

## **7. Evolución a lo largo del tiempo de los valores de predicción de un modelo de calibración por espectroscopia en el infrarrojo próximo**

---

## 7.1. INTRODUCCIÓN

El espectro NIR depende de las características físicas y químicas propias de cada muestra, por lo que cualquier factor que pueda alterar alguna de éstas características puede afectar también a los valores de predicción del modelo de calibración desarrollado. Esto obliga a que durante la etapa de modelado sea necesario tener en cuenta todas las fuentes de variación posibles de las muestras. No obstante, no siempre es posible conocer variabilidades futuras. Por ejemplo, ¿qué ocurre cuando se altera un proceso de fabricación, o cuando las muestras tienen un contenido de agua diferente a las producidas durante la etapa de desarrollo del modelo de calibración?.

En principio, una vez desarrollado y validado un modelo de calibración, éste ya se puede utilizar como método de control en la industria farmacéutica. Sin embargo, es importante llevar a cabo un estudio de los resultados obtenidos a lo largo del tiempo. De esta manera se puede garantizar su calidad. En caso de que se detectasen errores en los valores predichos por el modelo, sería necesario realizar un estudio exhaustivo para poder determinar las causas de los mismos y corregirlos en la medida de lo posible.

Desde un punto de vista teórico, antes de estudiar si los resultados obtenidos en un análisis son erróneos, se debería examinar si el espectro a partir del cual se obtienen estos resultados es significativamente diferente de los de calibración. Es decir, antes de obtener un valor numérico a partir de un espectro sería necesario recurrir a un método que nos permitiera discernir si el espectro es o no diferente a los de la calibración, ya que en caso negativo no tiene sentido llevar a cabo la cuantificación puesto que, obviamente, va a proporcionar un valor erróneo. Existen diferentes procedimientos para realizar este estudio, como el diagrama de control de  $T^2$  o del residual espectral  $Q^{1-3}$ , entre otros. En análisis farmacéutico esto ya está implementado en rutina, no directamente mediante el cálculo de un parámetro de los anteriormente citados, sino a través de una identificación y/o cualificación del espectro de la muestra en cuestión. No obstante, así como al cualificar se realiza un control total y absoluto del espectro, siendo posible detectar cualquier pequeña alteración espectral, al llevar a cabo únicamente una identificación, el control no es tan completo, requiriéndose un estudio posterior.

Como se ha comentado, cualquier alteración que se produzca en el espectro se traduce en una alteración en los valores predichos por el modelo de calibración. La variación espectral puede producirse por distintas causas, como la modificación de los protocolos de registro espectral, la modificación del protocolo de pretratamiento de la muestra,

actuaciones sobre el espectrofotómetro o cambios en la composición o proceso de manufacturación del preparado.

Cuando se producen variaciones en el espectro que no pueden ser corregidas, ¿es necesario volver a desarrollar y validar el modelo de calibración teniendo en cuenta esta nueva fuente de variabilidad espectral?.

Esta situación es similar a la que se presenta cuando surge la necesidad de transferir un modelo de calibración de un instrumento a otro<sup>4-7</sup>. En este caso, la señal registrada con los dos instrumentos puede presentar diferencias, ya sea por desplazamientos en las longitudes de onda y/o por variaciones en las intensidades medidas, por lo que es imposible utilizar directamente la calibración establecida en un instrumento para cuantificar espectros de muestras medidos con otro instrumento. Para solventar el problema, en la bibliografía, se han sugerido las siguientes soluciones<sup>8</sup>:

- Desarrollar calibraciones más robustas que se puedan transferir sin ninguna estandarización, ya sea mediante un pretratamiento espectral apropiado que reduzca la variabilidad espectral entre instrumentos<sup>5,6,9,10</sup> o bien midiendo alguna o todas las muestras de calibración en varios instrumentos.
- Ajustar la calibración existente para que trabaje de forma adecuada con el nuevo instrumento<sup>11</sup>.
- Corregir matemáticamente los espectros registrados en un instrumento de forma que puedan ser utilizados en calibraciones establecidas con otro instrumento<sup>12-15</sup>.

De todas las posibles soluciones expuestas para resolver la aparición de pequeñas variaciones espectrales, ya sea por el cambio de instrumento de medida o por el cambio de alguna de las propiedades de la muestra, la más sencilla es la que realiza un ajuste del modelo de calibración<sup>16,17</sup>, ya que para ello sólo se requiere un cierto número de muestras analizadas por el método de referencia<sup>8</sup>. Además, algunos softwares comerciales, como por ejemplo el Vision<sup>18</sup>, incorporan rutinas que permiten llevar a cabo este ajuste de forma casi automática.

No hay que olvidar que siempre que se realice una modificación del método de análisis es necesario efectuar una revalidación, para demostrar que éste continúa siendo suficientemente fiable. El grado de revalidación requerido dependerá de la naturaleza de los cambios realizados<sup>19</sup>.

En este capítulo se realiza un estudio de la evolución, a lo largo de dos años, de los valores de predicción de un modelo de calibración aplicado a un preparado farmacéutico que se presenta en dos formas de granulación diferente.

## **7.2. EXPERIMENTAL**

### **7.2.1. Instrumentación y software**

El registro de los espectros se ha llevado a cabo con el espectrofotómetro NIRSystem 5000 equipado con el módulo de sonda de fibra óptica, el cual al principio del periodo estudiado estaba controlado por el software NSAS versión 3.52. y posteriormente fue sustituido por el software Vision versión 2.22.

La regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR) y la predicción de los espectros de las muestras con el modelo de calibración original se ha realizado con el programa Unscrambler versión 7.5.

El ajuste del modelo de calibración y la predicción de los espectros de las muestras con el modelo de calibración corregido se han efectuado con el software Vision versión 2.22.

### **7.2.2. Descripción de las muestras**

El preparado farmacéutico se presenta en forma de granulado con un contenido de principio activo en el producto acabado de 200mg/g. Con la misma composición química se preparan dos granulados de tamaño de partícula diferente. Estas diferentes formas físicas se identifican con el código de la muestra.

Se disponía de dos conjuntos de espectros registrados a lo largo de dos años después de la puesta a punto y validación del modelo de calibración. Cada uno de los conjuntos pertenecía a un tipo de granulación. Un conjunto estaba compuesto de 304 espectros registrados en un periodo de 24 meses, y el otro por 182 espectros registrados en un periodo de 21 meses.

### **7.2.3. Registro de los espectros NIR**

Dado que el preparado farmacéutico se presentaba en forma de dos granulados con tamaño de partícula diferente y los espectros NIR se ven afectados por los distintos tamaños de partícula, las muestras se molturaban para su análisis. Cuando se desarrolló el modelo de calibración las muestras se molturaban a mano. En cambio después, para

facilitar y sistematizar la molturación, las muestras se molturaban mediante un molinillo eléctrico, siguiendo un protocolo que la empresa farmacéutica estableció por su cuenta.

La muestra molturada se analiza directamente, sin realizar ningún otro tratamiento, utilizando la sonda de fibra óptica. Cada espectro registrado es el promedio de 32 scans en el intervalo de longitudes de onda de 1100 a 2498nm. De cada muestra se registran tres espectros, removiéndola antes de cada medida, utilizando, en los cálculos posteriores, el espectro promedio de los tres replicados.

## **7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.3.1. Antecedentes**

En el año 1997 se puso a punto y se validó un modelo de calibración para la cuantificación del principio activo del preparado farmacéutico. El modelo de calibración utilizaba como método de regresión el PLSR, en el intervalo espectral 1100-1850nm, usando 5 componentes principales y utilizando como pretratamiento espectral la primera derivada. La matriz de calibración estaba formada por un conjunto de 37 muestras totales, 27 de las cuales eran muestras dopadas y el resto muestras de producción. Algunas muestras se registraron en días diferentes para incluir en la calibración la variabilidad debida al factor día. El conjunto de predicción estaba formado por 21 muestras (11 dopadas y 10 de producción). Los errores de predicción (RSEP) que se obtuvieron fueron de 1.3% para las muestras del conjunto de calibración y de 1.2% para las muestras del conjunto de predicción.

### **7.3.2. Evolución de los valores de predicción**

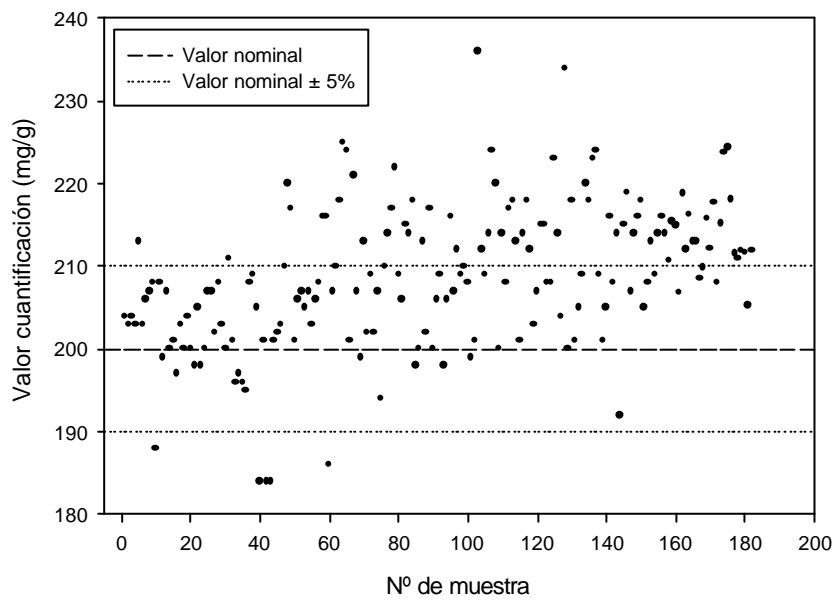
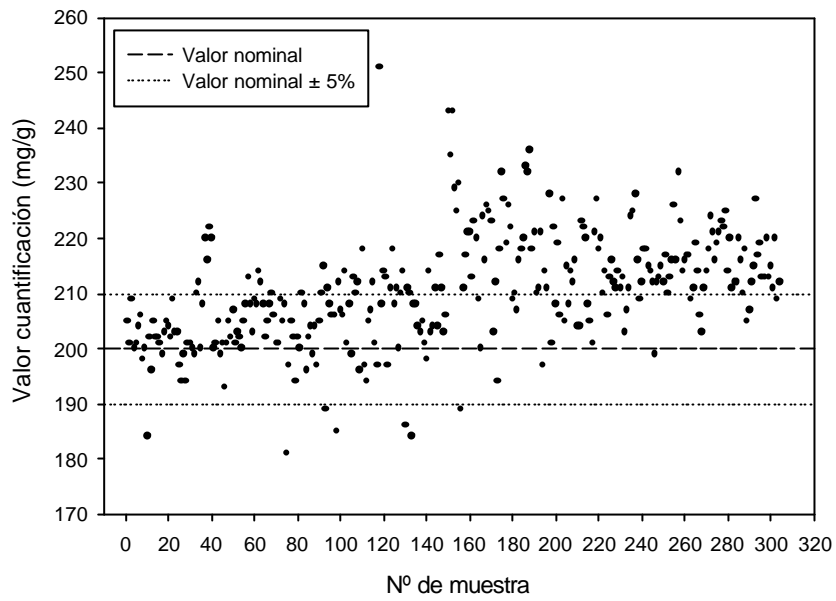
Todos los espectros disponibles de los dos conjuntos de muestras se cuantificaron con el modelo de calibración original. Como se puede observar en la figura 7.1, tanto para las muestras del conjunto 1 como para las del conjunto 2, existe una tendencia a producir valores de cuantificación por exceso respecto al valor nominal, especialmente a partir de un determinado momento (aproximadamente muestra número 150 para el conjunto 1 y muestra número 100 para el 2).

Una manera de analizar la evolución de los resultados es realizar un suavizado de los mismos, mediante la aplicación de un filtro de ventana móvil. De esta manera se reduce la dispersión entre los resultados de forma que es más fácil apreciar cualquier efecto que se produzca. En la figura 7.2 se representa la evolución de los resultados cuando se les aplica un filtro de ventana móvil de 5 puntos. Para las muestras del conjunto 1 se observa un pequeño salto a partir de la muestra 50 y un segundo salto, cuantitativamente más importante, a partir de la muestra 150. Sin embargo, para las muestras del conjunto 2, a pesar de que también se observan dos saltos, el primero es el cuantitativamente más importante.

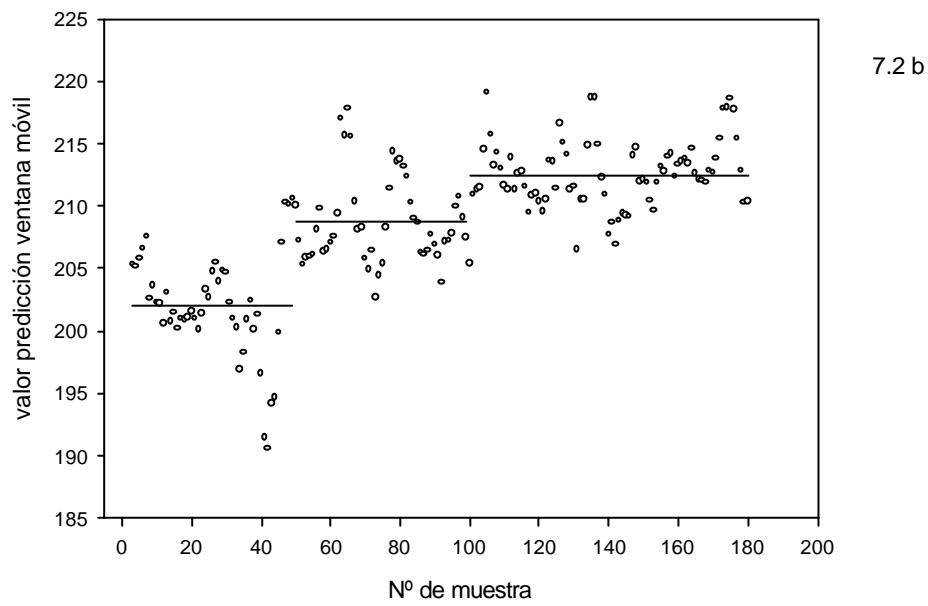
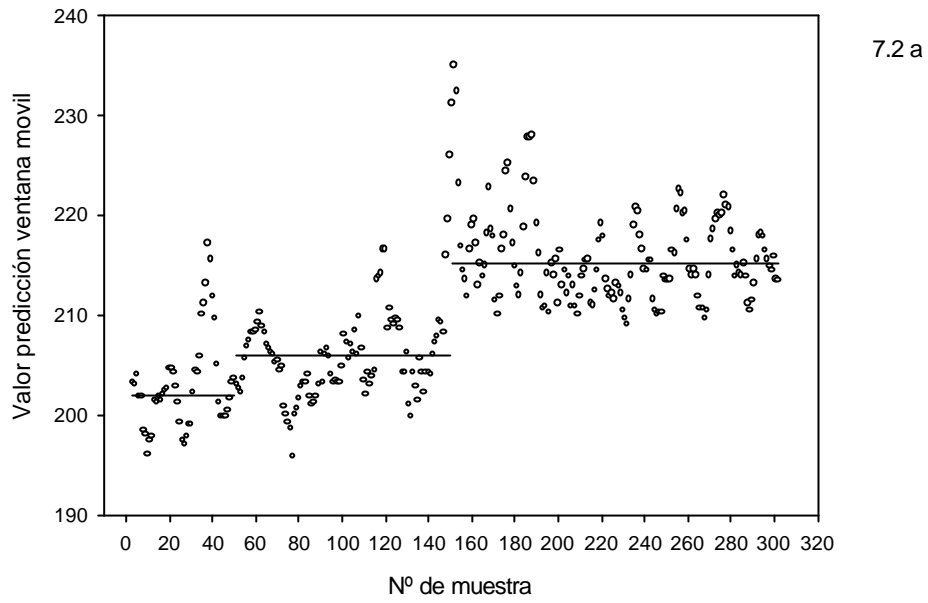
Otro tipo de diagrama de control, el diagrama de sumas acumuladas (DSA)<sup>20</sup>, permite comprobar la exactitud de un determinado método. Para ello, se realiza la suma de las desviaciones de los valores obtenidos por dicho método respecto al valor objetivo de cuantificación, acumuladas de atrás hacia adelante. Si el proceso funciona correctamente, las desviaciones positivas y negativas son igualmente probables, por lo que la suma acumulada debería oscilar alrededor de cero.

En la figura 7.3 se muestran los diagramas de sumas acumuladas para los 2 conjuntos de muestras. En ambos casos se ha tomado como valor objetivo de cuantificación la media de los primeros 20 valores de predicción, eliminando los valores que se encuentran fuera de los límites de tolerancia ( $\pm 5\%$  del valor de especificación)<sup>21</sup>, es decir, 202.3mg/g para las muestras del conjunto 1 y 203.2mg/g para las del 2. Para el conjunto de muestras 1 se puede observar que se producen 3 tendencias. En la primera, los valores de la suma acumulada se distribuyen más o menos aleatoriamente alrededor del 0. A partir de, aproximadamente, la muestra 50 el valor de la suma es siempre positivo, pero bastante constante, hasta la muestra 150, momento en que va aumentando de forma prácticamente regular. Sin embargo, para el conjunto de muestras 2 sólo se advierten 2 tendencias. Inicialmente los valores de la suma acumulada se distribuyen alrededor del 0 hasta aproximadamente la muestra 60, a partir de la cual va aumentando de forma bastante regular.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que, a pesar de que algunas de las muestras estudiadas, eran claramente outliers (sus valores de predicción se alejaban de la tendencia de sus muestras cercanas), se tuvieron en cuenta tanto para calcular el diagrama de sumas acumuladas como al realizar el suavizado de los resultados mediante la aplicación de un filtro de ventana móvil.

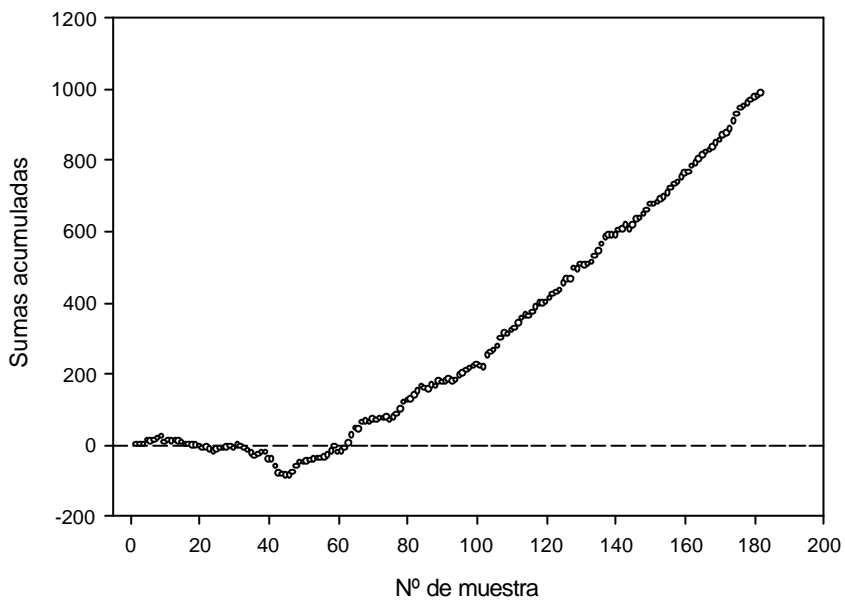
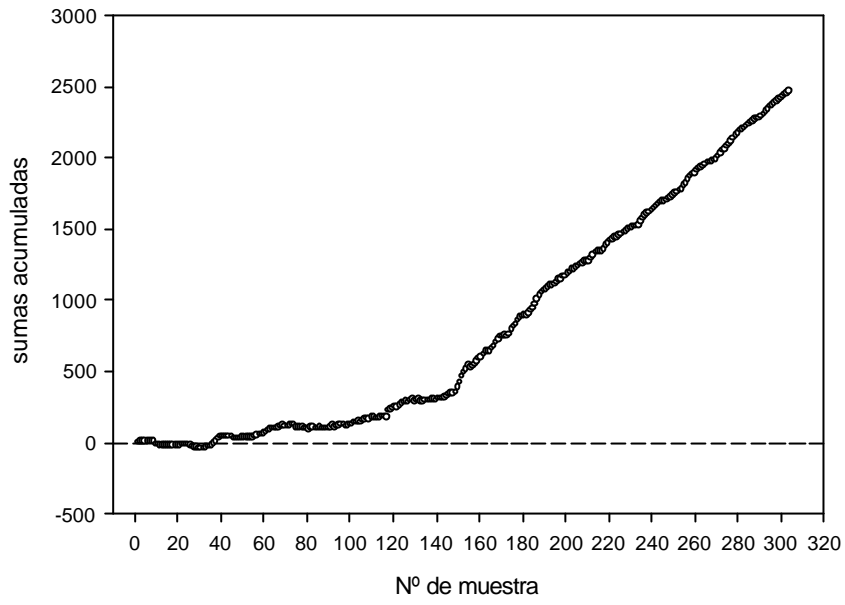


**Figura 7.1.** Valores de cuantificación de las muestras de producción. (a) Muestras del conjunto 1. (b) Muestras del conjunto 2.



**Figura 7.2.** Suavizado de los valores de cuantificación de las muestras de producción mediante un filtro de ventana móvil de 5 puntos. (a) Muestras del conjunto 1. (b) Muestras del conjunto 2.





**Figura 7.3.** Diagrama de sumas acumuladas para las muestras de producción.  
(a) Muestras del conjunto 1. (b) Muestras del conjunto 2.

### 7.3.3. Estudio de las posibles causas de la variación en los valores de predicción

En primer lugar se comparó el espectro de una muestra analizada en el año 2000, siguiendo el mismo protocolo de pretratamiento de la muestra utilizado cuando se puso a punto el método, con los espectros de las muestras utilizadas para la preparación del modelo de calibración (figura 7.4). Como se puede observar, las mayores diferencias entre los dos espectros se encuentran en:

- La zona de absorción del agua (1450 y 1900nm).
- La zona de la anomalía de Woods (1500nm)<sup>22</sup>.
- La zona alta del espectro (2000-2200nm).

A la vista de lo anterior se procedió a preparar un nuevo modelo de calibración utilizando los espectros de la calibración original, pero excluyendo las zonas del mismo donde se presentan las máximas diferencias espectrales. Es decir, el intervalo espectral utilizado fue de 1100 a 1360 y de 1600 a 1850nm.

Se cuantificaron todos los espectros con el modelo sin las bandas correspondientes al agua y a la anomalía de Woods, identificado en lo sucesivo como modelo reducido. Se estudió tanto el valor de predicción encontrado como el valor del residual espectral  $Q$ .

El valor del residual  $Q$  es un parámetro que indica la falta de ajuste de los datos espectrales en un modelo PLSR, es decir, la variabilidad no incluida en el modelo.

Para una muestra  $i$ , el parámetro  $Q_i$  se calcula a partir del residual  $\mathbf{e}_i^T$  (fila  $i$  de la matriz  $E$  de residuales) y su vector transpuesto  $\mathbf{e}_i$ ; a partir de la siguiente expresión:

$$Q_i = \mathbf{e}_i^T \mathbf{e}_i \quad (7.1)$$

Las pautas encontradas se reproducen en los dos conjuntos de muestras estudiados, indicando que el problema es sistemático e independiente de la muestra analizada (figuras 7.5 y 7.6):

- La calibración original tiende a producir siempre valores de cuantificación mayores que la calibración reducida.

-La variación de los valores de predicción no es uniforme, sino que se detectan “saltos”. Estos saltos se pueden apreciar en ambos modelos de calibración, pero son menos importantes con el modelo reducido.

-Asimismo, en el parámetro Q también se producen saltos de forma más o menos equivalente a los que se producen en los valores de cuantificación<sup>a</sup>

A continuación se describirán estos “saltos” para las muestras del conjunto 1, aunque las conclusiones son extrapolables a las muestras del conjunto 2.

El primer salto representa el cambio cualitativo más importante en el ajuste espectral, aunque los valores de predicción no se ven demasiado afectados. Hasta ese momento el modelo de calibración funcionaba perfectamente, con un valor medio (50 espectros) de 203.0 mg/g para el modelo original y de 202.2mg/g para el modelo reducido. A partir de ese momento, y hasta que se produce el segundo salto, el ajuste espectral es notablemente peor. Esto indica que los espectros registrados son diferentes a los originales o que contienen más ruido. Los valores de predicción aumentan ligeramente, con un valor medio (100 espectros) de 205.9 mg/g para el modelo original y de 204.7 mg/g para el modelo reducido.

El segundo salto es cuantitativamente más importante. En este caso, el ajuste espectral no se ve tan afectado, pero sí los valores de predicción, que aumentan considerablemente, con un valor medio (154 espectros) de 215.8 mg/g para el modelo original y de 211.4 para el modelo reducido.

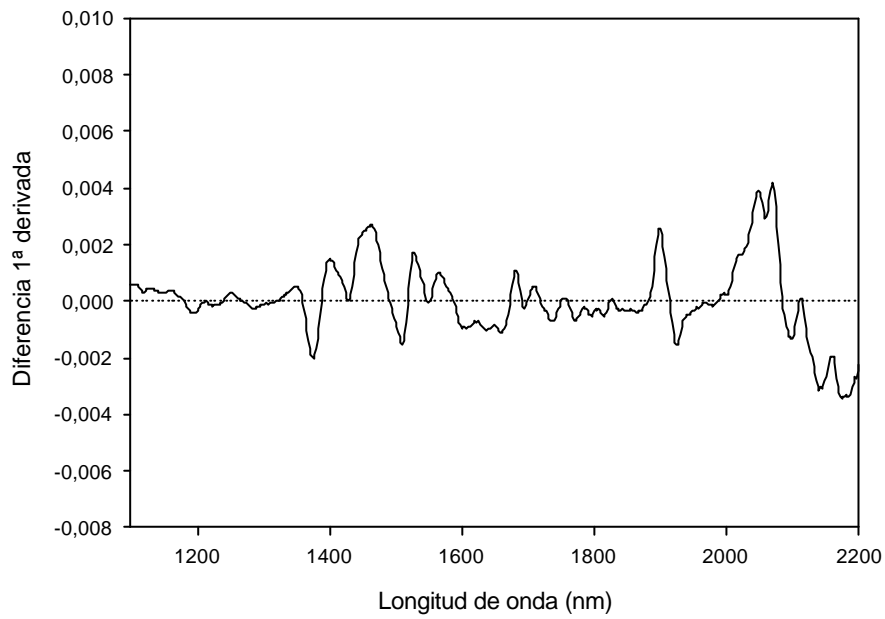
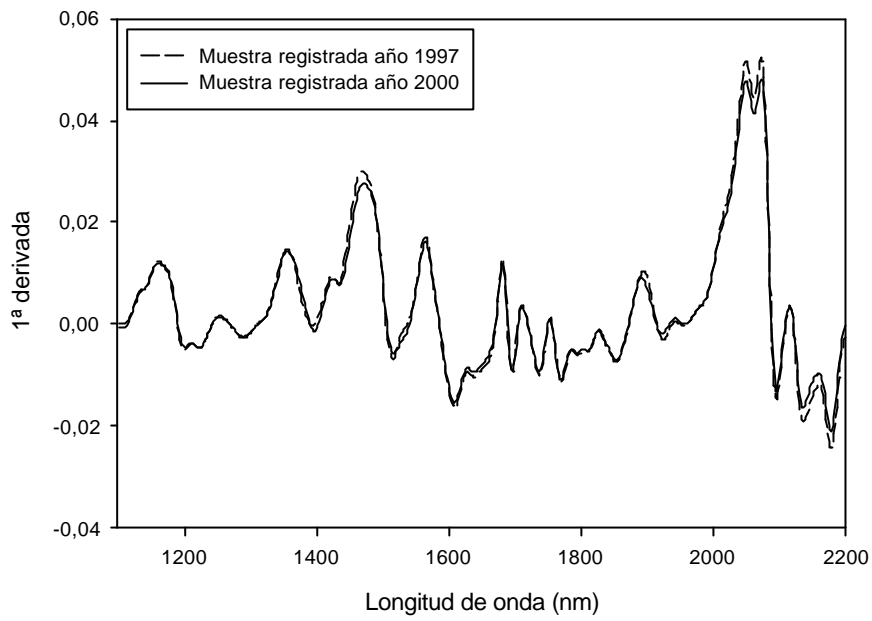
El modelo de calibración reducido parece menos afectado y más robusto que el que utiliza el espectro completo. Sin embargo, todavía se acusa la tendencia a obtener los valores de cuantificación por exceso respecto al valor nominal. Como se ha dicho anteriormente, en un primer momento las muestras de producción eran molturadas a mano. No obstante, posteriormente las muestras se molturaban mediante un molinillo eléctrico, para facilitar y sistematizar la molturación, con la consiguiente disminución del tamaño de partícula. Si se comparan los espectros de las últimas muestras molturadas con el molinillo eléctrico, con los espectros de las muestras utilizadas para la preparación del modelo de calibración (figura 7.7) se puede observar que las diferencias espectrales no se producen en

---

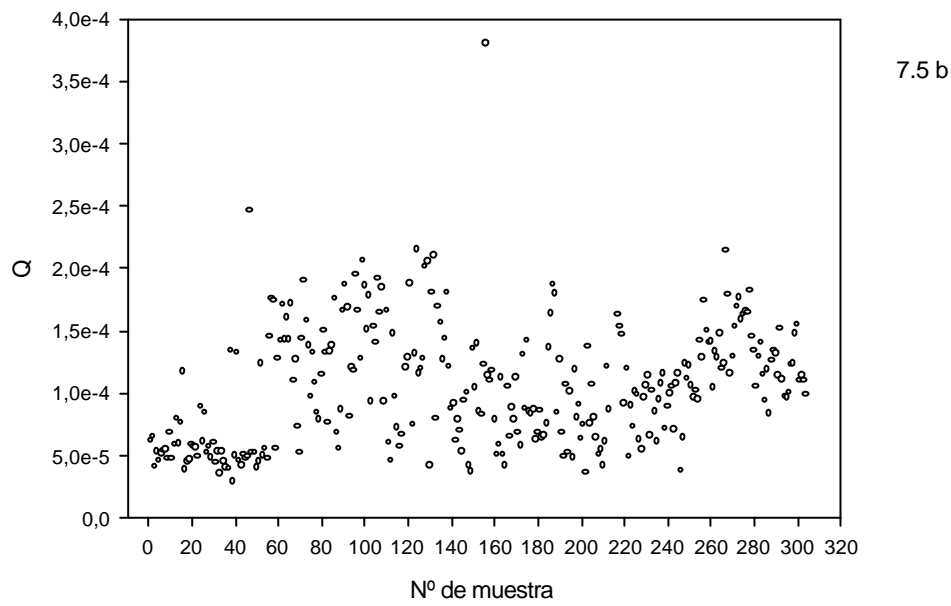
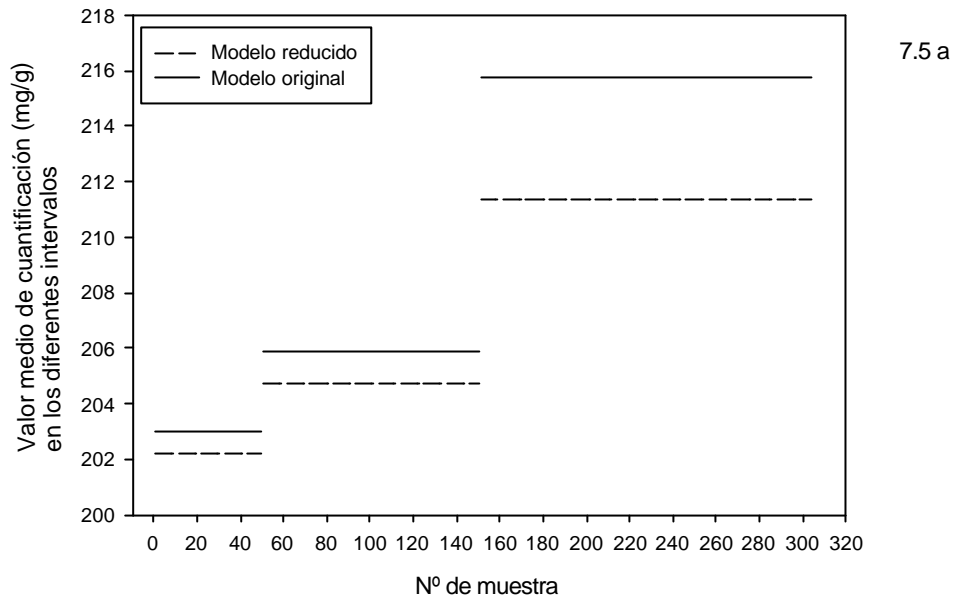
<sup>a</sup> En las figuras 7.5 y 7.6 sólo se muestra la evolución del parámetro Q para el modelo original. Para el modelo reducido, los valores siguen la misma tendencia, aunque disminuye su dispersión.

zonas concretas, sino que éstas son apreciables a lo largo de todo el intervalo espectral. Las intensidades de las bandas del espectro de las muestras molturadas con el molinillo eléctrico son menores que la de los espectros de las muestras molturadas a mano. En la figura 7.8 se muestra que una disminución de la intensidad de la banda implica un aumento en la concentración de principio activo, por lo que es lógico que las muestras molturadas con el molinillo se predigan siempre por exceso respecto al valor nominal.

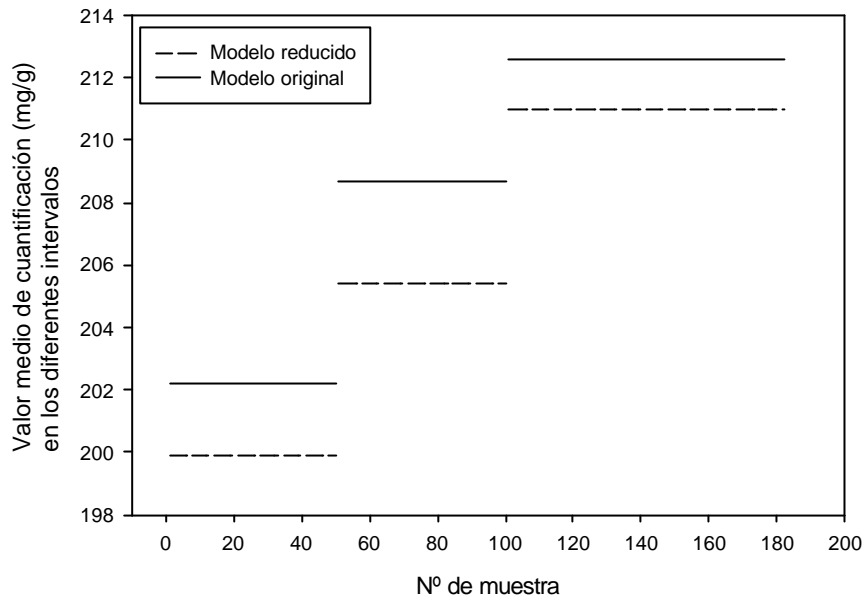
Analizando las fechas en las que se produjeron los diferentes saltos, las dos correspondían a un mantenimiento y limpieza del instrumento. Asimismo, la fecha del segundo salto también coincidió con el cambio de protocolo de molturación de las muestras.



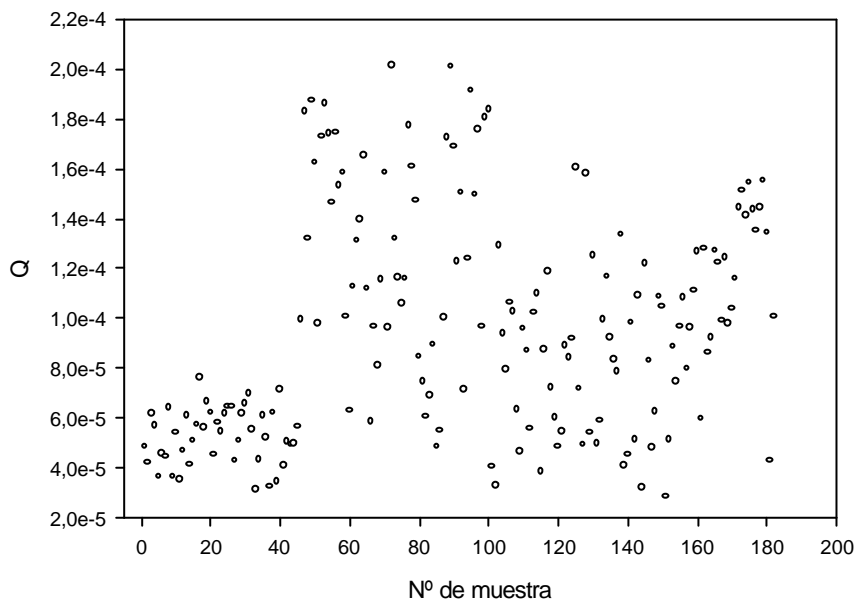
**Figura 7.4.** Comparación del espectro de una muestra registrada en el año 1997 con el espectro de una muestra registrada en el año 2000. (a) Espectros de 1ª derivada. (b) Diferencia de los dos espectros de 1ª derivada.



**Figura 7.5.** Cuantificación de las muestras del conjunto 1. (a) Variación del valor medio de cuantificación (mg/g) en los diferentes intervalos de tiempo. (b) Variación del parámetro Q para el intervalo de longitudes de onda del modelo original.

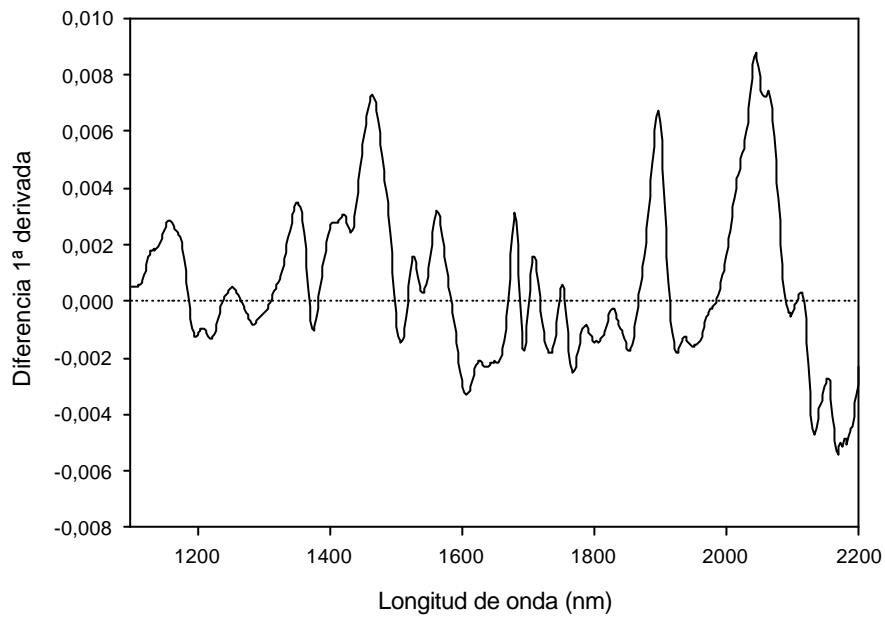
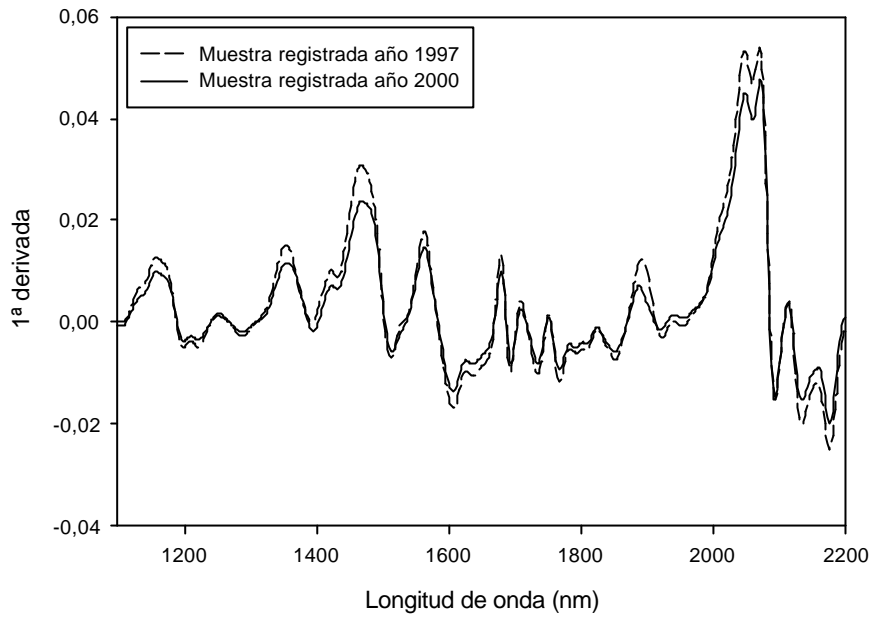


7.6 a



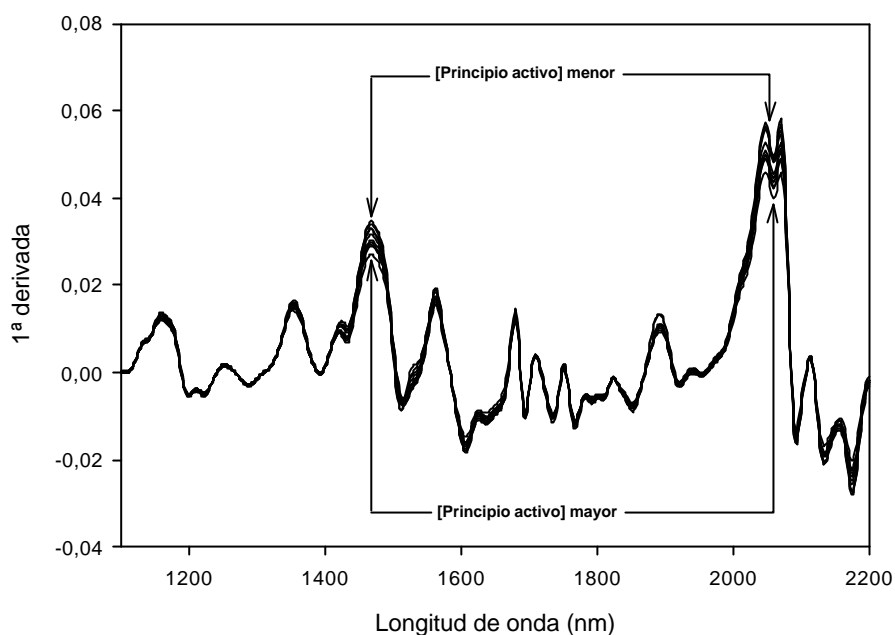
7.6 b

**Figura 7.6.** Cuantificación de las muestras del conjunto 2. (a) Variación del valor medio de cuantificación (mg/g) en los diferentes intervalos de tiempo. (b) Variación del parámetro Q para el intervalo de longitudes de onda del modelo original.



**Figura 7.7.** Comparación del espectro de una muestra, molturada a mano, registrada en 1997, con un espectro de una muestra, molturada con el molinillo eléctrico, registrada en el año 2000. (a) Espectros de 1ª derivada. (b) Diferencia de los dos espectros de 1ª derivada.





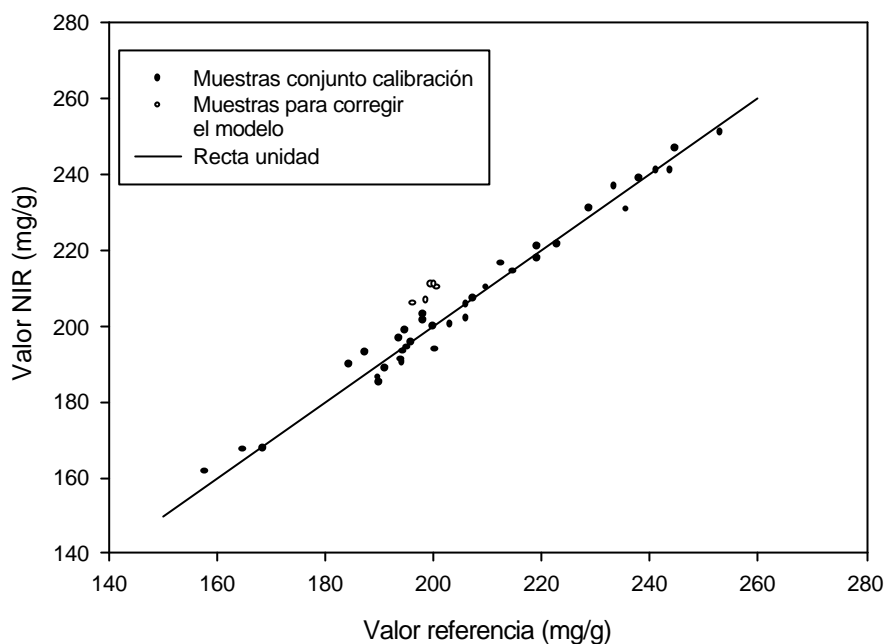
**Figura 7.8.** Variación de la intensidad de las bandas espectrales en función de la concentración de principio activo en las muestras dopadas.

### 7.3.4. Corrección del modelo de calibración

Como el modelo de calibración reducido es más robusto que el que utiliza el espectro completo, la corrección del modelo de calibración se llevará a cabo sobre éste.

Para corregir pequeñas variaciones espectrales es necesario disponer de un cierto número de muestras analizadas por el método de referencia. A partir de estas muestras es posible realizar una corrección del modelo de calibración mediante la introducción de un bias y/o el reajuste de la pendiente.

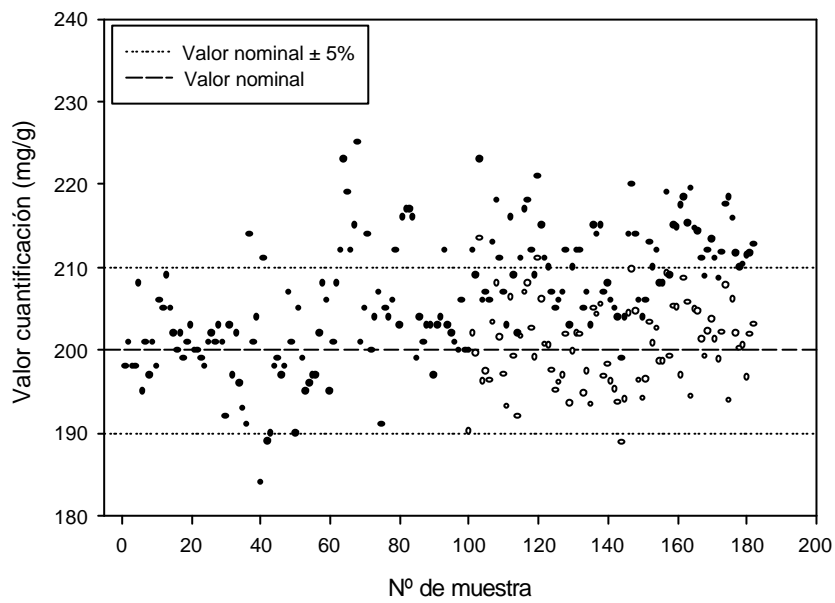
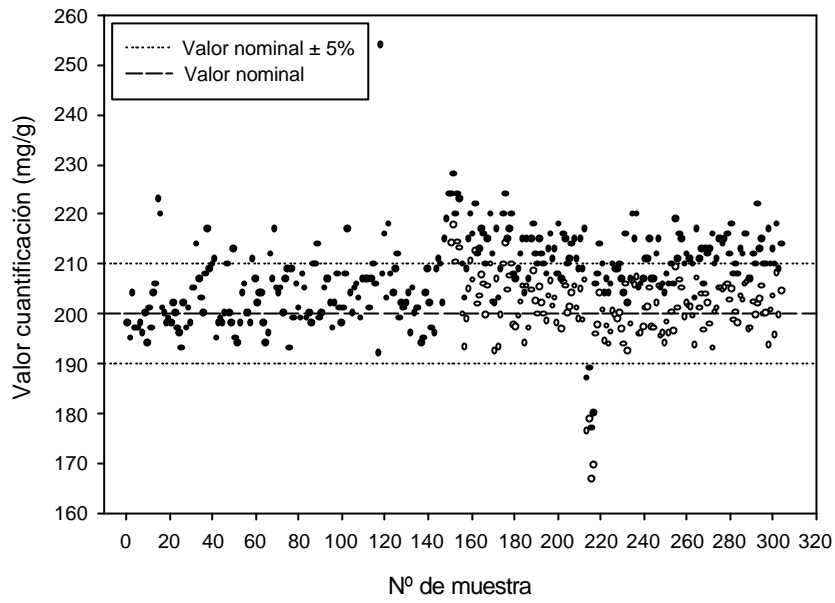
Para ello se utilizaron 5 muestras producidas y registradas en el año 2000. A partir de la representación del valor predicho frente al valor de referencia se puede llevar a cabo el ajuste del modelo. En la figura 7.9 se observa que, en la representación del valor predicho frente al valor de referencia, la diferencia fundamental entre las muestras del conjunto de calibración y las 5 muestras utilizadas para corregir el modelo de calibración es un pequeño bias, manteniendo una pendiente muy parecida a la original.



**Figura 7.9.** Representación del valor predicho frente al valor de referencia para las muestras del conjunto de calibración y para las 5 muestras utilizadas para corregir el modelo de calibración reducido.

#### 7.3.4.1. Corrección mediante la introducción de un bias.

En primer lugar se realizó una corrección del modelo de calibración mediante la introducción de un bias. El modelo corregido se aplicó a las últimas muestras analizadas, es decir, a partir de la muestra 150 para el conjunto 1 y de la 100 para el 2. En la figura 7.10 se muestran los valores de cuantificación para las muestras de ambos conjuntos, antes y después de aplicar la corrección. Como se puede observar, los valores de predicción de casi todas las muestras se encuentran dentro de los límites de tolerancia, distribuyéndose aleatoriamente alrededor del valor nominal.



**Figura 7.10.** Valores de cuantificación de las muestras de producción. (a) Muestras del conjunto 1. (b) Muestras del conjunto 2. (●) Modelo de calibración reducido. (○) Modelo de calibración corregido mediante la introducción de un bias.

#### *7.3.4.2. Corrección mediante la introducción de un bias y el ajuste de la pendiente.*

Cuando se dispone de un conjunto de muestras que cubren un intervalo de concentración lo suficientemente amplio, se puede realizar la corrección del modelo de calibración no únicamente con la introducción de un bias, sino también mediante el ajuste de la pendiente de la recta de calibración. En nuestro caso sólo se poseían muestras cuya concentración de principio activo era muy próxima al valor nominal, como se muestra en la figura 7.9, con lo que, en principio, este tipo de corrección no se podía llevar a cabo. A pesar de ello, se comprobó cómo ésta afectaba a los resultados. Los resultados eran parecidos a los obtenidos con la corrección únicamente mediante la introducción de un bias.

## **7.4. CONCLUSIONES**

Una vez desarrollado y validado un método de calibración, es importante llevar a cabo un estudio de los resultados obtenidos a lo largo del tiempo, para poder garantizar la calidad de los mismos. A veces se producen alteraciones en los valores de predicción, las cuales pueden ser debidas a distintas causas, como cambios o modificaciones en la composición del preparado farmacéutico, en el instrumento, en los protocolos de pretratamiento de las muestras, etc. Una vez identificadas las causas de estas alteraciones, pueden ser solucionadas mediante una corrección del modelo de calibración a partir de la introducción de un bias y/o el reajuste de la pendiente. Para ello sólo es necesario disponer de un conjunto pequeño de muestras analizadas por el método de referencia. Sin embargo, para llevar a cabo la corrección mediante el reajuste de la pendiente es necesario que estas muestras cubran un intervalo de concentración lo suficientemente amplio. No obstante, en nuestro caso, a pesar de disponer de muestras de concentración muy parecida, con ambos métodos se obtuvieron resultados similares.

Otra de las fuentes de variación espectral no controlable es la humedad de las muestras, siendo posible la obtención de modelos más estables eliminando las regiones espectrales en las que el agua presenta absorción.

La revalidación del método garantizará que éste sigue siendo adecuado y puede ayudar a discernir cuál de los dos tipos de correcciones es el que proporciona resultados más fiables.

## 7.5. BIBLIOGRAFÍA

1. J.E. Jackson, G.S. Mudholkar, *Technometrics*, **21**, 341, 1979.
2. T. Kourti, J.F. McGregor, *J. Quality Technol.*, **28**, 409, 1996.
3. S.K. Setarehdan, J.J. Soraghan, D. Littlejohn, D.A. Sadler, *Anal. Chim. Acta*, **452**, 35, 2002.
4. E. Bouveresse, D.L. Massart, P. Dardenne, *Anal. Chim. Acta*, **297**, 405, 1994.
5. S.T. Sum, S.D. Brown, *Appl. Spectrosc.*, **52**, 869, 1998.
6. T.B. Blank, S.T. Sum, S.D. Brown, S.L. Monfre, *Anal. Chem.*, **68**, 2987, 1996.
7. H. Swierenga, W.G. Haanstra, A.P. de Weijer, L.M.C. Buydens, *App. Spectrosc.*, **52**, 7, 1998.
8. T. Fearn, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **9**, 229, 2001.
9. O.E. de Noord, *Chemom. Intell. Lab.*, **23**, 65, 1994.
10. P. Geladi, H. Barring, E. Dabakk, J. Trygg, H. Antti, S. Wold, B. Karlberg, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **7**, 251, 1999.
11. J.A. Jones, I.R. Last, B.F. MacDonald, K.A. Prebble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 1227, 1993.
12. E. Bouveresse, D.L. Massart, P. Dardenne, *Anal. Chim. Acta*, **297**, 405, 1994.
13. J.J. Siska, C.R. Hurburgh Jr., *J. Near Infrared Spectrosc.*, **9**, 107, 2001.
14. Y. Xie, P.K. Hopke, P. Paatero, *Anal. Chim. Acta*, **392**, 347, 1999.
15. Y. Wang, T. Dean, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **63**, 2750, 1991.
16. S. Macho, A. Rius, M.P. Callao, M.S. Larrechi, *Anal. Chim. Acta*, **445**, 213, 2001.
17. F. Sales, A. Rius, M.P. Callao, F.X. Rius, *Talanta*, **52**, 329, 2000.
18. Vision v. 2.00 software manual; NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, 1998.
19. International Conference on Harmonization (ICH). Harmonized Tripartite Guidelines: Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology, 1994.
20. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, Ellis Horwood, Londres, 1988.
21. Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, Vol.1: Legislación Farmacéutica, Comisión Europea, Dirección General III-Industria Productos Farmacéuticos y Cosméticos, Bruselas, 1998, p.26.
22. M. Malyj, J.E. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **40**, 52, 1986.

## **8. Conclusiones generales**

---

## CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones que pueden extraerse de la investigación presentada en esta memoria son las siguientes:

-La espectroscopia NIR, unida a técnicas quimiométricas de calibración, permite desarrollar métodos de análisis de preparados farmacéuticos sólidos que, por su rapidez y calidad de los resultados, constituyen una alternativa ventajosa a los métodos tradicionales.

-En medidas por reflectancia difusa, el uso de un módulo de RCA o de una sonda de fibra óptica permite simplificar la manipulación de la muestra por parte del analista. No obstante, el módulo RCA mejora la relación señal/ruido en la zona alta del espectro (2200-2500nm) respecto a la sonda de fibra óptica.

-El empleo de un aparato de aire acondicionado durante el registro de los espectros NIR causa ruido en los mismos, debido a las fluctuaciones en el vapor de agua atmosférico.

-La utilización de bibliotecas de espectros NIR para la identificación de productos farmacéuticos es una buena alternativa a los métodos tradicionales de análisis cualitativo, por su rapidez, sencillez y objetividad.

-El uso de bibliotecas en dos etapas o en cascada permite aumentar la capacidad discriminante del proceso de identificación. En la primera etapa se identifican los distintos productos y en la segunda se diferencian los productos más relacionados, permitiendo incluso la detección de pequeñas alteraciones en la composición del fármaco.

-Para que el modelo de calibración desarrollado proporcione resultados satisfactorios es necesaria la utilización de un conjunto de calibración que incorpore espectros de muestras de laboratorio y de producción. Las muestras de laboratorio permiten extender el estrecho intervalo de concentración con que se elaboran los preparados farmacéuticos, mientras que las de producción incorporan la variabilidad normal del proceso de fabricación.

-El cálculo de un PCA de los espectros de las muestras de producción permite observar la existencia de diferencias entre ellas, atribuibles a la variabilidad física entre lotes y fases de producción. Por tanto, las muestras a incluir en la calibración se deben seleccionar de manera que se cubra la máxima variabilidad posible.

-Entre los dos tipos de muestras de laboratorio, sintéticas y dopadas, existen ciertas diferencias que no permiten su utilización de forma indistinta. Dado que las muestras dopadas son las más parecidas a las muestras reales de producción, se sugiere su utilización para desarrollar y validar el modelo de calibración.

-Para que un método de análisis NIR sea aceptado como método de control es necesario llevar a cabo su validación. Debido a la falta de normativas específicas para la validación de este tipo de métodos, se tienen que adaptar las normativas existentes de la *International Conference on Harmonization (ICH)* a las necesidades particulares.

-Al trabajar con muestras que presentan heterogeneidad de tamaños de partícula se generan problemas de reproducibilidad espectral, dificultando la obtención de un espectro representativo de las mismas. La molturación previa de la muestra permite minimizar este problema, aunque no eliminarlo, al igual que el registro y promediado de un mayor número de espectros. Por ello, es necesario llevar a cabo un estudio, espectral y cuantitativo, que permita asegurar que el número de espectros promediados es suficiente para garantizar su representatividad.

-Una vez desarrollado y validado un método de calibración, es importante evaluar los resultados obtenidos a lo largo del tiempo. De esta manera, es posible detectar alteraciones en los valores de predicción, las cuales pueden ser debidas a diversas causas.

-Cuando se producen variaciones en el espectro que no pueden ser corregidas, no es necesario volver a desarrollar y validar un modelo de calibración que tenga en cuenta esta nueva fuente de variabilidad espectral, sino que es posible corregir el modelo original a partir de la introducción de un bias y/o el reajuste de la pendiente. Para ello sólo es necesario disponer de un conjunto pequeño de muestras analizadas por el método de referencia.

-Siempre que se realice una modificación del método de análisis es necesario efectuar una revalidación, para demostrar que éste continúa siendo suficientemente fiable.



## **Símbolos y abreviaturas**

---

---

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AOTF	Filtros optoacústicos
AQL	<i>Acceptable quality level</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
CCD	Detectores <i>Charged-Coupled Devices</i>
CEE	Comunidad Económica Europea
CLS	Regresión lineal múltiple clásica ( <i>Classical Least Squares</i> )
CPMP	<i>Committee for Proprietary Medicinal Products</i>
CV	Coefficiente de variación
EMA	Agencia europea de evaluación de medicamentos ( <i>European Medicines Evaluation Agency</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIR	Infrarrojo lejano
FPA	Detectores <i>Focal Point Array</i>
FT	Transformada de Fourier
FT-NIR	Instrumentos NIR de transformada de Fourier
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ILS	Regresión lineal múltiple inversa ( <i>Inverse Least Squares</i> )
IND	<i>Investigational New Drug</i>
IR	Infrarrojo
K-M	Kubelka-Munk
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LEDs	Diodos de luz emisora

MIR	Infrarrojo medio
MLR	Regresión lineal múltiple ( <i>Multiple Linear Regression</i> )
MSE	Error cuadrático medio ( <i>Mean Squared Error</i> )
MSEP	Error cuadrático medio de predicción ( <i>Mean Squared Error of Prediction</i> )
MSECV	Error cuadrático medio por <i>cross-validation</i> ( <i>Mean Squared Error of Cross-Validation</i> )
NCF	Normas de correcta fabricación
NDA	<i>New Drug Application</i>
NIPALS	Algoritmo iterativo no lineal parcial por mínimos cuadrados ( <i>Nonlinear Iterative Partial Least Squares</i> )
NIR	Infrarrojo próximo
OSC	Corrección ortogonal de la señal ( <i>Orthogonal Signal Correction</i> )
PCs	Componentes principales ( <i>Principal Components</i> )
PCA	Análisis en componentes principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Regresión en componentes principales ( <i>Principal Component Regression</i> )
PLS (PLSR)	Regresión parcial por mínimos cuadrados ( <i>Partial Least Squares Regression</i> )
PRESS	Suma de cuadrados del error residual de predicción ( <i>Predicted Residual Error Sum of Squares</i> )
RMSE	Raíz cuadrada del error cuadrático medio ( <i>Root Mean Squared Error</i> )
RMSEC	Raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración ( <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i> )
RMSEP	Raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción ( <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i> )
RSEP	Error estándar relativo de predicción ( <i>Relative Standard Error of Prediction</i> )
SCR	Suma de cuadrados de los residuales
SNV	Variable normal estándar ( <i>Standard Normal Variate</i> )
RCA	<i>Rapid-Content Analyser</i>

UE	Unión Europea
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visible