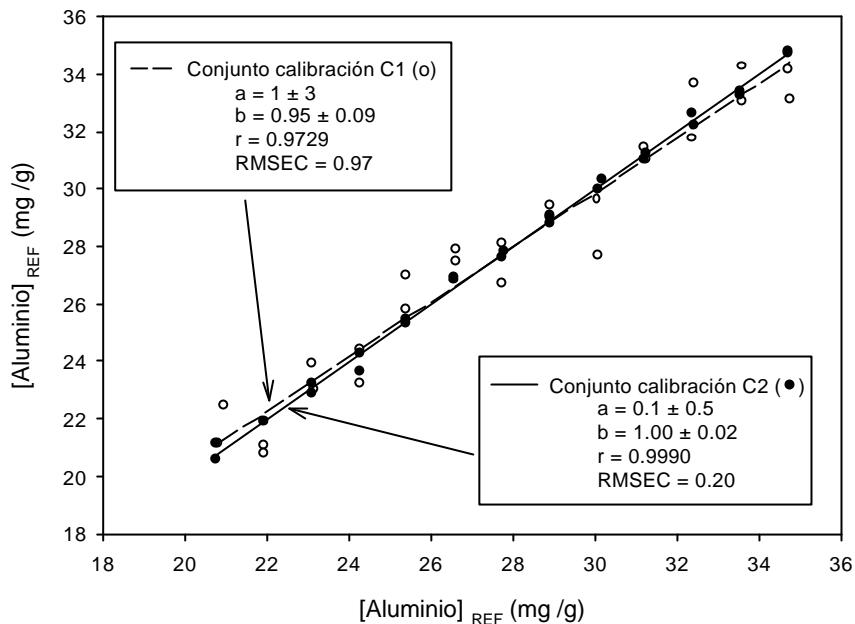


Figura 6.11. Representación de los resultados NIR frente a los valores de referencia para los dos tipos de muestras sintéticas. Las pendientes y ordenadas en el origen se muestran con un intervalo de confianza del 95%. (●)Calibración con muestras con sorbitol molturado. (○) Calibración con muestras con sorbitol no molturado.

6.3.2.2. Calibración con muestras molturadas

Para construir el modelo de calibración se utilizaron las muestras sintéticas preparadas con el sorbitol molturado y las muestras de producción molturadas siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Como se ha comentado en capítulos anteriores, las muestras de producción introducen al modelo la variabilidad del proceso de producción, mientras que las sintéticas sirven para extender el estrecho margen de concentración que presentan las primeras.

Las 36 muestras de producción totales de las que se disponía fueron fabricadas a lo largo de un período de 11 meses y fueron suministradas en 5 tandas. Los modelos de calibración, desarrollados a medida que llegaban las muestras, provocaban errores sistemáticos en la predicción de las nuevas muestras, por lo que era necesario desarrollar nuevos modelos donde éstas hubieran sido incluidas. A partir de la tercera tanda de muestras este efecto dejó de apreciarse. Al calcular un PCA de los espectros de segunda

derivada de todas las muestras de producción (figura 6.12) se observó claramente que, así como las muestras pertenecientes a las tres primeras tandas presentaban una variabilidad diferente entre ellas (tres grupos claramente definidos), la variabilidad de las pertenecientes a las dos últimas tandas era explicada por las muestras anteriores.

De esta forma el conjunto de calibración final estaba formado por 27 muestras totales, 16 sintéticas y 11 de producción. Las muestras sintéticas cubrían perfectamente el intervalo de concentraciones deseado. Las muestras de producción se seleccionaron a partir de un PCA de sus espectros en 2^a derivada, escogiendo aquellas que presentaban la máxima variabilidad en la gráfica del primer score frente al segundo²¹ a la vez que pertenecían a las tres primeras tandas. En la figura 6.12 se indican las muestras que fueron seleccionadas. El modelo se construyó con el espectro promedio de los 15 registrados para cada muestra, para asegurar que éste era representativo de la misma.

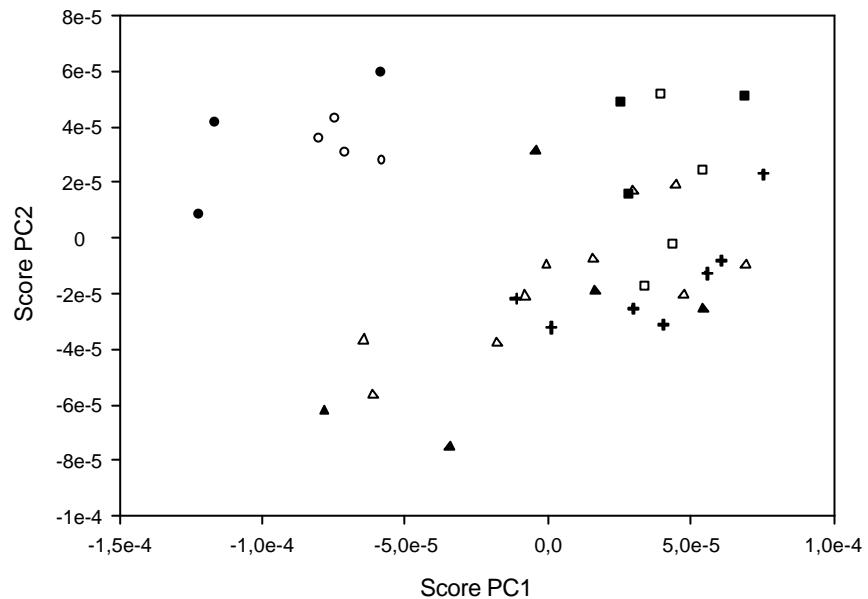


Figura 6.12. Representación del primer score frente al segundo en el análisis en componentes principales de las muestras de producción. (■, □) Muestras tanda 1. (●, ○) Muestras tanda 2. (▲, △) Muestras tanda 3. (+) Muestras tandas 4 y 5. (●, ▲, ■) Muestras de calibración. (○, △, □, +) Muestras de predicción.

Se ensayaron diferentes modelos PLSR, utilizando diferentes intervalos de longitudes de onda y empleando, en todos los casos, el modo espectral 2^a derivada. Los mejores resultados se obtuvieron usando el intervalo espectral 1130-2450nm y 6 componentes principales, con un valor de RMSEC de 0.25.

6.3.2.3. Predicción de las muestra sintéticas y de producción no utilizadas en la calibración

Tal y como se ha comentado anteriormente, los espectros obtenidos al promediar 6 o más espectros se podían considerar representativos de la muestra, mientras que el obtenido a partir de un promediado de 3 espectros no.

Dado que de cada muestra se poseía un total de 15 espectros, se pudo realizar un estudio que permitió observar cómo afectaba el número de espectros promediados (3 o 6) en la cuantificación de las muestras.

Puesto que los 15 espectros de cada muestra se registraron en 5 bloques de tres replicados, se puede decir que de cada muestra se obtienen 5 espectros promedio de 3 espectros y 10 espectros promedio de 6 espectros.

6.3.2.3.1. Espectros promedio de 3 espectros

Al predecir los 5 espectros de cada muestra se calculó un valor medio de la predicción y una desviación estándar de la misma. Al representar el valor medio NIR frente al valor de referencia para cada muestra, se obtuvo una recta que pasaba por el origen y tenía pendiente unidad. Al añadir, en esta representación, la desviación estándar para cada muestra, se obtuvo información sobre la dispersión de los resultados de cuantificación, que a la vez nos permitió evaluar cuáles eran los valores de cuantificación que se podían esperar para cada muestra.

En la figura 6.13 se muestra el valor medio de predicción y su desviación estándar para cada muestra del conjunto de predicción. Además se representan también las líneas correspondientes a un error absoluto de 2mg/g en la cuantificación del aluminio de las muestras.

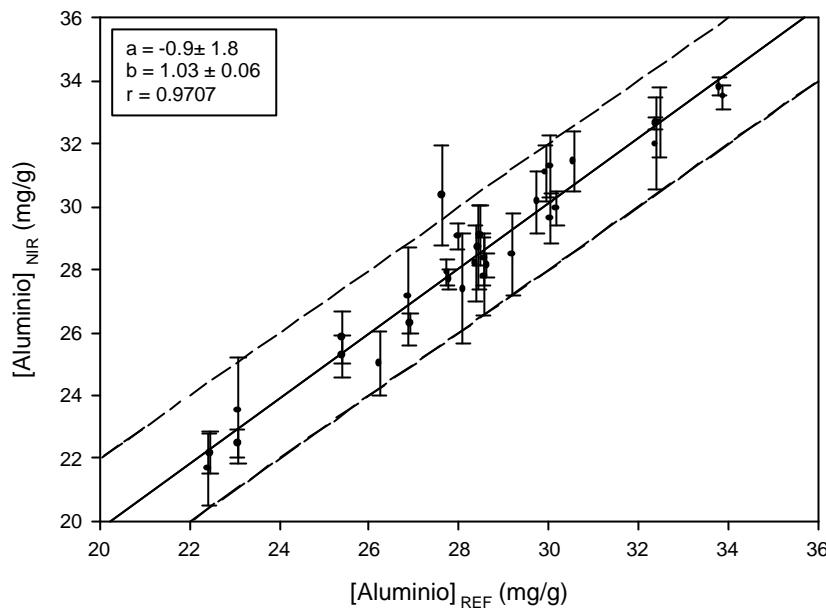


Figura 6.13. Representación de la concentración media de aluminio obtenida por el método NIR frente al método de referencia para cada muestra del conjunto de predicción, junto con la desviación estándar de la misma. La línea punteada muestra un error absoluto de 2mg/g. Espectros promedio de 3 espectros.

En la figura 6.14 se puede observar el error relativo frente a la concentración de referencia obtenido para cada uno de los 5 espectros de cada muestra del conjunto de predicción, obteniéndose en algún caso un error superior al 10%.

Como de cada muestra se poseían 5 replicados, se pudo calcular un coeficiente de variación (CV%) de los valores de predicción obtenidos para cada una de ellas. El coeficiente de variación medio obtenido para todas las muestras fue de 3.2% (valores entre 0.5 y 7.1%).

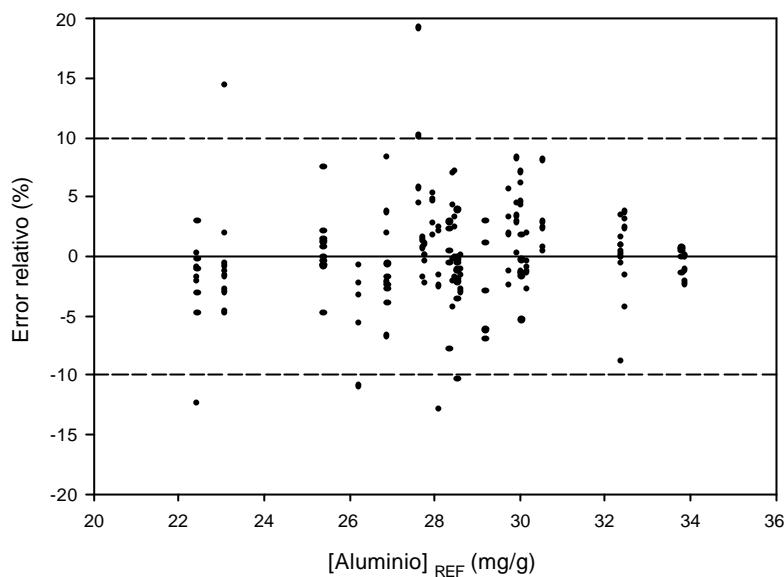


Figura 6.14. Error relativo frente a la concentración de referencia para cada uno de los 5 espectros (promedio de 3) de las muestras del conjunto de predicción. La línea punteada muestra un error relativo de un 10%.

6.3.2.3.2. Espectros promedio de 6 espectros

Para los espectros promedio de 6 se realizó el mismo estudio que para los espectros promedio de 3. De esta manera, en la figura 6.15 se muestra el valor medio de predicción y su desviación estándar para cada muestra del conjunto de predicción y en la figura 6.16 se puede observar el error relativo frente a la concentración de referencia obtenido para cada uno de los 10 espectros de cada muestra del conjunto de predicción. El coeficiente de variación medio que se obtuvo en este caso fue de 1.8% (valores entre 0.3 y 4.0%).

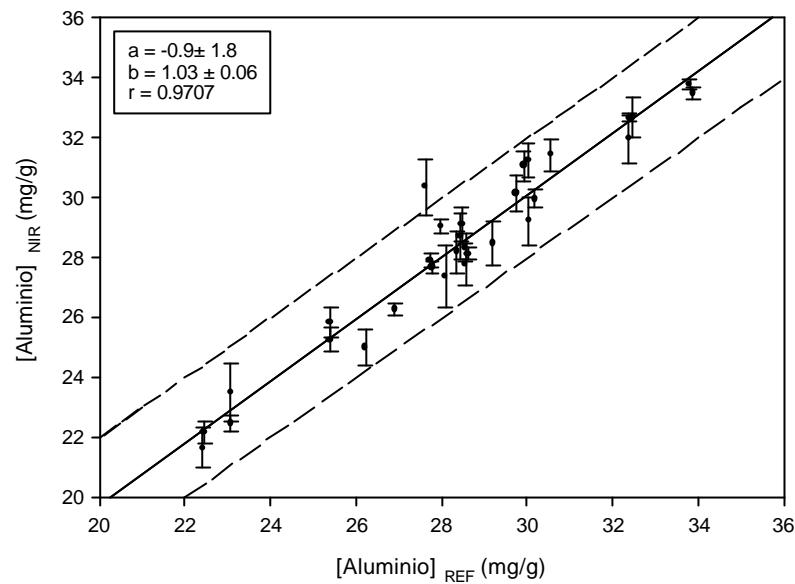


Figura 6.15. Representación de la concentración media de aluminio obtenida por el método NIR frente al método de referencia para cada muestra del conjunto de predicción, junto con la desviación estándar de la misma. La línea punteada muestra un error absoluto de 2mg/g. Espectros promedio de 6 espectros.

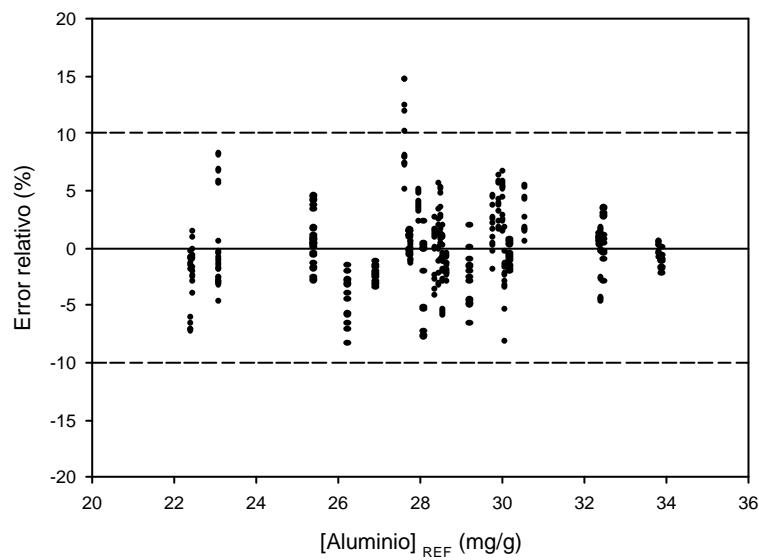


Figura 6.16. Error relativo frente a la concentración de referencia para cada uno de los 10 espectros (promedio de 6) de las muestras del conjunto de predicción. La línea punteada muestra un error relativo de un 10%.

6.3.2.3.3. Comparación de los resultados obtenidos al promediar 3 o 6 espectros

El hecho de promediar más espectros proporciona una menor dispersión de los resultados. Esto se puede observar en el coeficiente de variación, obteniéndose un valor de casi la mitad al promediar 6 espectros (CV=1.8%) en lugar de 3 (CV=3.2%).

Asimismo, al promediar 6 espectros es previsible que los valores de cuantificación para todas las muestras, excepto en un caso, presenten un error absoluto inferior a 2mg/g, tal y como se observa en la figura 6.15. De la misma forma, en la figura 6.16 se muestra que todos los errores relativos de cuantificación son inferiores a un 10%, excepto en una muestra, siendo éste el error aceptado para la aprobación del contenido en aluminio en este fármaco.

De esta manera, tanto desde un punto de vista espectral como cuantitativo se llegó a la misma conclusión. Para poder garantizar la obtención de espectros representativos de las muestras y conseguir así cuantificaciones correctas (con errores relativos inferiores a un 10%) era necesario registrar y promediar un mínimo 6 espectros por cada muestra.

6.4. CONCLUSIONES

El tamaño de partícula es uno de los parámetros físicos que más afecta al espectro NIR. Al trabajar con muestras con tamaños de partícula dispares pueden surgir problemas de falta de reproducibilidad espectral, es decir, se produce un aumento de la variabilidad entre los diferentes espectros.

Este hecho puede provocar errores al llevar a cabo el análisis de la muestra, ya que el espectro obtenido podría no ser representativo de la misma. Una manera de minimizar este problema es realizar una molituración previa de la muestra, aunque con ello no se asegure una completa solución. En este caso, es necesario registrar y promediar un número determinado de espectros, realizando un estudio que permita afirmar desde un punto de vista espectral y, en consecuencia, cuantitativo, que el número de espectros promediados es suficiente para garantizar su representatividad y que un aumento en el número de registros no aporta una mejora en los resultados.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

1. C. Faulí, *Tratado de Farmacia Galénica*, Ed. Luzán 5, S.A., Madrid, 1993.
2. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, F. González, R. Pous, *Near Infra-red spectroscopy, (Bridging gap between data analysis and NIR applications)*, K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes, A. Tandberg, Ellis Horwood, Chichester, 1992
3. T. Burger, J. Kuhn, R. Caps, J. Fricke, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 309, 1997.
4. P. Flake, I. Gill, C.N. Luscombe, D.R. Rudd, J. Waterhouse, U.A. Jayasooriya, *Analyst*, **123**, 2043, 1998.
5. M.F. Devaux, N. Nathier-Dufour, P. Robert, D. Bertrand, *Appl. Spectroscopy*, **49**, 84, 1995.
6. A.J. O'Neal, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst*, **123**, 2297, 1998.
7. A.J. O'Neal, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst*, **124**, 33, 1999.
8. E.W. Ciurczak, R.P. Torlini, M.P. Demkowicz, *Spectrosc.*, **1**, 36, 1986.
9. J.L. Ilari, H. Martens, T. Isaksson, *Appl. Spectrosc.*, **42**, 722, 1988.
10. M.C. Pasikatan, J.L. Steele, C.K. Spillman, E. Haque, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **9**, 153, 2001.
11. L.S. Aucott, P.H. Garthwaite, S.T. Buckland, *Analyst*, **113**, 1849, 1988.
12. J.P. Nielsen, D. Bertrand, E. Micklander, P. Courcoux, L. Munck, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **9**, 275, 2001.
13. A.I. Vogel, *A textbook of quantitative inorganic analysis*, 3rd Edition, London, 1961.
14. The Merck Index, 11th edition, Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey, 1989.
15. O. Berntsson, L.-G Danielsson, M.O. Johansson, S. Folestad, *Anal. Chim. Acta*, **419**, 45, 2000.
16. H. Mark, J. Workman, *Anal. Chem.*, **58**, 1454, 1986.
17. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
18. D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
19. B.G Osborne, T. Fearn, P.H. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, 2nd ed., Longman Scientific & Technical, Harlow, Essex, England, 1993.

- 20 M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, J. Pagès, *Anal. Chim. Acta*, **384**, 207, 1999.
- 21 M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. Maspoch, *J. Pharm. Sci.*, **88**(5), 551, 1999.