

UAB

TESIS DOCTORAL



**Implementación de la Tecnología Analítica de
Procesos (PAT) en algunos procesos de
fabricación farmacéutica
Utilización de la espectroscopia del infrarrojo cercano
(NIRS) y de técnicas de imagen química (CI)**

Juan G. Rosas Portugal

**Directores: Prof. Marcelo Blanco Romia
Dr. Manel Alcala Bernàrdez**

**Programa de doctorado de Química
Departamento de Química
Facultad de Ciencias
Bellaterra, 2012**



Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**Implementación de la Tecnología Analítica de
Procesos (PAT) en algunos procesos de fabricación
farmacéutica. Utilización de la espectroscopia del
infrarrojo cercano (NIRS) y de técnicas de imagen
química (CI)**

Juan Guillermo P. Rosas Portugal

Directores: Prof. Marcelo Blanco Romia

Dr. Manel Alcalà Bernàrdez

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2012

*Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per **Juan Guillermo P. Rosas Portugal***

Juan Guillermo P. Rosas Portugal

Vist i plau

Prof. Marcelo Blanco Romia

Dr. Manel Alcalà Bernàrdez

Bellaterra, 31 de Octubre de 2012

*"No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu
abuela"*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Durante mi estancia en el doctorado he tenido el placer de encontrar mucha gente con las cuales he compartido conocimientos y han aportado al desarrollo de esta tesis doctoral

En primer lugar agradecer al ministerio de ciencia y educación (MEC) por la financiación de la presente tesis doctoral por medio de una beca pre-doctoral FPI y los proyectos CTQ 2006-12923 y CTQ2009-08312.

De una forma muy especial agradecer al Profesor Marcelo Blanco Romia por darme la oportunidad de pertenecer al *Grup de Quimiometria Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona* y enseñarme todo aquello que hoy muestro en esta memoria. De igual forma, agradezco al Dr. Manel Alcalá por su amistad, sus consejos y continuo soporte en los proyectos realizados, y por estar siempre presente cuando necesitaba alguna ayuda.

Al Grupo farmacéutico Menarini-España, en especial a D. Josep M^{ra} González, por todo el apoyo en la realización de los diversos experimentos realizados en la empresa, de igual manera al personal de producción y desarrollo galénico por su ayuda. De igual manera agradecer a laboratorios Esteve, en especial a Fernando Santamaría por el soporte para la realización de un estudio con un equipo NIR inalámbrico.

Gracias al Dr. Sergio Armenta por su amistad y por el tiempo que pasamos juntos discutiendo de quimiometría y de todo un poco, gracias igualmente por sus consejos y críticas constructivas de mi trabajo, muchos de los cuales han sido mejorados gracias a sus comentarios, “moltes gràcies Sergi”.

De igual forma hago extensivo el agradecimiento a los docentes y doctorandos del grupo, con los cuales he compartido esta experiencia año tras año y muy en especial Anna Palou, Vanessa Cárdenas, Ruben Cueva, y todos los demás que ya han ido dejando el grupo poco a poco (Dr. Manel Bautista, Dra. Anna Peguero, Dr. Carlos Cairos, Dr. Jordi Cruz, Dr. David Zamora y Dr. Ricardo Lucio) gracias por los buenos momentos vividos en vuestra compañía.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar estas líneas al Dr. José Manuel Amigo, con quien realice una estancia en la Universidad de Copenhague en Dinamarca, gracias José por tu tiempo y todo lo que me enseñaste respecto al análisis de imagen, gracias a tu apoyo se despertó en mí el interés por la programación en Matlab. Hago extenso el agradecimiento a todos los integrantes del grupo de Quality & Technology, especialmente al Prof. Rasmus Bro y al Dr. Frans Van den Berg por sus consejos y ayuda, *thanks Frans for your invaluable help in the experiments during my stay in København ...*

I am grateful to Prof. Thomas de Beer of Process Analytical Technology laboratory in the Ghent University (Belgium) for give me the opportunity to make a research stay in his group. This experience allowed me to expand my knowledge in manufacturing processes and the use of spectroscopic techniques. I would like to thank the entire staff of PAT group, especially to Laurent Hansen for his help in carrying out the freeze-drying processes. Dank u wel.

Quiero dedicar estas líneas a mi esposa Emilie, por su constante apoyo incondicional, el cual ha sido el soporte de mi trabajo. *Merci beaucoup ma chérie pour ces premiers cinq ans ensemble, pour tout et pour être toujours à mon côté où que je sois...*

Finalmente, hacer un agradecimiento a mis padres Mary y Gaspar, sin los cuales no seria la persona que soy actualmente, gracias por su apoyo incondicional en mi carrera y por tener siempre confianza en lo hago y aunque la distancia nos separa, siempre están en mi corazón, sé que no tendré nunca suficientes palabras para expresarles mi gratitud.

A todos muchas gracias de corazón

Juan

Resumen	1
Abstract	5
Objetivos	9
Objectives	13

I. INTRODUCCION

CAPÍTULO 1

LA ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO CERCANO (NIR) Y EL ANÁLISIS DE IMAGEN QUÍMICA..... 17

1.1 LA ESPECTROSCOPIA NIR	21
1.1.2. Instrumentación convencional	24
1.1.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica	25
1.2. ANÁLISIS DE IMAGEN	26
1.2.1. Tipos de imagen.....	27
1.2.2. Imagen Química (CI)	28
1.2.3. Imagen Química NIR (NIR-CI).....	29
1.2.3.1. Principios básicos	29
1.2.3.2. Instrumentación	30
1.2.3.2.1. Imagen de registro por puntos.....	30
1.2.3.2.2. Imagen de registro por líneas	31
1.2.3.2.3. Imagen de registro por plano.....	31
1.2.3.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	31

CAPÍTULO 2

QUIMIOMETRÍA 35

2.1. INTRODUCCIÓN	41
2.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS (DoE)	43
2.2.1. Diseños D-óptimos	45
2.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EN NIRS	47
2.3.1. Métodos cualitativos	47
2.3.1.1. Análisis por componentes principales (PCA).....	49
2.3.1.2. Coeficiente de correlación (CorrCoef).....	51
2.3.1.3. Índices de mezclado	51

2.3.2. Métodos cuantitativos.....	53
2.3.2.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).....	53
2.4. TECNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN	61
2.4.1. Métodos para imagen (M x N).....	61
2.4.1.1. Análisis de clúster por K-medias (K-means)	61
2.4.1.2. Análisis por macropíxeles	61
2.4.1.3. Métodos para determinar homogeneidad. Índices de mezclado ..	63
2.4.2. Métodos para imagen hiperespectral (M x N x λ).....	67
2.4.2.1. Resolución Multivariante de Curvas-Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS).....	70
2.4.2.2. Isys-PLS1	71
2.5. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN NIRS	72
2.5.1. Suavizado.....	74
2.5.2. Derivadas	74
2.5.3. Varianza normal estándar (SNV)	74
2.5.4. Corrección ortogonal de la señal (OSC)	75
2.6. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN IMAGEN NIR.....	76

CAPÍTULO 3

CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA. NIRS COMO HERRAMIENTA PAT..... 79

3.1. INTRODUCCIÓN	83
3.2. CONTROL DE CALIDAD (QC) Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD (QA).....	83
3.2.1. Control de calidad (QC).....	85
3.2.2. Aseguramiento de la calidad (QA).....	85
3.3. ARMONIZACIÓN INTERNACIONAL DE CRITERIOS, REQUISITOS Y ACTUACIONES	86
3.4. BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN (GMP)	88
3.5. TECNOLOGÍA ANALÍTICA DE PROCESOS (PAT)	91
3.5.1. Definición.....	91
3.5.2. Antecedentes	92
3.6. DIRECTRICES ICH Q8, Q9 Y Q10	97
3.7. CALIDAD MEDIANTE EL DISEÑO (QbD)	98
3.7.1. Espacio de Diseño (DS).....	99
3.8. NIRS COMO HERRAMIENTA PAT.....	102
3.8.1. Estudios de viabilidad	103
3.8.2. Estudios de QbD	104

3.8.3. Antes del proceso de fabricación	105
3.8.4. Durante el proceso de fabricación	105
3.8.5. Después del proceso de fabricación.....	106

II. METODOLOGIA Y DISCUSION DE RESULTADOS

CAPÍTULO 4

ESTUDIO BASADO EN CALIDAD POR DISEÑO (QBD) PARA UN PROCESO DE FABRICACIÓN DE UN GEL FARMACÉUTICO 111

4.1. INTRODUCCIÓN	115
4.2. EXPERIMENTAL	117
4.2.1. Composición de la formulación	117
4.2.2. Muestras de laboratorio	118
4.2.3. Equipos y descripción del proceso	118
4.2.4. Diseño de experimentos (DoE).....	121
4.2.5. Procesamiento de datos.....	123
4.2.6. Control estadístico multivariable de procesos (MSPC)	124
4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	125
4.3.1. Determinación del espacio de diseño (SD).....	125
4.3.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR	137
4.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO.....	148
4.4.1. Determinación del espacio de diseño (SD).....	148
4.4.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR	149

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN EN TIEMPO REAL DE ATRIBUTOS CRÍTICOS DE CALIDAD (CQAs)..... 153

5.1. INTRODUCCIÓN	157
5.2. EXPERIMENTAL	158
5.2.1. Formulación farmacéutica	158
5.2.2. Muestras utilizadas en calibración	158
5.2.3. Modelo de calibración utilizando el método de espectro del proceso (Sp).....	159

5.2.4. Proceso de granulación	160
5.2.5. Métodos de referencia utilizados.....	160
5.2.6. Equipo NIR	162
5.2.7. Procesamiento espectral.....	163
5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	164
5.3.1. Construcción de los modelos de calibración.....	164
5.3.2. Validación de la robustez de los métodos NIR propuestos	174
5.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	176

Capítulo 6

EVALUACIÓN DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA LA MONITORIZACIÓN NO INVASIVA DE UN PROCESO DE MEZCLADO POR MEDIO DE LA ESPECTROSCOPIA NIR WIRELESS 179

6.1. INTRODUCCIÓN	183
6.2. MATERIALES Y METODOS	187
6.2.1. Materiales.....	187
6.2.2. Preparación de muestras de calibración en laboratorio	187
6.2.3. Proceso de mezclado y espectrómetro NIR	188
6.2.4. Análisis de muestras.....	189
6.2.4. Adquisición de espectros NIR y análisis de datos	190
6.2.5. Pre-tratamientos espectrales y construcción del modelo PLS.....	190
6.2.6. Métodos libres de calibración	191
6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	192
6.3.1. Método de calibración	192
6.3.2. Comparación de los métodos.....	197
6.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	201

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS PARA LA MONITORIZACIÓN IN-LINE DE UN PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE UNA MEZCLA MULTI-COMPONENTE 205

7.1. INTRODUCCION	211
7.2. MATERIALES Y METODOS	213
7.2.1. Materiales.....	213
7.2.2. Descripción del proceso	213
7.2.3. Registro In-line de los espectros NIR	215

7.2.4. Análisis de datos.....	216
7.2.5. Difracción de rayos X de polvo	217
7.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	218
7.3.1. Examinación de los espectros NIR.....	219
7.3.2. Caracterización de los polimorfos de manitol	221
7.3.3. Comparación de los métodos quimiométricos	224
7.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	233

CAPÍTULO 8

BASES DE UN NUEVO CRITERIO PARA EVALUAR LA HOMOGENEIDAD EN IMÁGENES HIPERESPECTRALES 237

8.1. INTRODUCCIÓN	243
8.2. EXPERIMENTAL	244
8.2.1. Muestras	244
8.2.2. Equipamiento	244
8.2.3. Proceso de mezclado y adquisición de las imágenes	245
8.2.4. Técnicas utilizadas.....	247
8.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	247
8.3.1. Pre-tratamiento de las imágenes y la estimación de las concentraciones de los componentes.....	248
8.3.2. Elección del tamaño de macropixel.....	250
8.3.3. Índices de mezclado para mezclas de dos componentes	251
8.3.4. Índices de mezclado para mezclas multicomponentes	255
8.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	259

CAPÍTULO 9

APLICACIÓN DE ÍNDICES DE HOMOGENEIDAD EN EL ESTUDIO DE LA HOMOGENEIDAD DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS.. 263

9.1. INTRODUCCIÓN	269
9.2. EXPERIMENTAL	270
9.2.1. Muestras	270
9.2.2. Instrumentación	271
9.2.3. Programas para el tratamiento de datos	273
9.2.4. Procesamiento de datos.....	273
9.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	273
9.3.1. En imágenes binarias.....	274

9.3.2. Elección del tamaño óptimo de macropíxel	275
9.3.3. Método 1. Cálculo de M_P y $H\%_{Poolle}$ a partir de desviaciones estándar espectrales	280
9.3.4. Método 2. Cálculo del M_P y $H\%_{Poolle}$ a partir de CorrCoef.....	283
9.3.5. Método 3. Cálculo de M_P y $H\%_{Poolle}$ a partir de mapa de concentraciones.....	284
9.3.6. Método 4. Cálculo de M_P y $H\%_{Poolle}$ a partir de imágenes binarias	286
9.3.7. Grado de homogeneidad.....	286
9.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO.....	289

III. CONCLUSIONES

Conclusiones	293
Conclusions	297

BIBLIOGRAFIA POR CAPITULOS

ANEXOS

- I) Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part I: Determination of the design space.
- II) Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part II: NIR monitoring of composition and physical parameters.
- III) Real-time determination of critical quality attributes using near-infrared spectroscopy: a contribution for Process Analytical Technology (PAT).
- IV) Assessment of chemometric methods for non-invasive solid blending monitoring by using wireless NIR spectroscopy.
- V) NIR spectroscopy for the in-line monitoring of a multicomponent formulation during the entire freeze-drying process.
- VI) A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 1: Homogeneity index bases and blending processes.
- VII) A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 2: Application of homogeneity indices to solid pharmaceutical dosage forms.

Resumen

Se ha evaluado la aplicación de la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) como herramienta para la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) y la calidad mediante el diseño (QbD). Este trabajo pretende realizar una contribución para promover la implementación de las metodologías PAT y QbD en procesos de fabricación farmacéutica. Esta evaluación se realizó mediante la determinación de atributos críticos de calidad (CQA) en productos farmacéuticos, utilizando nuevas técnicas, mas rápidas y eficientes comparadas con los métodos convencionales. Estos métodos alternativos deben aportar nuevas soluciones a problemas de fabricación reales en la industria farmacéutica y deben de ser capaces de ser rutinariamente utilizadas en el control de calidad a lo largo del proceso de fabricación y en el producto terminado.

Este estudio ha sido conducido dentro del marco de un proyecto QbD, involucrando el proceso de fabricación de una formulación farmacéutica semisólida (gel). Los parámetros críticos de proceso (CPPs) y los CQAs, del proceso y producto terminado respectivamente, fueron empleados para la construcción de un diseño D-óptimo, con el objeto de definir el espacio de diseño (DS) para el proceso. Posteriormente, se utilizo la espectroscopia NIR, en combinación con herramientas quimiométricas, para desarrollar métodos multivariantes NIR que permitan determinar la composición del gel farmacéutico y evaluar los cambios temporales en los factores físicos mas importantes que afectan la calidad del producto terminado (ej. viscosidad y pH).

Por otro lado, la espectroscopia NIR a sido satisfactoriamente utilizada para el desarrollo de métodos cuantitativos rápidos y no invasivos que predigan en tiempo real los CQAs de un granulado farmacéutico, tales que contenido de principio activo (API), pH, humedad, fluidez, ángulo de reposo y tres tamaños de partículas. Los espectros NIR fueron adquiridos en el mismo mezclador después del

proceso de granulación en una área no clasificada y sin la necesidad de extraer muestra.

Se da desarrollado un nuevo criterio cualitativo (índice de mezclado M), para evaluar la homogeneidad en operaciones de mezclado de sólidos y determinar adecuadamente el punto final de mezclado utilizando un equipo NIR inalámbrico. Este método se comparó con tres métodos quimiométricos para realizar la monitorización de un proceso de mezclado de pellets. Los métodos evaluados fueron la regresión PLS1, el bloque móvil de desviación estándar (MBSD) y el análisis de distancia de scores en componentes principales (PC-SDA). Los resultados que proporcionan el índice M para evaluar la homogeneidad en procesos de mezclado fueron buenos y robustos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por el PLS1 para determinar el punto final de mezclado.

La espectroscopia NIR también se utilizó para examinar si esta técnica permite realizar la monitorización in-line de todos los componentes a lo largo de un proceso de liofilización de una formulación multicomponente (fenofibrato, manitol, terbutanol y agua). Para tal fin, se han evaluado y comparado diversas técnicas de tratamiento de datos espectrales (ej. número de onda seleccionadas, coeficiente de correlación y el análisis en componentes principales) con el objeto de extraer información útil de todos los componentes de la formulación a partir de datos espectrales multivariantes obtenidos durante la monitorización espectroscópica in-line. Los resultados obtenidos demostraron que NIRS es una técnica adecuada para las medidas in-line y la comprensión del proceso de liofilización en un entorno de hielo.

Con respecto a la imagen de la química, hemos propuesto un nuevo criterio para la evaluación de la homogeneidad en imágenes digitales e hiperespectrales. Esencialmente, se definieron y evaluaron los existentes índices de mezclado y uno nuevo propuesto, llamado "porcentaje de homogeneidad" ($H\%$). La distribución superficial de los componentes se determinó mediante el análisis de macropíxel. Se

RESUMEN

evaluó satisfactoriamente el potencial del procesamiento de imagen química en combinación con los índices de mezclado para evaluar el punto final de mezclado y la distribución de los componentes de la mezcla. Posteriormente, los índices de homogeneidad fueron aplicados con éxito a imágenes hiperespectrales NIR de muestras farmacéuticas sólidas, tales que tabletas cubiertas, núcleos, tabletas efervescentes y mezclas en polvo, con el objeto de evaluar su homogeneidad.

En conclusión, se han propuesto nuevas estrategias para el desarrollo de métodos de análisis in la industria farmacéutica, aplicando la espectroscopia NIR y la técnica de imagen química NIR. Los métodos permitieron determinar los ingredientes activos en diferentes formulaciones farmacéuticas, tales que granulados, pellets, productos liofilizados y formulaciones semisólidas (gel). El estudio QbD permitió determinar las variables del proceso y definir su espacio de diseño (DS), el cual es la combinación de las condiciones del proceso que garantiza la calidad del producto terminado. Se han desarrollado métodos multivariantes NIR para determinar varios CQAs durante el mezclado de granulados y pellets. La aplicación de la espectroscopia NIR a un proceso de liofilización permitió de extraer información útil del proceso, permitiendo observar que los solventes cristalizan durante la fase de congelado, mientras los solutos lo hacen al incrementar la temperatura del interior del liofilizador. El nuevo criterio propuesto para la evaluación de la homogeneidad en imágenes, permitió calificar una imagen de acuerdo a su distribución homogénea de sus componentes claves.

En resumen, las metodologías presentadas en esta Tesis doctoral proporcionaron soluciones efectivas a problemas de fabricación reales en la industria farmacéutica. El mejoramiento continuo del proceso durante la fabricación fue realizada utilizando los métodos analíticos como herramientas de rutina para el control de calidad. Por consecuencia, la capacidad de la espectroscopia NIR y la técnica de imagen química, como herramientas de la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) ha sido demostrada.

Abstract

The application of Near-Infrared spectroscopy (NIRS) as tool for the process analytical technology (PAT) and quality-by-design (QbD) has been evaluated. This work intends to make a contribution for promoting the implementation of PAT and QbD methodologies in pharmaceutical manufacturing processes. This assessment has been performed by means of the determination of critical quality attributes (CQA) in pharmaceuticals, using new faster and more efficient analytical techniques compared to the conventional methods. These alternative methods should provide novel solutions to real manufacturing problems in the pharmaceutical industry and must be able to be routinely used in the quality control throughout the manufacturing process and finished product.

This study has been was conducted in the framework of a QbD project involving the manufacturing process of a pharmaceutical semi-solid formulation. Critical process parameters (CPPs) and the critical quality attributes (CQAs) for process and finished product, respectively, were employed to construct a D-optimal design in order to define the design space (DS) of this manufacturing process. Afterward, NIRS technique was utilized, in combination with chemometric tools, to develop expeditious NIRS methods for determining the composition of a pharmaceutical gel and assess the temporal changes in major physical factors affecting the quality of the product (e.g. viscosity and pH).

Moreover, NIRS has been successfully used to develop faster and non-invasive quantitative methods for real-time predicting of CQAs in pharmaceutical granulates, such as API content, pH, moisture, flowability, angle of repose and three particle sizes. NIR spectra have been acquired from the bin blender after granulation process in a non-classified area without the need of sample withdrawal.

A new qualitative criterion (mixing index M), has been developed to assess homogeneity in solid blending operations and determine

ABSTRACT

adequately the end-point using NIRS wireless. This method was compared with three chemometric methods for monitoring a blending process of gastro-resistant pellets. The methods evaluated were PLS1 regression, moving block standard deviation (MBSD) and principal component scores distance analysis (PC-SDA). Furthermore, the M index provided good and robust results for assessing the homogeneity in blending processes and its results were quite similar to PLS for determining blending end-points.

Conventional NIRS was also used to examine whether NIRS allows in-line monitoring of all components during the entire freeze-drying process of a multi-component formulation (fenofibrate, mannitol, tertiary-butyl alcohol, and water). Several spectral data analysis techniques (e.g. selected wavenumbers, correlation coefficient and principal component analysis) have been evaluated and compared to extract useful information of all components in the formulation from the large multivariate data-sets obtained during in-line spectroscopic monitoring. The obtained results demonstrated that NIRS is an adequate technique for the in-line measurements and process understanding in an icy environment.

Concerning the chemical imaging, we proposed a new criterion for assessing homogeneity in digital and hyperspectral images. Essentially, the existing mixing indices and a new proposed criterion called the “percentage of homogeneity” ($H\%$) were defined and evaluated. The surface distribution of components was determined by macropixel analysis. Furthermore, the potential of image processing in combination with mixing indices was successfully assessed for assessing blending end-point and component distribution. Afterward, the homogeneity indices were efficaciously applied to NIR hyperspectral images of pharmaceutical solid forms (e.g. coated, uncoated and effervescent tablets, as well as to powder blends) in order to evaluate their homogeneity.

In conclusion, new strategies have been proposed for the development of analysis methods in the pharmaceutical industry, by

ABSTRACT

applying the NIRS and NIR chemical imaging. These methods allowed determining the active pharmaceutical ingredients (API) in different pharmaceutical formulations, such as granules, pellets, freeze dried products and semi-solid formulations (gels). The QbD study allowed determining the process variables and defining the design space (DS), which is the combination of process conditions that guarantee the quality of the finished product. NIR multivariate methods have been developed to determine various CQAs in granules and pellets blending. NIRS applied to a freeze-drying process allowed extracting useful information from the process and observing that solvents crystallize during the freezing phase, while solutes crystallize after increasing the shelf temperature. The new criterion proposed for the assessment of homogeneity in images (digital or hyperspectral), allowed classifying an image according to its homogeneous distribution of their key components.

In summary, the methodologies presented in this Thesis have provided solutions effective solution to real pharmaceutical manufacturing problems. The continuous improvement of the processes during manufacturing is performed using the analytical methods as routine tools for the quality control. Consequently, the capability of NIR spectroscopy and chemical imaging as Process Analytical Technology (PAT) tools in the pharmaceutical industry has been demonstrated.

Objetivos

Uno de los objetivos fundamentales de la industria farmacéutica es la elaboración de productos de calidad que cumplan las estrictas normas regulatorias que todos los países del mundo han establecido para esta actividad. Las metodologías actuales para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos, se basan en ensayos *off-line* realizados sobre el producto terminado, es decir cuando ya no es posible corregir el factor que afecta a la calidad del producto y en el caso de no cumplir las especificaciones de calidad establecidas, se traduce en pérdidas económicas importantes para la empresa.

Para evaluar y asegurar la calidad de un medicamento, los conceptos que se aplican son el control de calidad (QC)¹ y la garantía de calidad (QA)². Mientras que el QC se orienta al producto (medicamento), la QA lo hace en el proceso. No obstante, estos dos conceptos están ligados muy estrechamente para conseguir la obtención de medicamentos de buena calidad. La Tecnología Analítica de Procesos (PAT)³ nace como respuesta a la demanda de una mayor productividad y menores costos de fabricación en el proceso industrial de fabricación, sin dejar de cumplir unos estándares de calidad cada vez más estrictos.

PAT ha sido definida⁴ como un mecanismo de diseño, análisis y control de los procesos de fabricación farmacéutica a través de la monitorización y control de los parámetros críticos de proceso (CPP)⁵ que tienen una influencia directa o indirecta en los atributos críticos de calidad (CQA)⁶ del producto. El objetivo de PAT es mejorar el conocimiento y comprensión del proceso de fabricación, desde el inicio (materias primas) hasta el producto acabado (medicamento), para que

¹ *Quality control*

² *Quality assurance*

³ *Process analytical technology*

⁴ *Food and Drugs Administration*

⁵ *Critical Process Parameter*

⁶ *Critical Quality Attributes*

OBJETIVOS

este se pueda realizar de manera más eficiente, permitiendo su mejora continua.

El concepto de calidad basada en el diseño (QbD),⁷ ha surgido en los últimos años para redefinir las normas de correcta fabricación (GMP)⁸ con el objeto de integrarlas en los sistemas de calidad de la industria farmacéutica, mediante una gestión de la calidad basada en el análisis de riesgos, bajo la premisa que el conocimiento científico del producto y la comprensión del proceso reducen el riesgo de falta de calidad. La QbD, permite a la industria farmacéutica realizar una gestión de la calidad y cumplimiento normativo más rentable basado en la aplicación de nuevas tecnologías (espectroscópicas, acústicas, etc) y metodologías tales como PAT, diseño de experimentos (DoE)⁹ y liberación a tiempo real (RTR).¹⁰ De hecho, la necesidad de asegurar la calidad del producto durante el proceso de producción impulsa la aplicación de analizadores no invasivos de etapas críticas de la fabricación (operaciones unitarias). Dentro de las tecnologías propuestas, la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS)¹¹ ocupa un lugar privilegiado, siendo la herramienta PAT más recomendada por los organismos reguladores, tales que FDA y EMA.¹²

En este estudio conducente a la realización de la tesis doctoral se propone realizar contribuciones que promuevan la implementación de las metodologías PAT y QbD en procesos de producción farmacéutica, permitiendo identificar y determinar los CQA mediante nuevos métodos desarrollados empleando herramientas PAT tales que la espectroscopia NIR convencional i/o la imagen química NIR (NIR-CI)¹³. Los métodos a desarrollar deben aportar nuevas soluciones a problemas reales en la producción farmacéutica y deben ser capaces de ser utilizados en rutina, tanto en el control durante del proceso de fabricación como en el control de calidad del producto acabado. Estos métodos también

⁷ *Quality by Design*

⁸ *Good Manufacturing Practice*

⁹ *Design of experiments*

¹⁰ *Real time release*

¹¹ *Near-Infrared Spectroscopy*

¹² *European Medicine Agency*

¹³ *Chemical imaging near-infrared*

OBJETIVOS

deberán permitir comprender y mejorar el control del proceso, además de ser de fácil implementación, no invasivos y capaces de proporcionar información en tiempo real. Esta comprensión y mejora continua de los procesos se realizaría, como mencionado, mediante la determinación de CQA, sobretodo durante el proceso, para asegurar que el producto acabado reúna las especificaciones de calidad. Estos CQA a determinar pueden ser de tipo químico, como el pH, la humedad, la concentración de API y excipientes (y propiedades relacionadas con la uniformidad de contenido y homogeneidad) o físicos, tal que viscosidad, fluidez, tamaño de partícula o ambos tipos al mismo tiempo, por lo que las metodologías que se propongan han de permitir la determinación de estos parámetros de calidad.

Objectives

The mission of the pharmaceutical industry is the development of quality products that meet strict worldwide regulations. Current analytical methods to ensure the quality of pharmaceutical products are based on off-line tests carried out on the finished product. Therefore it is no longer possible to correct the process parameters that may affect the quality of the product. In the case of quality out of specifications, it implies into significant economic losses for the company.

To evaluate and ensure the quality of pharmaceuticals, the concepts of quality control (QC) and quality assurance (QA) are often employed. While the QC is oriented to the finished pharmaceutical formulation, the QA is focused in the process. However, these two concepts are closely linked in order to get good quality drugs. Process analytical technology (PAT) was developed by the US Food and Drug Administration (FDA) as a response to the demand for greater productivity and lower costs of manufacturing in the industrial processes, while still meeting increasingly stringent quality standards.

PAT has been defined as a mechanism for design, analysis and control by monitoring pharmaceutical manufacturing processes and control of critical parameters of process (CPP) that have a direct or indirect influence on the critical quality attributes (CQA) of a product. The PAT aim is to improve the knowledge and understanding of the manufacturing process, from the beginning (raw materials) to the finished product, so that it can be performed more efficiently, enabling continuous improvement.

The concept of quality by design (QbD) has emerged in recent years to redefine the rules of good manufacturing practices (GMPs) in order to integrate them into the quality systems of the pharmaceutical industry, through a quality management based on risk analysis. This has been developed under the premise that the scientific knowledge of

OBJECTIVES

the product and understanding of the process reduces the risk of lack of quality. QbD allows the pharmaceutical industry to perform the management of quality and cost-effective regulatory compliance based on the application of new technologies (spectroscopic, acoustic, etc.) and methodologies such as PAT, design of experiments (DoE) and real time release (RTR). In fact, the need to ensure the quality of the product during the production process promotes the application of non-invasive analysers of critical stages of manufacturing (unit operations). Within the proposed technologies, the near infrared (NIR) spectroscopy becomes a privileged tool, being the most recommended by regulatory agencies, such as FDA and the European Medicine Agency (EMA).

In this study leading to the achievement of the doctoral thesis intends to make contributions that will promote the implementation of PAT and QbD methodologies in pharmaceutical manufacturing processes, allowing to identify and determine the CQAs by new methods developed using PAT tools such as conventional NIR spectroscopy and NIR chemical image (NIR-CI). The methods should provide new solutions to real problems in the pharmaceutical manufacturing and must be able to be routinely used in the quality control during the manufacturing process and of finished product. These methods must also permit to understand and improve process control, in addition to being easy to implement, non-invasive and capable of providing real time information. This understanding and continuous improvement of processes will perform, as mentioned, through the determination of CQA, especially during the process, to ensure that the finished product meets quality specifications. These determined CQAs may be chemical, such as pH, moisture, concentration of active principle ingredients (APIs), excipients and the uniformity of content and homogeneity-related properties. Also physical properties can be evaluated such as viscosity, flowability, particle size or both types at the same time. The proposed methodologies must allow the determination of these parameters throughout the pharmaceutical processes to ensure state of the art quality standards of industrial manufacturing.



INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

La Espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR) y el análisis de imagen química

1.1 LA ESPECTROSCOPIA NIR.....	21
1.1.2. Instrumentación convencional.....	24
1.1.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	25
1.2. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	26
1.2.1. Tipos de imagen.....	27
1.2.2. Imagen Química (CI).....	28
1.2.3. Imagen Química NIR (NIR-CI).....	29
1.2.3.1. Principios básicos.....	29
1.2.3.2. Instrumentación.....	30
1.2.3.2.1. Imagen de registro por puntos.....	30
1.2.3.2.2. Imagen de registro por líneas.....	31
1.2.3.2.3. Imagen de registro por plano.....	31
1.2.3.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	31

Lista de abreviaciones

	Inglés	Castellano
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Principio activo
CI	Chemical Image	Imagen química
FDA	Food and Drugs Administration	Administración de drogas y alimentos
FIR	Far Infrared	Infrarrojo lejano
FT-IR	Fourier Transform infrared	Infrarrojo de transformada de Fourier
HI	Hyperspectral image	Imagen hiperespectral
IR	Infrared	Infrarrojo
MIR	Middle Infrared	Infrarrojo medio
NIR	Near-Infrared	Infrarrojo cercano
NIR-CI	Near-Infrared Chemical Image	Imagen química del Infrarrojo cercano
PAT	Process Analytical Technology	Tecnología analítica de procesos
QbD	Quality by Design	Calidad por diseño
RGB	Red-Green-Blue	Rojo-verde-azul

1.1 ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO CERCANO NIR

Desde su descubrimiento, allá por los años 1800,^{1,2} la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR) ha evolucionado a lo largo de los años (Tabla 1.1), evidentemente de la mano con el avance tecnológico. En la actualidad, es de amplia utilización en el sector petroquímico, agroalimentario, textil, biotecnológico y farmacéutico principalmente. Gracias a sus ventajas frente a otras técnicas instrumentales, la espectroscopia NIR es considerada como una técnica de relevancia en la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) para la industria farmacéutica (capítulo 3). Su capacidad de analizar muestras de un modo no destructivo ni invasivo, sin apenas tratamiento previo, permitiendo la obtención rápida de resultados analíticos y además de su capacidad para determinar propiedades químicas y físicas de las muestras con tan solo un espectro, han contribuido a aumentar aún más su popularidad.³

Tabla 1.1. Evolución histórica de la espectroscopia NIR^{4,5}

Año	Hecho relevante
1800	Primera publicación sobre la radiación infrarroja (W. Hershel)
1881	Primeros espectros NIR en el rango espectral 1000–1200nm (W. Abney)
1905	Observación de que dos compuestos no tienen el mismo espectro (W. Coblenz)
1912	Primeras medidas cuantitativas de humedad atmosférica (F. Fowle)
1938	Determinación de agua en gelatina (J. Ellis y J. Bath)
1943	Primeros estudios en combustibles (P. Barchewitz)
1950	Primeros estudios en aceites vegetales (I. Barr)
1954	Presentación de espectros en el rango espectral 700-3500nm (W. Kaye)
1964	Estudio en matrices complejas de origen natural (K. Norris)
1968	Primer modelo de calibración multivariante usando MLR (I. Gera y K. Norris)
1972	Primer instrumento NIR comercial (NEOTEC)
1985	Primeras fibras ópticas
1990	Mejoras en monocromador y detectores
2006	Comercialización de equipos NIR wireless (inalámbricos) (P. Brush)

¹ W. Hershel, *Philos. Trans. R. Soc.* **90** (1800) 255–283.

² W. Abney, E.R. Festing, *Philos. Trans. R. Soc.* **172** (1881) 887–918.

³ E. Ciurczak, *Journal of Process Analytical Technologies*, **3** (2006) 19–21.

⁴ H. W. Siesler (<http://www.nir-spektroskopie.de>)

⁵ P. Hindle, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc. New York, 2008, pp. 4–6.

Como reflejo del gran avance de la aplicación de la espectroscopia NIR en todos los sectores y sobre todo en el sector farmacéutico, solo basta con buscar en cualquier base de datos los artículos publicados en NIR. Un resumen de los últimos 80 años se puede apreciar en la **Figura 1.1**.

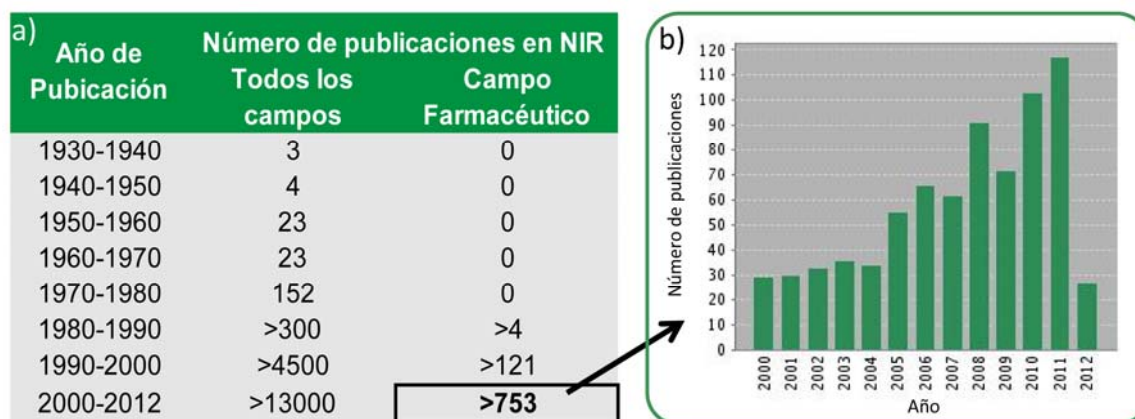


Figura 1.1. a) Evolución de las publicaciones relacionadas a la espectroscopia NIR. b) Gráfico de publicaciones NIR en el sector farmacéutico en los últimos 12 años.

La región del infrarrojo comprende el intervalo espectral entre 780 y 10⁶ nm. De acuerdo a la absorción de energía por parte de la materia, podemos dividir esta región en tres zonas (Tabla 1.2): infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR, *Middle Infra-red*) e infrarrojo lejano (FIR, *Far Infra-red*). El origen del NIR se debe a los sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales del MIR.^{6, 7}

Tabla 1.2 División del espectro electromagnético⁸

Región	Longitud de onda (nm)	Origen de la absorción
Rayos X	0.01-190	Transiciones de electrones internos de un átomo
Ultravioleta	190 – 360	Transiciones de electrones π deslocalizados
Visible	360 – 780	Transiciones de electrones externos:
NIR	780 – 2500	Sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales
MIR	2 500 – 50x10 ³	Vibraciones moleculares fundamentales
FIR	50x10 ³ – 10 ⁶	Rotaciones moleculares
Microondas	10 ⁶ >	Rotaciones moleculares

⁶ J. Workman, *Appl. Spectrosc. Reviews*, **34** (1999) 1–89.

⁷ R. Goddu, D. Delker, *Anal. Chem.* **32** (1960) 140-141.

⁸ D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*, 5ª Ed., McGraw-Hill, 2001.

Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos ligeros como C-H, N-H, O-H, S-H, debido a su mayor anarmonicidad. En la Figura 1.2 se muestran las regiones NIR donde absorben los diferentes enlaces. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F o C-Cl, en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto, los primeros sobretonos también aparecen en esa región.⁹

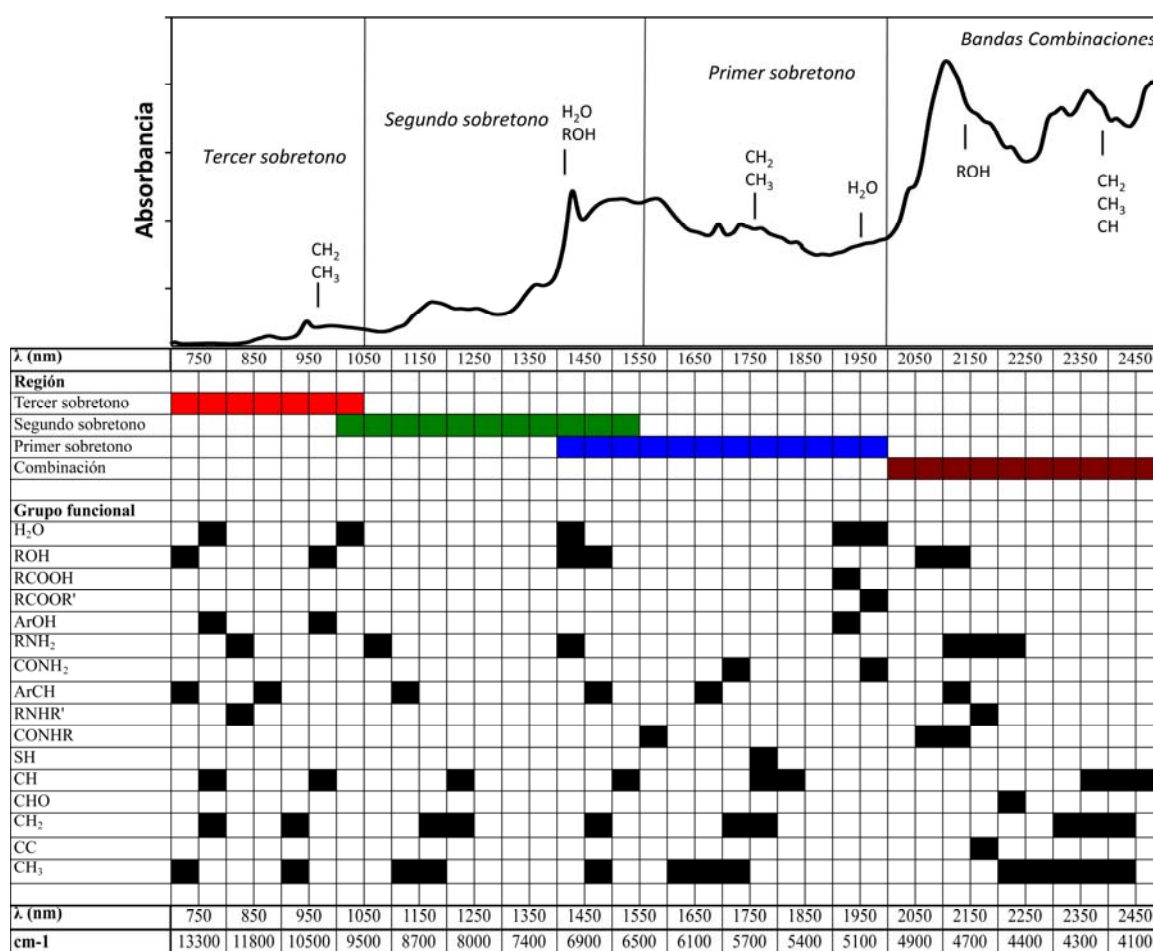


Figura 1.2. Asignación de bandas de grupos funcionales en la región NIR.¹⁰ Espectro NIR de un producto farmacéutico terminado (Nimesulene).

⁹ M. Simpson, in: K. Bakeev (Ed.), Process Analytical Technology, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp. 39–41.

1.1.2. Instrumentación convencional

Una de las causas de la tardía aparición de los primeros espectrofotómetros NIR (inicios de los 1970), se debió a la baja intensidad de las bandas NIR, haciendo que el nivel de exigencia de los espectrofotómetros NIR, en términos de nivel ruido permisible y estabilidad instrumental, deba ser mayor que en otros instrumentos, sobre todo si se pretende aplicar al análisis cuantitativo. Los equipos NIR empezaron a comercializarse solo cuando los avances tecnológicos permitieron obtener nivel adecuados de sensibilidad, reproducibilidad y ruido. Un esquema básico de un espectrofotómetro NIR se puede apreciar en la Figura 1.3. Como partes básicas podemos distinguir: fuente de radiación, sistema de selección de longitud de onda, compartimiento de muestra y detector.

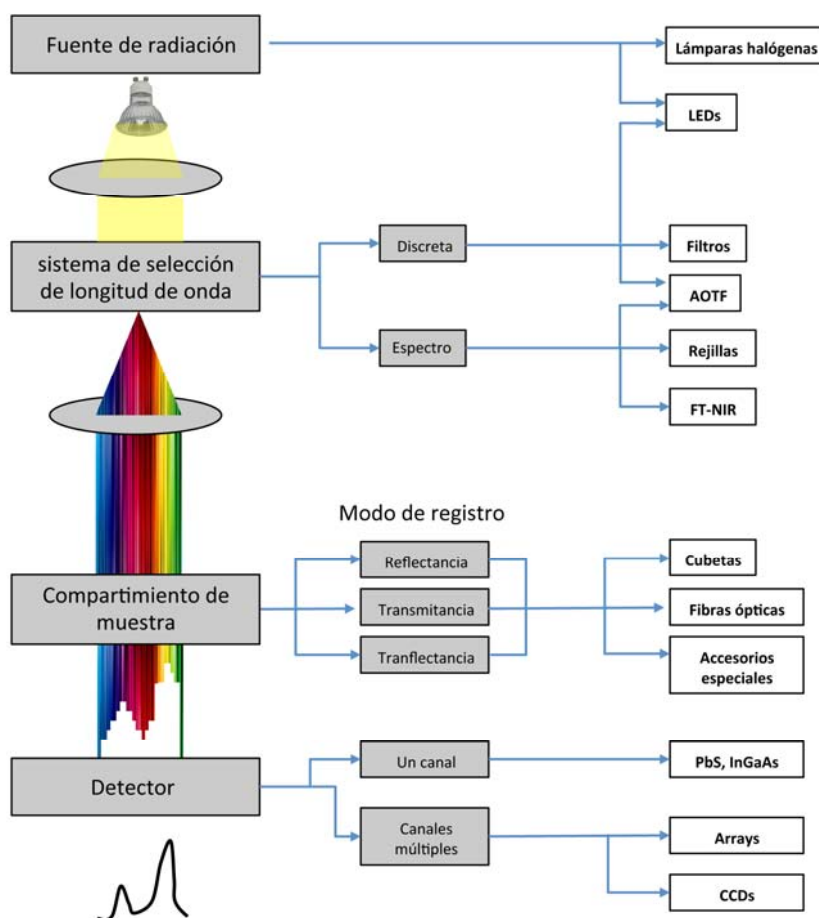


Figura 1.3. Características principales de un espectrofotómetro NIR¹⁰

¹⁰ M. Blanco, I. Villarroya, *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 240–250.

1.1.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica

La utilización de la espectroscopia NIR en el sector farmacéutico ha aumentado considerablemente en los últimos años debido, en gran parte, a las demandas de aplicaciones analíticas de la industria farmacéutica. Tal y como se pudo apreciar en la Figura 1.1, el número de publicaciones científicas englobando la espectroscopia NIR en el sector farmacéutico se incrementa a pasos agigantados. Más aún, las últimas guías regulatorias están promoviendo encarecidamente su uso para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas.¹¹ El uso de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica tiene una serie de ventajas, incluyendo que es una técnica de naturaleza no destructiva y por su capacidad de proporcionar resultados de forma inmediata, es una técnica enormemente versátil en una gran cantidad de aplicaciones, tanto para análisis cualitativo o cuantitativo, en control de calidad y monitorización en tiempo real de procesos. Algunos de los más conocidos usos de la espectroscopia NIR en la producción de formas farmacéuticas incluyen la identificación química de la materia prima,¹² uniformidad de contenido de API y excipientes,¹³ determinación de humedad¹⁴⁻¹⁷ y pH.¹⁸ En cuanto a determinaciones de parámetros físicos, algunos de los trabajos más resaltantes fueron en la determinación de: tamaño de partícula en API y granulados,¹⁹⁻²²

¹¹ United States Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, FDA, 2004.

¹² M. Blanco, M. Romero, *Analyst*. **126** (2001) 2212-2217.

¹³ M. Blanco, M. Alcalá, in: K.A. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Lackwell Publishing, United Kingdom, 2010, pp. 482-485.

¹⁴ J.A. Jones et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11** (1993) 1227-1231.

¹⁵ M.S. Kamat et al., *Pharm. Res.* **6** (1989) 961-965.

¹⁶ X. Zhou et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17** (1998) 219-225.

¹⁷ J.G. Rosas et al., *Talanta* **97** (2012) 163-170.

¹⁸ J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 4442-4451.

¹⁹ E. Ciurczak, *Appl. Spectrosc. Rev.* **23** (1987) 147-163.

²⁰ J.L. Ilari et al., *Appl. Spectrosc.* **42** (1988) 722-728.

²¹ M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, F. Gonzalez, R. Pous, *Near infrared spectroscopy*. In *Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*, K. Hildrum, T. Isaksson, T. Næs, A. Tandberg (Eds), Ellis Horwood, Chichester, 1992.

²² M. Blanco, A. Peguero, *Talanta* **77** (2008) 647-651.

viscosidad,²³ fluidez y ángulo de reposo,²⁴ dureza en tabletas,²⁵⁻²⁷ ensayos de disolución^{28,29} y determinación de polimorfos.^{30,31}

Sin embargo, el gran salto de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica ha sido su implementación e incorporación en proyectos PAT y QbD (calidad por diseño), los cuales son fomentados por la US-FDA.³² Como importancia de este apartado, en el capítulo 3 se describen más detalladamente las aplicaciones de la espectroscopia NIR en proyectos PAT.

1.2. ANÁLISIS DE IMAGEN

Una de las técnicas analíticas que se encuentran en plena expansión, es la técnica del análisis de imagen. Recientemente, han surgido nuevas tecnologías que hacen posible obtener un nuevo tipo de imagen que no sean imágenes en escala de grises o RGB. Sistemas multiespectrales de imágenes con hasta 20 bandas de longitud de onda se han utilizado desde la década de 1960, pero los sistemas de imágenes hiperespectrales (HI) con más de 100 bandas de longitud de onda están ganando un progresivo interés en los últimos años en el sector industrial. La imagen química (CI) hiperespectral ha experimentado un importante avance y una creciente aplicación, la cual unida a la utilización de algoritmos y pre-tratamientos espectrales (capítulo 2) pueden aportar información química y física de las muestras analizadas. Sus aplicaciones para la determinación de concentraciones de API y excipientes han sido ampliamente estudiadas.³³⁻³⁶

²³ J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 4442–4451.

²⁴ J.G. Rosas et al., *Talanta* **97** (2012) 163–170.

²⁵ K.M. Morisseau, C.T. Rhodes, *Pharm. Res.* **14** (1997) 108–111.

²⁶ M. Blanco, M. Alcalá, *Anal. Chim. Acta.* **557** (2006) 353–359.

²⁷ J.D. Kirsch, J.K. Drennen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19** (1999) 351–362.

²⁸ M. Blanco et al., *NIRNews* **18** (2007) 10–12.

²⁹ M. Blanco et al., *J. Proc. Anal. Tech.* **3** (2006) 25–28.

³⁰ M. Blanco et al., *Anal. Chim. Acta.* **502** (2004) 221–227.

³¹ J.G. Rosas et al., (2012). Resultados aún no publicados.

³² United States Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, FDA, 2004.

³³ J. Cruz, M. Blanco, *Talanta*, **80** (2009) 473–478.

Antes de entrar en la descripción de las imágenes hiperespectrales, abordaremos ciertos conceptos en cuanto a los tipos de imágenes mencionados en esta memoria.

1.2.1. Tipos de imagen

En esta memoria, se han utilizado 4 tipos de imágenes: imágenes a escala de intensidades (I_λ), imágenes en color (I_{RGB}), imágenes codificadas (binarias, I_b o ternarias I_T) e imágenes hiperespectrales (HI). Estas imágenes se pueden observar en la Figura 1.4.

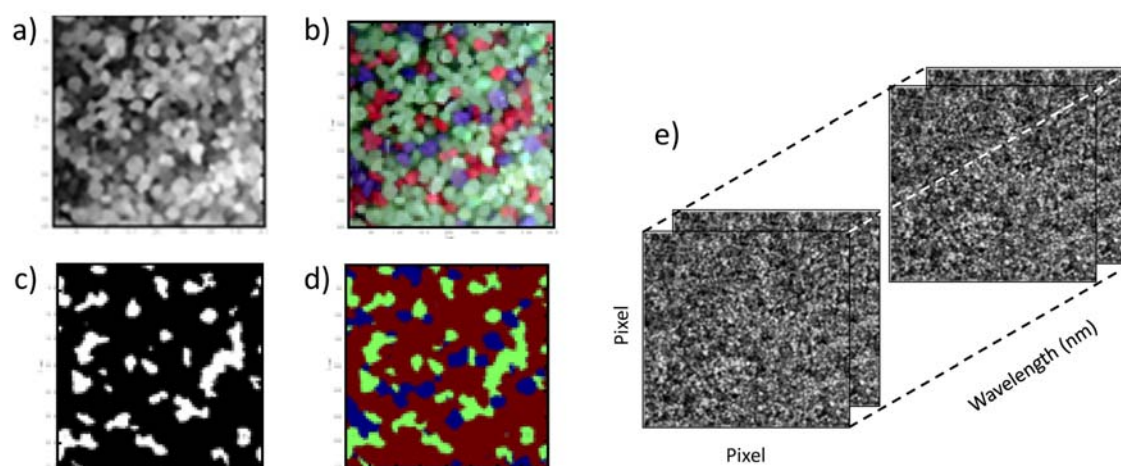


Figura 1.4. Tipos de imagen a) imagen en escala de grises, b) imagen RGB, c) imagen binaria, d) imagen ternaria y e) imagen hiperespectral.

Una I_λ es una imagen monocromática o matriz de datos bidimensional ($M \times N$), cuyos valores han sido escalados para representar intensidades, donde M y N son el número de píxeles. Los valores de intensidades de los píxeles de las I_λ utilizadas en esta memoria se encuentran en el rango $[0 - 1]$, a estas imágenes también se le puede llamar imagen en escala de grises. Una imagen en escala de grises esta

³⁴ J.M. Amigo, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 93–109.

³⁵ J.M. Amigo, C. Ravn, *Eur. J. Pharm. Sci.* **37** (2009) 76–82.

³⁶ C. Ravn, E. Skibstedb, R. Bro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 554–561.

compuesta exclusivamente por tonos de grises, variando de negro en la más débil intensidad hasta el blanco en la más fuerte.

Una imagen de color, I_{RGB} , es una matriz tridimensional ($M \times N \times 3$) de píxeles de colores, donde cada pixel de color es un triplete correspondiendo a los colores primarios rojo, verde y azul. Una imagen RGB puede ser vista como una matriz de tres imágenes en escala de grises.

Una imagen binaria es una matriz de valores lógicos de 0 ó 1. Desde otro punto de vista, una imagen binaria y ternaria puede ser definida como imágenes codificadas con dos y tres clústeres respectivamente.

Una HI es una matriz tridimensional ($M \times N \times \lambda$), donde λ_i es una I_λ a una determinada longitud de onda, donde M y N son las dimensiones espaciales y λ la dimensión espectral.

1.2.2. Imagen Química (CI)

Una CI resulta de la combinación de la espectroscopia vibracional convencional con la imagen digital. La información espectral y espacial se registra al mismo tiempo proporcionando un espectro en cada píxel de la imagen de muestra. La imagen química usando espectroscopia vibracional de múltiples canales (FT-Infrared (IR), Near Infrared (NIR) y Raman) está desarrollándose de forma amplia como demuestra la bibliografía en los últimos años.³⁷⁻⁴¹ Los términos “espectral” y “química” son a menudo intercambiables para describir este tipo de análisis de imagen. El termino “imagen espectral” puede ser aplicado a casi cualquier técnica espectroscópica (IR, Raman, Fluorescencia, UV, MS), mientras que el termino “imagen química” se refiere a las técnicas de espectroscopia vibracional (IR, NIR, Raman). Combinando la selectividad química de la espectroscopia vibracional y el poder de visualización de las técnicas de imagen, CI permite una descripción más

³⁷ A.S. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 1298–1307.

³⁸ J. Johansson, S. Pettersson, L.S. Taylor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002) 1223–1231.

³⁹ L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Anal. Chim. Acta.* **545** (2005) 262–278.

⁴⁰ H. Ma, C.A. Anderson, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 3305–3320.

⁴¹ S. Sasic, *Anal. Chim. Acta.* **611** (2008) 73–79.

completa de la concentración de los ingredientes y la distribución de muestras sólidas, semisólidas, polvos. Entre todas las técnicas de imagen, la imagen química en el infrarrojo cercano, NIR-CI (del acrónimo en inglés *Near Infrared-Chemical Imaging*) ha sido reportada como una herramienta excelente para extraer información de alta calidad de la superficie de muestras, habiendo sido aplicada a una serie de investigaciones relacionadas con la calidad de los productos farmacéuticos

1.2.3. Imagen Química NIR (NIR-CI)

1.2.3.1. Principios básicos

La espectroscopia de imagen en el infrarrojo cercano (NIR-CI) combina la espectroscopia NIR convencional con el tratamiento de imagen digital. Por consecuencia, los principios vistos para la espectroscopia NIR son aplicables a esta técnica. El resultado consiste en un conjunto de datos tridimensional, que se denomina cubo de datos hiperespectral (Figura 1.5). Los ejes M y N representan la información espacial, mientras que el eje λ se corresponde con el eje de la longitud de onda (medida espectral).

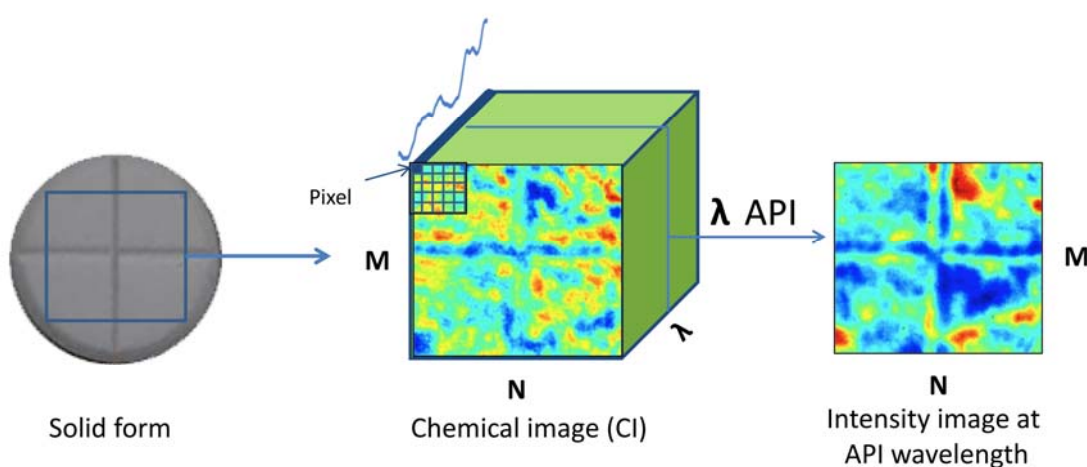


Figura 1.5. Imagen química NIR de una tableta conteniendo ácido acetil salicílico (ASA).

La característica más importante de esta técnica es que, además de la identificación y cuantificación de componentes químicos presentes en la muestra, se obtiene simultáneamente su distribución espacial, permitiendo visualizar la estructura y elucidar la distribución de cada componente químico de la muestra y relacionarlos con la calidad del producto.

Teniendo en cuenta que la distribución espacial de los componentes en materiales complejos influye en las propiedades físicas y químicas de la muestra, es una característica de gran importancia para la industria farmacéutica, debido a que es primordial que haya una correcta distribución del principio activo y excipientes.

La información espectral y espacial registrada, en un período de tiempo relativamente corto, conlleva a que una sola imagen contenga miles de espectros, superando ampliamente la capacidad del NIR convencional.

1.2.3.2. Instrumentación

Las cámaras hiperespectrales presentes en el mercado actual, pueden ser clasificadas según el tipo de registro de imagen. Existen tres tipos de registro los cuales se describen muy brevemente a continuación:

- Imagen de registro por puntos (*Wisherbroom system*)
- Imagen de registro por líneas (*pushbroom system*)
- Imagen de registro por plano (*staring imager system*)

1.2.3.2.1. Imagen de registro por puntos

En este tipo de técnica, se crea los mapas espectrales, a partir de la emisión de luz en un punto en concreto de la imagen (Figura 1.6a). Esta técnica permite obtener imágenes con muy buena resolución espacial, sin embargo el tiempo requerido puede ser muy largo, del orden de horas e incluso días.

1.2.3.2.2. *Imagen de registro por líneas*

Esta técnica registra los espectros por líneas de píxeles, obteniendo la imagen en menor tiempo que el primer tipo de registro, aunque reduciendo la calidad de la imagen (Figura 1.6b).

1.2.3.2.3. *Imagen de registro por plano*

Esta técnica consiste en registrar imágenes de toda la muestra a diferentes longitudes de onda, reduciendo el tiempo de análisis considerablemente, sin embargo puede conllevar una disminución de resolución espacial (Figura 1.6c).

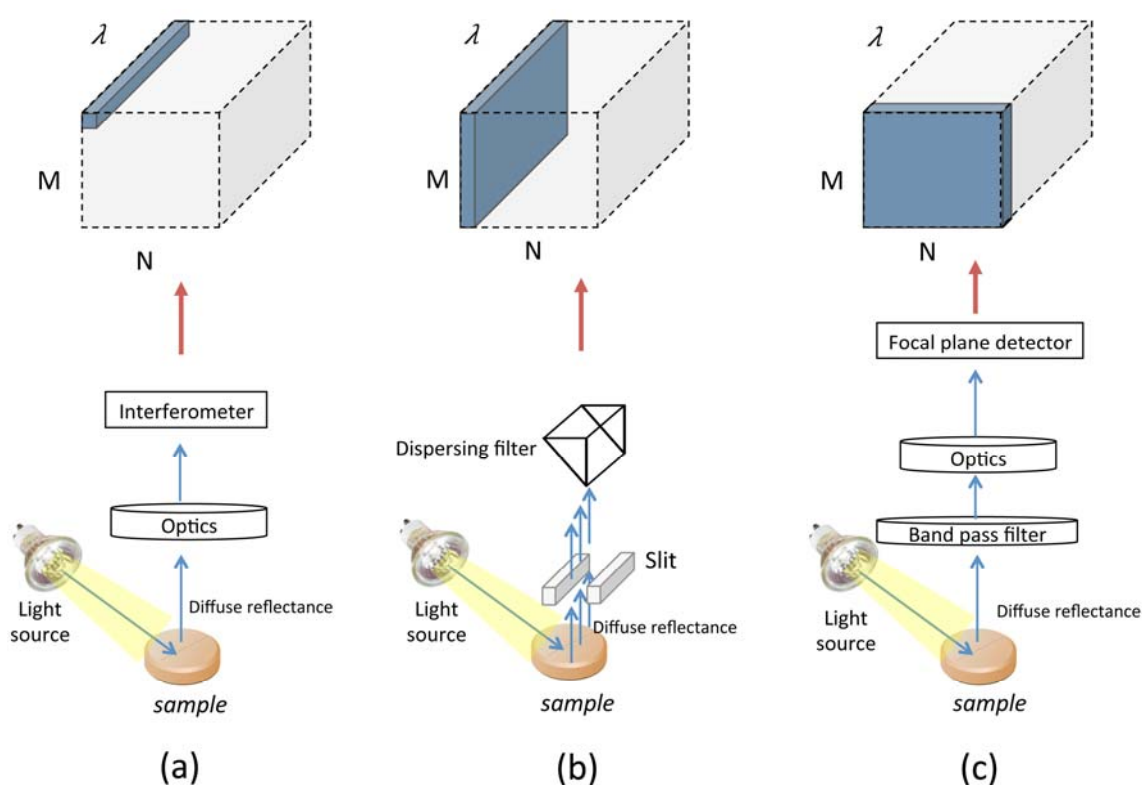


Figura 1.6. Esquema de los tres sistemas de registro de imágenes hiperespectrales y la estructura tridimensional del cubo de datos ($M \times N \times \lambda$).

1.2.3.3. Aplicaciones en la industria farmacéutica

A pesar de ser una técnica relativamente nueva, la NIR-CI ha sido reportada como una herramienta excelente para extraer información de

alta calidad de la superficie de muestras, habiendo sido aplicada a una serie de investigaciones relacionadas con la calidad de los productos farmacéuticos, incluyendo evaluación de calidad, información sobre la composición de muestras solidas, homogeneidad de mezclado, grosor de recubrimiento, identificación de falsificaciones, entre otras. Un resumen de estas aplicaciones pueden son recogidas en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Aplicaciones de NIR-CI en la industria farmacéutica

Aplicación	Referencia
Información sobre composición	42 – 45
Evaluación de calidad	46
Información relacionada a procesos	47,48
Uniformidad de contenido	49 – 54
Homogeneidad de distribución	55
Espesor de recubrimiento	56,57
Detección de falsificaciones	58 – 60
Identificación remota	61
Análisis de alto rendimiento	62,63
Tamaño de partícula	64 – 66
Desarrollo de formulaciones	47,54,55,67

⁴² J. Cruz, M. Blanco, *Talanta*, **80** (2009) 473–478.

⁴³ A. de Juan, R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36** (2006) 163–170.

⁴⁴ J.M. Amigo, C. Ravn, *Eur. J. Pharm. Sci.* **37** (2009) 76–82.

⁴⁵ J.M. Amigo, *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010) 93–109.

⁴⁶ Y. Roggo et al., *Anal. Chim. Acta.* **535** (2005) 79–87.

⁴⁷ F. Clarke, *Vib. Spectrosc.* **34** (2004) 25–35.

⁴⁸ Y. Roggo et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61** (2005) 100–110.

⁴⁹ R.C. Lyon et al., *AAPS PharmSciTech.* **3** (2002) 1–15.

⁵⁰ R.C. Lyon et al., *Am. Pharm. Rev.* **6** (2003) 62–70.

⁵¹ A.S. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 1298–1307.

⁵² F. Clarke, S. Hammond, *Eur. Pharma Rev.* **1** (2003) 41–50.

⁵³ N. Jovanovic et al., *Pharm. Res.* **23** (2006) 2002–2013.

⁵⁴ T. Furukawa et al., *Anal. Sci.* **23** (2007) 871–876.

⁵⁵ J.G. Rosas, M. Blanco, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70** (2012) 691–699.

⁵⁶ E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, L.H. Kidder, Near-infrared chemical imaging as a process analytical tool. in: K.A. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2005, pp. 187–225.

⁵⁷ A. Palou et al., *J. Pharm. Anal.* **2** (2012) 90–97.

⁵⁸ O. Rodionova et al., *Anal. Chim. Acta.* **549** (2005) 151–158.

⁵⁹ J. Dubois et al., *Spectroscopy* **22** (2007) 40–50.

⁶⁰ M.A. Veronin, E. Lee, E.N. Lewis, *Ann. Pharmacother.* **41** (2007) 1111–1115.

⁶¹ S.J. Hamilton, A.E. Lowell, R.A. Lodder, *J. Biomed. Opt.* **7** (2002) 561–570.

⁶² E. Lee et al., *Spectroscopy* **21** (2006) 24–32.

⁶³ L. Makein et al., *NIR news*, **7** (2008) 11–15.

⁶⁴ L.R. Hilden et al., *Int. J. Pharm.* **353** (2008) 283–290.

⁶⁵ L. Weiyong et al., *Int. J. Pharm.* **350** (2008) 369–373.

⁶⁶ H. Ma, C.A. Anderson, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 369–373.

⁶⁷ C. Gendrin et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68** (2008) 828–837.

Capítulo 2

Quimiometría

2.1. INTRODUCCIÓN.....	41
2.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS (DoE).....	43
2.2.1. Diseños D-óptimos	45
2.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EN NIRS	47
2.3.1. Métodos cualitativos.....	47
2.3.2. Métodos cuantitativos.....	47
2.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN.....	61
2.4.1. Métodos para el análisis de imágenes ($M \times N$)	61
2.4.1.1. Análisis de clúster por el método de las K-medias.....	61
2.4.1.2. Análisis por macropíxeles	61
2.4.1.3. Métodos para determinar homogeneidad. Índices de mezclado.....	63
2.4.2. Métodos para imágenes hiperespectrales ($M \times N \times \lambda$)	67
2.4.2.1. Resolución Multivariante de Curvas-Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS).....	70
2.4.2.2. Isys-PLS1	71
2.5. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN NIRS.....	72
2.5.1. Suavizado	74
2.5.2. Derivadas.....	74
2.5.3. Varianza normal estándar (SNV)	74
2.5.4. Corrección ortogonal de la señal (OSC).....	75
2.6. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN IMAGEN NIR.....	76

“Chemometrics is the chemical discipline that uses mathematical, statistical and other methods employing formal logic to: (1) design or select optimal measurement procedures and experiments; and (2) provide maximum relevant chemical information by analyzing chemical data”.

S. Wold y B. Kowalski (1972)

“The science of relating measurements made on a chemical system or process to the state of the system via application of mathematical or statistical methods”

International Chemometrics Society

Lista de abreviaciones

	Inglés	Castellano
ANN	Artificial Neural Network	Redes neuronales artificiales
CI	Chemical image	Imagen química
CLS	Classical Least Squares	Mínimos cuadrados clásica
CorrCoef	Correlation Coefficient	Coefficiente de correlación
CPP	Critical Process Parameter	Parámetro crítico de proceso
CQA	Critical Quality Attribute	Atributo crítico de calidad
DoE	Design of Experiments	Diseño de experimentos
EPO	External Parameter Orthogonalisation	Ortogonalización paramétrica externa
FT	Fourier Transform	Transformada de Fourier
ICA	Independent Component Analysis	Análisis de componentes independientes
KNN	K-Nearest Neighbours	Vecino mas cercano
LDA	Linear Discriminant Analysis	Análisis discriminante lineal
LOF	Lack of Fit	Falta de ajuste
LQV	Learning vector quantization neural network	Redes neuronales de cuantificación por vectores de aprendizaje
LWR	Locally Weighted Regression	Regresión local ponderada
MCR-ALS	Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares	Resolución multivariada de curvas y mínimos cuadrados alternantes
MLR	Multiple Linear Regression	Regresión lineal múltiple
MSC	Multiplicative Scatter Correction	Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión
NAS	Net Analyte Signal	Señal neta del analito
NIPALS	Non-Linear Iterative Partial Least Squares	Mínimos Cuadrados Parciales Iterativos No Lineales
NIR-CI	Near-Infrared Chemical image	Imagen química en el infrarrojo cercano
OPLS	Orthogonal Projections to Latent Structures	Proyección ortogonal sobre estructuras latentes
OSC	Orthogonal Signal Correction	Corrección ortogonal de señal
PAT	Process Analytical Technology	Tecnología analítica de procesos
PCA	Principal Component Analysis	Análisis en componente principales
PCR	Principal Component Regression	Regresión en componentes principales
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales
PLSR	Partial Least Squares Regression	Regresión por mínimos cuadrados parciales
PNN	Probabilistic Neural Networks	Redes neuronales probabilísticas
PRESS	Predicted Residual error Sums of Squares	Suma del error residual al cuadrado de predicción
QbD	Quality by Design	Calidad mediante el diseño
RMSE	Root Mean Square Error	Error cuadrático medio
RSE	Relative Standard Error	Error estándar relativo
SIMCA	Soft independent modelling by class analogy	Modelado blando independiente por analogía de clases
SNV	Standard Normal Variate	Varianza normal estándar
SVD	Singular Value Decomposition	Descomposición de valor singular
SVM	Support Vector Machine	Maquinas vectoriales de soporte
WT	Wavelet Transform	Transformación por ondas

2.1. INTRODUCCIÓN

Debido al avance tecnológico en estos últimos años y sobre todo de la producción de equipos analíticos capaces de registrar miles de variables en un corto periodo de tiempo (ej. Espectrómetros) se hace necesario la utilización de nuevos algoritmos y métodos capaces de manipular toda esta enorme cantidad de datos y poder extraer la información fisico-química que está contenida en ellos. En la actualidad, la quimiometría es una parte fundamental del abanico de prestaciones para la implementación de la tecnología analítica de procesos (PAT) en la industria farmacéutica (Figura 2.1). La combinación de la quimiometría con otras disciplinas hace que PAT pueda ser implementada en cualquier proceso de producción. La Quimiometría ha sido utilizada en esta memoria doctoral para el desarrollo y aplicación de diversos modelos empíricos en el análisis de muestras farmacéuticas.

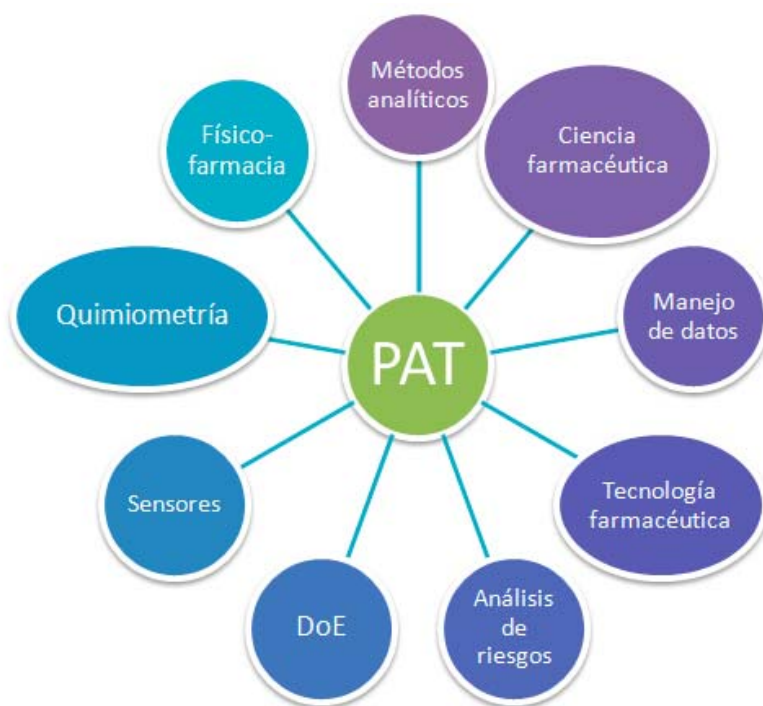


Figura 2.1. Abanico de disciplinas implicadas en la implementación de PAT¹

¹ M. Ulmschneider, Y. Roggo, Process Analytical Technology, in: S. Cox Gad (Ed.), Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality, John Wiley & Sons, Inc. New York, pp.353 – 410, 2008.

Históricamente, desde sus inicios en tanto que ciencia hasta nuestros tiempos, la quimiometría y su difusión ha evolucionado a pasos agigantados (Tabla 2.1), obviamente de la mano del avance tecnológico, y sobre todo informático. Existen numerosas publicaciones sobre la teoría y práctica de métodos quimiométricos en la industria farmacéutica, por tal motivo, en esta memoria únicamente se han detallado aquellas técnicas utilizadas para el desarrollo de modelos quimiométricos aplicados en esta memoria.

Tabla 2.1. Algunos hechos relevantes en la historia de la quimiometría

Año	Publicación / hecho relevante	Autor
1971	Introducción del termino “Quimiometría”	S. Wold ²
1972	Primeros artículos sobre Quimiometría	Kowalski, ³ Massart ⁴ y Wold ⁵
1977	Primer libro publicado (en ingles) sobre quimiometría	B. Kowalski ⁶
1977	La revista <i>Analytica Chimica Acta</i> incorpora una sección dedicada a la quimiometría	J. Clere ⁷
1978	Libro (en ingles) de Quimiometría (Chemometrics book)	Massart et al. ⁸
1987	Aparición de la revista “ <i>Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems</i> ”	L. Massart ⁹
1987	Aparición de la revista “ <i>Journal of Chemometrics</i> ”	B. Kowalski ¹⁰
1990	Libro (en ingles): “ <i>Chemometrics Tutorials</i> ”	D. Massart ¹¹
2003	Review: “ <i>Chemometrics in spectroscopy Part 1 & 2</i> ”	P. Geladi ¹²
2003	Review: “ <i>The Evolution of chemometrics</i> ”	P. Hopke ¹³
2007	Libro (en castellano) “Temas avanzados de quimiometría”	M. Blanco ¹⁴

En cuanto al contenido de este capítulo, nos hemos centrado en 4 puntos importantes, el diseño de experimentos (DoE), métodos cuali-

² P. Geladi, K. Esbensen, *J. Chemometr.* **4** (1990) 337–354.

³ B. Kowalski, C. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 5632–5639.

⁴ D. Massart et al., *Anal. Chem.* **44** (1972) 2390–2393.

⁵ S. Wold, M. Sjostrom, *Chem. Scripta* **2** (1972) 49–55.

⁶ B. Kowalski (Ed.), *Chemometrics: Theory and Application*, American Chemical Society, Washington, DC, 1977.

⁷ *Analytica Chimica Acta*, ISSN 0003-2670 since 1947.

⁸ D. Massart, A. Dijkstra, L. Kaufman, *Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures, A Survey of Statistical and Mathematical Techniques*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1978.

⁹ *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, ISSN: 0169-7439 since 1987.

¹⁰ *Journal of Chemometrics* ISSN: 0886-9383 since 1987.

¹¹ D. Massart, R. Brereton, R. Dessy, P. Hopke, C. Spiegelman, W. Wegscheider (Eds), *Chemometrics Tutorials*, Elsevier, Amsterdam, 1990

¹² P. Geladi, *Spectrochimica Acta Part B* **58** (2003) 767–782.

¹³ P. Hopke, *Anal. Chim. Acta* **500** (2003) 365–377.

¹⁴ M. Blanco, V. Cerdá (Eds.). “Temas avanzados de quimiometría”. Univ. Illes Balears, Col·lecció materials didàctics, 125. Palma de Mallorca, 2007.

cuantitativos utilizados en NIRS, técnicas de análisis de imagen, pre-tratamientos espectrales en NIRS y en imagen química.

2.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS (DoE)

El DoE es una metodología que consiste en aplicar sistemáticamente la estadística a la experimentación. Esta metodología consiste en realizar una serie de ensayos en las que se provocan cambios deliberados en las variables de entrada (factores) a un proceso de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. En la industria farmacéutica hablamos de parámetros críticos de proceso, CPP, y atributos críticos de calidad, CQA, cuando nos referimos a variables de entrada y salida respectivamente.

El objeto de la utilización de los diseños experimentales es reducir lo más posible el número de experimentos a llevar a cabo sin sacrificar la precisión en los resultados analíticos. En la actualidad, existe un gran número de tipos de diseños experimentales (Tabla 2.2). Cada uno, gracias a sus propiedades permite resolver ciertos problemas particulares.

Tabla 2.2. Comparación de diseños experimentales según el caso experimental

Etapas	Nº de Factores	Modelo	Diseño
Screening	10 a 30	Variables cualitativas	* Factoriales fraccionados (Asimétrico) * D-Óptimo
		Linear (Con ciertas interacciones)	* Diseño de Hadamart * Factoriales fraccionados (simétrico) * D-Óptimo
Estudio de efectos	5 a 15	Linear con interacciones	* Factoriales fraccionados * Factoriales completos * D-óptimo
Optimización	2 a 7	Cuadrático	* Centrados compuestos * Diseños de Doehlert * D-óptimo * Factoriales fraccionados (3 niveles) * Diseños de Box Benhken
Mezclas	>3	Linear o cuadrático	* Tipo I (diseños de Schéffé) * Tipo II * Tipo III * Tipo IV

El tipo de DoE a utilizar dependerá del número de factores que se pueden estudiar y del tipo de información que se desea conocer. La idea fundamental que se debe tener en cuenta en el procedimiento experimental, es que debemos adecuar un DoE con la finalidad de responder a una problemática precisa. Por consiguiente, es necesario escoger o construir el DoE que dará las informaciones buscadas. Con el objeto de obtener información pertinente, se puede seguir los siguientes pasos: (1) definir los objetivos y criterios, (2) definir los factores que se desean estudiar y el dominio experimental, (3) construir el DoE, (4) llevar a cabo los experimentos, 5) analizar los resultados, 6) realizar, eventualmente, experimentos suplementarios, 7) validar los resultados y finalmente, 8) obtener las conclusiones del estudio.

En la presente memoria doctoral, se ha utilizado el DoE como una herramienta para:

- 1) Evaluar los CPP y CQA en un estudio basado en la filosofía de calidad mediante el diseño (QbD)^{15,16} y
- 2) Crear un grupo representativo de muestras de laboratorio, las cuales serán utilizadas en la construcción de modelos de calibración multivariantes. Este conjunto de muestras deberá cumplir los requisitos de cubrir el rango de concentraciones, evitando al mismo tiempo la colinealidad entre los componentes de las muestras y conteniendo toda la variabilidad deseada en cada componente.¹⁷

Técnicamente hablando, los factores (CPPs) son cualquier fuente de variación que pueda generar variabilidad al conjunto de calibración, estos factores podrán ser cualitativos o cuantitativos. Los niveles de un factor son los tipos o grados específicos del factor que se tendrán en cuenta en la realización del experimento. Por ejemplo, si consideramos como factor la concentración de principio activo en una formulación

¹⁵ ICH. ICH-Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development, 2009.

¹⁶ J. G. Rosas, M. Blanco, J. M. González, M. Alcalá, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 4432–4441.

¹⁷ R. Kramer. *Chemometric techniques for quantitative analysis.* (1998), New York: Marcel Dekker.

farmacéutica, los niveles de este factor serán los diferentes valores de concentración del principio activo. La matriz experimental contendrá las posibles combinaciones entre los diferentes niveles de cada uno de los factores, es decir el número de muestras que se deben preparar. De hecho, la utilización del DoE para la construcción de conjuntos de calibración ha sido reportada con éxito en la bibliografía^{18,19}

A modo de ejemplo grafico, en los DoE comúnmente utilizados (diseños factoriales completos, fraccionados y centrados compuestos), el dominio experimental puede ser representado de forma geométrica (Figura 2.2), siendo cada punto un experimento.

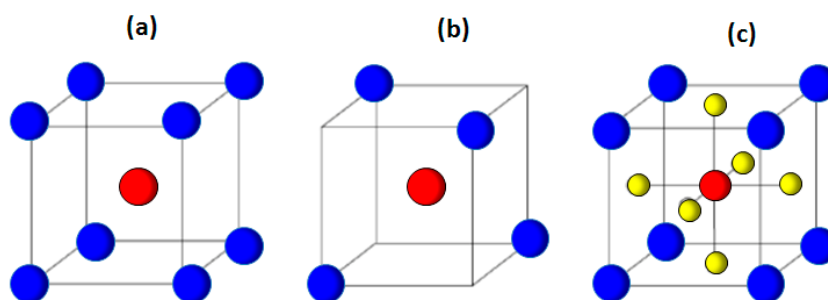


Figura 2.2. Comparación de tres tipos de diseños experimentales usando 3 factores y un punto central: (A) diseño factorial completo, (B) diseño factorial fraccionado y (C) diseño central compuesto con seis experimentos adicionales.

2.2.1. Diseños D-óptimos

Existen diversos criterios para escoger un diseño D-óptimo, por ejemplo basados en la D-optimalidad, A-optimalidad, V-optimalidad, G-optimalidad y G-eficiencia (Tabla 2.3). El más conocido y utilizado es el que sigue el criterio D-optimalidad (determinante), el cual trata de encontrar la combinación de puntos de un diseño de entre una lista de puntos candidatos que minimice el determinante $(X^T X)^{-1}$, donde X es la matriz de información, consiguiéndose con esto, que el diseño sea lo más cercano a la idealidad posible (es decir, a la ortogonalidad y la

¹⁸ J. Ferré, F. X. Rius, *TrAC, Trends anal. Chem.* **16** (1997) 70–73.

¹⁹ S. J. Haswell, A. D. Walmsley, *Anal. Chem. Acta.* **400** (1999) 399–412.

rotabilidad). Los diseños óptimos permiten crear un conjunto de calibración con un número elevado de factores y de niveles y además no es necesario que todos los factores tengan igual número de niveles. En términos generales, se requiere de un diseño D-óptimo cuando: La región experimental es irregular, los experimentos realizados deben ser incluidos, los factores cualitativos tienen más de dos niveles, se debe de reducir el número de experimentos, se deben calcular modelos especiales de regresión y cuando se utilizan factores de proceso y mezclas simultáneamente.²⁰

Tabla 2.3. Criterios de calidad para elegir una matriz D-óptima

	Criterio	Objetivo
D (Determinante)	$\det(X^t.X)$ determinante de la matriz de datos	Maximizar
M (Momentos)	$\det(M(\xi_n)) = \det[(X^t.X) / n^p]$ determinante de la matriz de momentos	Maximizar
A (Varianza media de los coeficientes)	$\text{Traza } (X^t.X)^{-1}$ Traza de la matriz de dispersión	Minimizar
G (Varianza general)	$d(U)_{MAX}$ Función de varianza máxima	Minimizar
Efectividad G	$\text{Eff G} = [p / (d(U)_{MAX} \cdot n)]$	Maximizar

²⁰ L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikstrom, S. Wold, *Design of Experiments-Principles and applications* (3rd Ed.), Umetrics AB, Umea, Sweden, 2008

2.3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EN NIRS

Los cambios físicos y químicos ocurridos durante un proceso se ven plasmados en los espectros NIR de las muestras, sin embargo esta información se encuentra escondida y su extracción a simple vista es prácticamente imposible, con lo cual es necesaria la ayuda de herramientas quimiométricas adecuadas. Desde la primera aplicación de algoritmos matemáticos reportada por K. Norris²¹ a espectros NIR, con el objeto de extraer información relacionada con la humedad de harinas y semillas, allá por los años 60, se han venido ensayando una gran diversidad de algoritmos, algunos complejos y otros simples, con un mismo objetivo, resolver problemas de extracción de información química i/o física contenida en los espectros NIR.

Dentro de estas técnicas se pueden distinguir dos grandes grupos, los métodos cualitativos y cuantitativos.

2.3.1. Métodos cualitativos

Los métodos cualitativos se refieren básicamente al a clasificación de las muestras de acuerdo a sus espectros NIR. Las identificaciones de los espectros NIR están basadas en métodos de reconocimiento de pautas. Las técnicas de clasificación pueden ser divididas en dos categorías: las no supervisadas y las supervisadas (Tabla 2.4). En las clasificaciones no supervisadas, las muestras son clasificadas sin un conocimiento previo, excepto el propio espectro NIR. En cuanto a las supervisadas, son técnicas en las cuales hay un conocimiento previo, por ejemplo la pertenencia a una categoría determinada.

De toda la variedad de métodos cualitativos empleados en NIRS (Tabla 2.4), los que han sido utilizados en esta memoria han sido el análisis en componentes principales y el coeficiente de correlación. No obstante, se han propuesto otros métodos que no entran dentro de la clasificación

²¹ K. Norris, J. Hart, In: A. Wexler (ed.), Principles and Methods of Measuring Moisture in Liquids and Solids, Reinhold, New York, vol. 4, pp. 19–25 (1965)

hecha (Tabla 2.4), los cuales pueden ser considerados como métodos basados en varianza espectral, estos son los índices de mezclado.

Tabla 2.4. Métodos quimiométricos cualitativos utilizados en NIRS

Categoría	Método
A. No supervisados	A.1. Análisis en componentes principales (PCA) ²²
	A.2. Dendrogramas ²³
	A.3. Modelos de mezclas Gaussinas ²³
	A.4. K-medias ²⁴
	A.5. Densidad basada en clúster espacial de aplicaciones con ruido ²⁵
	A.6. Redes neuronales de Kohonen ²⁶
	A.7. Análisis en componentes independientes (ICA) ²⁷
B. Supervisados	B.1. Métodos basados en correlación y distancias
	* Coeficiente de correlación (CorrCoef) ²⁸
	* Métodos de distancia ²⁹
	- Distancia de Euclidiana
	- Distancia de Mahalanobis
	B.2. Análisis discriminante
	* Análisis discriminante lineal (LDA) ³⁰
	* Análisis discriminante cuadrático (QDA) ³⁰
	B.3. K-vecino más cercano(KNN) ³¹
	B.4. Métodos de modelado
	* Modelado suave independiente por analogía de clases (SIMCA) ³²
	* Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) ³³
	B.5. Métodos no lineales
	* Redes neuronales artificiales (ANN) ³⁴
	* Redes neuronales de aprendizaje por cuantificación vectorial (LQV) ³⁵
* Redes neuronales probabilísticas (PNN) ³⁶	
* Máquinas de soporte vectorial (SVM) ³⁷	

²² Y. Roggo, C. Roeseler, M. Ulmschneider, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 777–786.

²³ W. Vos L. Evers, (<http://www.stats.ox.ac.uk/~vos/FullNotes.pdf>), 2004.

²⁴ D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

²⁵ M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **56** (2001) 83–92.

²⁶ J.A. Lopes et al., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **74** (2004) 269–275.

²⁷ M. Toivainen et al., *J. Chemometrics* **24** (2010) 514–522.

²⁸ T. Mark, *Anal. Chem.* **57** (1985) 1449–1456.

²⁹ D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.M. Deming, *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

³⁰ D. Coomans, M. Jonckheer, D.L. Massart, I. Broeckaert, P. Blockx, *Anal. Chim. Acta.* **103** (1978) 409–415.

³¹ M.-P. Derde et al., *Anal. Chem.* **59** (1987) 1868–1871.

³² S. Wold, *Pattern Recogn.* **8** (1976) 127–139.

³³ L. Stahle, S. Wold, *J. Chemom.* **1** (1987) 185–194.

³⁴ R.E. Shaffer, S.L. Rose-Pehrsson, R.A. McGill, *Anal. Chim. Acta.* **384** (1999) 305–317.

³⁵ T. Kohonen, *Proc. IEEE* **78** (1990) 1464–1480.

³⁶ D.F. Specht, *Neural Networks* **3** (1990) 109–118.

³⁷ E.S. Huang, *Drug Discov.* **10** (2005) 69–73.

2.3.1.1. Análisis por componentes principales (PCA)

El PCA (*Principal Component Analysis*),^{38,39} es sin duda uno de los métodos de reducción de variables más utilizados en NIRS y en la implementación de PAT. De hecho, del total de trabajos reportados en la literatura, dentro del marco PAT, es aproximadamente el 20% ha utilizado el PCA como método quimiométrico.⁴⁰

Dada una matriz bidimensional de datos \mathbf{X} ($M \times N$), formada por M espectros (muestras registradas) y N longitudes de onda. El PCA tiene como objetivo encontrar las direcciones de máxima variabilidad en que están agrupados los M puntos en el espacio de dimensión N , reduciendo así la dimensionalidad de \mathbf{X} , calculando un número inferior de nuevos ejes llamados componentes principales (PCs) o variables latentes (LVs), los cuales expliquen la información original. El primer PC1 es la combinación lineal de las N variables que explica la máxima variabilidad de las muestras (Figura 2.3); el segundo PC2 será ortogonal a PC1 y recogerá una variabilidad inferior a PC1 y así sucesivamente hasta que se explique la máxima variabilidad.

Matemáticamente hablando, la matriz de datos espectrales \mathbf{X} se descompone en el producto de las matrices de *scores* y *loadings*, más una matriz \mathbf{E} de residuales. La ecuación 2.1 detalla la descomposición de la matriz de datos en n PCs, esta ecuación se puede presentar también en forma matricial (ecuación 2.2).

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_n\mathbf{p}_n^T + \mathbf{E} \quad (2.1)$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (2.2)$$

Los *loadings* (\mathbf{P}) son los cósenos de los ángulos que forman los nuevos ejes con los originales. Los *scores* (\mathbf{T}) son las coordenadas de las muestras en los nuevos ejes. Debido a la ortogonalidad, los n PCs contendrán diferente información. Los primeros PCs describirán las fuentes de variabilidad más relevantes, mientras que los últimos

³⁸ H. Hotelling, *J. Educ. Psychol.* **24** (1933) 417–441, 498–520.

³⁹ S. Wold. *Chemom. Intell. Lab. Syst* **2** (1987) 37–52.

⁴⁰ A. L. Pomerantsev, O. Y. Rodionova, *J. Chemometr.* **26** (2012) 299–310.

describirán variaciones debidas al ruido. La matriz de datos \mathbf{E} contiene la información no recogida por los n componentes principales y se le conoce como residuales.

Por otro lado, el PCA se puede describir de forma esquemática (Figura 2.3), de tal manera que sea más fácil su comprensión.

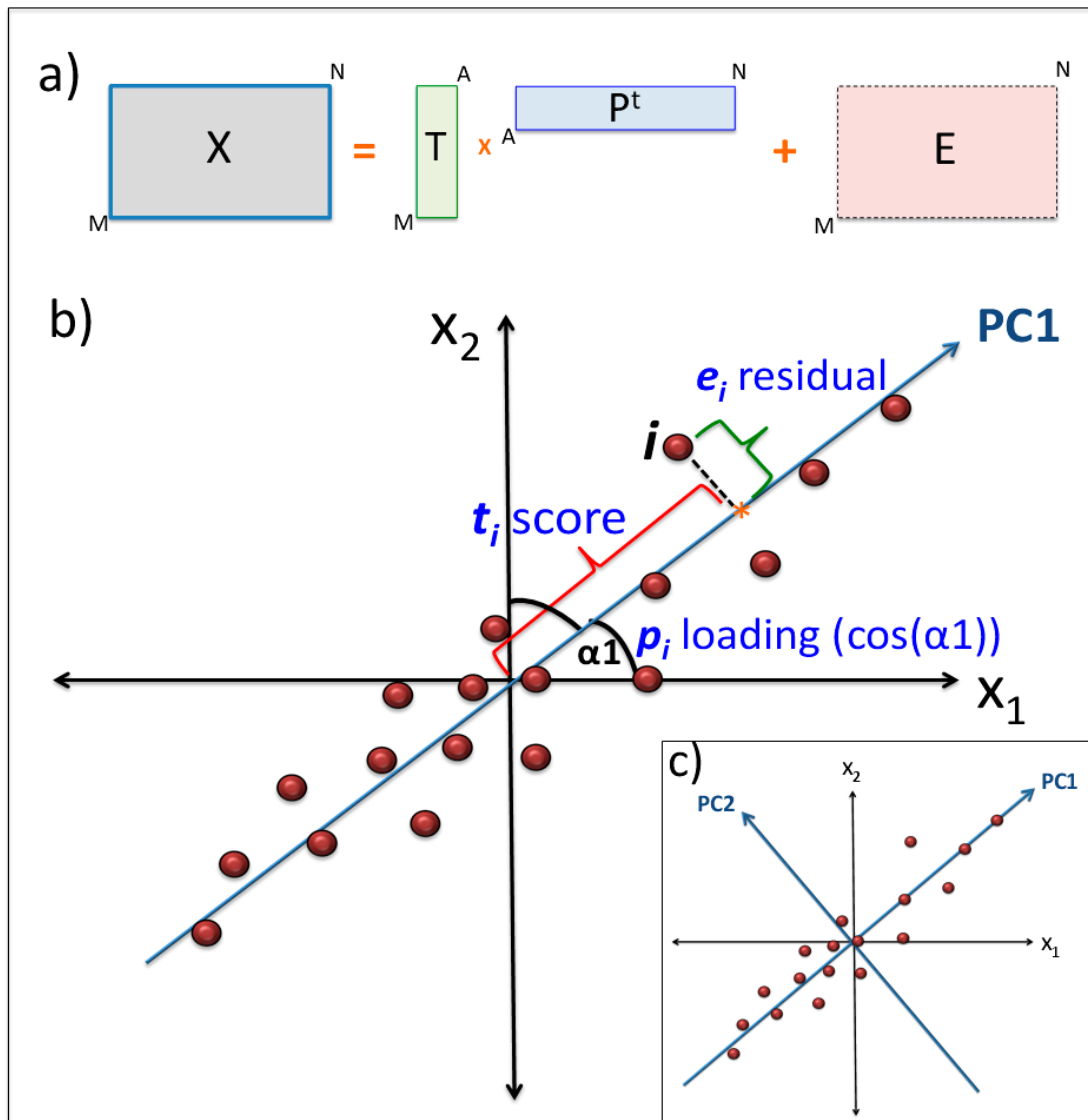


Figura 2.3. Representación gráfica de un PCA. a) Esquema gráfico de la ecuación 2.2, b) Distribución de datos en el espacio de la variables originales (ej. x_1 , x_2) y forma gráfica de calcular los *scores* y *loadings* c) datos en los nuevos componentes principales.

Existen diferentes algoritmos para calcular las matrices **T** y **P**, siendo los más utilizados NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*),⁴¹ SVD (*singular value decomposition*) y EVD (*eigenvalue Decomposition*).⁴²

2.3.1.2. Coeficiente de correlación (CorrCoef)

El coeficiente de correlación (CorrCoef) proporciona un criterio muy bien conocido para evaluar la similitud entre espectros.⁴³ El *CorrCoef* se calcula entre el espectro del componente puro (ej. principio activo, API) y los obtenidos de las muestras (ecuación 2.3)

$$\text{CorrCoef} = \frac{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda} y_{\lambda}}{\sqrt{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda}^2 \sum_{\lambda} y_{\lambda}^2}} \quad (2.3)$$

donde, para cada longitud de onda, $x_{mn\lambda}$ es el espectro para la mn-th muestra e y_{λ} es el espectro puro para el analito en cuestión. La similitud es máxima para dos espectros con un $\text{CorrCoef} = 1$. El CorrCoef es esencialmente un parámetro cualitativo que es utilizado mayormente en imagen química. Sin embargo, ha sido utilizado con buenos resultados en datos de NIRS convencional.^{44,45}

2.3.1.3. Índices de mezclado

Los índices de mezclado son aproximaciones estadísticas principalmente utilizados para medir el grado de mezclado de una mezcla de sólidos.⁴⁶ Durante los últimos cincuenta años, muchos índices han aparecido en la literatura, la mayoría han sido desarrollados para mezclas de dos componentes y se basan en el análisis estadístico, principalmente utilizando la desviación estándar, varianza o el coeficiente de variación de la composición entre las

⁴¹ H. Wold. *Multivariate analysis*, Krishnaloh, New York (1966).

⁴² H. Wu, D.L. Massart, S. de Jong, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **36** (1997) 165–172.

⁴³ N. Jovanovic et al., *Pharm. Res.* **23** (2006) 2002–2013

⁴⁴ J. Rosas, M. Blanco, *J. Pharm. Biom. Anal.* **70** (2012) 691–699.

⁴⁵ J. Rosas, T. De Beer, H. De Waard, M. Blanco, **(en redacción)**

⁴⁶ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* **62** (1970) 53–66.

muestras extraídas de una mezcla.⁴⁷ La utilización de estos conceptos clásicos puede aportar información del estado de un proceso de mezclado, aplicando criterios simples y ampliamente estudiados, como son los índices de mezclado (M). Miles^{48,49} propuso un índice M para evaluar la homogeneidad en mezclas de semillas y lo definió de la siguiente forma:

$$M = \left(1 - \frac{\sigma^2}{\sigma_0^2}\right) \quad (2.4)$$

Donde, M es el grado de mezclado, σ^2 y σ_0^2 son la varianza de diferentes muestras extraídas y la varianza al inicio del mezclado respectivamente, los cuales pueden ser determinadas de forma experimental. Sin embargo, para poder utilizar esta ecuación con datos espectrales NIR, hemos adaptado la ecuación 2.4 de la forma como se describe a continuación:

$$M = \left(1 - \frac{Var}{Var_0}\right) \times 100 \quad (2.5)$$

Donde, M es el índice de mezclado en porcentaje, Var es la varianza media de una ventana “fija” móvil de n espectros consecutivos (de m longitudes de onda) y Var_0 es la varianza media para una ventana de n espectros consecutivos al inicio del proceso. Las varianzas se pueden calcular experimentalmente de la siguiente forma:

$$Var_i = \frac{\sum_{j=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_i)^2}{n-1} \quad (2.6)$$

$$Var = \frac{\sum_{i=1}^m Var_i}{m} \quad (2.7)$$

⁴⁷ N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow, *Mixing in the process industries*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, London, 1997.

⁴⁸ S.R. Miles, *Inst. Seed Test. Assoc. Proc.* **27** (1962) 407–412.

⁴⁹ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* **62** (1970) 53–66.

Donde, A_{ij} es la absorbancia a la longitud de onda i en el espectro registrado j y \bar{A}_i es la absorbancia media para los n espectros a la misma longitud de onda. Esta ecuación 2.6 proporciona un vector de varianza (Var_i). Finalmente, se calcula la varianza media como vector, Var , para m longitudes de onda.

2.3.2. Métodos cuantitativos

En la presente memoria, el único método de regresión cuantitativo que se ha utilizado fue la regresión por mínimos cuadrados (PLS), por lo cual será el método que se describirá en detalle, sin embargo la Tabla 2.5 muestra las diversas técnicas cuantitativas reportadas en la bibliografía, las cuales han sido aplicadas en la espectroscopia NIR.

Tabla 2.5. Métodos cuantitativos más utilizados en NIRS

Tipo	Método
Métodos lineales	Regresión lineal múltiple (MLR) ⁵⁰
	Regresión de componentes principales (PCR) ⁵¹
	Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) ⁵²
Métodos no lineales	Regresión PLS no lineal (Non-linear PLS) ⁵³
	Redes neuronales artificiales (ANN) ⁵⁴
	Máquinas de soporte vectorial (SVM) ⁵⁵
	Regresión local ponderada (LWR) ⁵⁶

2.3.2.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

El algoritmo PLS (*Partial Least Squares*) fue desarrollado por H. Wold,⁵⁷ siendo desde entonces ampliamente utilizado en diversos campos.^{58,59}

⁵⁰ H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, JohnWiley&Sons, Chichester, 1996.

⁵¹ T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, A.M.C. Davies, *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications, Chichester, UK, 2002.

⁵² M.J. Adams, *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1995.

⁵³ M. Blanco et al., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **50** (2000) 75–82.

⁵⁴ Y. Chen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **27** (2001) 623–631.

⁵⁵ U. Thissen et al., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **73** (2004) 169–179.

⁵⁶ S. Chang, E. Baughman, B. McIntosh, *Appl. Spectrosc.* **55** (2001) 1199–1206.

⁵⁷ H. Wold. Soft modelling. *The basic design and some extensions*. In systems under indirect observation. K. G. Jöreskog, H. Wold (Eds.), Amsterdam, 1982.

⁵⁸ P. Geladi. *J. Chemometr.* **2** (1988) 231–246.

⁵⁹ A. Höskuldsson, *J. Chemometr.* **2** (1988) 211–228.

Dentro del marco de PAT, del total de trabajos reportados en la literatura, aproximadamente el 45% utilizan la regresión PLS como método de análisis,⁶⁰ lo cual demuestra su importancia.

En esta memoria nos centraremos en una versión en particular de la regresión PLS, la PLS1, ya que fue la que se utilizó para la construcción de los modelos de calibración multivariantes. En la actualidad, la PLS1 es probablemente el método de regresión por reducción de variables más utilizado.⁶¹ Su primera aplicación con datos espectrales NIR fue reportada por Martens y Jensen.⁶²

En el PLS1, la matriz \mathbf{X} (ej. Espectros) y el vector respuesta \mathbf{y} (ej. Contenido de API) son descompuestos utilizando un número dado de variables latentes, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad (2.8)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{T}\mathbf{q}^t + \mathbf{f} \quad (2.9)$$

Donde, \mathbf{T} y \mathbf{P} son respectivamente los *scores* y *loadings* para \mathbf{X} , \mathbf{q} es el vector *loading* para \mathbf{y} , \mathbf{E} y \mathbf{f} son los residuales para \mathbf{X} e \mathbf{y} respectivamente. Estos residuales se obtienen por deflación para cada nueva variable latente.

Existen diversas maneras y algoritmos para calcular una regresión PLS1,⁶³ sin embargo la metodología utilizada en todos los modelos PLS reportados en esta memoria se encuentra resumida en la Tabla 2.6. Se asume que \mathbf{X} ($n \times k$) es una matriz centrada e \mathbf{y} ($n \times 1$) es un vector también centrado. El algoritmo se inicia con $j = 1$, $\mathbf{X}_1 = \mathbf{X}$ e $\mathbf{y}_1 = \mathbf{y}$. El algoritmo continúa mediante diversos pasos (tabla 2.6) para encontrar las primeras g variables latentes. En primer lugar (paso 1), se busca la dirección en el espacio \mathbf{X} , la cual produzca la mayor covarianza entre \mathbf{X} e \mathbf{y} . Esta dirección esta dada por el vector unidad \mathbf{w} y es tal que

⁶⁰ A.L. Pomerantsev, O.Y. Rodionova, *J. Chemometr.* **26** (2012) 299–310.

⁶¹ H. Martens, T. Naes. *Multivariate calibration*, John Wiley & Sons, England, 1989.

⁶² H. Martens, S.A. Jensen, Partial least squares regression : A new two-stage NIR calibration method. In: *Progress in Cereal Chemistry and technology*, Vol. 5a, J. Holas, J. Kratochvil, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 607 – 647.

⁶³ M. Andersson, *J. Chemometr.* **23** (2009) 518–529.

grandes variaciones en los valores de \mathbf{X} son acompañados por grandes variaciones en los correspondientes valores de \mathbf{y} . El vector unitario \mathbf{w}_1 ($k \times 1$) es formado por la normalización de la matriz de covarianza de \mathbf{X} e \mathbf{y} . Luego (paso 2), el vector de scores \mathbf{t}_1 ($n \times 1$) es formado como una combinación lineal de las columnas de \mathbf{X} con los pesos de \mathbf{w}_1 . Posteriormente (paso 3), se calcula el coeficiente de regresión \hat{q}_1 mediante una regresión lineal ordinaria entre \mathbf{y} e \mathbf{t}_1 . Subsecuentemente (paso 4), se calcula el vector \mathbf{p}_1 ($k \times 1$), el cual es la transpuesta del vector de coeficiente de regresión obtenidos a partir de regresiones lineales simples de las columnas de \mathbf{X} sobre \mathbf{t}_1 . Finalmente (paso 5), el vector ($k \times 1$) de residuales $\mathbf{X}_2 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T$ es calculado después de la regresión entre \mathbf{X} y \mathbf{t}_1 , y correspondientemente, $\mathbf{y}_2 = \mathbf{y} - \mathbf{t}_1 \hat{q}_1$ son los residuales después de la regresión entre \mathbf{y} e \mathbf{t}_1 . En esta etapa se asegura que los vectores \mathbf{t}_j sean ortogonales y por consecuencia asegurar que la regresión múltiple de \mathbf{y} y \mathbf{T} pueda ser calculada una columna al mismo tiempo. El procedimiento se repite usando \mathbf{X}_2 e \mathbf{y}_2 y posteriormente una y otra vez, de manera que cada ejecución del algoritmo revele más y más información acerca de la relación entre \mathbf{X} e \mathbf{y} . Después de que g iteraciones sean completadas se obtienen las ecuaciones 2.8 y 2.9.

En cuanto a las predicciones, consideremos una nueva muestra desconocida \mathbf{z} ($1 \times k$) y su valor predicho \bar{y} , ambos sin centrar. Dado $\bar{\mathbf{x}}$ e $\bar{\mathbf{y}}$ ($k \times 1$), las cuales son las medias de las muestras de calibración, la predicción se lleva a cabo mediante los pasos 1–5, dejando el vector fila $\mathbf{z} - \bar{\mathbf{x}}$ seguir el mismo camino que una fila de la matriz \mathbf{X} . Una vez formadas las matrices \mathbf{W} , \mathbf{T} , \mathbf{P} y el vector $\hat{\mathbf{q}}$ por aplicación del algoritmo PLS1 para el conjunto de calibración, la predicción se realiza mediante los pasos 1–6a (Tabla 2.6) o también puede realizarse de una forma rápida (paso 6b).⁶⁴

⁶⁴ R. Bro, *J. Chemometr.* **10** (1996) 47–61.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2.6. Pasos en la construcción de un modelo de calibración PLS1

Pasos	Ecuación	
Calibración	Paso 1. Calculo de los “loading weights”, \mathbf{w}	$w_j = X_j^T y_i / \ X_j^T y_i\ $
	Paso 2. Calculo de los scores, $\hat{\mathbf{t}}_a$	$t_j = X_a w_j$
	Paso 3. Calculo de los loadings químicos, \mathbf{q}	$\hat{q}_j = t_j^T y_j / t_j^T t_j$ $p_j = X_j^T t_j / t_j^T t_j$
	Paso 4. Calculo de residuales para “ \mathbf{X} ” e “ \mathbf{y} ”	$X_{j+1} = X_j - t_j p_j^T$ $y_{j+1} = y_j - t_j \hat{q}_j$
	Paso 5. Calculo del vector de regresión $\hat{\mathbf{b}}$	$\hat{\mathbf{b}} = \mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \hat{\mathbf{q}}$
Predicción	Paso 1. Centrar los nuevos datos espectrales, \mathbf{x}_j	$x_j = z - \bar{x}$
	Paso 2. Encontrar los nuevos scores \mathbf{t}_j	$t_j = x_j w_j$
	Paso 3. Calculo del nuevo residual	$x_{j+1} = x_j - t_j p_j^T$
	Paso 4. dado $j = j+1$, repetir pasos 2 – 4 hasta $j = g$	
	Paso 5. Formar el vector fila $\hat{\mathbf{t}}$	$\hat{\mathbf{t}} = (t_1, \dots, t_g)$
	Paso 6a. Predicción de $\bar{\mathbf{y}}$	$\bar{\mathbf{y}} = \bar{\mathbf{y}} + \hat{\mathbf{t}} \hat{\mathbf{q}}$
Paso 6b. Forma rápida de predicción de $\bar{\mathbf{y}}$, utilizando $\hat{\mathbf{b}}$	$\bar{\mathbf{y}} = \bar{\mathbf{y}} + (\mathbf{z} - \bar{\mathbf{x}}) \hat{\mathbf{b}}$	

Un ejemplo gráfico resumiendo los pasos más importantes en la regresión PLS1 puede ser apreciado en la Figura 2.4. Note como el primer factor PLS (CP1) es orientado de tal manera que describa la variación de \mathbf{X} , mientras que al mismo tiempo proporciona una buena correlación con el vector \mathbf{y} . El vector de scores \mathbf{t}_1 es calculado a partir de las nuevas coordenadas de las proyecciones de las observaciones sobre CP1 en el espacio \mathbf{X} . Este vector \mathbf{t}_1 resume la información en las variables originales \mathbf{X} . Una primera estimación de la variable \mathbf{y} ($\bar{\mathbf{y}}_1$) es calculada multiplicando $\mathbf{t}_1 \times \mathbf{q}_1$. El segundo factor PLS (CP2), ortogonal al primero, permite calcular el vector \mathbf{t}_2 , el cual es utilizado para una segunda estimación de la variable \mathbf{y} ($\bar{\mathbf{y}}_2$). Este procedimiento se repite hasta que la correlación sea adecuada.

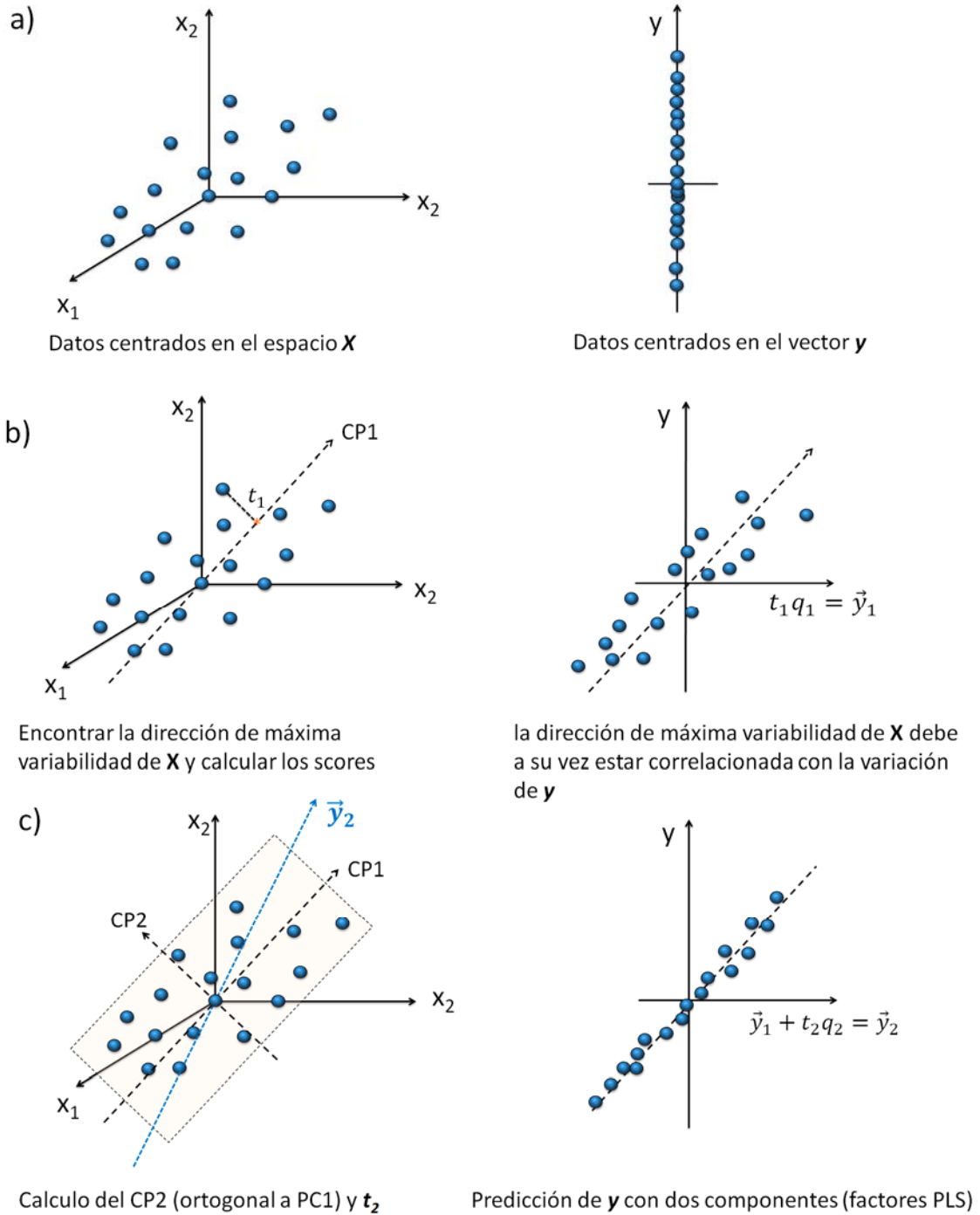


Figura 2.4. Ejemplo gráfico resumiendo los pasos más destacados en una PLS1 con dos factores PLS. a) centrado de los datos, b) cálculo del primer factor PLS y c) cálculo del segundo factor PLS.

2.5.2.1.1. Construcción de un modelo PLS1 y evaluación de resultados

Un modelo multivariante es la relación matemática que se establece entre las variables analíticas (\mathbf{x}) con los CQAs (\mathbf{y}) del analito, pudiendo ser estos parámetros físicos (tamaño de partícula, fluidez, viscosidad, presión) i/o químicos (concentración, humedad, pH). La construcción de un modelo de calibración multivariante, desde su concepción, validación y aplicación engloba una serie de pasos, que de ser bien respetados, asegura una buena robustez de los modelos (Figura 2.5).



Figura 2.5. Pasos a seguir para obtener modelos de calibrado multivariante robustos

En cuanto a la valuación del modelo, es de gran importancia examinar ciertos parámetros, los cuales aportaran información sobre la calidad de los modelos (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Criterios para evaluar la calidad de un modelo de calibración PLS1

Paso	Descripción	Ecuaciones
Selección del número de factores PLS	<p>La selección del número de factores PLS debe incorporar la información relevante, pero también debe de excluir el ruido. La forma más común de escogerlos adecuadamente es utilizar el PRESS (<i>Predicted Residual error Sums of Squares</i>) o la varianza explicada.</p> <p>Otro criterio consiste en escoger aquel con los errores de predicción más bajos. Para evaluar los errores de calibración y predicción se utilizan el RSE (<i>Relative Standard Error</i>) y el RMSE (<i>Root Mean Square Error</i>), siendo diferenciados como RSEC y RMSEC para calibración, y RSEP y RMSEP para predicción, seleccionando en número de factores en función del error de predicción.</p>	$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i^{pred} - y_i^{ref})^2 \quad (2.10)$ <p>Donde, n es el número de muestras, y_i valor de la propiedad a determinar obtenido por el método de referencia e y_i^{pred} los valores predichos de la propiedad a determinar</p> $RSE = \left(\sqrt{\frac{PRESS}{\sum_{i=1}^n (y_i^{ref})^2}} \right) \times 100 \quad (2.11)$ $RMSE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (2.12)$ <p>Donde, n es el número de muestras</p>
Porcentaje de varianza explicada (% Expl. Var.)	Este parámetro determina cuanta información contenida en las variables originales es recogida por los nuevos factores. Es uno de los primeros parámetros a examinar, tanto para los datos espectrales (X) como para los datos de concentración (Y). Ayuda a determinar el número apropiado de factores.	
Gráfico de concentración predicha vs. referencia	Se utiliza para evaluar la falta de ajuste (<i>lack of fit</i>) y el bias o sesgo, así como para detectar muestras anómalas. En un modelo correcto, las muestras han de estar distribuidas aleatoriamente alrededor de una línea con pendiente 1 y ordenada en el origen 0.	
Gráficos de <i>loadings</i> y <i>scores</i>	Además de ser útiles para determinar las regiones espectrales con mayor importancia, los <i>loadings</i> se utilizan para examinar visualmente los factores que incorporan ruido en el modelo de calibración. El gráfico de dispersión de <i>scores</i> se utiliza para examinar similitudes o diferencias entre muestras, así como para observar pautas anómalas en los datos.	
Residuales de concentración vs. <i>leverage</i>	El <i>leverage</i> muestra como de diferente es el registro espectral de una muestra frente al resto. Las muestras con un <i>leverage</i> muy superior al resto se han de investigar para detectar la causa, ya que pueden ser <i>outliers</i> . Así, muestras con residuales de concentración y <i>leverage</i> elevados son posibles <i>outliers</i> .	

La robustez de un modelo de calibración multivariante se puede considerar como la estabilidad de su capacidad predictiva frente a perturbaciones externas.⁶⁵

La falta de robustez de los modelos de calibración, manifestada mediante grandes errores de predicción debidos a pequeñas perturbaciones en la respuesta instrumental o ligeros cambios en el proceso, es uno de los principales obstáculos para la extensión de aplicaciones espectrométricas en la industria farmacéutica.⁶⁶

⁶⁵ M. Zeaiter, J.M. Roger, *TrAC Trend. Anal. Chem.* **23** (2004) 157–170.

⁶⁶ P.J. Gemperline, *Chemometr. Intell. Lab.* **39** (1997) 29–40.

2.4. TECNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN

2.4.1. Métodos para el análisis de imágenes ($M \times N$)

2.4.1.1. Análisis de clúster por el método de las K -medias

El agrupamiento (*clustering*) es una manera para separar grupos de una población. El método de las K -medias trata cada componente como una posición en el espacio, asignando cada pixel x_{mn} de la imagen a un k^{th} clúster, por su proximidad a un centroide, por medio de la minimización de la suma de distancias al cuadrado de cada pixel a sus respectivos centroides (Ecuación 2.13).

$$J = \sum_{k=1}^K \sum_{mn=1}^{MN} \left\| x_{mn}^{(k)} - m_k \right\|^2 \quad (2.13)$$

Donde, $x_{mn}^{(k)}$ es el nm^{th} pixel y m_k es el centroide del clúster k . La aplicación del algoritmo involucra los siguientes pasos: (1) Elección del número de clústeres, k ; (2) Generación de los k clústeres y determinación de sus centroides; (3) Asignación de cada pixel al centroide mas cercano; (4) Calculo de J y re calculo de nuevos centroides y (5) Repetición de 3 y 4 hasta que se cumpla un criterio de convergencia.

La principal ventaja de este algoritmo es su simplicidad, que permite procesar grandes conjuntos de datos. Por otro lado, su principal inconveniente es un riesgo de una convergencia a un local mínimo y forzar a cada píxel a pertenecen exclusivamente a un clúster.

2.4.1.2. Análisis por macropíxeles

El análisis por macropíxel fue introducido como una medida de la heterogeneidad de imagen basada en un clúster de píxeles.⁶⁷ Esta técnica divide una imagen en N cuadrados de píxeles no superpuestos,

⁶⁷ M.L. Hamad et al., *J. Pharm. Sci.* **96** (2007) 3390–3401.

INTRODUCCIÓN

a partir de los cuales se puede extraer información estadística cuantitativa, ya sea dentro o entre macropíxeles, por ejemplo la media, la desviación estándar y la varianza. Obviamente, la desviación estándar de las medias de todos los macropíxeles de una imagen es más baja cuando la muestra es más representativa de la imagen total.

Estadísticamente hablando, cada macropíxel puede verse como una muestra de una población más grande (la imagen), por lo tanto la distribución de componentes en la superficie de la imagen puede evaluarse comparando todos los macropíxeles. Obviamente, si los macropíxeles de una imagen son muy parecidos, la imagen tendrá una distribución homogénea. Esto puede observarse comparando la media (\bar{X}) y la desviación estándar (Sd) de todos los macropíxeles de la imagen y utilizando la desviación estándar (σ_m) y la varianza (Var_m) de las medias de todos los macropíxeles en una imagen. Para facilitar la comprensión del proceso analítico, la Tabla 2.8 y la Figura 2.6 resumen las ecuaciones y el procedimiento con macropíxeles respectivamente.

Tabla 2.8. Ecuaciones para realizar análisis de macropíxel

Estadística	Dentro de macropíxeles	Ec.	Entre macropíxeles	Ec.
Media	$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	(2.14)	$\bar{M}_{Sd} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Sd_i$	(2.15)
Desviación estándar	$Sd = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}$	(2.16)	$\sigma_m = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\bar{X}_i - Mt)^2}$	(2.17)
Varianza	$Var = Sd^2$	(2.18)	$Var_m = \sigma_m^2$	(2.19)
Donde,	\bar{X} = Intensidad media de los píxeles, n = Número de píxeles, x_i = Valor del píxel, Sd = Desviación estándar de píxeles, Var = Varianza de los píxeles		\bar{M}_{Sd} = Promedio de las desviaciones estándar de los macropíxeles en toda la imagen, Sd_i = Desviación estándar de cada macropíxel N = Numero total de macropíxeles en la imagen , σ_m = Desviación estándar de las medias de macropíxeles, \bar{X}_i = Media de cada macropíxel, Mt = Promedio de las medias de macropíxeles Var_m = Varianza de las medias de macropíxeles	

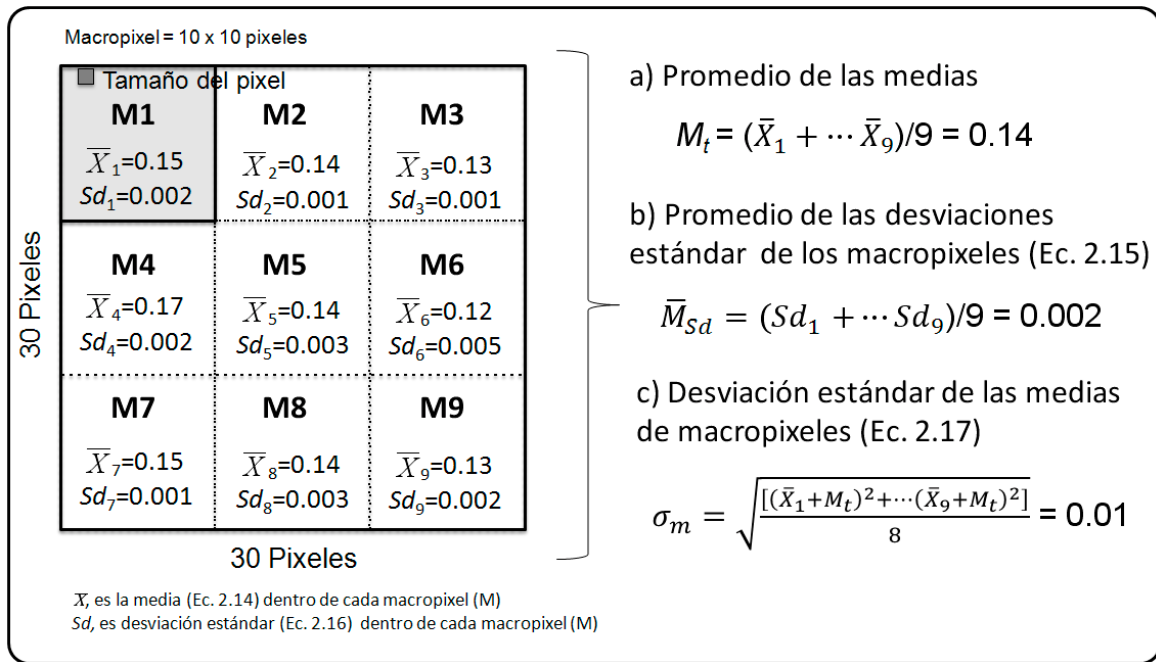


Figura 2.6. Análisis de Macropixel usado para extraer los parámetros estadísticos de una imagen.

2.4.1.3. Métodos para determinar homogeneidad. Índices de mezclado

Las nociones clásicas de homogeneidad de una mezcla pueden extrapolarse al análisis de imagen en términos de macropixeles. En lugar de información estadística sobre la imagen entera, el procedimiento utiliza las estadísticas para cada macropixel y las compara para estimar la homogeneidad en toda la imagen.

2.4.1.3.1. Mezclas Binarias

Tradicionalmente, la varianza teórica de una mezcla binaria al estado segregado o heterogéneo (σ_o^2) está dada por la Ecuación 2.20 y para una mezcla al estado totalmente aleatorio u homogénea (σ_r^2) por la Ecuación 2.22.⁶⁸ No obstante estas ecuaciones pueden ser extrapoladas al análisis de imagen (Tabla 2.9). Obviamente, σ_r^2 se acercara a cero cuando el tamaño de macropixel aumente hasta igualar el tamaño total de la imagen.

⁶⁸ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* **62** (1970) 53–66.

Tabla 2.9. Ecuaciones originales y adaptadas a imagen para determinar los índices de mezclado

Parámetro	Ecuación original	Ec.	Adaptada a imágenes	Ec.
Varianza teórica (completamente segregado)	$\sigma_0^2 = \rho(1 - \rho)$	(2.20)	$\sigma_0^2 = P(1 - P)$	(2.21)
Varianza teórica (mezcla aleatoria)	$\sigma_r^2 = \frac{\rho(1 - \rho)}{n}$	(2.22)	$\sigma_r^2 = \frac{P(1 - P)}{n}$	(2.23)
Índice de Segregación	$I = \frac{\sigma^2 - \sigma_r^2}{\sigma_0^2 - \sigma_r^2}$	(2.24)	$I = \frac{\sigma_m^2 - \sigma_r^2}{\sigma_0^2 - \sigma_r^2}$	(2.25)
Índice de Lacey	$M = \frac{\sigma_0^2 - \sigma^2}{\sigma_0^2 - \sigma_r^2}$	(2.26)	$M_L = \frac{\sigma_0^2 - \sigma_m^2}{\sigma_0^2 - \sigma_r^2}$	(2.27)
Índice de Poole	$M = \frac{\sigma}{\sigma_r}$	(2.28)	$M_p = \frac{\bar{M}_{Sd}}{\sigma_r}$	(2.29)
Índice de Segregación usando el Chi-cuadrado	$S = \frac{\chi_o^2 - \chi_r^2}{\chi_s^2 - \chi_r^2}$	(2.30)	$I_\chi = \frac{\chi^2 - \chi_r^2}{\chi_o^2 - \chi_r^2}$	(2.31)
			$M_\chi = \frac{\chi_o^2 - \chi^2}{\chi_o^2 - \chi_r^2}$	(2.32)
Donde,	<p>$p, (1-p)$ son las proporciones de los componentes en la mezcla n = Numero de partículas en cada muestra σ_0 = desviación estándar de la mezcla antes del mezclado σ_r = Desviación estándar para una mezcla completamente aleatoria σ = Desviación estándar observada S = Índice de segregación con Chi-cuadrado χ_o^2 = Chi-cuadrado para cualquier mezcla χ_r^2 = Chi-cuadrado para una mezcla aleatoria χ_s^2 = Chi-cuadrado para una mezcla segregada</p>		<p>$p, (1-p)$ son las proporciones de los componentes en la mezcla n = numero de pixeles en cada macropixel σ_0 = Desviación estándar de la mezcla antes de iniciar el mezclado σ_r = Desviación estándar para una mezcla completamente aleatoria σ_m = Desviación estándar de las medias de macropixeles \bar{M}_{Sd} = Promedio de las desviaciones estándar de macropixeles en imagen, I_χ y M_χ = Índices de segregación y de Lacey con Chi-cuadrado χ_o^2 = Chi-cuadrado experimental para una mezcla χ_r^2 = Chi-cuadrado para una mezcla aleatoria χ_s^2 = Chi-cuadrado para una mezcla segregada</p>	

En 1952, Danckwerts⁶⁹ introdujo el termino intensidad de segregación (I) como una medida de la homogeneidad en mezclas de sólidos. El índice original y su versión adaptada a imagen son definidos por las ecuaciones 2.24 y 2.25 respectivamente (Tabla 2.9). Un valor de uno corresponde a un estado totalmente segregado y uno de cero a un estado totalmente aleatorio. Años después, en 1954, Lacey⁷⁰ introdujo el índice de mezclado M para evaluar la homogeneidad de mezclas, el cual ha sido ampliamente discutido y estudiado en la literatura

⁶⁹ P.V. Dankwertz, *Appl. Sci. Res.* **3** (1952) 279–289.

⁷⁰ P.M.C. Lacey, *J. Appl. Chem.* **4** (1954) 257–268.

especializada.⁷¹ El índice M original y el adaptado a imagen (M_L) del índice de Lacey son definidos por las ecuaciones 2.26 y 2.27 respectivamente (Tabla 2.9). Para una mezcla real, el rango de M_L es de 0 (totalmente heterogénea) a 1 (totalmente homogénea). Posteriormente, a inicios de los años 60, Poole⁷² desarrolló un índice aún mas discriminativo, M_P , el cual en la practica tiende a la unidad cuando la mezcla es totalmente homogénea. La versión original y la adaptada a imagen del índice de Poole son definidas en las Ecuaciones 2.28 y 2.29 respectivamente (Tabla 2.9).

2.4.1.3.2. Mezclas de multicomponente

Los índices descritos anteriormente, han sido largamente estudiados para sistemas binarios, pero en la mayoría de mezclas reales, la cantidad de componentes es de orden superior. Como respuesta a este problema, Gayle⁷³ propuso el cálculo de los índices de mezcla basados en estadísticas del Chi-cuadrado (χ^2) en mezclas multicomponente, obteniendo buenos resultados. De manera análoga a la de Gayle, pero considerando el contenido de cada componente de la mezcla dentro de cada macropíxel, podemos evaluar la distribución de los componentes en la superficie de la imagen. El cálculo de χ^2 se realiza con la siguiente expresión:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} \quad 2.33$$

donde, χ^2 es el Chi-cuadrado, O es el valor experimental y E es el valor teórico.

Para mezclas multicomponente, Gayle adaptó la ecuación del índice de segregación (I) usando los valores de Chi-cuadrado, la ecuación original y nuestra adaptación a imagen para los índices de segregación y de Lacey se pueden observar en las ecuaciones 2.31 y 2.32

⁷¹ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* **62** (1970) 53–66.

⁷² K.R. Poole, R.F. Taylor, G.P. Wall, *Trans. Instn. Chem. Eng.* **42** (1964) 305–315.

⁷³ J. Gayle, O. Lacey, J. Gary, *Eng. Chem.* **50** (1958) 1279–1282.

respectivamente (Tabla 2.9). Según Gayle, χ_o^2 es igual al número de grados de libertad multiplicado por el contenido total de la mezcla. El número de grados de libertad se define como el número de elementos de los datos que puede facilitarse mediante un proceso aleatorio bajo un procedimiento de recuento utilizado. El valor de χ_r^2 es igual al número de grados de libertad.⁷⁴

Como otra alternativa al cálculo de índices para mezclas multicomponente, Stange (1963) presentó una forma de calcular σ_r^2 ,⁷⁵ pero el procedimiento de cálculo es complicado por lo que no se utilizó en nuestros trabajos. Por otro lado, Walker y Rollins⁷⁶ utilizaron el análisis multivariante de varianzas (MANOVA) para calcular índices de segregación en mezclas multicomponente, llegando a la conclusión de que este método era muy sensible a cambios en la fuente de varianza, pudiendo llevar a errores de interpretación, por lo que también no ha sido considerado en la presente memoria.

En la práctica, un sistema multicomponente se puede considerar como una mezcla del componente más importante (ej. API) y el resto de los componentes (ej. excipientes) y se podría manipular como una mezcla binaria,⁷⁷ (pseudo-binaria) lo que permitiría simplificar los cálculos y utilizar las ecuaciones para mezclas binarias.

2.4.1.3.3. Porcentaje de homogeneidad (H%)

Por definición, una mezcla se considera homogénea cuando la distribución de sus componentes es completamente aleatoria.⁷⁸ Debido a que no se cuenta actualmente con referencias o estándares de homogeneidad para el tratamiento de imagen, se propone en esta memoria un índice capaz de comparar los índices de homogeneidad de una imagen con respecto a su imagen aleatoria (construida a partir de

⁷⁴ K.R. Poole, R.F. Taylor, G.P. Wall, *Trans. Instn. Chem. Eng.* **42** (1964) 305–315.

⁷⁵ K. Stange, *Chem. Ing. Tech.* **35** (1963) 580–582.

⁷⁶ J.J. Walker, D.K. Rollins, *Chem. Eng. Sci.* **53** (1997) 651–655.

⁷⁷ K. Miyanami, Mixing, in: K. Gotoh, H. Masuda, K. Higashitani, (Eds.), *Powder Technology Handbook*, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 609–625.

⁷⁸ F.J. Muzzio, A. Alexander, C. Goodridge, E. Shen, T. Shinbrot, in: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta (Eds.), *Handbook of industrial mixing*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2004, pp. 887–940.

los mismos píxeles de la imagen en estudio). La imagen aleatoria obtenida será considerada como referencia de perfecta homogeneidad, debido a que su distribución es completamente aleatoria.

El cociente de los índices de mezclado, por ejemplo Lacey y Poole, de imágenes cuya homogeneidad es desconocida y sus respectivas imágenes aleatorias la llamamos fracción de homogeneidad. El porcentaje de homogeneidad ($H\%$) es entonces obtenido multiplicando la fracción de homogeneidad por 100:

$$H\%_{Lacey} = \left(\frac{M_{L_image}}{M_{L_random_image}} \right) \times 100 \quad 2.34$$

$$H\%_{Poole} = (M_P) \times 100 \quad 2.35$$

Obviamente, cuanto más cercano es $H\%$ a 100, la distribución de los componentes están más cercanos a una distribución aleatoria, por consecuencia la mezcla será más homogénea.

Hemos adoptado un umbral para $H\%$ de 95% como el criterio para considerar una mezcla homogénea.

2.4.2. Métodos para imágenes hiperespectrales ($M \times N \times \lambda$)

La imagen química (CI) es una técnica que combina la imagen digital y las técnicas espectroscópicas, con el objeto de extraer información espacial y espectral de muestras. De hecho, las palabras espectral y química se emplean a menudo indistintamente para referirse también a esta técnica. Considerando que el termino imagen espectral puede aplicarse a prácticamente todas las técnicas espectroscópicas (IR, Raman, fluorescencia, UV, MS), la imagen química se refiere a técnicas de espectroscopia vibracional (IR, NIR, Raman) en particular. La selectividad química de las espectroscopias vibracionales y el poder de visualización de las técnicas de imágenes pueden combinarse para obtener una descripción más completa de las concentraciones y de las

distribuciones de los ingredientes en muestras solidas en polvo, semisólida y otros tipos de muestras.

La imagen química en el infrarrojo cercano (NIR-CI) es una técnica especialmente utilizada para extraer información sobre la calidad de la superficie de las muestras.

Antes de aplicar cualquier técnica quimiométrica a imágenes hiperespectrales, es aconsejable efectuar un desdoblamiento (Figura 2.7) de la imagen hiperespectral ($M \times N \times \lambda$) a una matriz bidimensional ($MN \times \lambda$), para facilitar la utilización de los algoritmos, los cuales en su mayoría han sido desarrollados para trabajar con matrices en dos dimensiones. Dentro de las técnicas utilizadas hasta el momento en el análisis de CI hiperespectrales tenemos: la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS),⁷⁹ el análisis PLS discriminante (PLS-DA),⁸⁰⁻⁸⁵ el análisis en componentes principales (PCA),^{81,86-90} una única longitud de onda,⁹¹⁻⁹³ el análisis de Clustering,⁹⁴⁻⁹⁹ la regresión clásica de mínimos cuadrados (CLS),^{100,101} el coeficiente de correlación,¹⁰² la CLS directa (DCLS),¹⁰³ la resolución multivariante curva mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS),^{104,105} la proporción entre alturas de picos,¹⁰⁶ el

⁷⁹ A. Palou et al., *J. Pharm. Anal.* **2** (2012) 90–97.

⁸⁰ W. Li et al., *Int. J. Pharm.* **350** (2008) 369–373.

⁸¹ T. Furukawa et al., *Anal. Sci.* **23** (2007) 871–876.

⁸² R.C. Lyon et al., *AAPS PharmSciTech.* **3** (2002) 1–15.

⁸³ S. Sasic, *Appl. Spectrosc.* **61** (2007) 239–250.

⁸⁴ J. Burger, P. Geladi, *J. Near Infrared Spectrosc.* **15** (2007) 29–37.

⁸⁵ B.J. Westenberger et al., *Int. J. Pharm.* **306** (2005) 56–70.

⁸⁶ F.W. Koehler ET AL., *Spectrosc. Eur.* **14** (2002) 12–19.

⁸⁷ Y. Roggo et al., *Anal. Chim. Acta* **535** (2005) 79–87.

⁸⁸ E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, L.H. Kidder, Near-infrared chemical imaging as a process analytical tool, in: K.A. Bakeev (Ed.) *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing Ltd, 2005, pp. 187–225.

⁸⁹ F. Clarke, *Vib. Spectrosc.* **34** (2004) 25–35.

⁹⁰ L.R. Hilden et al., *Int. J. Pharm.* **253** (2008) 283–290.

⁹¹ J.M. Amigo et al., *TrAC, Trends Anal. Chem.* **27** (2008) 696 – 713.

⁹² N. Jovanovic et al., *Pharm. Res.* **23** (2006) 2002–2013.

⁹³ C. Gendrin et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68** (2008) 828–837.

⁹⁴ A.S. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 1298–1307.

⁹⁵ L. Makein et al., *NIR News* **19** (2008) 11–15.

⁹⁶ L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Anal. Chim. Acta* **545** (2005) 262–278.

⁹⁷ J.C. Noordam et al., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **75** (2005) 115–126

⁹⁸ B. Walczak, *Wavelets in Chemistry*, Elsevier, New York, 2000.

⁹⁹ S. Theodoridis, K. Koutroumbas, *Pattern Recognition*, Academic, Press, New York, 1999

¹⁰⁰ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Talanta* **73** (2007) 733–741.

¹⁰¹ K.L.A. Chan et al., *Chem. Eng. Res. Des.* **83** (2005) 1303–1310.

¹⁰² N. Jovanovic et al., *Pharm. Res.* **23** (2006) 2002–2013.

¹⁰³ B. Vajna et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51** (2010) 30–38.

¹⁰⁴ J. Jaumot et al., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **76** (2005) 101–110.

¹⁰⁵ R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **30** (1995) 133–146.

¹⁰⁶ Y. Roggo et al., *Anal. Chim. Acta* **535** (2005) 79–87.

Simplex identification of split augmented Lagrangian (SISAL),^{107,108} el *Self-modeling mixture analysis* (SIMPLISMA),^{109,110} la correlación 2D espectroscópica muestra-muestra,^{111,112} la factorización positiva de matrices (PMF),¹¹³ el *Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis* (FSIW-EFA),¹¹⁴ el análisis de rango local¹¹⁵ y el análisis de parámetros simétricos en imagen (SPIA).¹¹⁶ Estos métodos han demostrado ser herramientas poderosas para extraer información cualitativa y cuantitativa de las muestras. No obstante, en la presente memoria, solamente describiremos el MCR y el PLS, ya que han sido los que se utilizaron en el análisis por imagen química para la confirmación de resultados.

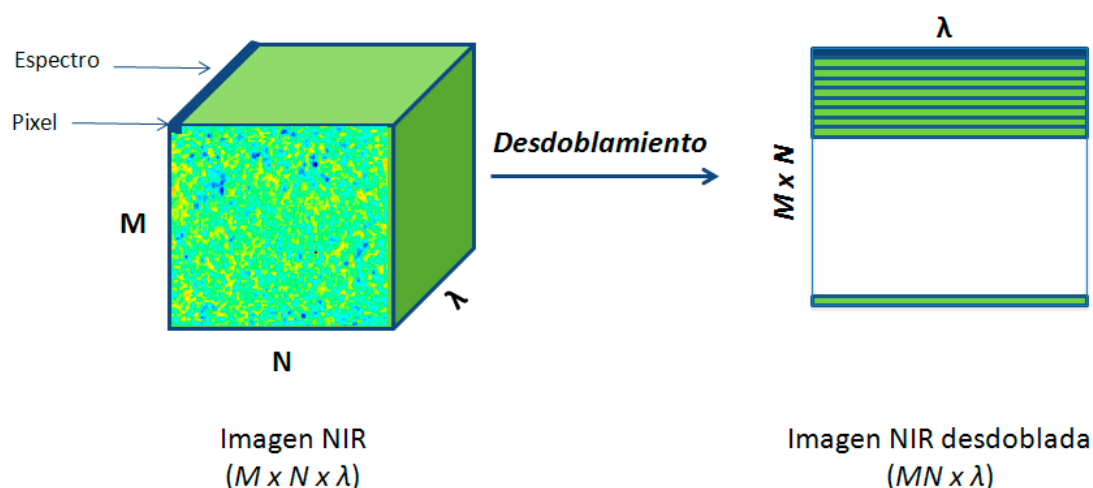


Figura 2.7. Desdoblamiento de una imagen química hiperespectral NIR

¹⁰⁷ B. Vajna et al., *J. Raman Spectrosc.* **42** (2011) 1977–1986.

¹⁰⁸ M.B. Lopes et al., *Anal. Chem.* **82** (2010) 1462–1469.

¹⁰⁹ L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, *Anal. Chim. Acta* **545** (2005) 262–278.

¹¹⁰ B. Vajna et al., *Anal. Chim. Acta* **712** (2012) 45–55.

¹¹¹ ¹¹⁰ H. Shinzawa et al., *Vib. Spectrosc.* **51** (2009) 125–131.

¹¹² S. Sasic et al., *Appl. Spectrosc.* **59** (2005) 630–638.

¹¹³ L. Duponchel et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43** (2003) 2057–2067.

¹¹⁴ A. de Juan et al., *J. Chemometr.* **22** (2008) 291–298.

¹¹⁵ A. de Juan et al., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **77** (2005) 64–74.

¹¹⁶ T. Puchert et al., *Eur. J. Pharm. And Biopharm.* **78** (2011) 117–124.

2.4.2.1. Resolución Multivariante de Curvas-Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS)

La MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*)¹¹⁷⁻¹¹⁹ descompone la matriz espectral \mathbf{X} ($MN \times \lambda$) en el producto de dos matrices, \mathbf{C} ($MN \times F$), la cual contiene los perfiles de concentraciones de los analitos y \mathbf{S}^T ($F \times \lambda$), la cual contiene los perfiles espectrales para cada componente \mathbf{F} .

$$\mathbf{X} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (2.36)$$

Donde, \mathbf{X} es la imagen hiperespectral desdoblada, \mathbf{E} ($MN \times \lambda$) es la matriz de residuales, es decir la información que no es explicada por el modelo. La representación gráfica de la ecuación 2.36, por ejemplo para una imagen con tres componentes, se muestra en la Figura 2.8. La MCR-ALS funciona por optimización iterativa de las matrices \mathbf{C} y \mathbf{S}^T con la ayuda de restricciones basados en el conocimiento químico o en parámetros estadísticos de los datos.

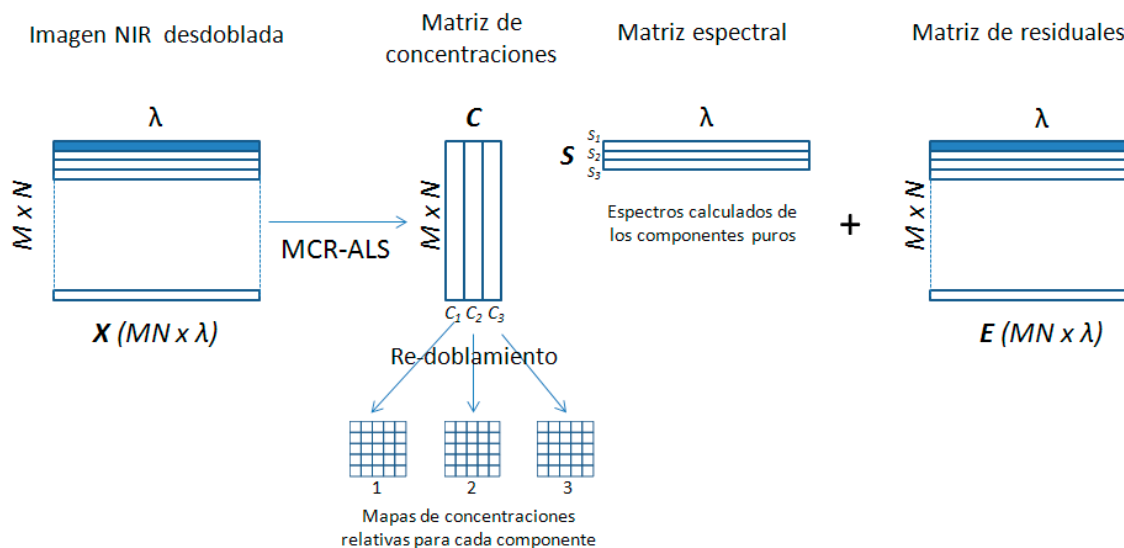


Figura 2.8. Representación gráfica de la aplicación del MCR-ALS

¹¹⁷ R. Tauler, B.R. Kowalski, S.Flemming, *Anal. Chem.* **65** (1993) 2040–2047.

¹¹⁸ R. Tauler, A.Smilde, B.R.Kowalski, *J. Chemometr.* **9** (1995) 31–58.

¹¹⁹ J. Jaumot et al., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **76** (2005) 101–110.

2.4.2.2. Isys-PLS1

Este algoritmo, denominado como PLS1, viene incluido en el programa Isys® 5.0 de Malvern. Es un método que aparentemente es parecido a un análisis de PLS discriminante (PLS-DA), el cual consiste en la creación de un modelo PLS donde la variable de respuesta es una variable categórica, que expresa la clase perteneciente de la observación realizada. El modelo PLS describe el conjunto de variables observadas y predice su respuesta asignando a cada observación una categoría. Este método, define una matriz de espectros de los componentes puros y una matriz de respuestas '1' y '0' que indican la pertenencia o no, respectivamente, a la clase de cada componente puro. El algoritmo aplicado a los espectros que componen una imagen hiperespectral proporciona un mapa de concentraciones de cada uno de los componentes modelados de la muestra (Figura 2.9), que junto a sus histogramas constituyen herramientas muy útiles para el conocimiento de la distribución de cada componente.

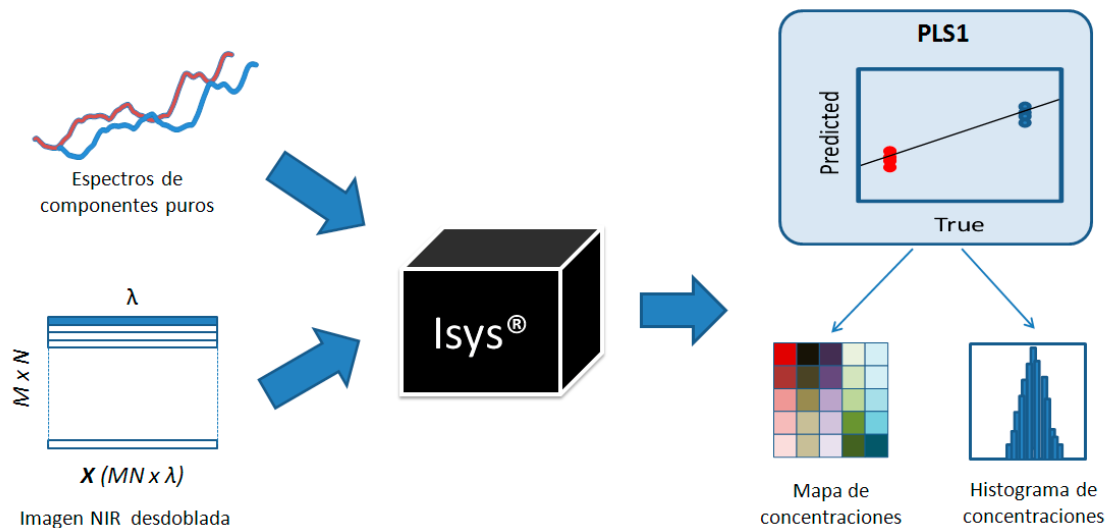


Figura 2.9. Esquema del empleo del método PLS1 en el programa Isys®, para obtener el mapa de concentraciones e histogramas

2.5. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN NIRS

Los datos espectroscópicos contienen, habitualmente, ciertas variaciones de desplazamiento de línea base y efectos multiplicativos que son, usualmente irrelevantes para determinar los parámetros o propiedades de interés. Esta información irrelevante dificulta enormemente la capacidad de desarrollar un modelo adecuado. El objetivo principal de la utilización de pre-tratamientos es reducir o eliminar esta información irrelevante, reduciendo considerablemente el cálculo matemático de modelado para desarrollar un método eficaz. Existen muchos pre-tratamientos reportados en la literatura,¹²⁰ sin embargo en esta memoria serán descritos en detalle únicamente los que han sido utilizados a lo largo de los diversos trabajos realizados. Como una apreciación general, la Figura 2.10 resume de forma jerárquica los pre-tratamientos más utilizados en la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica.¹²¹ Note como los pre-tratamientos de interés para esta memoria, y los cuales serán descritos en detalle a continuación, se encuentran en color azul.

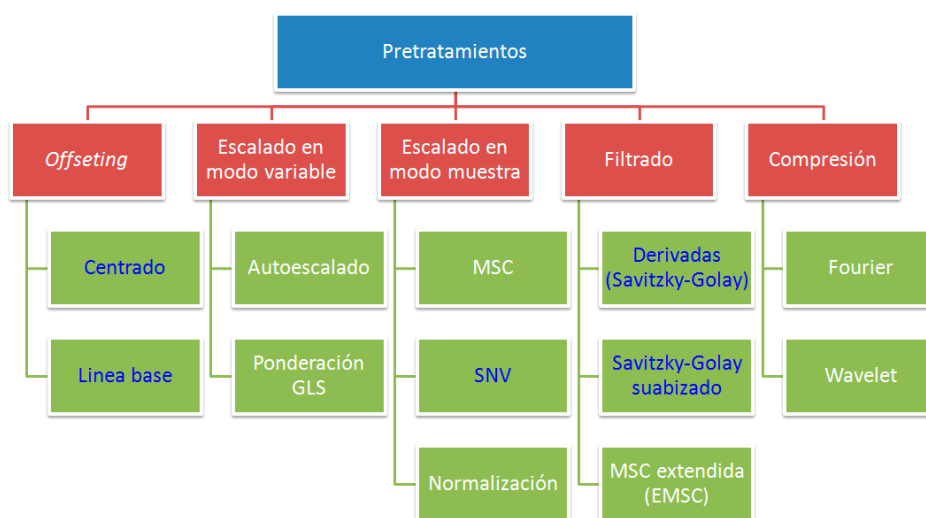


Figura 2.10. Representación jerárquica de los pre-tratamientos espectrales más utilizados en NIRS dentro de la industria farmacéutica.¹²¹

¹²⁰ M. Zeaiter, D. Rutledge. *Preprocessing Methods*. Comprehensive Chemometrics. Elsevier, Oxford, 2009.

¹²¹ C. Miller, in: Bakeev, K.A. (Ed.), *Process Analytical Technology*, Lackwell Publishing, UK, pp. 354–438, 2010.

Otra clasificación, mucho más amplia de las técnicas de pre-tratamiento espectral en NIR es resumida en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Pre-tratamientos empleados en la espectroscopia NIR

Para reducción de la dimensionalidad	Referencia
<i>a) Métodos no basados en la proyección ortogonal</i>	
- Análisis de componentes principales (PCA)	122
- Análisis de componentes independientes (ICA)	123
- Transformada de Fourier (FT)	123
- Transformada mediante ondas (<i>Wavelet Transform</i> (WT))	124
- Recocido simulado (<i>Simulated annealing</i> (SA))	125
<i>b) Métodos basados en la proyección ortogonal</i>	
- Corrección ortogonal de la señal (OSC)	126
- Corrección ortogonal de la señal proyectada (POSC)	127
- Corrección ortogonal de la señal directa (DOSC)	128
- Señal neta del analito (NAS)	129
- Cresta estimada de OSC (<i>Ridge-estimated</i> OSC (REOSC))	130
- Ortogonalización directa (DO)	131
- Proyección ortogonal sobre estructuras latentes (OPLS)	132
- Corrección ortogonal de la señal paso a paso mejorada	133
- Análisis de componentes principales obligado (CPCA)	134
- Reducción de la interferencia independiente (IIR)	135
- Ortogonalización mediante parámetros externos (EPO)	136
- Proyección ortogonal dinámica (DOP)	137
Para corrección de escala y normalización de señal	
Escalado a partir de la media (<i>Mean scaling</i>)	138
Escalado a partir del valor máximo (<i>Maximum scaling</i>)	123
Escalado por rango (<i>Range scaling</i>)	123
Escalado MinMax (MinMax scaling)	123
Escalado logarítmico (<i>Logarithmic scaling</i>)	123
Transformación de la varianza normal estándar (SNV)	139
SNV-Detrend	123
Transformación de la varianza normal robusta (RNV)	140
Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC)	141
MSC extendida (EMSC)	142
Sustracción de interferencia espectral (SIS)	123

¹²² A. Barros, D. Rutledge, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **73** (2004) 245–255.

¹²³ M. Zeaiter, D. Rutledge. *Preprocessing Methods*. Comprehensive Chemometrics. Elsevier, Oxford, 2009.

¹²⁴ J. Trygg, S. Wold. *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **42** (1998) 209–220.

¹²⁵ H. Swierenga, F. Wulfert, *Anal. Chim. Acta.* **411** (2000) 121–135.

¹²⁶ S. Wold et al., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44** (1998) 175–184.

¹²⁷ J. Trygg, S. Wold, *J. Chemom.* **16** (2002) 119–128.

¹²⁸ J. Westerhuis, S. De Jong, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **56** (2001) 13–25.

¹²⁹ H. Goicoechea, A. Olivieri, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **56** (2001) 73–81.

¹³⁰ Q. Shen, J.H. Jiang, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **82** (2006) 44–49.

¹³¹ C. Andersson, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **47** (1999) 51–63.

¹³² T. Fearn, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **50** (2000) 47–52.

¹³³ R. Feudale, H. Tan, *Appl. Spectrosc.* **57** (2003) 1201–1206.

¹³⁴ Y. Takane, T. Shibayama, *Psychometrika* **56** (1991) 97–120.

¹³⁵ P. Hansen, *J. Chemom.* **15** (2001) 123–131.

¹³⁶ J.M. Roger, F. Chauchard, V. Bellon-Maurel, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **66** (2003) 191–204.

¹³⁷ M. Zeaiter, J.M. Roger, *J. Chemom. Intell. Lab. Syst.* **80** (2006) 227–235.

¹³⁸ M. Zeaiter, D. Rutledge. *Preprocessing Methods*. Comprehensive Chemometrics. Elsevier, Oxford, 2009.

¹³⁹ R. Barnes, S. Dhanoa, *J. Near Infrared Spec.* **1** (1993) 185–186.

¹⁴⁰ Q. Guo, W. Wu, *Anal. Chim. Acta* **382** (1999) 87–103.

¹⁴¹ T. Isaksson, T. Naes, *Appl. Spectrosc.* **42** (1988) 1273–1284.

¹⁴² H. Martens, E. Stark *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9** (1991) 625–635.

2.5.1. Suavizado

Un suavizado de los espectros se realiza mediante filtros que permiten minimizar el ruido espectral mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay)¹⁴³ o por Transformada de Fourier (FT).¹⁴⁴

2.5.2. Derivadas

La baja resolución que a menudo presentan los espectros NIR puede ser mejorada derivando los espectros, lo cual permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Los métodos de derivación más utilizados son el de Norris¹⁴⁵ y el de Savitzky-Golay,¹⁴³ el cual incluye un suavizado previo a la derivación.

2.5.3. Varianza normal estándar (SNV)

La SNV (*Standar Normal Variate*) se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (*scattering*) producido por diferencias en el tamaño de partícula de muestras sólidas.¹⁴⁶

$$X_{i,m}^{SNV} = \frac{X_{i,m} - \bar{X}_i}{S_i} \quad (2.37)$$

Donde $X_{i,m}^{SNV}$ es el valor de la absorbancia de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) una vez aplicado el pretratamiento, $X_{i,m}$ es el valor de la absorbancia original de la fila i (espectro i) y la columna m (variable m), \bar{X}_i es la absorbancia media del espectro i y S_i es la desviación estándar de la fila i (espectro i).

¹⁴³ A. Savitzky, M. Golay, *Anal. Chem.* **36** (1964) 1627–1639.

¹⁴⁴ G. Horlick, *Anal. Chem.* **44** (1972) 943–947.

¹⁴⁵ K.H. Norris, P.C. Williams, *Cereal Chemistry*. **61** (1984) 158–165.

¹⁴⁶ R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.* **43** (1989) 772–777.

2.5.4. Corrección ortogonal de la señal (OSC)

La OSC (*Orthogonal Signal Correction*) permite eliminar toda aquella información contenida en la matriz de datos espectrales (\mathbf{X}) que no está correlacionada con la propiedad a determinar (\mathbf{Y}). Su aplicación permite obtener modelos de calibración más simples.

El OSC, introducido por Wold et al.¹⁴⁷ utiliza un algoritmo similar al empleado en la regresión PLS, la diferencia es que en OSC se minimiza la matriz de covarianza entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , mientras que en el PLS se maximiza. Matemáticamente el OSC se puede definir como:

$$\mathbf{X}_{osc} = \mathbf{X} - \sum_{i=1}^A \mathbf{T}_i \mathbf{P}_i^t \quad (2.38)$$

Donde, la matriz de datos OSC (\mathbf{X}_{osc}) corresponde a la matriz de datos espectrales original (\mathbf{X}), a la cual se le sustrae el producto de matrices de scores y *loadings* (con A factores), que contienen la información no correlacionada con \mathbf{Y} . Cuanto mayor sea el número de factores, mayor será la varianza eliminada. El sobreajuste es frecuente en OSC, normalmente son necesarios pocos factores para obtener resultados satisfactorios.

¹⁴⁷ S. Wold et al., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44** (1998) 175–185.

2.6. PRE-TRATAMIENTOS ESPECTRALES EN IMAGEN NIR

A diferencia de los datos espectrales NIR convencionales, en el análisis de imagen es necesario realizar el desdoblamiento de la imagen antes de realizar cualquier pre-tratamiento espectral. Esta etapa es de suma importancia para poder utilizar correctamente cualquier tipo de algoritmo (derivadas, SNV, OSC), los cuales han sido diseñados para datos en dos dimensiones. Una vez desdoblada la matriz, el tratamiento de los espectros se realiza de la misma forma que en la espectroscopia NIR clásica, resaltando que el número de espectros a tratar es mucho mayor en las imágenes hiperespectrales NIR. De igual manera y como se vio anteriormente, la misma matriz bidimensional (pre-tratada) es utilizada para la aplicación de los diversos métodos quimiométricos, tal que el PCA, PLS, MCR entre otros.

Capítulo 3

Control de calidad en la industria farmacéutica. NIRS como herramienta PAT

3.1. INTRODUCCIÓN.....	83
3.2. CONTROL DE CALIDAD (QC) Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD (QA).....	83
3.2.1. Control de calidad (QC).....	85
3.2.2. Aseguramiento de la calidad (QA).....	85
3.3. ARMONIZACIÓN INTERNACIONAL DE CRITERIOS, REQUISITOS Y ACTUACIONES.....	86
3.4. BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN (GMPs).....	88
3.5. TECNOLOGÍA ANALÍTICA DE PROCESOS (PAT).....	91
3.5.1. Definición.....	91
3.5.2. Antecedentes.....	92
3.6. NORMAS ICH Q8, Q9 Y Q10.....	97
3.7. CALIDAD MEDIANTE EL DISEÑO (QbD).....	98
3.7.1. Espacio de Diseño (DS).....	99
3.8. NIRS COMO HERRAMIENTA PAT.....	102
3.8.1. Estudios de viabilidad.....	103
3.8.2. Estudios de QbD.....	104
3.8.3. Antes del proceso de fabricación.....	105
3.8.4. Durante el proceso de fabricación.....	105
3.8.5. Después del proceso de fabricación.....	106

Lista de abreviaciones

	Inglés	Castellano
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Principio activo
CPP	Critical Process Parameter	Parámetros críticos de proceso
CQA	Critical Quality Attributes	Atributos críticos de calidad
DMAIC	Define, Measure, Analyse, improve and Control	Definir, Medir, Analizar, Mejorar y Controlar.
DoE	Design of Experiments	Diseño de experimentos
DS	Design Space	Espacio de diseño
EFPIA	European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations	Federación Europea de industrias y asociaciones farmacéuticas
EFTA	European Free Trade Association	Asociación Europea de Libre Cambio
EMA	European Medicine Agency	Agencia europea para el medicamento
EMA	European Medicines Agency	Agencia Europea de Medicinas
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1995-2004)	Agencia Europea para la evaluación de medicinas
FDA	Food and Drugs Administration	Administración de drogas y alimentos
FMEA	Failure Mode and Effects Analysis	Análisis modal de fallos y efectos
GMP	Good Manufacturing Practice	Buenas practicas de manufactura
ICH	International Conference of harmonization	Conferencia internacional de armonización
ISO	International Organization for standardization	Organización internacional para la estandarización
JPMA	Japanese Pharmaceutical Manufacturers Association	Asociación Japonesa de fabricantes farmacéuticos
MBO	Management by objectives	Gestión por objetivos
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare	Ministerio de salud, trabajo y bienestar
NIRS	Near-Infrared Spectroscopy	Espectroscopia del infrarrojo cercano
PAC	Process Analytical Chemistry	Tecnología analítica química
PAT	Process Analytical Technology	Tecnología analítica de procesos
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America	Fabricantes e investigadores farmacéuticos de los Estados Unidos
PMDA	Japanese Pharmaceutical and Medical Devices Agency	Agencia Japonesa de dispositivos médicos y farmacéuticos
QA	Quality Assurance	Garantía de calidad
QbD	Quality by Design	Calidad mediante el diseño
QC	Quality Control	Control de calidad
QFD	Quality Function Deployment	Despliegue en función de la calidad
QRA	Quantified Risk Assessment	Evaluación y cuantificación de riesgos
QTPP	Quality Target Product Profile	Perfiles objetivo de calidad del producto
SPC	Statistical Process Control	Control estadístico de procesos
TQC	Total Quality Control	Control total de calidad
TQM	Total Quality Management	Gestión total de calidad
WHO	World Health Organization	Organización mundial de la salud (OMS)

3.1. INTRODUCCIÓN

La implementación de la tecnología analítica de procesos (PAT) esta ocurriendo en el momento de cambio probablemente mas importante en la industria farmacéutica después de 3 décadas.

En este capitulo se muestra el progreso histórico de las normas regulatorias (Figura 3.1) para el análisis de procesos y control de calidad en la industria farmacéutica y así dar una visión del porque es necesaria la implementación de PAT en la industria farmacéutica. Además, se presenta las normas regulatorias, las cuales han sido minuciosamente aplicadas en los trabajos realizados en la presente memoria.

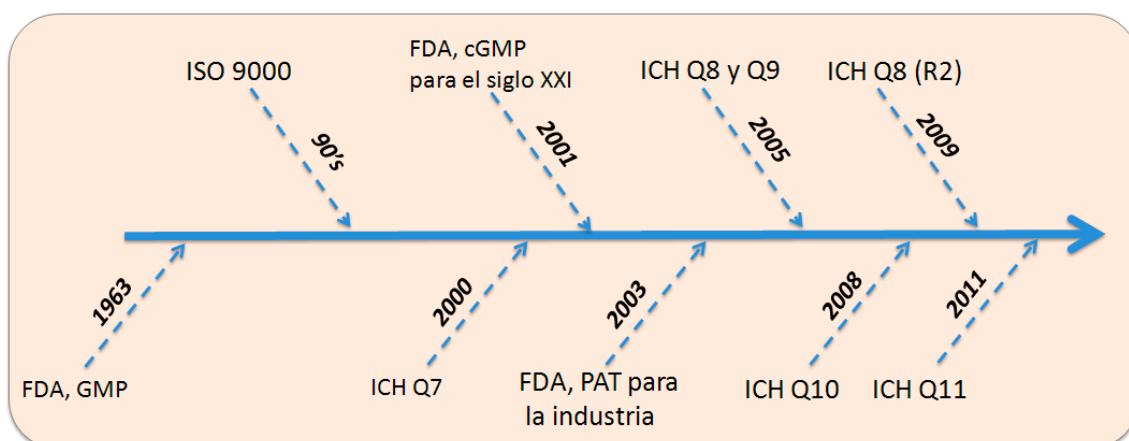


Figura 3.1. Evolución de la reglamentación en procesos de producción en industria farmacéutica

3.2. CONTROL DE CALIDAD (QC) Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD (QA)

Para evaluar y asegurar la calidad de un medicamento los dos conceptos más ampliamente utilizados son el control de calidad (QC) y el aseguramiento de la calidad (QA). Estos dos términos son a menudo confundidos, sin embargo, existen ligeras diferencias entre los dos (Figura 3.2). Por ejemplo, mientras que el control de calidad se centra

INTRODUCCIÓN

en el producto (medicamento), el aseguramiento de la calidad se centra en el proceso de fabricación en sí.

De acuerdo con la norma ISO 9000,¹ el control de calidad (QC) se define como "las técnicas y actividades operacionales que se utilizan para cumplir con los requisitos de calidad", y el aseguramiento de la calidad (QA) se define como "todas aquellas actividades planificadas y sistemáticas aplicadas para proporcionar la confianza adecuada, de que la entidad (industria farmacéutica) cumplirá con los requisitos de calidad".

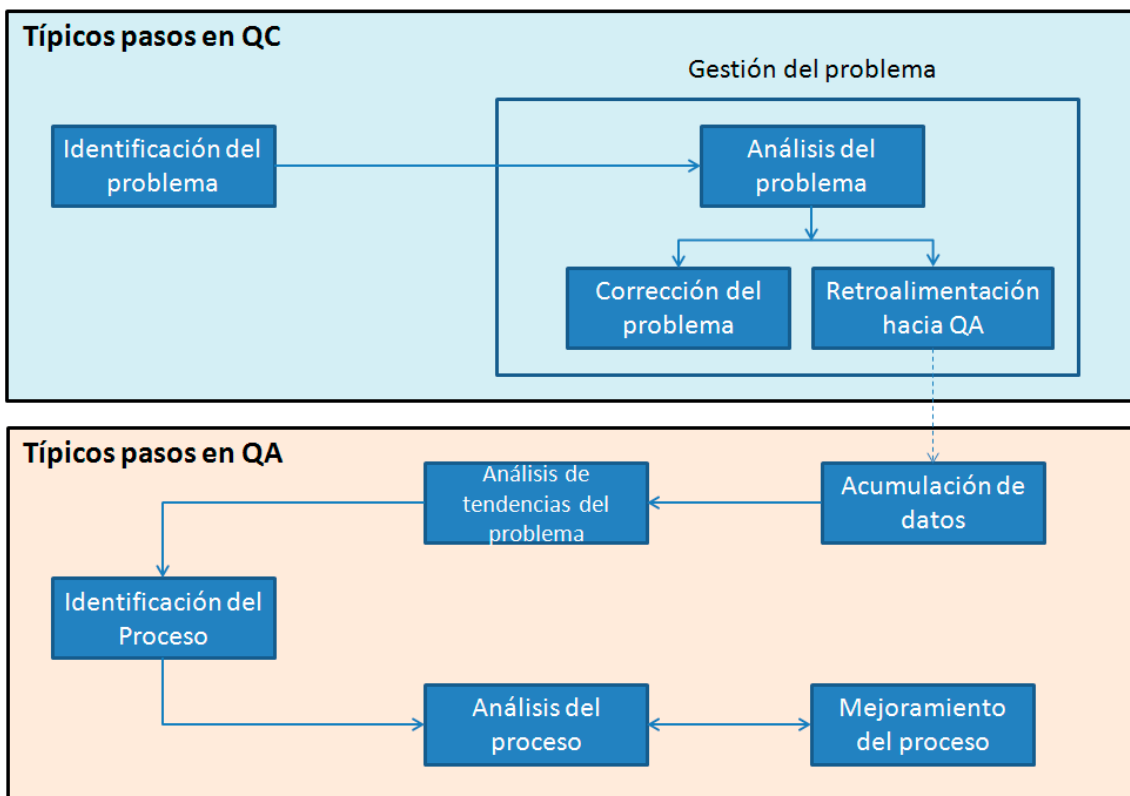


Figura 3.2. Diagrama comparativo de los pasos en un sistema de QC y QA

¹ ISO 9000:2005 Quality Management Systems - Fundamentals and Vocabulary

3.2.1. Control de calidad (QC)

El QC es un sistema que comprende las técnicas o actividades rutinarias, las cuales permiten medir y controlar la calidad del producto farmacéutico. El objetivo del QC es proporcionar productos al cliente de mejor calidad, los cuales deben reunir o ser incluso superiores a los requerimientos del consumidor. El QC de los procesos farmacéuticos incluye los controles de precisión en los cálculos y la estimación de incertidumbres; mediante la utilización de actividades estandarizadas para la generación de datos, archivo y reporte de dicha información.

Resumiendo y de acuerdo con las normas ISO 9000, un sistema de QC esta diseñado para:

- Proporcionar una continua verificación a fin de garantizar la exactitud e integridad de los datos.
- Distinguir los errores y afrontarlos.
- Documentar y registrar todos los procesos de control de calidad.

El QC engloba a todo tipo de actividad necesaria para controlar y verificar las medidas de calidad de un determinado producto. El examen de los procesos y productos se realiza a fin de mantener un nivel de calidad necesario. No obstante, el QC no se limita solamente a procesos y productos, si no que también incluye a servicios, personas, es decir controlando la eficiencia de los empleados de la empresa, ya que empleados ineficientes o incompetentes pueden afectar seriamente la calidad del producto.

3.2.2. Aseguramiento de la calidad (QA)

El QA es el proceso de validación a fin de verificar que los productos o servicios cumplen (o exceden) con las expectativas de los clientes. El objetivo del QA es utilizar un proceso de producción planificado y sistemático, creando una seguridad en cuanto a la idoneidad del producto. Es así que los dos principios adoptados por el QA son:

- El producto (o servicio) debe ser adecuado y apropiado para los fines previstos.
- Los procesos utilizados deben ser tales que eliminen los errores y las deficiencias.

La regulación de la calidad de las materias primas, los productos y los servicios relacionados con diversas funciones (producción, inspección, administración, etc.) están relacionados con el QA (Figura 3.3). Para ofrecer una calidad que cumpla (o supere) las expectativas del cliente, es importante saber cuál es la calidad esperada por el cliente final.

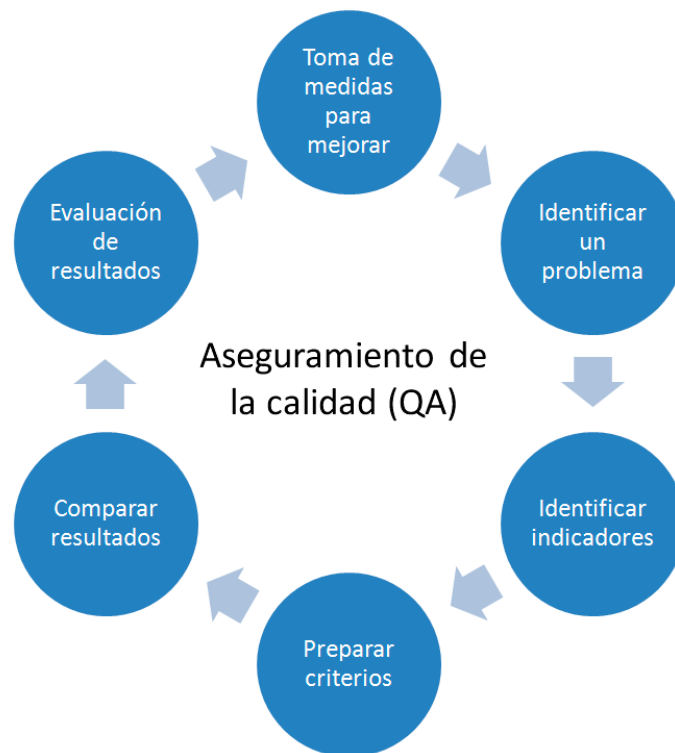


Figura 3.3. Diagrama general de las acciones del QA

3.3. ARMONIZACIÓN INTERNACIONAL DE CRITERIOS, REQUISITOS Y ACTUACIONES

La unificación del mercado de medicamentos en 1980 en la comunidad europea demostró que era posible la armonización. Es así que se inician

conversaciones bilaterales con USA y Japón sobre la posibilidad de armonización. El resultado fue el nacimiento en 1990 de la Conferencia internacional sobre armonización (ICH) de requerimientos técnicos para el registro farmacéutico de uso humano. La ICH se estableció como un proyecto conjunto entre las autoridades regulatorias e industrias farmacéuticas con el fin de mejorar, por medio de la armonización, la eficacia del proceso de desarrollo y del registro de nuevos fármacos en los Estados Unidos, Europa y Japón. Los seis miembros fundadores con derecho a voto, representando las autoridades regulatorias y la industria fueron la FDA y PhRMA por los estados unidos, la EMEA (actualmente EMA) y EFPIA por la unión europea y la MHLW y JPMA por el Japón. La ICH también cuenta con otros tres observadores, pero sin derecho de voto, la OMS, el ministerio de salud de Canadá (Health Canada) y la EFTA representada por la swissmedic.

Los objetivos de la ICH son de economizar los recursos humanos, animales y materiales; eliminar el retraso innecesario en el desarrollo y la disponibilidad de nuevos medicamentos; recomendar la mejor manera de alcanzar una mayor armonización en la interpretación y aplicación de las directrices técnicas y en los requerimientos del registro de un producto y reducir la necesidad de repetir los análisis llevados a cabo durante la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos.

Por otro lado, la misión de la ICH comprende el mantener un foro de diálogo entre las autoridades reguladoras y la industria farmacéutica; contribuir a la protección de la salud pública desde un punto de vista internacional; controlar y actualizar los requerimientos técnicos armonizados; evitar divergencias entre requerimientos futuros por avances terapéuticos y desarrollo de nuevas tecnologías; facilitar la adopción de nuevos técnicos de I+D; facilitar la información mediante directrices; fomentar la implementación y la integración de estándares comunes.

Las diversas directrices de la ICH se encuentran clasificadas dentro de grandes cuatro categorías, llamas comúnmente las directrices QSEM:

- Categorías Q (Calidad), relacionadas con la QA química y farmacéutica
- Categorías S (seguridad), relacionadas con estudios preclínicos in vitro e in vivo
- Categorías E (Eficacia), relacionadas con estudios clínicos en humanos
- Categorías M (multidisciplinarios), relacionadas con varias de las categorías anteriores.

En la presente memoria, se han utilizado las directrices de la categoría Q que forman parte del nuevo enfoque de calidad para el siglo XXI, siendo estas las Q7, Q8, Q9, Q10 y Q11, las cuales serán descritas más adelante.

3.4. BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN (GMP)

Históricamente, la guía de buenas prácticas de fabricación (GMP) fue desarrollada por la *Pharmaceutical Manufacturers Association* (PMA) a inicios de los años 1960, siendo adoptadas por la FDA en el año 1962. Desde entonces las guías de GMP se han ido actualizando periódicamente con nuevos conceptos y requisitos. Oficialmente, las GMP formaron parte de la primera edición del *Code of Federal Regulations* (CFR) en 1963 (Título 21, Capítulo I, Partes 210 y 211). En 1971, en el congreso de Ginebra de la organización mundial de la salud (OMS) se estableció la adopción de la GMP de obligado cumplimiento para la fabricación de medicamentos. Es así que en 1992 la comunidad europea edita las normas de correcta fabricación para medicamentos de uso humano y veterinario, de obligado cumplimiento para todos los estados miembros. Un gran salto se dio en el año 2000, cuando la ICH publicó la Q7 (GMP para principios activos), haciendo realidad en antiguo deseo de las GMP de ser extendida a materias primas. Con el fin de modernizar las regulaciones de calidad farmacéutica, en agosto

de 2002 la FDA anunció las *Pharmaceutical cGMPs for the 21st century: A risk-Based approach*,² cuyos objetivos principales fueron:

- Estimular la adopción temprana de nuevos avances tecnológicos de la industria farmacéutica.
- Facilitar la aplicación industrial de técnicas modernas de gestión de calidad, que incluyan la implementación de sistemas de calidad en todos los aspectos de la producción y del aseguramiento de la calidad.
- Motivar la aplicación de enfoques basados en el análisis de riesgo, los cuales se centren en la industria y la atención de las agencias en las áreas críticas.
- Asegurar que las políticas reguladoras de revisión, cumplimiento e inspección estén basadas en el estado del arte de las ciencias y la técnica farmacéutica.
- Mejorar la consistencia y la coordinación de los programas de reglamentación farmacéutica de calidad de la FDA, en parte, por una mayor integración de los sistemas de mejora de la calidad de los enfoques en los procesos empresariales de la agencia y las políticas reguladoras relativas a las actividades de revisión e inspección.

Con esta iniciativa, básicamente se buscó asegurar que (1) los conceptos más actualizados de sistemas de calidad y gestión del riesgo se incorporen a los procesos de manufactura de la industria farmacéutica, manteniendo la calidad de los productos; (2) la industria farmacéutica se sienta motivada a aplicar los mas recientes avances científicos y tecnológicos; (3) las regulaciones y los estándares de manufactura se apliquen consistentemente por la agencia reguladora (FDA) y los fabricantes y fundamentalmente que (4) la gerencia basada en el riesgo estimule la innovación en el sector farmacéutico.

² FDA, *Pharmaceutical cGMP for the 21st Century: A Risk-Based Approach*, Department of Health and human services, Roskilde, 2004

INTRODUCCIÓN

Básicamente las cGMP fueron como la necesidad de llenar el espacio que existía entre los sistemas de QC y QA (Figura 3.4), enfatizando en que la calidad del producto podía ser mejorada utilizando nuevas tecnologías. De hecho, fue la cGMP el primer documento en mencionar oficialmente el término de tecnología analítica de procesos (PAT) introduciendo el concepto y las vías hacia la mejora continua.

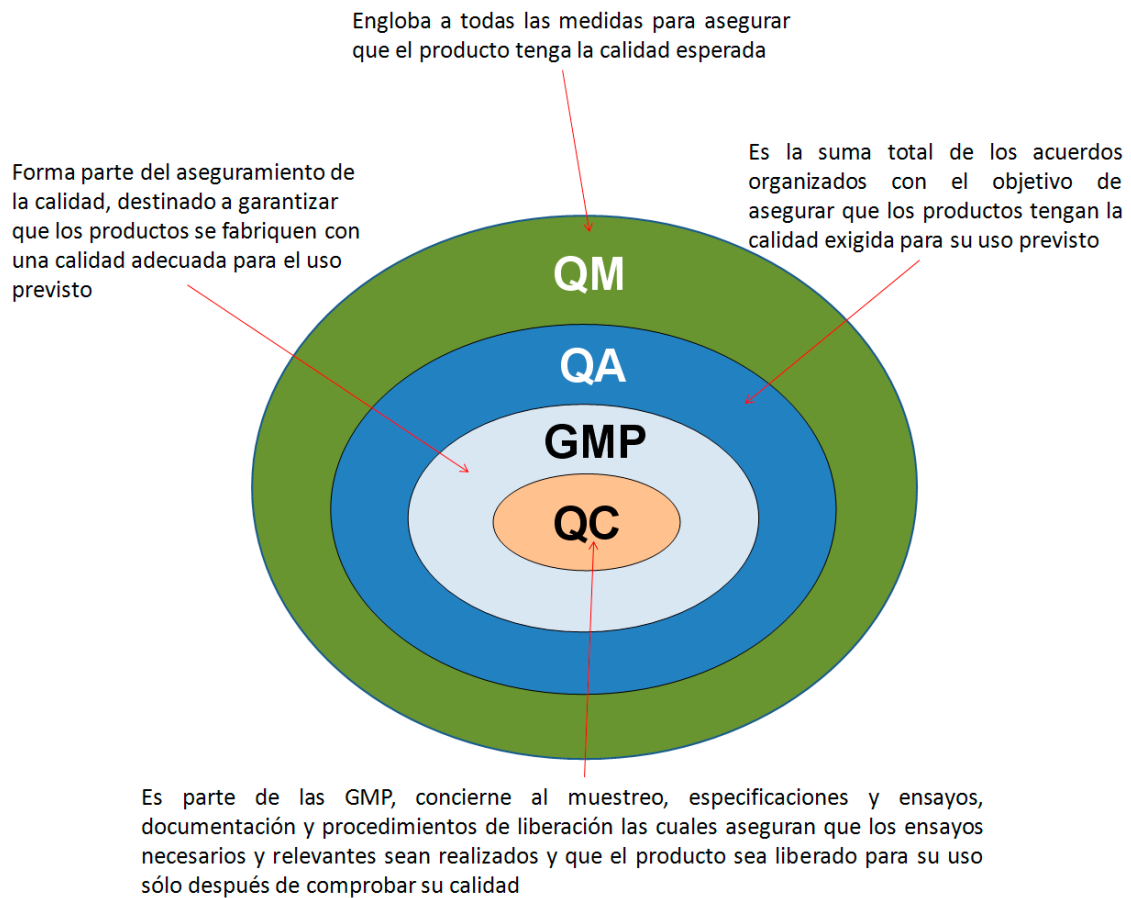


Figura 3.4. Relación de la calidad. QM=Gestión de la calidad, QA=Aseguramiento de la calidad, GMP=buenas practicas de manufactura y QC=control de calidad

3.5. TECNOLOGÍA ANALÍTICA DE PROCESOS (PAT)

3.5.1. Definición

Como se mencionó anteriormente, la Tecnología Analítica de Procesos (PAT) surgió, históricamente, como uno de los objetivos incluidos en la iniciativa farmacéutica *cGMP for the 21st century* publicada por la FDA y es definida como:

*“un sistema para el diseño, análisis y control de la producción farmacéutica a través de medidas de parámetros críticos de calidad. Las medidas realizadas en las materias primas y durante el proceso o en parámetros del proceso con la finalidad de mejorar la calidad del producto final”.*³

El PAT fomenta la innovación tecnológica, especialmente la adopción de nuevas técnicas analíticas por la industria farmacéutica, las cuales son diseñadas para mejorar el conocimiento y control de los procesos de fabricación. Para esto, PAT se sirve de diferentes disciplinas para cumplir sus objetivos (Figura 3.5), es decir basándose en el conocimiento científico.

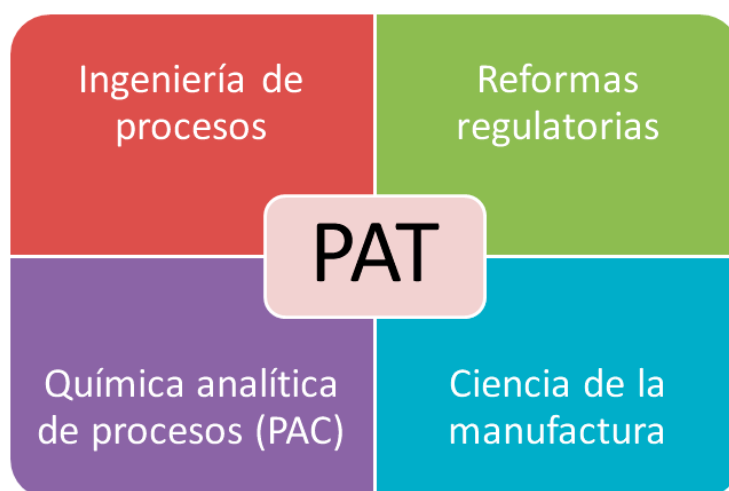


Figura 3.5. Componentes multidisciplinarios de PAT en la industria farmacéutica.

³ <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>

3.5.2. Antecedentes

Es bien conocido que una porción significativa de conceptos, los cuales definen el núcleo de PAT en la ciencia farmacéutica fueron introducidos décadas atrás en otros sectores industriales (ej. químico, automóvil, telecomunicaciones, semiconductores petróleo, etc). Estos conceptos basados, principalmente en los trabajos de Shewhart, allá por los años 1920, fueron evolucionando con el paso de los años, hasta llegar a los conceptos que se conoce actualmente. Sin embargo, esta evolución se hizo periódicamente y gracias a la formación de reglamentaciones, movimientos y asociaciones el concepto de “calidad” fue tomando forma, de tal manera que se diseñaron y organizaron recomendaciones y conferencias para establecer estándares de calidad. Un resumen de esta evolución en la gestión de calidad, se puede observar en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Evolución de las normas regulatorias de calidad

Hecho relevante	Año
Bases del actual SPC, Walter Shewhart (Bell Laboratories)	1920s
“Control total de calidad” (TQC), Edward Deming y Joseph M. Juran	1950s
Gestión por objetivos (MBO)	1960s
Movimiento Crosby de cero defectos (ZD)	1970s
Movimiento de gestión total de calidad (TQM)	1970-1980
Buenas practicas de fabricación (GMP)	1962
Círculos de calidad	1970
Despliegue de funciones de calidad (QFD)	1980
Química Analítica de procesos (PAC)	1984
Organización internacional de estandarización (ISO) 9000	1987
Premio nacional de calidad Malcom Baldrige	1987
Seis-Sigma (Motorola)	1986
DMAIC (<i>define, measure, analyse, improve and control</i>)	
DMADV (<i>define, measure, analyse, design and verify</i>)	
DFSS (<i>diseños para seis sigma</i>)	
Creación de la ICH	1990
ICH Q7 (GMP para APIs)	2000
cGMPs para el siglo XXI	2002
Directriz PAT para la industria (FDA/EMA)	2003/04
ICH Q8 y Q9 Calidad mediante el diseño (QbD)	2005
ICH Q10	2008
ICH Q11	2011

Los orígenes de los conceptos de PAT que se conocen actualmente están basados, como es sabido, en la Química Analítica de Procesos (PAC). El término PAC, en ese entonces, se utilizaba para describir la ciencia y

tecnología asociada con las medidas hechas en el laboratorio con sensores e instrumentación posicionados cerca del sitio operacional. Históricamente, se puede considerar que PAC comenzó principalmente con la formación del centro para la Química Analítica de Procesos (CPAC) en 1984.⁴ A partir de los años 2000 y en paralelo con la iniciativa de la FDA, el término de PAC fue gradualmente remplazado (en el lenguaje industrial) por el de PAT.

Mientras que el termino PAT fue formalmente introducido durante la FDA *science board meeting* en noviembre 2001 y abril de 2002,^{5,6} no fue hasta agosto de 2002, que la FDA anuncia la directriz “*Pharmaceutical cGMPs for the 21st century*” para modernizar las regulaciones de calidad farmacéutica, dando los primeros conceptos de PAT. Posteriormente, con el objeto de promover aun más la iniciativa PAT, en agosto de 2003, la FDA lanzó una directriz para la industria intitulada “*PAT Guidance for Industry: A framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*”.⁷ La directriz, la cual apoya las cGMP, se centró en la utilización de un enfoque científico (basado en el análisis de riesgos) en el desarrollo, fabricación y en el QA en la industria farmacéutica. Finalmente, en noviembre del 2003, la agencia europea de medicinas (EMA) también fomentó la implementación de PAT.⁸

“El aumento de la comprensión del producto y del proceso a través de la monitorización y control de los procesos farmacéuticos resultaría en productos mas consistentes y de elevada calidad”.

⁴ D.L. Illman, *TrAC Trends Anal. Chem.* 5 (1986) 164–172.

⁵ D.C. Watts, PAT-An FDA paper presented at the The Heidelberg PAT Conference, Heidelberg, Germany, 2006.

⁶ A.S. Hussain, Emerging science issues in pharmaceutical manufacturing: Process analytical technologies, paper presented at the science board presentations to FDA, Rockville, MD, 2001

⁷ <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>

⁸ http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000162.jsp&mid=WC0b01ac0580027089#section1

INTRODUCCIÓN

El motivo por el cual fue necesaria la aparición de PAT, es que las compañías farmacéuticas se enfrentan cada día a la creciente demanda de una mayor productividad y con menores costos de fabricación, teniendo a la vez que cumplir con las necesidades de la evolución de los estándares de calidad, los cuales son cada vez más altos.

El objetivo del PAT es mejorar el conocimiento y la comprensión del proceso para que los procedimientos se puedan realizar de manera diferente y sobre todo más eficiente (Figura 3.6). De hecho, uno de los propósitos del PAT es proporcionar un marco motivador para aportar la calidad en el producto desde el principio. Siendo así, indispensable su involucración en la fase de I + D, pudiendo así PAT desempeñar un papel aún más importante en el diseño y el análisis de los procesos de fabricación, permitiendo el control del rendimiento, basándose en la medición puntual de datos críticos del proceso.

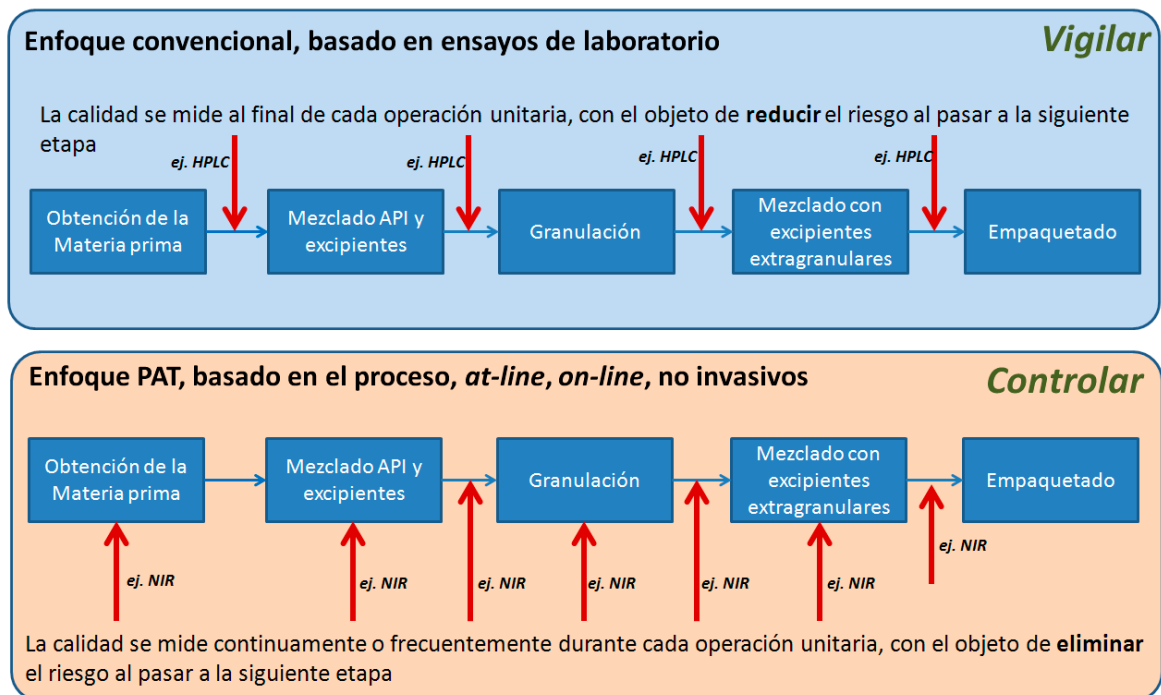


Figura 3.6. Enfoque convencional y PAT para evaluar un proceso de fabricación de granulados.

Si bien algunas herramientas de monitorización y control de procesos ya están siendo utilizados en la industria farmacéutica, estas no engloban todas las operaciones unitarias y los atributos críticos de calidad (CQAs) no son necesariamente medidos.

Algunas de las razones por las que la implementación de PAT en la industria farmacéutica no se ha realizado es que la implementación de nuevas tecnologías (de monitorización y control) requiere de una fuerte inversión inicial, mayor desarrollo de métodos (métodos quimiométricos), capacitación de personal, validación y calificación. Esta desconfianza puede también ser atribuida a la inseguridad de la aceptación por parte de las entidades regulatorias y la probabilidad del éxito de implementación en los procesos. Sin embargo, en la actualidad, muchas compañías farmacéuticas mantienen un esfuerzo activo en PAT, dentro del desarrollo y la fabricación. Los esfuerzos están focalizados principalmente en (i) reducir el ciclo de producción a través de pruebas de liberación rápidas, (ii) mejorar consistentemente el proceso, (iii) reducir la pérdida de lotes o su reprocesamiento, a través de un aumento en el muestreo en tiempo real y promover la liberación del lote en tiempo real. Si bien estos temas son relevantes, sobre todo en el entorno de fabricación, el uso de PAT en el desarrollo farmacéutico esta siendo defendido como una herramienta para mejorar la comprensión del proceso y de esta manera reducir el tiempo que dura el desarrollo de un nuevo proceso.

El aumento de la comprensión del producto y del proceso, en combinación con la monitorización y control del proceso, reduciría el número de experimentos a realizar, por lo tanto se disminuiría considerablemente el uso de los ingredientes farmacéuticos activos (API) en la fase de desarrollo y lógicamente el tiempo de lanzamiento al mercado de nuevos medicamentos. De hecho, una salida más rápida al mercado del producto, la seguridad de una mayor eficiencia en la producción, la optimización en la reducción de los residuos y la certeza de una calidad constante en el producto proporcionan los incentivos

económicos necesarios para la aplicación del PAT en el desarrollo y fabricación farmacéutica.

Tabla 3.2. Tipos de analizadores

Analizador	Definición	Ventajas	Desventajas
Off-line (fuera de línea)	El analizador esta localizado en un laboratorio, lejos del proceso.	<ul style="list-style-type: none"> • Analistas expertos • Operaciones flexibles • Ambiente controlado • Bajo costo/ensayo 	<ul style="list-style-type: none"> • Lento (horas) • Conflicto de prioridades • Costos administrativos adicionales • Excesiva documentación • Puede no ser representativo del proceso
At-line (cerca de la línea)	Existe un analizador dedicado para el análisis de las muestras extraídas del proceso, en un área cercana al punto de muestreo, es decir cerca del proceso.	<ul style="list-style-type: none"> • Instrumento dedicado • Muestreo rápido • Control de prioridades • La producción es propietaria de los resultados 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja utilización del equipo • El equipo debe ser robusto para estar en el ambiente de producción • Sistema Invasivo
On-line (en línea)	Existe un sistema automático de toma de muestra que la lleva hasta el analizador y la devuelve (o no) al reactor.	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido (segundos) • <i>Feedback</i> automático • Analizador dedicado • La información es representativa del proceso 	<ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo del método es largo y costoso • Requiere de una disponibilidad de mantenimiento las 24 horas • Sistemas Invasivos • Se modifica la geometría del proceso
In-line (dentro de la línea)	No es necesaria la toma de muestra, el análisis se realiza dentro de la corriente de proceso o reactor.		
No invasivo	Similar al in-line, con la diferencia que no se modifica la geometría de los reactores ni se entra en contacto con la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido (segundos) • <i>Feedback</i> automático • Analizador dedicado • La información es representativa del proceso • No se interfiere con el proceso 	<ul style="list-style-type: none"> • El desarrollo del método es largo y costoso • Requiere de una disponibilidad de mantenimiento las 24 horas

Evidentemente, con el fin de realizar la monitorización, control y optimización de un proceso, se necesitan sensores, que variaran según la información requerida (ej. cuanti- y cualitativa). Es más, no solo

basta con disponer del sensor, sino que es imprescindible tener claro como se realizaran la medidas. Callis *et al.*⁹ describieron y definieron 4 tipos de analizadores utilizados en aquel entonces en el PAC (*off-line*, *at-line*, *on-line* e *in-line*). Aunque actualmente estos aun tienen valor para el PAT, la exigencia de no modificar el proceso ha hecho resaltar otro tipo de analizadores, los no-invasivos. Este tipo de analizadores están ganando popularidad en la industria farmacéutica, gracias a que cumplen con las exigencias y recomendaciones de los organismos regulatorios, no alteran la geometría del proceso (ej. reactores), no entran en contacto con el producto y la información proporcionada es en tiempo real. A continuación (Tabla 3.2) se exponen las principales diferencias entre estos 5 tipos de analizadores, presentándose sus ventajas y desventajas a considerar para poder implementarlos en un proceso farmacéutico.

3.6. DIRECTRICES ICH Q8, Q9 Y Q10

La familia de directrices ICH Q8, Q9 y Q10, desarrolladas por la ICH son de sumo interés para todos los laboratorios de fabricación de medicamentos. Su implementación supone una reducción en los costes de comercialización del producto, ya que se optimizan los procesos de control. Además, dicha implementación permitiría la flexibilización de los controles administrativos, demostrando el control de la calidad en todo el ciclo de vida del producto. Las normas ICH involucradas en los trabajos presentados en esta memoria fueron:

- ICH Q8 : Desarrollo Farmacéutico
- ICH Q9 : Gestión del Riesgo en la Calidad
- ICH Q10: Sistema de Calidad Farmacéutico

⁹ J.B. Callis, D.L. Illman, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 49 (1987) 624A–637A.

En términos generales, la Q8¹⁰ tiene como principal objetivo el control del proceso de diseño de medicamentos indicando el camino de como implementar los principios de calidad mediante el diseño (QbD) para la fabricación de medicamentos, introduciendo nuevos conceptos como el espacio de diseño (DS). La Q9¹¹ es una guía que establece los principios y ejemplos de herramientas para la gestión del riesgo en la calidad y que son aplicables a diferentes aspectos de la calidad farmacéutica. La Q10¹² describe la estrategia para la implementación de un sistema de calidad, el cual esta basado en conceptos del sistema de gestión de calidad de ISO, incorporando también regulaciones GMP y complementando las ICH Q8 y Q9.

3.7. CALIDAD MEDIANTE EL DISEÑO (QbD)

Como visto anteriormente, las directrices ICH Q8 y Q9 aportan ideas para la aplicación de la filosofía QbD en procesos de producción. Es así que la Q8 (desarrollo farmacéutico) está pensada para ayudar en la búsqueda de productos de calidad utilizando un diseño de producto adecuado y la Q9 (gestión de riesgos de calidad) en la reducción de los riesgos que influyen en la calidad del producto terminado.

De acuerdo con los criterios QbD, establecer las bases del conocimiento de los procesos de producción requiere de la comprensión de la variabilidad en sus materias primas, definición de los atributos críticos de calidad (CQAs) y de la identificación de la relación entre estos CQAs y las características clínicas de los productos finales (Figura 3.7). Como se observa, el enfoque holístico para QbD comienza con la definición del perfil objetivo de calidad del producto (QTPP) y la posterior aplicación de diversos principios y herramientas en diferentes pasos del proceso. Algunas herramientas como la evaluación del riesgo cuantificado (QRA),

¹⁰ ICH. Pharmaceutical Development. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q8 (R2), 2009 (www.ich.org).

¹¹ ICH. Quality Risk Management. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q9, 2005 (www.ich.org).

¹² ICH. Pharmaceutical Quality System, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q10, 2008 (www.ich.org).

análisis de riesgos, diagramas de Ishikawa y el análisis de modo y efecto de las fallas (FMEA) son utilizados para identificar una lista provisional de potenciales CQAs y parámetros críticos del proceso (CPPs). El siguiente paso implica la utilización de los CPPs, previamente identificados, para establecer un diseño experimental (DoE) y seleccionar los CPPs que tienen un efecto significativo sobre el proceso o el producto. Los resultados obtenidos, a continuación, pueden utilizarse para facilitar la definición del espacio de diseño (DS) con miras a desarrollar un proceso de producción farmacéutica eficaz. Por lo tanto, la calidad es generada durante el proceso y no establecida en el producto final.¹³⁻¹⁷

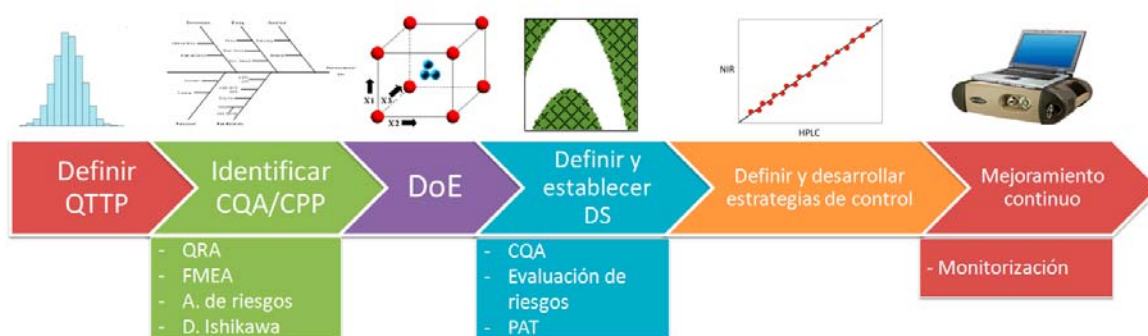


Figura 3.7. Diagrama de pasos a seguir para la implementación de un estudio por QbD. (QTTP = Perfiles objetivo de calidad del producto, CQA = Atributos críticos de calidad, CPP = Parámetros críticos de calidad, QRA = Evaluación y cuantificación de riesgos, FMEA = Análisis modal de fallos y efectos, DoE = diseño de experimentos, DS = espacio de diseño).

3.7.1. Espacio de Diseño (DS)

El concepto de DS proporciona una herramienta esencial para implementar la calidad mediante la filosofía QbD en la producción de productos farmacéuticos. La directriz ICH Q8 define el DS como:

¹³ H. Wu et al, *Int J Pharm.* 372 (2009) 39–48.

¹⁴ J. Huang et al., *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 23–32.

¹⁵ S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, D. Burgess, *Int. J. Pharm.* 377(2009) 185–198

¹⁶ ICH. Pharmaceutical Development. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q8 (R2), 2009 (www.ich.org).

¹⁷ ICH. Quality Risk Management. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q9, 2005 (www.ich.org).

*“la combinación e interacción multidimensional de variables de entrada y parámetros de proceso, que hayan demostrado proporcionar el aseguramiento de la calidad sobre el producto final. Trabajar dentro del Espacio de Diseño no se considera un cambio. Salir del Espacio de Diseño se considera un cambio que requiere un proceso regulatorio de autorización”.*¹⁸

Un DS está delimitado por los CPPs (Figura 3.8) identificados previamente con un DoE y debe al mismo tiempo contener al espacio de operación (condiciones actuales del proceso) y debe estar dentro del espacio de investigación (condiciones en DoE lo suficientemente variable para asegurar que se recoge toda la variabilidad del proceso). Como se describió en el capítulo 2, el DoE es un método estructurado y organizado que permite la relación entre los factores influyentes para un proceso y las respuestas del proceso. Como resultado, facilita la identificación y clasificación de los parámetros de un proceso que influyen en la calidad del producto terminado.^{19,20}



Figura 3.8. Esquema delimitando al espacio de diseño (DS), todo cambio al interior de el no es considerado cambio y no afecta el rendimiento del proceso, el espacio de investigación (IS) son las condiciones de experimentación iniciales y el espacio de operación (OS) reúne las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso.

¹⁸ ICH. Pharmaceutical Development. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q8 (R2), 2009 (www.ich.org).

¹⁹ H. Wu et al., *Int. J. Pharm.* 372 (2009) 39–48.

²⁰ C. Calvin et al., *J Pharm. Sci.* 98(2009) 239–247.

Una vez que se identifican las fuentes de variabilidad de un proceso, una herramienta PAT (ej. La espectroscopia NIR) puede utilizarse para controlar el proceso en el DS previamente establecido. En resumen, un DS esta definido por los CPPs identificados durante el proceso, los cuales serán utilizados para realizar una monitorización del proceso. Además de su evidente uso para garantizar que el proceso se desarrolle dentro de la DS aprobado, PAT también puede ayudar en la expansión del DS si fuese necesario.

Tabla 3.3. Comparación de un enfoque QbD y el tradicional para evaluar la calidad de un proceso de fabricación

Aspectos	Tradicional	QbD
Desarrollo farmacéutico	Empírico, típicamente experimentos univariantes.	Sistemático, experimentos multivariantes.
Proceso de fabricación	Proceso congelado, no se permiten cambios.	Proceso flexible en el DS, permitiendo una mejora continua.
Control del proceso	Ensayos en el proceso para pasar o no, análisis off-line.	Se utiliza PAT para una retroalimentación y poder obtener resultados en tiempo real.
Especificaciones del producto	Basadas en datos históricos de lotes fabricados.	Basadas en los requerimientos del producto.
Estrategias de control	Principalmente por ensayos intermediarios y en el producto final.	Basada en riesgos, controles hacia atrás, reducir variabilidad del producto, liberación en tiempo real.
Gestión del ciclo de vida del proceso	Reactivo a los problemas y lotes fuera de especificaciones, los cambios necesitan ser aprobados previamente.	Mejoramiento continuo habilitado dentro del DS.
Evaluación de la calidad	Calidad garantizada por las pruebas y la inspección.	La calidad es construida en el producto y el proceso por diseño, basado en conocimiento científico.
Presentación de datos	Presentación de datos intensivos con información dispersa sin una gran imagen del proceso.	Presentación rica en conocimiento - mostrando la comprensión del producto y del proceso.
Enfoque	Se enfoca en la reproducibilidad, a menudo para evitar o ignorar la variación	Se enfoca en la robustez, la comprensión y el control de la variación.

Esta claro que las ventajas de un enfoque basado en QbD frente al tradicional (Tabla 3.3) para evaluar un proceso de producción tiene como protagonista principal la calidad en el producto en todas las

etapas del proceso, obteniendo como resultado productos de indiscutible calidad.

3.8. NIRS COMO HERRAMIENTA PAT

La mayoría de aplicaciones PAT (70%) reportadas hasta el momento²¹ son desarrolladas para la industria farmacéutica, debido principalmente a las exigencias de los organismos reguladores en Estados Unidos (FDA) y la Unión Europea (EMA). Aproximadamente el 25% de las aplicaciones son enfocadas en la identificación y cuantificación de los ingredientes farmacéuticos activos (API) en el curso de fabricación, así como en los productos terminados. La necesidad de asegurar la calidad del producto durante un proceso de producción fomenta la aplicación de monitorizaciones *on- e in-line* de las etapas críticas de la fabricación.

Los instrumentos utilizados en aplicaciones PAT deben ser capaces de reflejar el estado del proceso en tiempo real. La mayoría de los analizadores son instrumentos espectroscópicos, los cuales son incorporados en el proceso de fabricación mediante accesorios como células de flujo,²² ventanas de cuarzo,²³ y sondas de inmersión. Se pueden encontrar en la bibliografía publicaciones que presentan mas en detalle las diferencias entre un control de proceso industrial tradicional y las ventajas de utilizar sensores espectroscópicos.²⁴

Las principales ventajas de la espectroscopia NIR como herramienta PAT frente a otras técnicas son: (1) es una técnica no destructiva y no invasiva; (2) las medidas son rápidas (<1min); (3) representan un bajo costo del análisis por muestra, ya que no requiere de reactivos químicos y un mismo operador puede analizar varias muestras; (4) permite la posibilidad de obtener información de una amplia superficie; (5)

²¹ A. Pomerantsev, O. Rodionova, *J. Chemometr.* (2012) DOI: 10.1002/cem.2445.

²² J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4442–4451.

²³ J.G. Rosas et al., *Talanta* 97 (2012) 163–170.

²⁴ Skibsted E, Engelsen SB. Spectroscopy for process analytical technology (PAT). In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (2nd edn, Vol. 3), Lindon J, Tranter G, Koppenaal D (eds). Elsevier: Oxford, 2010; 2651–2661.

requiere nula o no preparación de la muestra; (6) permite que varios constituyentes de la misma muestra puedan ser medidos al mismo tiempo; (7) es fácilmente aplicable en diferentes entornos tales como la industria o en el laboratorio; (8) las medidas pueden llevarse a cabo *on-*, *in-* y *at-line*; (9) existe la posibilidad de utilizar sondas con fibras ópticas, permitiendo hacer medidas remotas; (10) la disponibilidad actual de instrumentos portátiles permite obtener espectros directamente en el terreno, lo cual es útil para el seguimiento de algunos procesos activos; (11) posee la capacidad de penetrar en recipientes de vidrio y (12) la posibilidad de obtener información química y física con un mismo espectro.

Por otro lado, como toda técnica analítica, presenta ciertas desventajas: (1) Baja sensibilidad, sobre todo para una determinación por debajo de 0.1%(w/w); (2) La inversión financiera inicial es alta para la instrumentación; (3) El desarrollo de los modelos de calibración requiere un personal capacitado; (4) Una calibración robusta y precisa requiere un conjunto amplio de muestras, el cual incorpore diversas fuentes de variabilidad; (5) El modelo de calibrado requiere de un continuo mantenimiento; (6) La transferencia de calibración entre instrumentos del mismo fabricante o entre diferentes fabricantes es generalmente difícil y (7) Requiere de un método analítico de referencia.

La mayor parte de las recientes aplicaciones de la espectroscopia NIR dentro del marco del PAT en la industria farmacéutica se ve resumida en cinco fases: estudios de viabilidad, QbD, antes, durante y después de un proceso de fabricación.

3.8.1. Estudios de viabilidad

Definitivamente antes de que un método PAT sea sugerido a un fabricante farmacéutico, es importante realizar pruebas en el laboratorio, para asegurar que el método diseñado funciona correctamente. A menudo, se presenta otro objetivo, el cual es obtener

resultados en escala laboratorio que ayuden a convencer al fabricante de la necesidad del método propuesto. Estos estudios preliminares básicamente investigan tres cuestiones diferentes.

- Evaluar el potencial de cuantificación de propiedades o monitorizar operaciones específicas, en otras palabras es la extracción de la información mas relevante en tiempo real utilizando medidas NIR.
- Analizar el impacto de las variaciones en condiciones reales de fabricación, como la temperatura, presión, flujo, así como en las variaciones en la materia prima.
- Desarrollo de modelos de calibración fiables

3.8.2. Estudios de QbD

Como hemos visto anteriormente, la idea básica de la implementación PAT en la industria farmacéutica es que la calidad del producto final debería ser diseñada durante el proceso, por lo tanto los procedimientos PAT están ligados con el principio básico de la calidad mediante el diseño (QbD). De hecho, los estudios sobre los procedimientos de QbD basados en la espectroscopia NIR están emergiendo como una área específica con su propio vocabulario representado por un conjunto de abreviaturas, tales como QTPP, CPP, DS y CQA.^{14,25-27} Generalmente, las herramientas QbD, por ejemplo, diseño de experimentos (DoE) y análisis de superficie de respuesta ayudan a desarrollar el DS y revelar las fuentes de variabilidad del proceso y técnicas espectroscópicas (u otra herramienta PAT) pueda ser utilizada para controlar el proceso en el DS establecido.

²⁵ J. Huang et al., *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 23–32.

²⁶ J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4432–4441.

²⁷ J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4442–4451.

3.8.3. Antes del proceso de fabricación

El control de rutina de las materias primas es una parte esencial del PAT. De hecho, la identificación de los componentes con bibliotecas espectrales es el punto de partida del proceso de fabricación y en la industria farmacéutica, este procedimiento se utiliza principalmente para la confirmación de la calidad de cada lote de materia prima.²⁸

3.8.4. Durante el proceso de fabricación

Esta es probablemente el campo en que la espectroscopia NIR esta avanzando a pasos agigantados. La flexibilidad de esta técnica la hacen idónea para este tipo de medidas. Es durante el proceso que el objetivo PAT esta enfocado, ya que de asegurar la calidad durante el proceso, se asegura la calidad del producto final. Numerosos trabajos publicados pueden ser encontrados en la literatura, mostrando las virtudes de la espectroscopia NIR en las medidas durante los diversos procesos de fabricación.²⁹ Entre los más estudiados tenemos:

- Mezclado de solidos (*blending, mixing*),³⁰⁻³⁶
- Liofilización (*freeze-drying*),³⁷⁻⁴⁰
- Granulación húmeda (*wet granulation*),⁴¹⁻⁴³
- Gelificación (*gelation*),⁴⁴

²⁸ Blanco y M. A. Romero. *Analyst* 126 (2001) 2212–2217.

²⁹ T. De Beer et al., *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 32–47.

³⁰ A. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298–1307.

³¹ S. Sekulic et al., *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.

³² H. Wu et al., *Int. J. Pharm.* 372 (2009) 39–48.

³³ A.S. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 422–434.

³⁴ A.S. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 407–421.

³⁵ J.G. Rosas, M. Blanco, F. Santamaria, M. Alcalá (2012). Resultados aun no publicados.

³⁶ J.K. Drennen, R.A. Lodder, 1993. *Pharmaceutical applications of near-infrared spectrometry* JAI Press: Greenwich.

³⁷ T.R.M. De Beer et al., *Anal. Chem.* 79 (2007) 7992–8003.

³⁸ T.R.M. De Beer et al., *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3430–46.

³⁹ S. Pieters et al., *Anal. Chem.* 2011. (dx.doi.org/10.1021/ac2022184).

⁴⁰ J.G. Rosas et al., (2012) resultados aun no publicados.

⁴¹ P. Frake et al., *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 75–80.

⁴² J. Rantanen et al., *Powder Technol.* 99 (1998) 163–170.

⁴³ A. Jørgensen et al., *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2232–2243.

⁴⁴ J.G. Rosas et al., *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4442–4451.

⁴⁵ S.H. Tabasi et al., *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 4040–4051.

⁴⁶ O. Berntsson et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 895–900.

⁴⁷ A. Gupta et al., *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1047–1053.

⁴⁸ M. Andersson et al., *Anal. Chem.* 72 (2000) 2099–2108.

- Tableteado (*tableting*),⁴⁵
- Compresión de tabletas (*tablet compression*),^{46,47}
- Recubrimiento (*tablet coating*),^{48,49}
- Peletización (*pelletization*),⁵⁰
- Secado (*drying*),^{51,52}
- Extrusión por fusión caliente (*Hot melt extrusion*),^{53,54}
- Cristalización (*crystallization*)⁵⁵⁻⁵⁷ y
- Fermentación (*fermentation*).⁵⁸⁻⁶⁰

3.8.5. Después del proceso de fabricación

El objetivo de aplicar tecnologías PAT en esta etapa no es investigar las propiedades fisicoquímicas del producto terminado en detalle, sino confirmar que todos los lotes presentan la misma calidad.⁶¹ La aplicación de la espectroscopia NIR en pruebas de liberación en tiempo real puede sustituir la prueba del producto final.^{62,63}

⁴⁹ M. Lee et al., *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 325–335.

⁵⁰ M. Romer et al., *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 4020–4029.

⁵¹ K. Kogermann et al., *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 4983–4999.

⁵² A. Peinado et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2010) 13–20.

⁵³ V. Tumuluri et al., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 (2004) 505–511.

⁵⁴ V. Tumuluri et al., *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 77–84.

⁵⁵ L. Yu et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 56 (2004) 349–369.

⁵⁶ T. Norris et al., *Analyst*, 122 (1997) 549–552.

⁵⁷ G.X. Zhou et al., *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2337–2347.

⁵⁸ L. Rodrigues et al., *Talanta*, 75 (2008) 1356–1361.

⁵⁹ S. Tosi et al., *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1816–1821.

⁶⁰ M. Blanco et al., *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 364–373.

⁶¹ J.G. Rosas et al., *Talanta* 97 (2012) 163–170.

⁶² European Medicines Agency. Final Guideline on Real Time Release Testing (2012).

⁶³ E. Skibsted et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1297–1305.

II

METODOLOGIA Y DISCUSION DE RESULTADOS

Capítulo 4

Estudio basado en calidad por diseño (QbD) para un proceso de fabricación de un gel farmacéutico

4.1. INTRODUCCIÓN.....	115
4.2. EXPERIMENTAL	117
4.2.1. Composición de la formulación.....	117
4.2.2. Muestras de laboratorio	118
4.2.3. Equipos y descripción del proceso	118
4.2.4. Diseño de experimentos (DoE)	121
4.2.5. Procesamiento de datos	123
4.2.6. Control estadístico multivariable de procesos (MSPC).....	124
4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	125
4.3.1. Determinación del espacio de diseño (SD).....	125
4.3.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR.....	137
4.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	148
4.4.1. Determinación del espacio de diseño (SD).....	148
4.4.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR.....	149

En este capítulo se presenta el estudio de la evaluación de un proceso de fabricación de una formulación farmacéutica semi-sólida (un gel analgésico), con el objetivo de identificar y predecir sus atributos críticos de calidad (CQA). Para este fin, hemos utilizado un diseño experimental D-óptimo que permite evaluar el efecto de cinco parámetros críticos del proceso, CPP (concentración de etanol, agua y polímero; fracción de ácido neutralizado y la temperatura del reactor) sobre los CQAs del producto (viscosidad y pH). La identificación de los CQAs y definición de los CPPs se realizó aplicando los principios de calidad por diseño (QbD), con la finalidad de obtener información del proceso. Este conocimiento facilitará la comprensión del proceso con el objeto de establecer su adecuado espacio de diseño (DS).

En un segundo estudio, se propone la utilización de la espectroscopia NIR para determinar los CQAs y propiedades físicas tales como viscosidad y pH, además de la composición química (concentración de API y excipientes) de la formulación farmacéutica. Se ha realizado una comparación de lotes fabricados bajo condiciones normales (NOC) con lotes provenientes de un DoE con la finalidad de identificar similitudes o diferencias entre ellos. Para ello, se ha utilizado la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), en combinación con gráficos de control de residuales (*Q-statistic*) y de la estadística T^2 de Hotelling (*D-statistic*).

4.1. INTRODUCCIÓN

Asegurar la calidad en una formulación farmacéutica exige la determinación de varias propiedades fisicoquímicas antes de su liberación al mercado. La *no conformidad* de un lote fabricado, que se determina habitualmente al final del proceso de producción, no permite su liberación y obviamente esto tiene una repercusión económica negativa para la empresa. Determinar los parámetros de calidad del producto requiere realizar análisis lentos y complejos; nuevas metodologías se han desarrollado para asegurar la calidad en cada etapa del proceso de producción y por lo tanto en el producto final.^{1,2,3} La calidad del gel farmacéutico depende no solo de la concentración de los componentes sino también de variaciones no controladas que pueden alterar considerablemente las características del producto terminado.

Recientemente se han propuesto diferentes aproximaciones para mejorar los procesos de producción farmacéutica mediante los conceptos como la tecnología analítica de procesos (PAT) y recientemente la calidad por diseño (QbD).^{4,5,6,7} La aplicación de QbD requiere de un conocimiento básico del producto, incluyendo la variabilidad de la materia prima, la relación entre su producción y sus CQAs y la asociación de los CQAs a sus propiedades clínicas.⁸ La recopilación de esta información requiere obligatoriamente del intercambio continuo entre los farmacéuticos galénicos, quienes tienen un conocimiento detallado de las variables y problemas envueltos en la producción de medicamentos, y los químicos analíticos, a quienes este

¹ H. Wu, M.A. Khan, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2784–2798.

² J. Huang et al. *Int. J. Pharm.* 382(2009) 23–32.

³ J.M. Juran, Godfrey AB. 1999. *Juran's Quality Handbook* (5th Edition). McGraw-Hill.

⁴ S. Verma et al. *Int. J. Pharm.* 377(2009)185–198.

⁵ A. Ordoñez et al. *Int. J. Pharm.* 378(2009) 51–58.

⁶ Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, November 1, 2006.

⁷ Blanco M, Alcalá M. 2010. *Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*; Bakeev K, Ed. John Wiley & Sons, Ltd: pp 463–491.

⁸ ICH. ICH-Topic Q8(R2): Pharmaceutical Development, 2009.

conocimiento les es esencial para el desarrollo de modelos robustos para cada proceso en particular.

Una vez que se ha identificado las fuentes de variabilidad en el proceso, se pueden utilizar diversas herramientas analíticas para el control de procesos dentro de un espacio de diseño (DS) previamente construido. Las directrices de la *Food and Drug Administration* (FDA) y de las ICH Q8 definen un DS como:

*“the multidimensional combination and interaction of input variables (e.g. material attributes) and process parameters that have been demonstrated to provide assurance of quality. Working within the design space is not considered as a change. Movement out of the design space is considered to be a change and would normally initiate a regulatory post approval change process. Design space is proposed by the applicant and is subject to regulatory assessment and approval”.*⁹

Basados en estos principios, la Figura 4.1 ilustra, desde un enfoque QbD, los principales pasos para el desarrollo de un producto farmacéutico, en conformidad con las directrices ICH para la correcta creación de un DS.

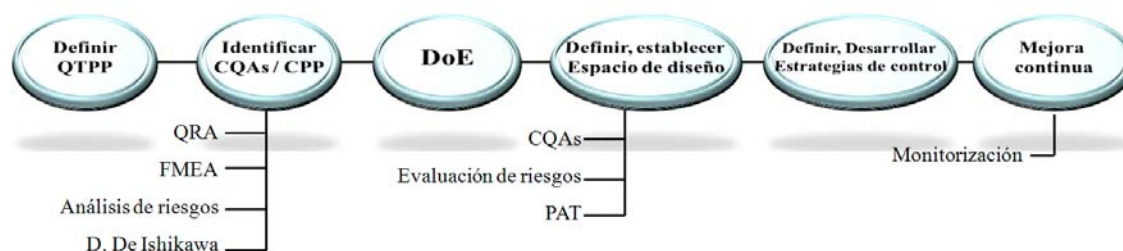


Figura 4.1. Pasos en el desarrollo de un producto farmacéutico y la creación de un espacio de diseño (DS) basado en un enfoque holístico QbD.

⁹ Guidance for industry: Q8 pharmaceutical development, US Department of Health and Human Service. FDA, Rockville, MD, May 2006

Basado en lo anterior, PAT engloba al mismo tiempo la comprensión del proceso y del producto.¹⁰ Además de su evidente utilización para garantizar que el proceso funcione dentro de su determinado DS, PAT puede ser de mucha ayuda en la expansión, si es necesario, de un DS el cual haya sido establecido previamente. Debido a que el análisis de los múltiples datos obtenidos durante los procesos es fundamental de cara a su comprensión, PAT se vale de herramientas como el análisis multivariable (MVA) y de los diseños experimentales (DoE).

La espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) es ampliamente utilizada como una herramienta analítica para la rápida determinación de las propiedades físicas y químicas de formulaciones farmacéuticas.^{11,12,13} La necesidad de ningún tratamiento de muestra en NIRS permite obtener una respuesta analítica en pocos segundos con el mínimo esfuerzo por parte del analista. Esta característica ha fomentado su amplio uso en el control de productos farmacéuticos.^{14,15,16}

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Composición de la formulación

La formulación estudiada fue un gel hidroalcohólico transparente e incoloro, que contiene 12.5mg/g de API (Dexketoprofeno, forma ácida), una mezcla de agua y etanol como vehículo y un polímero (Carbopol® 980 NF), el cual cumple la función de agente gelificante cuando se añade una solución de tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) que provoca la ionización parcial de los grupos carboxílicos del polímero.

¹⁰ Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, November 1, 2006.

¹¹ M. Blanco, M. Alcalá. *Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*; Bakeev K, Ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2010.

¹² J.G. Rosas et al. *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4432–4441.

¹³ J.G. Rosas et al. *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4442–4451.

¹⁴ R. Maesschalck et al, *Appl. Spectrosc.* 52(1998) 725–731.

¹⁵ M. Blanco, M. A. Romero, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30(2002) 467–472.

¹⁶ M. Kemper et al, *The AAPS Journal* 3(2001) 81–85.

El Carbopol es un polímero del ácido acrílico de alto peso molecular. Es un compuesto hidrófilo que se hincha cuando se dispersa en agua, formando un coloide. Su importante hinchamiento en agua, de hasta 1000 veces su volumen original, es debido a la ionización de los grupos carboxílicos cuando el pH del medio es suficientemente elevado (4.0 – 6.0).

4.2.2. Muestras de laboratorio

Se prepararon un total de 60 muestras en el laboratorio, todas ellas entre un rango de concentración de $\pm 20\%$ del valor nominal para el API y un $\pm 15\%$ para los excipientes. El diseño de muestras se hizo mediante un diseño D-óptimo para asegurar la más baja correlación entre pares de concentraciones de los componentes de la formulación. Estas muestras fueron utilizadas posteriormente para la construcción de los modelos de calibración PLS (sección 4.4).

4.2.3. Equipos y descripción del proceso

Todos los experimentos fueron realizados en la planta piloto de Laboratorios Menarini (Badalona, España). Diferentes lotes de gel fueron fabricados en un reactor de acero inoxidable IPROCMSA M-15L a escala de planta piloto (Castelao, España) de una capacidad de 15 Litros. El reactor está provisto de un sistema de agitación central en áncora (8 – 80 RPM), con palas de agitación provistas de rascadoras oscilantes de teflón y un agitador-emulsionador tipo turrax insertado en posición radial (3000 RPM). El reactor es capaz de soportar un vacío de hasta 760 mbar y permite la extracción de muestras durante el proceso. Los lotes utilizados en el estudio fueron fabricados a una escala de 1/100.

Los CQAs (viscosidad y pH) se registraron siguiendo los protocolos analíticos validados por la empresa para este producto. Para la viscosidad se utilizó un viscosímetro Rheomat RM180 de Rheometric Scientific (Maple Instruments Ltd., Ontario, Canadá) y una velocidad de

cizallamiento de 42.1 s^{-1} . En el caso del pH, se utilizó un pH-metro Metrohm 691 (Herisau, Suiza). Los dos CQA fueron registrados a temperatura ambiente ($23 - 24 \text{ }^\circ\text{C}$). Las medidas se realizaron para todas las muestras extraídas durante el proceso. El total de lotes fabricados fueron 13. Las proporciones de los componentes fueron obtenidas mediante un diseño experimental.

La Figura 4.2 resume esquemáticamente el procedimiento experimental seguido en este estudio, comenzando con el examen de los datos históricos de calidad obtenidos para la formulación, los cuales fueron utilizados para construir un DoE de lotes a fabricar y finalmente se procedió a la construcción de los modelos matemáticos.

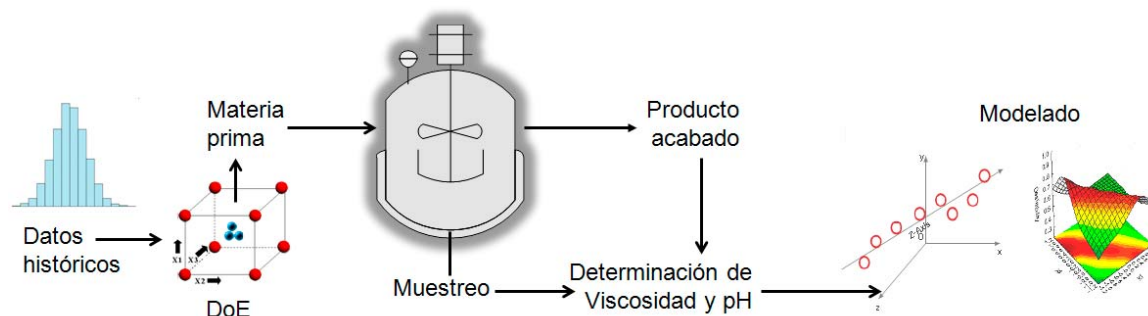


Figura 4.2. Metodología para el establecimiento de un DS para un proceso de fabricación de gel farmacéutico.

El proceso de fabricación consiste en la carga del reactor con etanol, se añade el API y se agita hasta completa disolución; a continuación se añadió el agua necesaria. Una vez homogenizada la mezcla, se añade el carbómero y se mantiene la agitación hasta conseguir su completa disolución. La acidez total de la disolución es la suma de las concentraciones de API y del carbómero. Por último, se añade la disolución de TRIS en diferentes fracciones para producir el proceso de gelificación. El volumen de solución de TRIS añadido representa un exceso respecto al contenido de API. Después de cada adición de TRIS, se homogenizó y se procedió a extraer muestras. Por cada proceso se extrajeron 15 muestras al 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50,

60 y 70% del ácido total neutralizado. Antes de extraer las muestras correspondientes, se registró la temperatura del gel en el reactor para posteriormente dejarlas enfriar a temperatura ambiente (21 – 23 °C) antes de la adquisición de sus respectivos espectros NIR y la medida de su viscosidad y pH.

Las medidas espectrales se realizaron con un espectrómetro NIR portátil LabSpec® Pro 5000 (ASD, Inc. USA) provisto de un soporte para una cubeta de flujo continuo, de un camino óptico de 0.1 mm, para el registro de los espectros NIR por transmitancia. La adquisición de espectros se realizó con el programa Indico Pro 5.2, también de ASD inc. El blanco correspondió al espectro de la cubeta vacía, es decir en ausencia de gel. Cada espectro NIR registrado fue el promedio de 32 scans en el rango espectral de 1000 – 2500 nm y con una resolución de 1 nm.

En la Figura 4.3 se describe esquemáticamente la metodología seguida en el estudio que comprende el registro y tratamiento de los datos mediante técnicas clásicas y multivariantes.

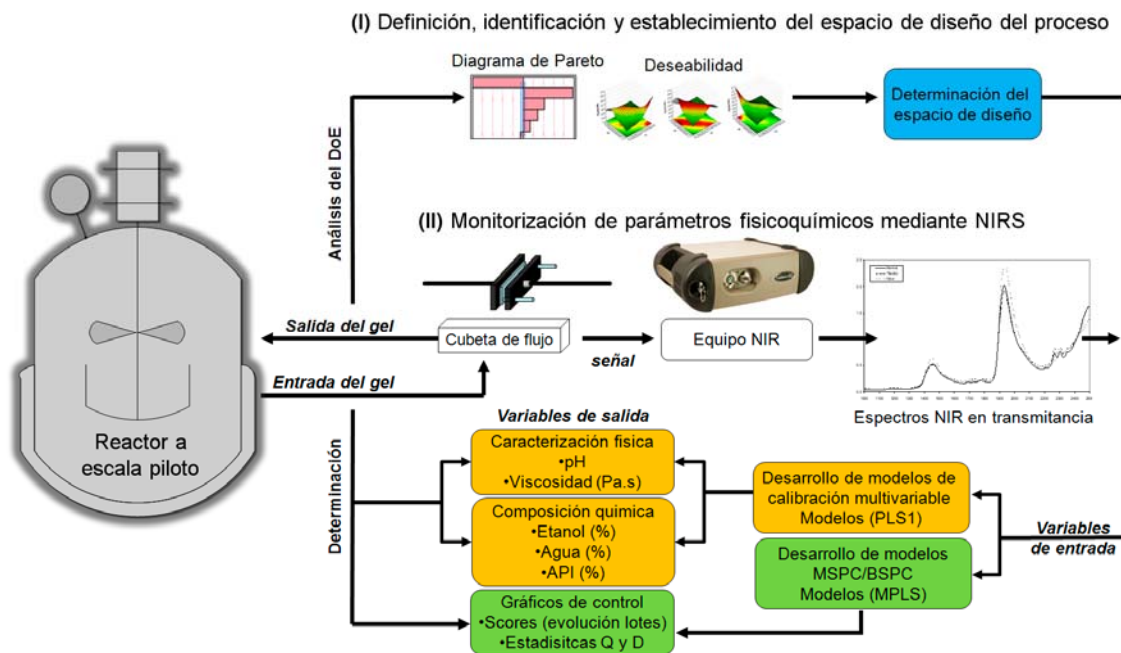


Figura 4.3. Metodología seguida para la obtención de datos estadísticos y propiedades fisicoquímicas durante en el proceso de fabricación de un gel.

4.2.4. Diseño de experimentos (DoE)

Para este estudio se utilizó un diseño D-óptimo, cuyos factores iniciales fueron: el contenido de etanol (X_1), de agua (X_2) y de polímero (X_3). Cada factor fue estudiado a tres niveles diferentes. Las variables respuesta estudiadas fueron la viscosidad (Y_1) y el pH (Y_2). La elección de los factores y respuestas estuvo basada en los datos históricos del producto. El número total de experimentos (lotes) a realizar fue de 13, dentro de los cuales tres fueron replicados en el centro del dominio experimental, los cuales fueron usados para calcular el error puro (varianza). En la Tabla 4.1 se muestran con más detalle las características del diseño experimental y los niveles utilizados de cada factor.

Tabla 4.1. Dominio experimental para el diseño D-óptimo

Variable	Factor / Respuesta	Nivel (-)	Nivel (0)	Nivel (+)
X_1	Etanol (%)	27.0	32.0	37.0
X_2	Agua (%)	58.0	63.0	68.0
X_3	Polímero (%)	1.3	1.5	1.7
X_4	Fracción de Ac. Neutralizado (%)	50.0	60.0	70.0
X_5	Temperatura del reactor (°C)	32.0	36.0	40.0
Y_1	Viscosidad (Pa.s)	2.7	3.0	3.3
Y_2	pH	6.0	6.2	6.4

Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa JMP® v. 7 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Es necesario destacar que se buscó obtener el número mas bajo de lotes a fabricar y que a su vez engloben toda la variabilidad del proceso de fabricación. Es así que para comprender mejor el proceso se han tenido en cuenta y añadido dos factores adicionales, la fracción de ácido neutralizada (X_4) y la temperatura del reactor (X_5). El factor X_4 representa las tres últimas fracciones de ácido neutralizado en el proceso, es decir 50, 60 y 70%. Finalmente, X_5 fue la temperatura en el interior del reactor a dichas

fracciones de ácido neutralizado (32, 36 y 40°C). Es así que nos encontramos finalmente con un diseño experimental total aumentado de cinco factores y 39 puntos experimentales (Tabla 4.1).

Un análisis de regresión lineal múltiple (MLR) y ANOVA fueron empleados para modelar los datos y obtener una expresión matemática de las respuestas Y1 e Y2. Cada respuesta fue descrita por un modelo de segundo orden (Ec. 4.1) adecuado para predecir las respuestas en la región experimental. Solo se incluyeron las interacciones binarias, ya que es muy poco probable que se produzcan las interacciones de orden superior, sobre todo en estas condiciones experimentales.

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_{11}(X_1)^2 + \beta_{22}(X_2)^2 \\
 & + \beta_{33}(X_3)^2 + \beta_{44}(X_4)^2 + \beta_{55}(X_5)^2 + \beta_{12}(X_1 X_2) + \beta_{13}(X_1 X_3) + \beta_{23}(X_2 X_3) \\
 & + \beta_{14}(X_1 X_4) + \beta_{24}(X_2 X_4) + \beta_{34}(X_3 X_4) + \beta_{15}(X_1 X_5) + \beta_{25}(X_2 X_5) \\
 & + \beta_{35}(X_3 X_5) + \beta_{45}(X_4 X_5)
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

Donde Y es la variable dependiente o variable respuesta (viscosidad o pH); X_1, X_2, X_3, X_4 y X_5 son los factores o variables independientes codificadas; β_0 es el término independiente y $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots$ son los coeficientes empíricos estimados por el método de mínimos cuadrados que explican las variables independientes X_i o sus interacciones con la respuesta Y .

Una prueba estadística de ajuste del modelo se realizó para comparar la variación debida a la falta de ajuste del error puro de la varianza utilizando la prueba F. El modelo ajustado es considerado adecuado si la varianza debida a la falta de ajuste no es significativamente diferente del error puro de la varianza.^{17,18,19}

La búsqueda de las condiciones experimentales para la optimización simultánea de $Y1$ y $Y2$, requiere el uso de la función de deseabilidad.

¹⁷ G. Lewis, D. Mathieu, Phan-Tan-Luu (Eds.) 1999. Pharmaceutical Design, Marcel Dekker, New York.

¹⁸ J. Goupy (Ed) 1999. Plans d'Expériences pour Surfaces de Réponse, Dunod, Paris.

¹⁹ R.H. Myres, D. C. Montgomery (Eds.), Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, Wiley, New York, 1995.

Para ello se transformaron las propiedades medidas de cada respuesta en la deseabilidad d_i , sin dimensiones escalares, definida como función parcial de la deseabilidad. Esto hizo posible la combinación de los resultados obtenidos en escalas diferentes. La escala de la función de deseabilidad varia entre $d=0$, para una respuesta completamente indeseada, y $d=1$, si la respuesta alcanza el valor deseado. Una vez que la función d_i se define para cada respuesta de interés, se define también una función de deseabilidad global (D). Esta función fue propuesta por Derringer y Suich (1980) y Jones (1990).²⁰ Considerando todos los requisitos para todas las respuestas, podemos así, elegir las condiciones de las variables del diseño que maximizan D. Se puede deducir que un elevado valor de D es obtenido solamente si todas las deseabilidades individuales d_i son elevadas. Además, los valores de D calculados de las respuestas observadas permiten que localicemos la región óptima.

4.2.5. Procesamiento de datos

Todos los modelos multivariantes descritos en la sección 4.4 y utilizados para determinar los parámetros fisicoquímicos fueron construidos utilizando el algoritmo de PLS1. Los pre-tratamientos espectrales aplicados han sido la primera y segunda derivada a diferentes valores de ventana móvil (15, 21 y 29 puntos), la transformación de la varianza normal estándar (SNV) y el análisis en componentes principales (PCA). En cuanto a la validación de los modelos se utilizó la validación cruzada completa. Los modelos PLS fueron construidos usando los programas informáticos The Unscrambler V.9.8, de CAMO (Trondheim, Noruega) y SIMCA-P+ v12.0 de Umetrics (Umeå, Suecia). La calidad de la calibración y la predicción fue medida en términos de *Root Mean Standard Error* (RMSE).

²⁰ J. Goupy (Ed). 1999. Plans d'Expériences pour Surfaces de Réponse, Dunod, Paris.

4.2.6. Control estadístico multivariable de procesos (MSPC)

El concepto de MSPC fue utilizado por primera vez por Nomikos y MacGregor.^{21,22} El seguimiento de la evolución de un lote en el tiempo permite comparar *at-line* el comportamiento de un nuevo lote que esta siendo procesado, esta comparación se realiza con lotes fabricados a condiciones normales de operación (NOC), los cuales son considerados como lotes de referencia. Por lo general, la comparación se realiza mediante la representación gráfica del estado del lote a lo largo del tiempo. La línea que une estos puntos se le denomina la trayectoria del lote, el cual tiene que permanecer dentro de ciertos límites establecidos (por ejemplo, la estadística T^2 de Hotelling).

El estado de un lote depende de múltiples variables, las cuales se pueden agrupar en una estructura de tres dimensiones, a la cual llamaremos cubo de datos ($K \times J \times N$), donde la dimensión K correspondiente a las variables (variables de proceso o longitudes de onda si lo aplicamos a espectros), J correspondiente a las muestras extraídas durante el proceso y la última dimensión N corresponde a los lotes en estudio.

Nomikos y MacGregor²³ propusieron desdoblar este cubo de datos, haciendo posible comparar los lotes que se están fabricando con lotes NOC, con los que se construyó el modelo. Sin embargo, este enfoque presenta dos inconvenientes, el primero es que es necesario que los lotes hayan finalizado para poder ser comparados, y el segundo es que todos los lotes deben tener la misma duración. Una modificación a este método fue propuesta por Wold et al.²⁴; donde la duración de los lotes no es un inconveniente siempre y cuando se mantenga constante la dimensión K de las variables (Figura 4.4).

Una vez desdoblado el cubo de datos X , se procede a construir el vector “ Y ”, el cual puede ser una propiedad de calidad del producto o el índice

²¹ P. Nomikos, J.F. MacGregor, *Technometrics* 37(1995) 41–59.

²² P. Nomikos, J.F. MacGregor, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30(1995) 97–108.

²³ P. Nomikos, J.F. MacGregor, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30(1995) 97–108.

²⁴ S. Wold, N. Kettaneh, H. Fridén, A. Holmberg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 44(1998) 331–340.

de tiempo correspondiente al periodo en la que se recolectaron las muestras.

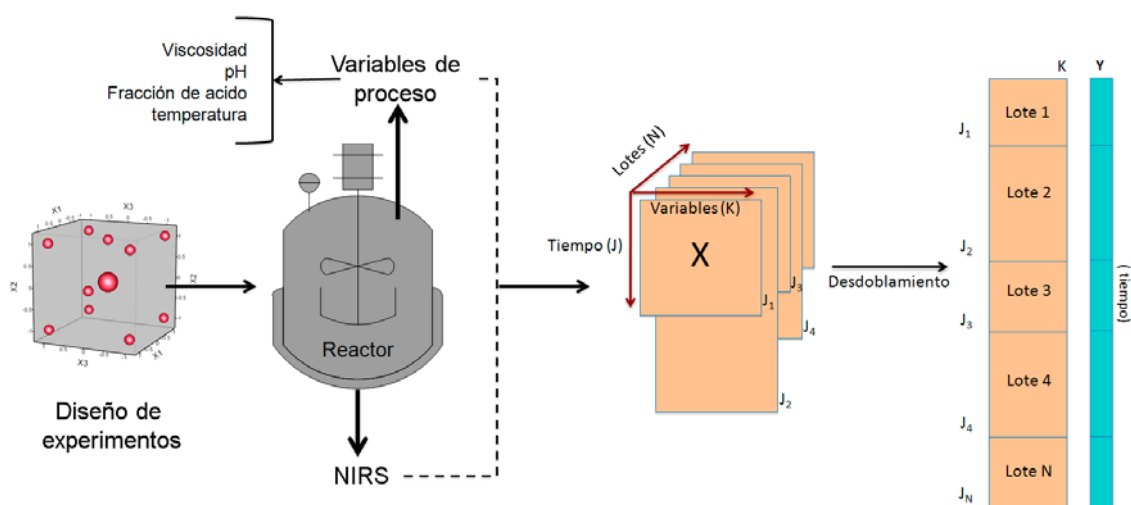


Figura 4.4. Esquema del desdoblamiento de los datos multivariantes del proceso, previo a la construcción del modelo MSPC.

4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación se recogen los resultados más relevantes de los dos enfoques, estadístico clásico y multivariante.

4.3.1. Determinación del espacio de diseño (SD)

Con la finalidad de establecer los CQAs para la formulación estudiada, se utilizaron los datos históricos de calidad provenientes de los lotes de gel fabricados en los últimos cuatro años. De este análisis se desprendió que todos los resultados de viscosidad y pH seguían una distribución normal. Los valores presentaron medias de viscosidad y pH de 3 Pa.s y 6.2 respectivamente.

Con respecto al proceso, la adición de la disolución de trometamol provocó la neutralización, en primer lugar, de los grupos ácido del API por su mayor acidez ($pK_a = 4.6$) y a continuación los del polímero ($pK_a \sim 6.0$). La acidez total de la muestra fue la suma de las cantidades de API

y de polímero y la adición de solución de trometamol produjo la neutralización del API, el cual requirió aproximadamente un 20% del total de base; a continuación se neutralizan los grupos ácidos del polímero, hasta neutralizar un 70% del ácido total. Para una fácil comprensión de esta etapa, la Figura 4.5 ilustra la evolución de la viscosidad y pH durante la neutralización; se pudo apreciar un aumento rápido de la viscosidad hasta la neutralización de un 15% del ácido total, para luego estabilizarse y descender ligeramente al final del proceso. Por otro lado, el pH se incrementó regularmente con la adición de la solución neutralizante. Como se puede observar, el rango de variación es mucho más importante para la viscosidad que para el pH.

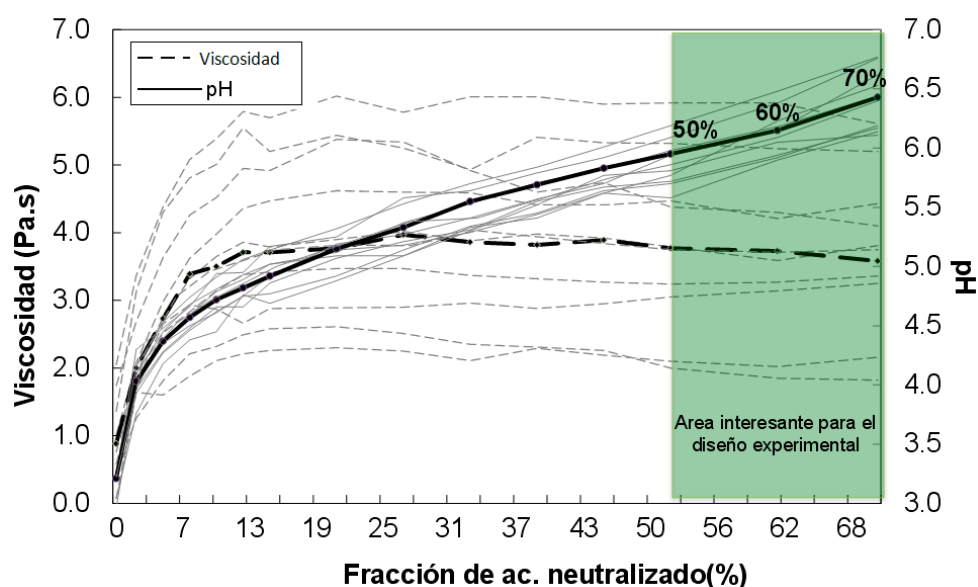


Figure 4.5. Perfiles de viscosidad y pH durante el proceso de gelificación para todos los experimentos. Los lotes NOC se grafican en línea gruesa.

4.3.1.1. Análisis estadístico y la validación de los modelos estadísticos

Se evaluó la ecuación lineal de los modelos teóricos propuestos y se calcularon los coeficientes de los factores por ajuste de mínimos cuadrados. Algunas interacciones de primer, segundo u orden superior no fueron significativas ($p > 0.05$), por lo que el modelo fue recalculado

solo con los efectos significativos. Los modelos para viscosidad (Y1) y pH (Y2) fueron matemáticamente definidos de la siguiente manera:

$$Y1 = 3.80 - 0.45X_1 + 0.94X_2 - 1.43X_3 + 1.76X_5 + 1.01X_1X_2 - 0.82X_1X_3 - 0.18X_1X_5 - 1.89X_2X_5 + 1.56X_3X_5 - 0.42(X_1)^2 - 1.21(X_2)^2 + 1.71(X_5)^2 \quad (4.2)$$

$$Y2 = 6.12 + 0.16X_1 - 0.10X_2 + 0.27X_3 + 0.28X_4 - 0.23X_5 - 0.08X_1X_2 + 0.14X_1X_3 - 0.26X_1X_5 + 0.12X_2X_5 - 0.06X_3X_4 - 0.42X_3X_5 - 0.33(X_1)^2 + 0.69(X_3)^2 - 0.22(X_5)^2 \quad (4.3)$$

El ANOVA aplicado a la regresión de coeficientes demostró que las ecuaciones se ajustaron a la ecuación lineal propuesta inicialmente. Así, la ecuación para Y1 (Ec. 4.2) y Y2 (Ec. 4.3) presentaron una muy buena linealidad ($R^2_{Y1} = 0.996$ y $R^2_{Y2} = 0.972$). Los modelos además no presentaron falta de ajuste ($LOF_{Y1}=0.94$ y $LOF_{Y2}=0.93$). Una vez evaluada la linealidad de los modelos se procedió a la exploración de los valores de residuales. La Tabla 4.2 muestra la lista de residuales para Y1 y Y2, como se puede apreciar las predicciones son correctas, obteniendo residuales inferiores al 5% de error absoluto, lo cual muestra que las ecuaciones propuestas se ajustan muy bien a los valores experimentales.

La validación de los modelos matemáticos se realizó por validación cruzada, el método consistió en dividir el conjunto de calibración original en dos subgrupos, uno con el 75% de los datos, el cual es usado para calibración y el 25% restante de los datos, el cual es usado para la validación. Los errores de predicción (RMSEP) para los dos modelos fueron muy bajos ($RMSEP_{Y1}=0.059$ y $RMSEP_{Y2}=0.064$).

Un diagrama de Pareto nos permitió visualizar fácilmente los efectos principales e interacciones de los factores. La **Figura 4.6a** muestra el diagrama de Pareto para Y1, solamente para los factores e interacciones

estadísticamente significativos. Como se puede observar X_2 y X_5 fueron los factores con efectos altamente significativos sobre $Y1$ y así sucesivamente en orden de importancia. La **Figura 4.6b** muestra el diagrama de Pareto para $Y2$, note como X_4 fue el factor más importante, seguido por X_5 , X_2 y X_1 .

Tabla 4.2. Condiciones experimentales del diseño y análisis estadístico

Lotes	Factores					Y1=Viscosidad (Pa.s)			pH (Y2)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Obs.	Pred.	Res. (%)	Obs.	Pred.	Res. (%)	
Al 50% del total del ac. neutralizado	01	-1	-1	-1	-1	0	3.24	3.29	-1.54	5.94	5.89	0.84
	02	-1	1	1	-1	1	5.32	5.26	1.13	5.72	5.72	0.00
	03	1	1	1	-1	1	4.47	4.37	2.24	5.58	5.65	-1.25
	04	-1	1	-1	-1	0	3.05	3.14	-2.95	5.77	5.84	-1.21
	05	1	1	-1	-1	0	5.92	5.92	0.00	5.70	5.71	-0.18
	06	1	-1	-1	-1	0	2.00	2.02	-1.00	6.09	6.08	0.16
	07	-1	-1	1	-1	0	2.10	2.09	0.48	6.19	6.25	-0.97
	08	1	-1	1	-1	1	4.38	4.26	2.74	5.81	5.76	0.86
	09	0	0	0	-1	0	3.82	3.80	0.52	5.93	5.84	1.52
	10	0	0	0	-1	0	3.86	3.80	1.55	5.78	5.84	-1.04
	11	0	0	0	-1	-1	3.75	3.76	-0.27	5.88	5.86	0.34
	12	0	1	0	-1	0	3.49	3.53	-1.15	5.76	5.73	0.52
	13	1	0	0	-1	-1	3.08	3.07	0.32	5.94	5.94	0.00
Al 60% del total del ac. neutralizado	01	-1	-1	-1	0	0	3.27	3.29	-0.61	6.15	6.23	-1.30
	02	-1	1	1	0	1	5.24	5.26	-0.38	5.94	5.94	0.00
	03	1	1	1	0	1	4.21	4.37	-3.80	5.90	5.87	0.51
	04	-1	1	-1	0	0	3.14	3.14	0.00	6.23	6.18	0.80
	05	1	1	-1	0	1	5.92	5.76	2.70	5.92	5.88	0.68
	06	1	-1	-1	0	-1	1.85	1.83	1.08	6.38	6.40	-0.31
	07	-1	-1	1	0	0	2.02	2.09	-3.47	6.48	6.48	0.00
	08	1	-1	1	0	1	4.30	4.26	0.93	6.05	5.99	0.99
	09	0	0	0	0	0	3.63	3.80	-4.68	6.17	6.12	0.81
	10	0	0	0	0	0	3.82	3.80	0.52	6.01	6.12	-1.83
	11	0	0	0	0	0	3.69	3.80	-2.98	6.10	6.12	-0.33
	12	0	1	0	0	0	3.60	3.53	1.94	6.05	6.02	0.50
	13	1	0	0	0	0	2.92	2.94	-0.68	5.96	5.95	0.17
Al 70% del total del ac. neutralizado	01	-1	-1	-1	1	0	3.36	3.29	2.08	6.62	6.57	0.76
	02	-1	1	1	1	1	5.20	5.26	-1.15	6.17	6.17	0.00
	03	1	1	1	1	1	4.43	4.37	1.35	6.14	6.10	0.65
	04	-1	1	-1	1	0	3.25	3.14	3.38	6.53	6.52	0.15
	05	1	1	-1	1	1	5.61	5.76	-2.67	6.19	6.23	-0.65
	06	1	-1	-1	1	-1	1.82	1.83	-0.55	6.76	6.74	0.30
	07	-1	-1	1	1	0	2.16	2.09	3.24	6.77	6.71	0.89
	08	1	-1	1	1	1	4.10	4.26	-3.90	6.11	6.22	-1.80
	09	0	0	0	1	0	3.84	3.80	1.04	6.46	6.41	0.77
	10	0	0	0	1	-1	3.75	3.76	-0.27	6.40	6.42	-0.31
	11	0	0	0	1	0	3.99	3.80	4.76	6.35	6.41	-0.94
	12	0	1	0	1	0	3.48	3.53	-1.44	6.30	6.30	0.00
	13	1	0	0	1	0	2.94	2.94	0.00	6.22	6.23	-0.16

Obs.: Respuesta experimental (observada)

Pred.: Predicción

Res.: Residual absoluto en %

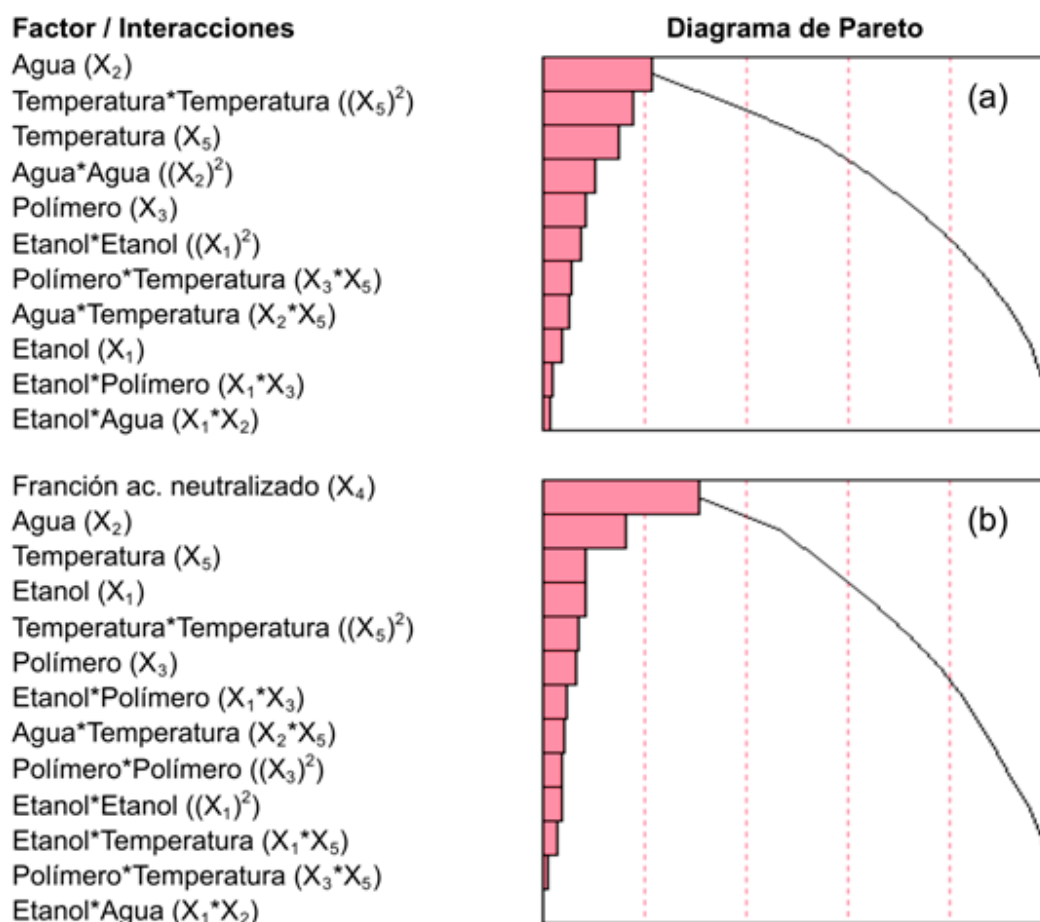


Figura 4.6. Diagrama de Pareto únicamente para efectos significativos en la viscosidad (a) y el pH (b).

4.3.1.2. Análisis de superficie de respuesta (RSA)

Con el objeto de ampliar la información que se puede extraer de los modelos lineales construidos (ecuaciones 4.4 y 4.5) se han obtenido los gráficos de contorno para cada respuesta, los cuales han sido dibujados trazando la variación de las respuestas frente a los dos factores más significativos; mientras que los factores restantes se mantuvieron constantes al nivel especificado. Así, manteniendo fijo el etanol al 32% y la temperatura a 36°C (valores centrales iniciales, ver Tabla 4.1), se obtuvieron los gráficos de contorno para el carbómero y el agua, el cual se muestra en la Figura 4.7a (la viscosidad esta indicado por las líneas rojas y el pH por las líneas azules). El conjunto de áreas A2 y A3 corresponden a la zona de aceptación solo para el pH, es decir cualquier

valor de pH dentro de estos límites estará dentro de las especificaciones definidas, mientras que el área A3 corresponde a la zona de aceptación solo para la viscosidad y al mismo tiempo es la zona de aceptación tanto para Y1 y Y2; por consiguiente todo valor que se encuentre en esta zona cumplirá con las especificaciones deseadas y por lo tanto delimita nuestro espacio de diseño. La Figura 4.7a muestra el gráfico de contorno entre X_3 y X_2 , que son los factores más significativos para Y1 (X_1 , X_4 y X_5 son fijados a nivel 0), como se puede apreciar el área de color blanco (A3) en la que cualquier punto contendrá Y1 y Y2 dentro de los límites de tolerancia. Una zona interesante se encuentra alrededor del 61% del contenido de agua y 1.52% de contenido de polímero en donde los valores objetivo de viscosidad y pH se entrecruzan.

La Figura 4.7b ilustra el gráfico de contorno entre X_2 y X_4 (factores más significativos para Y2), como se procedió anteriormente los tres factores restantes fueron fijados al nivel central, así según el gráfico se pudo deducir que entre el 53 – 63 % del ácido total neutralizado y 61 % de agua aproximadamente, cualquier valor, tanto de viscosidad y pH estaría dentro de las especificaciones deseadas.

De estos gráficos se pudo aislar una zona rectangular de color azul claro, la cual representa el espacio de diseño para estos factores ya que cualquier punto dentro del rectángulo azul claro reunirá los valores deseados de viscosidad y pH simultáneamente. Se pudo ver que esta fue una zona común para los gráficos, al aplicar el mismo principio a los factores restantes obtuvimos un espacio de diseño del proceso, el cual estuvo delimitado por las siguientes coordenadas:

$$X_1 = 32 \pm 1\%, X_2 = 61\%, X_3 = 1.5\%, X_4 = 60 \pm 6\% \text{ and } X_5 = 36 \text{ }^\circ\text{C}$$

Adecuando nuestro diseño a estas condiciones tendremos la certeza de que los valores de Y1 y Y2 se encontrarán siempre en el rango de tolerancia deseado. Note como los factores X_1 , X_3 , X_4 y X_5 propuestos para el espacio de diseño fueron muy próximos a los valores centrales

del diseño experimental, con excepción de X_2 que es inferior al valor central del dominio experimental.

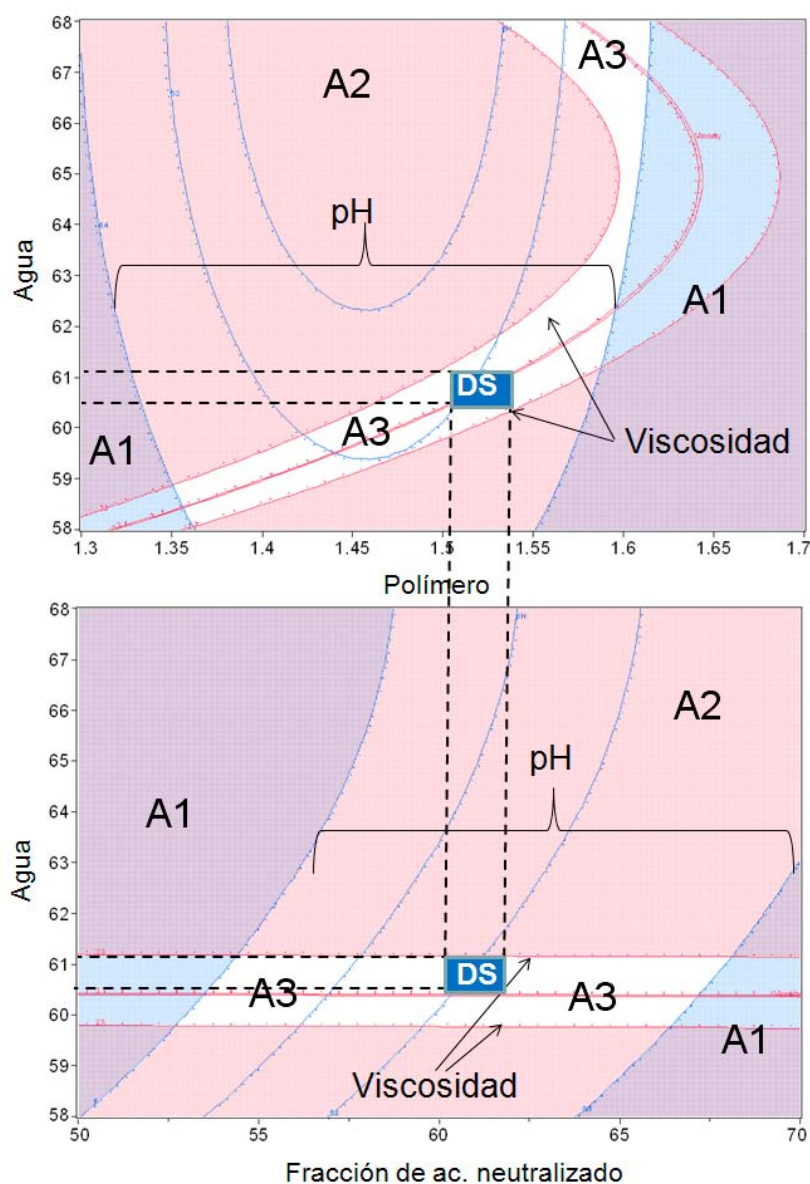


Figura 4.7. Gráficos de contorno para los factores significativos sobre la viscosidad (líneas rojas) y el pH (líneas azules). El etanol y la temperatura del reactor fueron fijados al valor central del dominio experimental, A1: zona de rechazo para el pH, A2: zona de rechazo para la viscosidad y A3: zona de aceptación para la viscosidad y el pH.

4.3.1.3. Optimización mediante la función de deseabilidad

Hasta aquí no hemos hecho más que explorar los resultados, analizar los datos y verificar la validez de los modelos. Pero todo este estudio no

tendría más trascendencia si no se utilizaran estos resultados para optimizar el proceso de fabricación, con respecto a los valores históricos, que son valores reales de lotes fabricados. Para la siguiente etapa utilizaremos una herramienta sencilla y muy eficaz para determinar un óptimo, teniendo en cuenta las restricciones para las dos respuestas, esta función es la deseabilidad.

Nuestro objetivo es obtener un gel cuyos CQAs sean $Y1 = 3 \pm 0.3$ Pa.s y $Y2 = 6.2 \pm 0.2$. Con esta viscosidad, el gel presenta ciertas características reológicas, ideales para mejorar su aplicación dérmica, facilitando el transporte del principio activo. Además, es conveniente que el pH sea lo mayor posible ($pH > 6$) para evitar o reducir en lo posible la formación de subproductos por reacción de los componentes entre si.

Usar la función de deseabilidad permite al experimentador alcanzar una razón matemática para seleccionar la mejor combinación de la formulación y de los parámetros críticos del proceso (CPPs). La función de deseabilidad es útil cuando es necesario encontrar el mejor compromiso entre varias respuestas. Esto hace posible de encontrar el mejor compromiso cuando existen restricciones en cada respuesta, como en nuestro caso. Así pues, si la deseabilidad global es igual a 1 todos los compromisos han sido logrados. Si la deseabilidad global es igual a 0, por lo menos uno de los compromisos no es alcanzado (es decir, la deseabilidad cero). Si la deseabilidad global se encuentra entre 0 y 1, todos los compromisos por lo menos son obtenidos parcialmente (algunos se pueden lograr totalmente). El mejor compromiso corresponde al valor global más alto de la deseabilidad.

Para calcular la deseabilidad de dos o más respuestas en simultáneo es conveniente calcular un modelo que considere al mismo tiempo las dos respuestas, este modelo no debe de ser muy diferente de los calculados en las ecuaciones 4.2 y 4.3. Esto significa básicamente conservar los mismos coeficientes para ambas respuestas (viscosidad y pH), en otras palabras si un factor no es significativo para la viscosidad, pero si para el pH (como el caso de X_4) los consideramos para el análisis simultaneo

y los coeficientes que no sean significativos para ambas respuestas serán suprimidos. Obtenemos así dos ecuaciones (ecuaciones 4.4 y 4.5) las cuales presentaron muy buena linealidad ($R^2_{Y1}=0.99$, $R^2_{Y2}=0.97$, $LOF_{Y1}=0.44$; $LOF_{Y2}=0.91$). Estos modelos nos permitirán calcular una deseabilidad global para las respuestas emparejadas.

$$\begin{aligned}
 Y1 = & 3.80 - 0.45X_1 + 0.93X_2 - 1.42X_3 + 0.01X_4 + 1.76X_5 + 1.01X_1X_2 \\
 & - 0.81X_1X_3 - 0.04X_1X_4 - 0.12X_1X_5 - 1.88X_2X_5 - 0.01X_3X_4 + 1.52X_3X_5 \\
 & - 0.05X_4X_5 - 0.41(X_1)^2 - 1.21(X_2)^2 - 0.01(X_3)^2 + 1.72(X_5)^2
 \end{aligned} \tag{4.4}$$

$$\begin{aligned}
 Y2 = & 6.11 + 0.14X_1 - 0.11X_2 + 0.25X_3 + 0.28X_4 - 0.23X_5 - 0.08X_1X_2 \\
 & + 0.13X_1X_3 - 0.02X_1X_4 - 0.22X_1X_5 + 0.14X_2X_5 - 0.05X_3X_4 - 0.40X_3X_5 \\
 & - 0.01X_4X_5 - 0.29(X_1)^2 + 0.04(X_2)^2 + 0.60(X_3)^2 - 0.20(X_5)^2
 \end{aligned} \tag{4.5}$$

Por consiguiente, utilizando estas formulas podemos calcular el valor de la deseabilidad global, la cual nos permitirá optimizar el proceso. La Figura 4.8 muestra, una de múltiples, condiciones óptimas para obtener una deseabilidad total $D_{Y1,Y2} = 1$. Es así que, después de múltiples simulaciones hechas por el programa obtenemos un perfil de predicciones, que consistió en encontrar una de muchas soluciones posibles para la optimización del proceso. Utilizando las coordenadas de los factores en la Figura 4.8, previa transformación a valores reales, obtendríamos los valores de cada factor para obtener un producto que presente al mismo tiempo una viscosidad y pH deseados. Estos valores fueron los siguientes:

Etanol al 30%, agua al 59%, polímero al 1.6%, temperatura al interior del reactor alrededor de 36°C y añadiendo una cantidad de solución neutralizante necesaria para neutralizar el 53% del ácido total aproximadamente.

Utilizando estos ajustes y remplazándolos en las ecuaciones 4.4 y 4.5 obtendríamos, en teoría, un producto cuya viscosidad y pH sean 3 ± 0.2

Pa.s y 6.2 ± 0.1 respectivamente. Como vemos, las formulas son ligeramente diferentes de las propuestas en las ecuaciones 4.2 y 4.3 debido a que para este cálculo utilizamos las dos muestras en simultáneo con el mismo número de coeficientes para las dos respuestas.

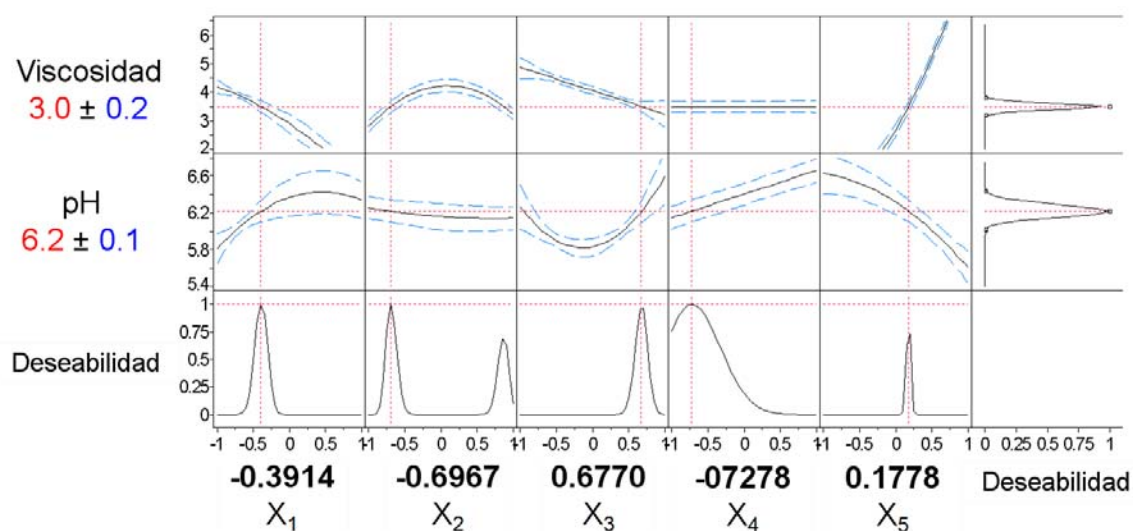


Figura 4.8. Aplicación de la función de deseabilidad para la viscosidad y el pH, utilizando los QTPPs de la formulación.

4.3.1.4. Combinación de viscosidad y pH en una nueva respuesta deseada (DR_n)

En los dos modelos matemáticos establecidos, hasta el momento se ha atribuido a cada una de las respuestas la misma importancia, es decir deseabilidad 1. Sin embargo, si deseamos saber cual de las dos respuestas es más influyente en nuestra deseabilidad global, será necesario calcular deseabilidades a diferentes pesos de Y1 y Y2 para verificar su importancia con respecto a la respuesta calculada.

Hemos observado que los modelos explicaron correctamente Y1 y Y2 como respuestas independientes, pudiendo utilizar la función de deseabilidad para determinar los niveles apropiados de nuestro compromiso. No obstante, desde el punto de vista práctico, podríamos relacionar las dos respuestas en una sola, evitando tener que utilizar

dos formulas para realizar las predicciones de variables, a esta respuesta la hemos llamado DR_n . Basada en la función de deseabilidad, esta propuesta nos permitirá con una sola formula evaluar nuestro diseño experimental.

En primer lugar, se normalizó las respuestas con respecto a nuestros CQAs (ecuaciones 4.6 y 4.7). Una vez normalizados los valores individuales, estudiamos la relación entre ellos. Tuvimos tres posibilidades: (a) Y1 e Y2 tengan el mismo peso en nuestra respuesta (DR_1), (b) Y1 tenga mayor peso que Y2 (DR_2) o (c) Y2 tenga mayor peso que Y1 (DR_3).

$$Visc_{Norm} = Viscosity(Pa.s)/3.00Pa.s \quad (4.6)$$

$$pH_{Norm} = pH/6.22 \quad (4.7)$$

$$DR_1 = (Visc_{Norm} * 0.5) + (pH_{Norm} * 0.5) \quad (4.8)$$

$$DR_2 = (Visc_{Norm} * 0.8) + (pH_{Norm} * 0.2) \quad (4.9)$$

$$DR_3 = (Visc_{Norm} * 0.3) + (pH_{Norm} * 0.7) \quad (4.10)$$

Basado en el ANOVA de los modelos para las tres respuestas (Tabla 4.3), se observó que el único modelo que presentó una falta de ajuste (LOF) fue DR_3 ($p = 0.010$). Contrariamente, el modelo con menos LOF fue el de DR_2 . Por lo tanto, la viscosidad tuvo más peso o importancia que el pH sobre nuestra respuesta, por lo que sería la variable a seguir muy de cerca en el proceso. En la Tabla 4.3 además se muestran los efectos significativos para las tres respuestas deseadas (efectos individuales de los factores, interacciones y cuadráticos), podemos apreciar que el efecto de X_4 fue únicamente significativo para DR_1 y

DR₃. Por otro lado, la interacción X₁.X₅ y el efecto cuadrático de X₁ fueron sólo significativos para DR₃. Nuestro objetivo fue maximizar el valor de la respuesta deseada DR₂, siempre y cuando se encuentre entre los límites establecidos. La ecuación 4.11 muestra la ecuación para el modelo DR₂ validado. Note como se han incluido en la ecuación cuatro coeficientes (X₄, X₁.X₄, X₁.X₅ y X₃.X₄) que a pesar de no ser significativos, según el análisis del DoE previo, se mantuvieron en la ecuación, debido a que están relacionados al pH y al suprimirlos afectarían la robustez de este modelo.

$$\begin{aligned}
 DR_2 = & 1.21 - 0.12X_1 + 0.25X_2 - 0.38X_3 + 0.01X_4 + 0.46X_5 + 0.27X_1X_2 \\
 & - 0.22X_1X_3 - 0.01X_1X_4 - 0.04X_1X_5 - 0.50X_2X_5 - 0.01X_3X_4 + 0.42X_3X_5 \\
 & - 0.11(X_1)^2 - 0.32(X_2)^2 + 0.66(X_3)^2 + 0.45(X_5)^2
 \end{aligned} \tag{4.11}$$

Tabla 4.3. Resumen del ajuste de los modelos DR₁, DR₂ y DR₃

Parámetro	DR ₁	DR ₂	DR ₃
R ²	0.995	0.996	0.992
R ² -ajustado	0.989	0.992	0.983
Estadísticos			
RMSE	0.016	0.024	0.012
<i>p-value</i>	<.0001	<.0001	<.0001
LOF	0.144	0.380	0.010
Factor	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ , X ₅	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₅	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ , X ₅
Efectos significativo			
Interacción	X ₁ /X ₂ , X ₁ /X ₃ , X ₂ /X ₅ , X ₃ /X ₅	X ₁ /X ₂ , X ₁ /X ₃ , X ₂ /X ₅ , X ₃ /X ₅	X ₁ /X ₂ , X ₁ /X ₃ , X ₁ /X ₅ , X ₂ /X ₅ , X ₃ /X ₅
Cuadrático	X ₂ , X ₅	X ₂ , X ₅	X ₁ , X ₂ , X ₅

LOF = *lack of fit*

Para definir el espacio de diseño de DR₂, hemos optimizado la ecuación 4.11, obteniendo las siguientes coordenadas:

Contenido de etanol 32 ± 1%; de agua 60 ± 1%, de polímero 1.6%, fracción de ácido total neutralizado 60 ± 9% y temperatura 37°C.

Podemos comparar este espacio de diseño al definido previamente utilizando la viscosidad y pH simultáneamente. La Tabla 4.4 muestra esta comparación, en donde se puede apreciar que los diseños fueron muy próximos entre si. Esta afirmación, desde el punto de vista práctico, es muy importante ya que permitiría hacer un seguimiento del proceso con una sola variable respuesta (DR₂); a la cual previamente hemos atribuido los pesos de 0.8 para viscosidad y 0.2 para pH, parámetros importantes para determinar si un lote reúne las especificaciones de calidad.

Tabla 4.4. Comparación de los espacios de diseño obtenidos

Factor	Código	Usando viscosidad y pH	Usando respuesta deseada DR2
Etanol (%)	X ₁	32.4	32
Agua (%)	X ₂	61	61
Polímero (%)	X ₃	1.51	1.58
Fracción de Ac. Neutralizado (%)	X ₄	60 ± 6	60 ± 9
Temperatura del reactor (%)	X ₅	36	37

4.3.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR

Como se mencionó anteriormente, durante el proceso de fabricación se fueron extrayendo muestras y se registraron sus espectros NIR. Con el conjunto de espectros registrados se realizó un PCA, seleccionándose los espectros que recojan la máxima variabilidad correspondiente a las variables escogidas, viscosidad y pH. Con los espectros seleccionados se construyeron y validaron los modelos de calibración PLS para viscosidad y pH. La construcción y validación de los modelos para los parámetros químicos se realizaron mayoritariamente con muestras preparadas en el laboratorio.

4.3.2.1. *Análisis Multivariante*

En la Figura 4.9 se muestran los espectros, en modo absorbancia, de las muestras extraídas durante un proceso completo. Podemos apreciar claramente las bandas correspondientes al agua (1300 – 1600 y 1900 – 2100 nm) y las correspondientes al etanol (2200 – 2350 nm), se puede además observar una relación entre ciertas regiones espectrales y la variación de la viscosidad y pH.

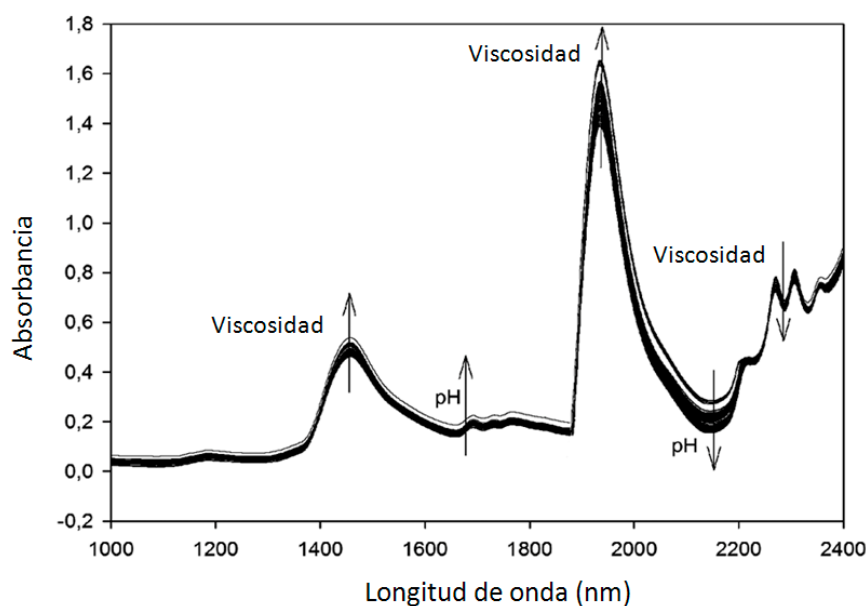


Figura 4.9. Espectros NIR en absorbancia para un proceso.

Antes de comenzar a construir los modelos, un PCA de los espectros de todas las muestras ayudó a observar las diferencias espectrales entre los lotes y a establecer los experimentos que pertenecían a una misma población. Es así que los lotes B2 y B4 fueron excluidos por presentar espectros demasiado diferentes de los otros lotes. La Figura 4.10 muestra el diagrama de dispersión de scores de las dos primeras componentes principales que explican el 93% de variabilidad. Como se puede apreciar los lotes están denotados por B1-B13, donde tres de ellos fueron lotes NOC (B9, B10 y B11). Se puede apreciar que las muestras extraídas de los diferentes lotes siguieron una misma

trayectoria, indicada en el gráfico por una flecha. Además, se observó que los lotes NOC se encontraron muy próximos entre si; por otro lado, algunos lotes se estuvieron alejados (B6 y B8) de los lotes NOC, mientras que otros estuvieron muy cercanos (B1 y B12). Esta separación fue evidencia de que la variación de la composición de los componentes dio lugar a geles con características diferentes.

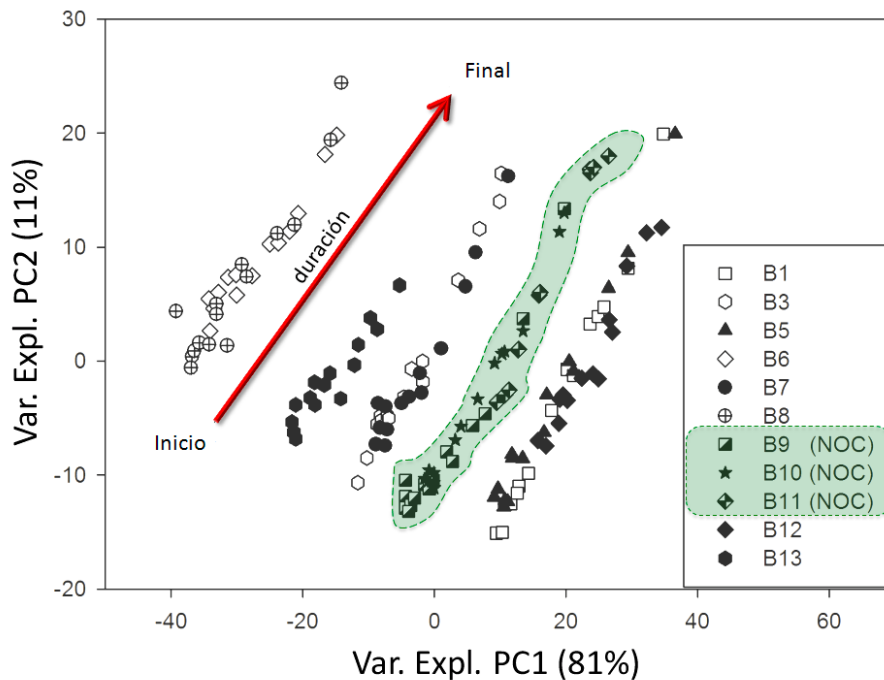


Figura 4.10. Diagrama de dispersión de scores para PC1 vs PC2 para los lotes fabricados a partir del DoE (se excluyeron los lotes B2 y B4).

Como se mencionó anteriormente, a parte de las muestras extraídas de los procesos, se prepararon muestras en el laboratorio. Con el 75% de estas muestras de laboratorio se construyeron modelos de calibración PLS1. El 25% restante se utilizó para evaluar la capacidad predictiva de los modelos de calibración. Esta selección de muestras se hizo a partir de un gráfico de scores de un PCA calculado con el 100% de las muestras cubriendo todo el rango de la variable “Y” y a la vez la máxima variabilidad espectral. Al conjunto de calibración se le incluyeron muestras de procesos para incorporar la variabilidad del proceso de fabricación a los modelos.

Se construyeron modelos para la determinación de la concentración de los constituyentes mayoritarios del gel. En la Figura 4.11 se muestra los espectros NIR correspondientes a una muestra del proceso (de concentración nominal), un placebo, agua, API y etanol. Como se aprecia, los espectros del placebo y la muestra del proceso son casi idénticos. La baja concentración del API y la alta absorción de la matriz hidro-alcohólica (64:32 agua/etanol) ocultan la contribución del API y en consecuencia, para la construcción del modelo de API se utilizaron las bandas donde este presentó la máxima absorción (1600 – 1800 nm), evitando así las fuertes bandas de absorción de la matriz hidro-alcohólica. Para la determinación del contenido de agua, etanol y API se construyeron modelos de calibración basados también en el algoritmo de PLS1.

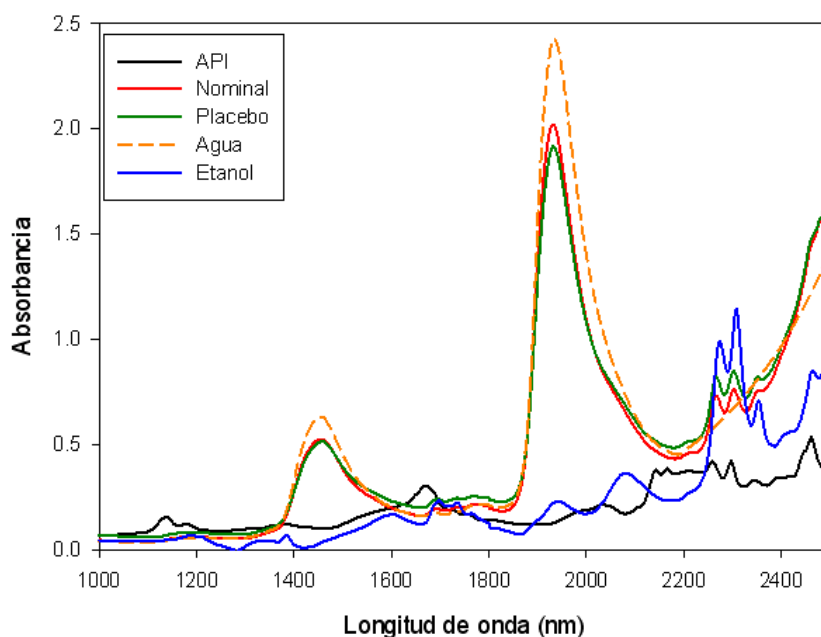


Figure 4.11. Espectros NIR para una muestra de producción de gel (nominal), un placebo y las materias primas, agua, API y etanol.

Las figuras de merito para los tres modelos PLS construidos para agua, etanol y polímero se muestran en la Tabla 4.5; merece destacarse que los modelos se caracterizaron por su simplicidad en cuanto al número

bajo de factores PLS y presentaron muy buena capacidad predictiva, con errores de predicciones muy bajos (RMSEP < 0.7).

Por otro lado, las figuras de merito de los modelos PLS para viscosidad y pH se recogen en la Tabla 4.6. Estos modelos necesitaron más factores PLS, sin embargo presentaron muy buena capacidad predictiva con errores de predicción bajos (RMSEP < 0.4).

Tabla 4.5. Figuras de merito de los modelos PLS para la determinación de parámetros químicos

Parámetro	Etanol	Agua	API
Modo espectral	1 ^{era} derivada SG	1 ^{era} derivada SG	1 ^{era} derivada SG
Rango espectral (nm)	1832 – 2100	1300 – 1642 1801 – 2100	1600 – 1800
Nº de factores PLS	2	2	3
Concentración nominal (%)	33.60	63.09	1.21
Calibración			
Nº muestras de laboratorio	9	8	15
Nº muestras de producción	10	3	30
Rango de concentración (%)	24.7 – 41.9	55.2 – 72.6	1.0 – 1.4
Predicción			
Nº muestras de laboratorio	14	13	26
Rango de concentración (%)	28.1 – 38.4	58.9 – 69.2	1.1 – 1.2
RMSEP	0.636	0.649	0.027

Tabla 4.6. Figuras de merito de los modelos PLS para la determinación de parámetros físicos

Parámetro	Viscosidad	pH
Modo espectral	1 ^{era} derivada SG 29p + SNV	1 ^{era} derivada SG 29p + SNV
Rango espectral (nm)	1000 – 1796 1984 – 2112	1100 – 1796 1861 – 2400
Nº de factores PLS	5	5
Valor nominal (%)	3.0 (Pa.s)	6.22
Calibración		
Nº muestras de producción	41	42
Rango de calibración	2.0 – 5.7 (Pa.s)	4.5 – 6.5
R ²	0,98	0.99
Predicción		
Nº muestras de producción	34	34
Rango de predicción	2.2 – 4.0 (Pa.s)	4.6 – 6.4
RMSEP	0.359	0.394

4.3.2.2. Control estadístico multivariable de procesos (MSPC)

Para calcular el primer modelo MSPC se utilizaron las variables registradas durante el proceso (viscosidad, pH, fracción de ácido neutralizado y temperatura). El segundo modelo se calculó únicamente con los espectros NIR. Ambos modelos se construyeron utilizando solamente los lotes NOC (lotes de referencia). Esta técnica nos permitió comparar la evolución de los lotes provenientes del DoE con respecto a lotes NOC. Para la mejor comprensión de los resultados, se utilizaron los gráficos de control de scores, de residuales (llamado también *Q-statistic* en PLS_toolbox o DModX en SIMCA-P+) y el de la estadística T^2 de Hotelling' (llamado también *D-statistic* en la PLS_toolbox). El gráfico de control de T^2 mide la desviación entre un nuevo lote y los lotes NOC en términos de variación que puede ser explicada por el modelo. Por contrario, el gráfico de control de residuales muestra la variación que no puede ser explicada por el modelo. Por lo tanto estos dos gráficos son complementarios.²⁵

Para ayudar a la interpretación de estos gráficos de control, supongamos un lote "L" (el cual se desea comparar con lotes NOC) que tiene valores elevados de T^2 de Hotelling y valores moderados de residuales; esto indica que la variación presente en el lote "L" se encuentra explicada en parte en los lotes NOC (es decir el modelo no explica completamente toda la variación del lote "L"), pero esta variación es grande cuando se compara a la variación de los lotes NOC (con un valor de T^2 de Hotelling elevado, el lote "L" se encuentra alejado del centro del modelo). Por otro lado, cuando un lote tiene residuales elevados, indica la presencia de alguna fuente nueva variación que no estuvo presente en los lotes NOC. Por lo tanto, es de mucha utilidad utilizar los dos tipos de gráficos de control simultáneamente.

El primer modelo MSPC construido que se realizó con las variables del proceso nos permitió explorar dicho proceso con medidas conocidas y reales. El modelo requirió dos factores PLS para explicar el 99% de la

²⁵ M. Islam et al, *The AAPS Journal* 6(2004) 61–67.

varianza total y su aplicación confirmó que todos los lotes, excepto B12 se encontraron alejados de los lotes NOC. A modo de ejemplo, las Figuras 4.12a y 4.12b muestran los gráficos de control de residuales y scores respectivamente para los lotes B1, B3 y B12. Un examen cuidadoso de los gráficos de control junto con los gráficos de contribución (no se muestran) reveló que la viscosidad es la variable individual más fuertemente afectada por los cambios de concentración en los componentes de gel; es decir, cualquier cambio en la concentración por encima o por debajo de los valores NOC redujo la fracción de la varianza explicada por el modelo y ocasiona que el lote afectado se encuentre fuera de los límites de los gráficos de control de residuales, esta diferencia se incrementa con el aumento de la viscosidad.

Para el segundo modelo MSPC, construido únicamente los espectros NIR, se probaron diferentes pre-tratamientos espectrales y el que dio mejor resultados fue la corrección de señal por ortogonalización (OSC). El modelo presentó un solo factor PLS significativo y explicó el 90% de la varianza total. Se aplicó el modelo a los lotes provenientes del DoE y como era de esperar todos estuvieron fuera de los límites en los gráficos de control, inclusive el lote B12 que según el modelo MSPC con variables del proceso estuvo dentro de los límites aceptación. A modo de ejemplo, en la Figura 4.13 se muestra el gráfico de control de scores del modelo y el lote B1, como se aprecia los límites fueron muy estrechos, lo que fue un indicio de la reproducibilidad del proceso y al mismo tiempo permitió detectar fácilmente lotes fuera de control. Sin embargo, esta comparación nos permitió identificar los lotes que a pesar de presentar diferentes concentraciones en los constituyentes, presentaron trayectorias de scores y residuales muy próximos, lo cual fue importante para la comprensión del proceso.

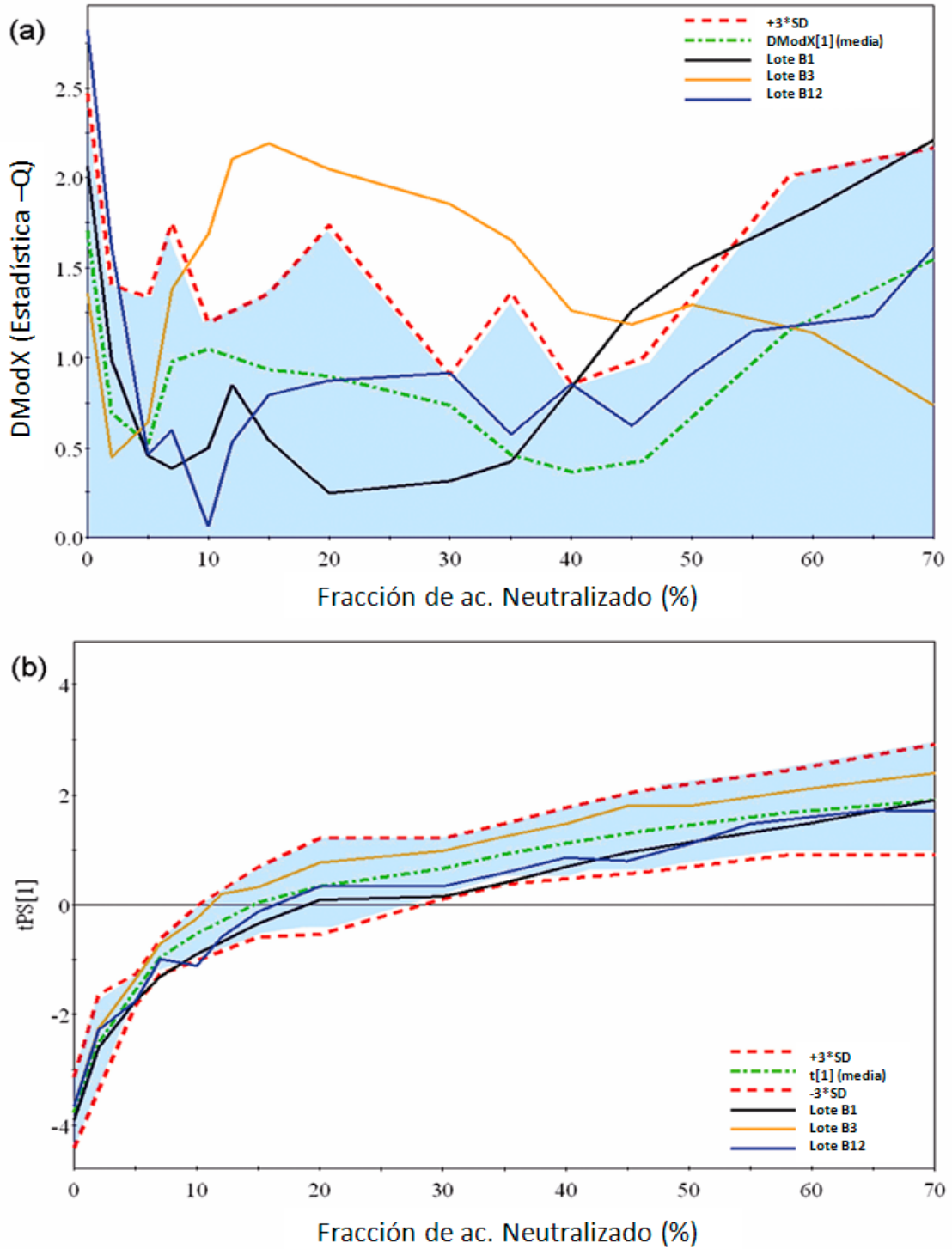


Figura 4.12. Gráficos de control de (a) scores y (b) de residuos (*Q*-statistic) para un modelo MSPC construido a partir de variables de proceso (viscosidad, pH, fracción de ácido neutralizado y temperatura del reactor).

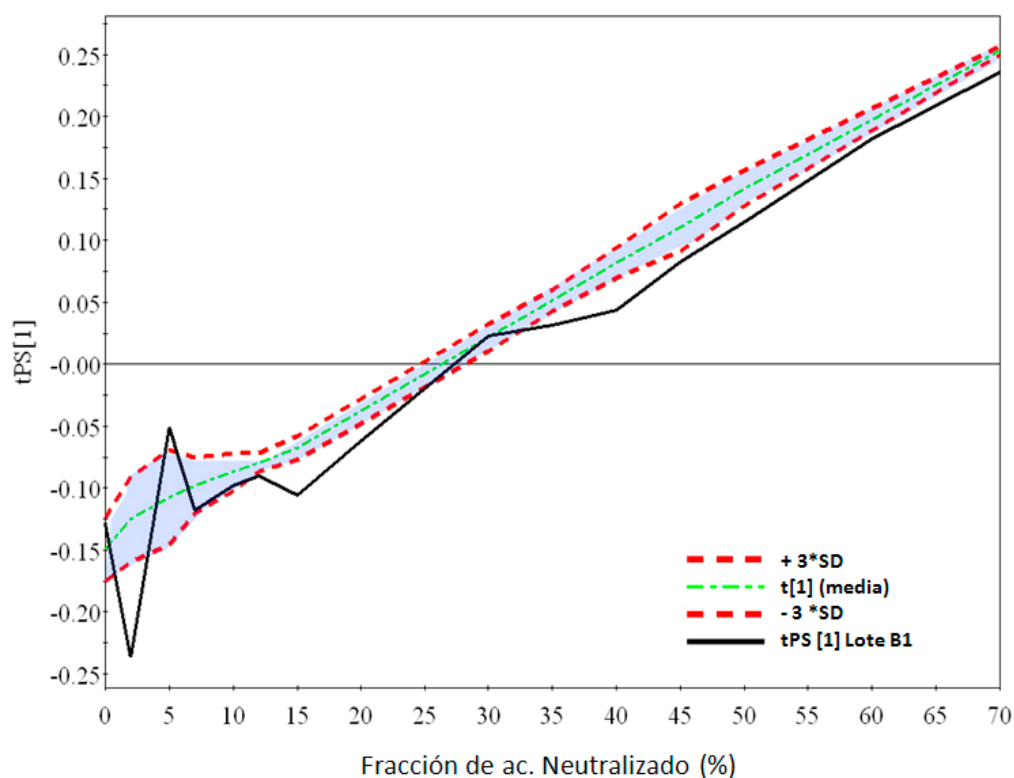


Figura 4.13. Gráficos de control de scores para el modelo MSPC construido únicamente a partir de espectros NIR.

Cabe indicar que estos modelos se construyeron únicamente con los lotes NOC disponibles, es por esta razón el estrecho margen entre los límites de aceptación para los gráficos de control. No obstante, esta información fue de mucha utilidad para realizar una monitorización mas exhaustiva con lotes NOC y construir un modelo que contenga casi toda la variabilidad del proceso, para esto será necesario una cantidad importante de lotes NOC.

4.3.2.3. Monitorización “at-line” de un proceso

Los modelos PLS construidos fueron utilizados durante un proceso para el seguimiento de los parámetros físicos y químicos durante la gelificación. Por medio de un t-test ($p=0.05$) se compararon las estimaciones del método NIR con los métodos de referencia utilizados. Las Tablas 4.7 y 4.8 resumen los t-test aplicados a las estimaciones de los parámetros químicos y parámetros físicos respectivamente. Como se observa en todos los casos las estimaciones NIR no fueron

significativamente diferentes de los métodos utilizados como referencia ($t_{crit} > t_{Obs}$). Obteniéndose predicciones correctas, con errores de predicción bajos ($RMSEP_{\text{viscosidad}}=0.48$ y $RMSEP_{\text{pH}}=0.26$), con lo cual se demostró que el método NIR puede ser aplicado para realizar un seguimiento de la evolución del pH y la viscosidad en un proceso de fabricación de un gel farmacéutico.

Tabla 4.7. Estadísticas de los residuales para las predicciones NIR de un lote de gel farmacéutico (parámetros químicos)

Estadísticas de residuales	Etanol (%)	Agua (%)	API (%)
Media	-0.17	0.04	-0.01
Desviación estándar	0.32	0.31	0.06
$t_{crit} (\alpha=0.05)$	2.14	2.14	2.14
$t_{obs} (\alpha=0.05)$	2.12	0.51	0.43
Grados de libertad	14	14	14
RMSEP	0.35	0.30	0.06

Tabla 4.8. Estadísticas de los residuales para las predicciones NIR de un lote de gel farmacéutico (parámetros físicos)

Estadísticas de residuales	Viscosidad (Pa.s)	pH
Media	-0.12	0.11
Desviación estándar	0.46	0.23
$t_{crit} (\alpha=0.05)$	2.16	2.14
$t_{obs} (\alpha=0.05)$	0.98	1.86
Grados de libertad	13	14
RMSEP	0.48	0.26

También se ha utilizado el modelo MSPC construido con espectros NIR; con estos modelos se ha realizado el seguimiento de un proceso a través de los scores y residuales. Los resultados fueron muy satisfactorios, el lote que fue monitorizado se mantuvo dentro de los límites de aceptación durante todo el proceso. Las Figuras 4.14a y 4.14b ilustran los gráficos de control MSPC de los scores y residuales para el lote

monitorizado. Como se puede apreciar en ambos gráficos el lote monitorizado se encontró dentro de los intervalos de aceptación.

De esta manera hemos aplicado una variedad de herramientas para realizar el seguimiento “at-line” de un proceso completo, demostrando que es posible realizar un seguimiento de la calidad de un lote utilizando la espectroscopia del infrarrojo cercano, NIRS.

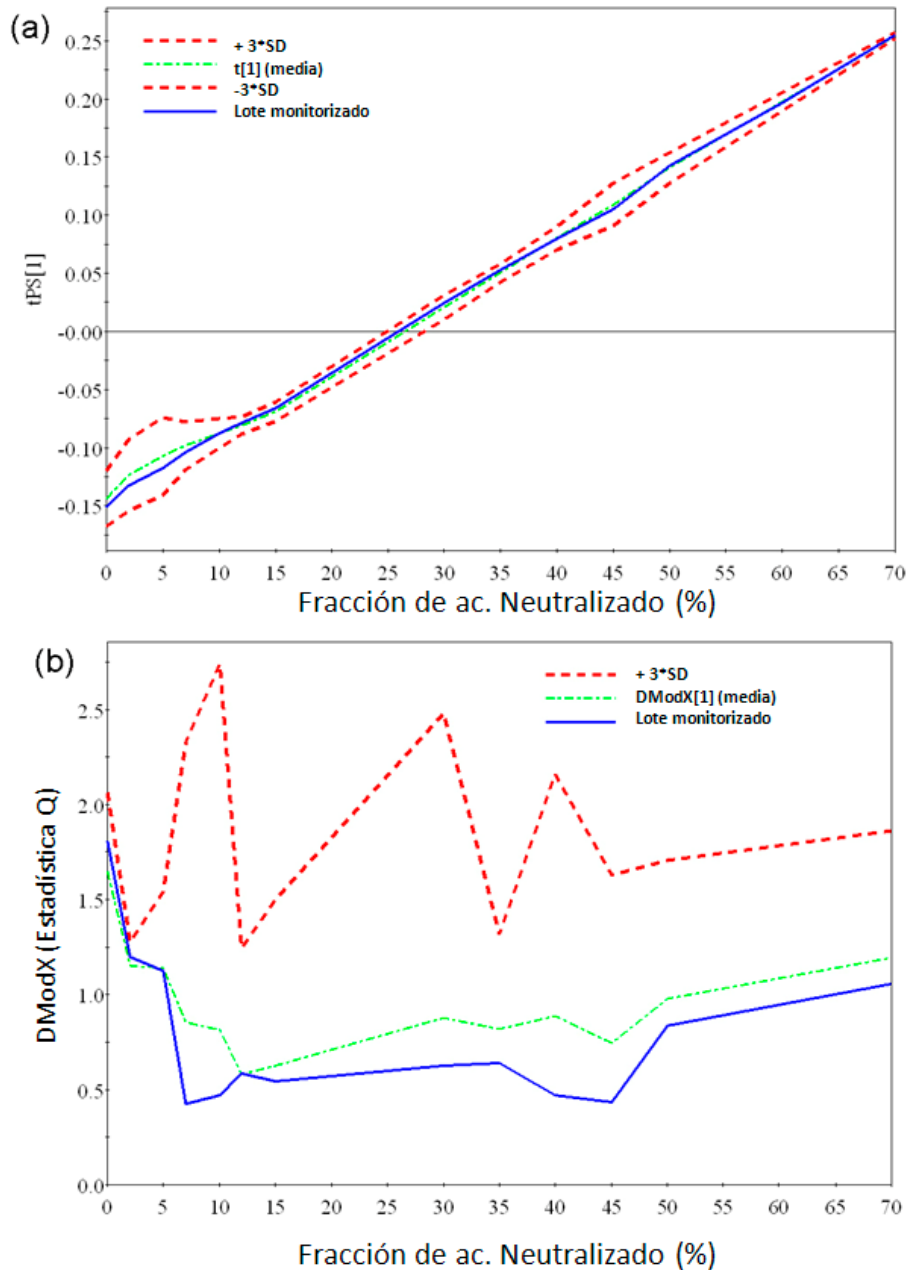


Figure 4.14. Monitorización de un proceso a partir de espectros NIR utilizando (a) gráfico de control de scores y (b) Gráficos de control de residuales (*Q-Statistic*).

4.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

4.4.1. Determinación del espacio de diseño (SD)

El contenido de etanol (X_1), agua (X_2) y polímero (X_3), así como la temperatura dentro del reactor (X_5), resultaron tener un efecto significativo sobre la viscosidad (Y_1) en el proceso de producción farmacéutica estudiado. Además, los factores X_1 , X_2 , X_3 , y la proporción de ácido neutralizado, X_4 , afectaron al pH del gel obtenido.

Basado en los resultados, los factores X_1 , X_3 , X_4 y X_5 en el espacio de diseño fueron muy cercanos a los valores centrales del diseño experimental; por otro lado, X_2 era más pequeño que su contraparte central. El factor X_4 fue el único factor con un rango de variación del $\pm 6\%$, el cual debe proporcionar un amplio espacio para completar el proceso de producción y obtener un producto terminado de calidad.

En el proceso para un lote obtenido en condiciones normales se encontró que se neutralizó cerca del 70% del ácido total, inicialmente presente en la mezcla.

El factor fracción de ácido neutralizado (X_4) no resultó tener efecto significativo sobre la viscosidad, la cual resultó tener más peso en la función de deseabilidad total. Por lo tanto, podemos asumir que neutralizar alrededor del 60% de todos los grupos ácidos permitirá obtener un producto con propiedades aceptables.

Combinando la viscosidad con un peso de 0.8 y el pH con uno de 0.2 en la misma respuesta de deseabilidad (DR) nos permitió definir un espacio de diseño muy similar al establecido utilizando las dos respuestas simultáneamente. La combinación de las respuestas Y_1 y Y_2 en una sola respuesta DR permitió controlar el proceso de manera más fácil.

4.4.2. Monitorización de la composición y parámetros físicos utilizando la espectroscopia NIR

Utilizando la combinación de los principios de QbD y PAT nos ha permitido detectar las fuentes de variabilidad en un proceso de producción de gel e identificar las variables que influyen sobre la robustez del proceso. Como se mostro, la NIRS es una excelente herramienta analítica la monitorización at-line de un proceso de producción de una formulación semisólida y permite la determinación de atributos críticos de calidad (CQA) químicos (concentración de API y excipientes) y CQA físicos (viscosidad y pH). Además, los gráficos de control MSPC proporcionaron una herramienta útil para la identificación de los lotes de producción partiendo de lotes NOC. Los errores obtenidos estuvieron dentro de los rangos esperados de estos productos farmacéuticos.

Finalmente, la utilización de muestras de un proceso real en combinación con las muestras de laboratorio permitió ampliar el rango de variación de los CQAs e identificar las variables críticas que influyen en el proceso, facilitando así la interpretación de los resultados.

Capítulo 5

Determinación en tiempo real de atributos críticos de calidad (CQAs)

5.1. INTRODUCCIÓN.....	157
5.2. EXPERIMENTAL	158
5.2.1. Formulación farmacéutica	158
5.2.2. Muestras utilizadas en calibración.....	158
5.2.3. Modelo de calibración utilizando el método de espectro del proceso (S_p)....	159
5.2.4. Proceso de granulación.....	160
5.2.5. Métodos de referencia utilizados.....	160
5.2.6. Equipo NIR.....	162
5.2.7. Procesamiento espectral	163
5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	164
5.3.1. Construcción de los modelos de calibración	164
5.3.2. Validación de la robustez de los métodos NIR propuestos	174
5.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	176

En este capítulo se presenta un estudio realizado para desarrollar un método NIR no invasivo para determinar en tiempo real los atributos críticos de calidad (CQAs) de un granulado farmacéutico durante el proceso de manufactura. Este método permite reducir el tiempo total de fabricación y obtener un mejor conocimiento de la influencia de algunas variables en el proceso de producción.

El método NIR propuesto realiza la determinación de CQAs primarios, tales como contenido de API, pH y humedad, a partir de espectros NIR registrados en el mezclador, inmediatamente después del proceso de granulación. Este método permitió también la determinación de parámetros físicos o CQAs secundarios, tales como propiedades de flujo (fluidez y ángulo de reposo) y parámetros relacionados al tamaño de partícula (fracciones <125, 125–250 y >250 μm). Todos estos parámetros influyen potencialmente en la calidad del producto terminado.

5.1. INTRODUCCIÓN

La producción de formas farmacéuticas sólidas es un proceso que consta de múltiples etapas, las cuales están constituidas por un conjunto de operaciones validadas y realizadas siguiendo estrictos procedimientos normalizados de trabajo (PNT). La garantía de calidad, que incluye las decisiones concernientes a la culminación satisfactoria de cada una de estas etapas, está basada en análisis *off-line* para establecer la calidad de un producto al final de cada etapa y también del producto terminado. Este enfoque consume mucho tiempo que hay que añadir al ciclo de vida del proceso de fabricación. Además, esta estrategia no asegura una total ausencia de defectos en el producto, debido a que no se consideran la evaluación y la gestión de riesgos. Como una respuesta a esta situación nació la iniciativa de PAT, dirigida por la US-FDA¹ cuyo objetivo es de fomentar en la industria farmacéutica el desarrollo de los procesos de fabricación con un mayor rigor técnico y científico.²

Un enfoque PAT, basado en el conocimiento científico y el análisis de riesgo, permite diseñar y desarrollar procesos eficientes y continuamente controlados. Por lo tanto, se asegura una calidad predefinida al final del proceso de fabricación. Podemos, entonces considerar a PAT como una estrecha colaboración entre los ámbitos de la química analítica y la tecnología farmacéutica.^{3,4,5}

¹ United States Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, FDA, 2004

² S. Doherty, C. Kettler, in: Bakeev, K.A. (Ed.), Process Analytical Technology, Lackwell Publishing, United Kingdom, 2005, pp. 329–358.

³ M. Blanco, M. Alcalá, *Anal. Chim. Acta.* 557 (2006) 353–359.

⁴ A. Heinza, M. Savolainenb, T. Radesa, C. Strachanc, *Eur. J. Pharm. Sci.* 32 (2007) 182–192.

⁵ Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, B. Wa Wabuye, *Anal. Chim. Acta.* 611 (2008) 143–150.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Formulación farmacéutica

La formulación farmacéutica es un sólido comercializado como granulado, envasado en sobres de 1g, que contiene 50mg de API por gramo de producto (5% p/p), sacarosa como excipiente mayoritario (90 % p/p), ácido cítrico como excipiente minoritario (1.5% p/p), macrogol (0.4 % p/p), maltodextrina (0.8% p/p) y aroma de naranja (2.1 % p/p). El API (Nimesulide) es un antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), con efectos analgésico y antipirético.

5.2.2. Muestras utilizadas en calibración

Se construyeron ocho modelos de calibración PLS para los siguientes parámetros: (1) Contenido de API, (2) pH, (3) humedad, propiedades de flujo (dentro de los cuales estuvieron (4) fluidez y (5) ángulo de reposo) y tamaño de partícula (dentro de los cuales se escogió tres fracciones de partículas (6) <125 μm , (7) 125–250 μm and (8) >250 μm).

Para la construcción de estos modelos se prepararon en el laboratorio un total de 55 mezclas en polvo preparadas por pesada en una balanza analítica de los ingredientes de la formulación y mezclados hasta homogeneidad en un mezclador de sólidos TURBULA. La composición del conjunto de muestras se estableció utilizando un diseño D-óptimo, con el objeto de minimizar la correlación entre las concentraciones. El rango de concentraciones y la matriz de correlación entre los componentes de las mezclas propuestas en diseño se muestran en la Tabla 5.1. Como se puede apreciar, la correlación fue mínima, salvo entre el API y la sacarosa, cuya elevada concentración (entre ambos representó el 95% de la mezcla) impidió rebajar el valor de la correlación. El conjunto total de muestras fue dividido en dos subconjuntos, uno de calibración y otro de validación.

Tabla 5.1. Coeficientes de correlación entre los pares de concentraciones de los componentes de las mezclas en polvo.

Componente	Coeficientes de correlación entre concentraciones					Concentraciones	
	API	E1	E2	E3	E4	Rango (mg/g)	Nominal (mg/g)*
API	1					34 - 66	50
E1	-0.97	1				890 - 921	900
E2	0.16	-0.24	1			12 - 18	15
E3	-0.17	0.11	-0.14	1		5 - 9	7
E4	-0.28	0.15	-0.42	-0.03	1	17 - 28	21

* Los 4 mg/g restantes de macrogol para completar el 100% de la formulación es añadido en solución durante el proceso de granulación. API=Nimesulene, E1= Sacarosa, E2= Ac. Cítrico, E3= Maltodextrina y E4= Aroma de naranja.

Los modelos para determinar humedad, propiedades de flujo y tamaño de partícula fueron construidos utilizando muestras provenientes de 12 lotes de producción. Por ejemplo, para construir el modelo de humedad se secaron y se humedecieron un conjunto de muestras de tal manera que permita ampliar el rango de calibración con respecto al valor nominal. El secado se realizó colocándolas en un desecador y la humectación se hizo manteniéndolas en un ambiente cerrado próximas a un recipiente con agua. Para la preparación de las muestras de los modelos de tamaño de partícula y las propiedades de flujo se tamizaron los 12 lotes de granulado, reteniendo tres fracciones de tamaños de partícula, las cuales a su vez, mediante mezclas apropiadas de los mismos sirvieron para ampliar el rango de calibración de la fluidez.

5.2.3. Modelo de calibración utilizando el método de espectro del proceso (S_p)

La construcción de los modelos de calibración para API y pH se basó en el método propuesto por Blanco y Peguero,⁶ con la diferencia de que en lugar de utilizar los espectros en absorbancia, se utilizó los espectros en SNV. Resumiendo el método, primeramente se calculó un espectro de

⁶ M. Blanco, A. Peguero, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1127–1136

proceso, S_p , el cual debe incorporar la variabilidad del proceso de fabricación (Ec. 5.1). Todos los cambios ocurridos durante el proceso de producción se ven reflejados en el espectro en forma de desplazamiento espectral, etc. y que en nuestro caso son el resultado de la etapa de granulación, principalmente. Este efecto es parcialmente eliminado por el tratamiento SNV de los espectros. El espectro S_p puede ser diferente según el tamaño medio de partícula de la muestra que tomemos para su cálculo y que variará para diferentes procesos de granulación.

$$S_p = S_t - S_{tab_ref} \quad (5.1)$$

Donde, S_t es el espectro de una muestra de producción y S_{lab_ref} es el espectro de referencia, es decir la mezcla en polvo de laboratorio que contiene API y excipientes en sus concentraciones nominales. A modo de ejemplo, en la Figura 5.1 se muestra el espectro proceso (S_p) obtenido a partir de un espectro de producción y una mezcla en polvo conteniendo las mismas concentraciones nominales de API y excipientes.

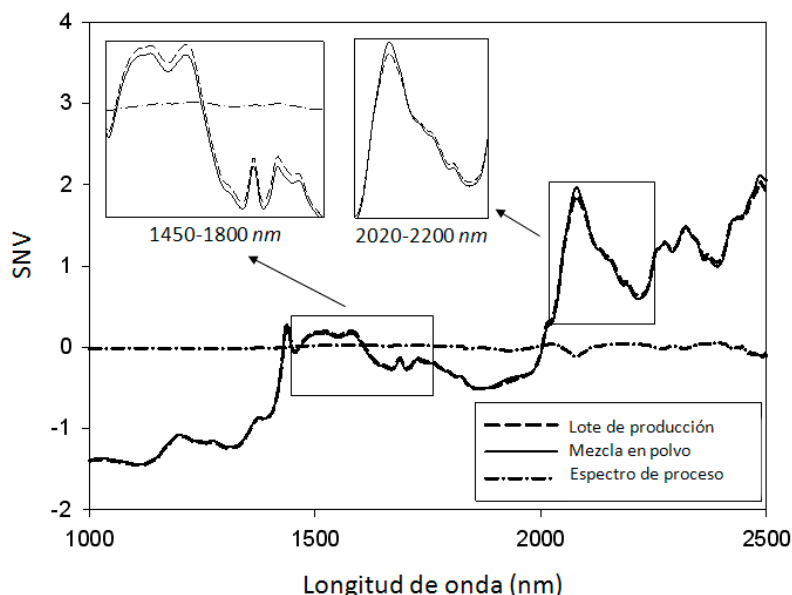


Figura 5.1. Espectros en modo SNV para una mezcla de laboratorio, una muestra granulada de producción (con las mismas concentraciones de API y excipientes) el S_p .

5.2.4. Proceso de granulación

La granulación se realizó en un sistema de lecho fluido GLATT WSG300. Las materias primas (API y excipientes) se introdujeron, por aspiración, en el granulador donde una corriente ascendente de aire caliente agita continuamente la carga con el fin de garantizar que la mezcla sea homogénea antes de comenzar la granulación. Se adicionó lentamente la solución ligante constituida por una solución acuosa de macrogol, sacarosa y maltodextrina. Una vez añadida la totalidad de solución ligante y formado el granulado se continuó el flujo de aire caliente hasta que se alcanzó el nivel de humedad requerida para el granulado. El tiempo total del proceso fue de aproximadamente 255 min. El granulado resultante fue transferido a un mezclador de acero inoxidable para su mezclado final con otro excipiente extra-granular y el aromatizante (no se añade durante el proceso de granulado para evitar su pérdida durante el secado). Una vez finalizado el proceso de mezclado se extrae una muestra cuyo contenido en API se analiza por HPLC; el resultado analítico determina si el lote pasa a la siguiente etapa del proceso de fabricación (el ensobrado) o si se mantiene en el mezclador para continuar su agitación hasta su perfecta homogenización. El traslado a una zona clasificada, unido a la extracción de la muestra y su envío al laboratorio para su análisis enlentece notablemente el proceso de fabricación.

5.2.5. Métodos de referencia utilizados

Todos los métodos utilizados para obtener los valores de referencia fueron métodos validados en Laboratorios Menarini y utilizados rutinariamente en el análisis analítico de los lotes de producción.

La determinación cuantitativa del principio activo (Nimesulide) se realizó en un cromatógrafo HPLC de Agilent Technologies (Santa clara, CA, USA) equipado con una columna Lichrospher 100 RP-18 a una

longitud de onda de 300nm y usando como fase móvil una mezcla ac. Acético 0.03M / Metanol (40:60%v/v).

El pH fue determinado midiendo directamente una solución al 2% (w/v) del granulado con un pH-meter 691 de Metrohm AG (Herisau, Suiza).

El contenido de humedad de las muestras se determinó usando el método de pérdida por desecación (LOD) en un LJ16 Moisture Analyzer Balance de Mettler-Toledo Intl. Inc.(Grifense, Suiza), calentando a una temperatura de 90° C durante 5min hasta peso constante.

La determinación del tamaño de partícula se realizó por tamizado de diferentes lotes de granulado de producción en una tamizadora Prufsieb Jel 200 (Hosokawa, Augsburg, Alemania) con el objeto de obtener solamente tres diferentes rangos de tamaños de partículas (<125 µm, 125–250µm y >250µm). La fluidez y el ángulo de reposo del granulado se determinaron usando un Powder Characterisation Instrument GmbH PTG-2 (Pharma Test AG, Alemania).

5.2.6. Equipo NIR

Los espectros NIR fueron registrados en el mezclador utilizando un espectrofotómetro NIR portátil LabSpec® Pro 2500 de ASD, Inc. (Colorado, USA). Las medidas se realizaron en modo de reflectancia a través de una ventana de zafiro de 3 mm de grosor y 2 cm de diámetro insertada en una boca del mezclador que se ha adaptado para insertar en ella la sonda que conecta al espectrómetro mediante una fibra óptica de 3m de longitud. Los diferentes componentes y el montaje se muestran en detalle en la Figura 5.2.

Se registraron los espectros de las muestras de calibración de laboratorio utilizando la misma sonda. Para esto, una cantidad adecuada de muestra se colocó en la tapa del mezclador, de tal manera que cubra totalmente la ventana de zafiro.

Los espectros fueron adquiridos con la ayuda del programa Indico Pro 5.2, también de ASD, Inc. Cada espectro NIR fue el resultado de 32

scans, cubriendo un rango espectral de 1000 – 2500 nm y con una resolución espectral de 1 nm.

5.2.7. Procesamiento espectral

Los tratamientos espectrales utilizados en este estudio incluyeron la transformación SNV, primera y segunda derivada Savitzky–Golay con ventanas móviles entre 11–21 puntos, la combinación de SNV + derivadas y el PCA. Los modelos fueron validados usando un conjunto externo de muestras. Los modelos PLS fueron desarrollados con el programa The Unscrambler v. 9.8 (CAMO, Trondheim, Noruega). Las predicciones en tiempo real de CQAs físicos y químicos de lotes de producción se realizaron con el programa Unscrambler On-line v. 2.2, también de CAMO. Finalmente, la calidad de los modelos PLS fue evaluada en términos de *root mean square error* (RMSE).

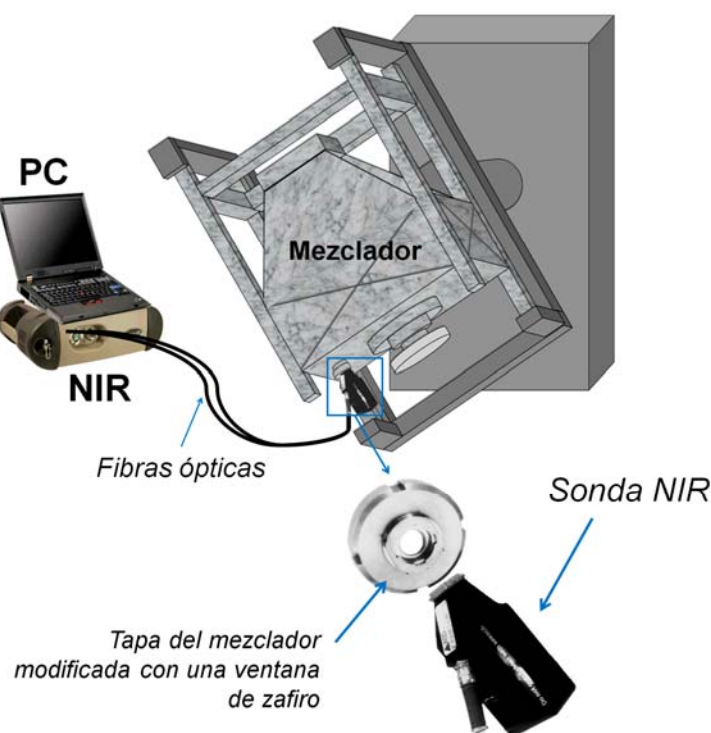


Figura 5.2. Esquema del modo de registro de los espectros NIR en el mezclador industrial.

5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las estrategias, convencional y nueva, utilizadas para el control del proceso de granulado y mezcla se recogen en el esquema mostrado en la Figure 5.3. En esta figura se observa la estrategia actual del proceso, conformada por cinco etapas y en paralelo se muestra la estrategia NIR propuesta. Las etapas (1) y (2), no se describirán en el presente estudio, debido a que forman parte de otro proyecto. La etapa de interés en este trabajo fue la etapa (3), el mezclado, debido a que actualmente es en esta etapa en la que se puede ganar un tiempo valioso. Por ejemplo, el tiempo desde que se toma la muestra (etapa 4) para realizar el análisis hasta que se obtienen los resultados es del orden de 2 – 3 horas y depende de varios factores ajenos al propio proceso, como por ejemplo disponibilidad de personal, disponibilidad del área clasificada ISO 8 para recoger la muestra, etc; tiempo durante el cual el lote se encuentra estocado, es decir sin procesar. Obtener resultados analíticos fiables en esta etapa en tiempo real, permitiría tener la seguridad de que el producto es apto para pasar a la siguiente y última fase del proceso; en caso contrario se puede actuar sobre el lote aplicando las operaciones de corrección pertinentes. La información (física y química) que proporcionan los modelos PLS en esta etapa del producto será mucho más amplia que la aportada por la metodología convencional y con un tiempo de respuesta del orden de segundos.

5.3.1. Construcción de los modelos de calibración

La selección de muestras para formar los conjuntos de calibración y validación de los modelos multivariantes se realizó utilizando un diagrama de dispersión de *scores* de los dos primeros componentes principales de un PCA⁷, asegurando que las muestras de calibración recojan la variabilidad de las muestras de producción. Si esta variabilidad no estuviese presente en las muestras disponibles, sería

⁷ M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 1236–1245

necesario añadirla mediante muestras seleccionadas o preparadas adecuadamente. Para cuantificar el API y el pH en el mezclador, se prepararon modelos PLS con muestras en polvo preparadas en el laboratorio, a las que se les añadió la matriz de espectros proceso (S_p), para incorporar la variabilidad del proceso al conjunto de muestras de calibración y predicción. La matriz S_p se calculó de la manera descrita en el apartado 5.2.3. Por ejemplo, para dar una idea de que el conjunto de muestras a las cuales se les adicionó los S_p , englobaron la variabilidad del proceso, se realizó un PCA del conjunto de calibración para API y se proyectó los scores de los lotes de producción.

Como se aprecia en la Figure 5.4a, los dos primeros componentes principales (PCs) explicaron el 87% de la varianza total. El PC1 (60%) fue asociado a la variabilidad del proceso incluida en las muestras con el S_p , separando las muestras en dos clústeres con similares S_p . El PC2 y PC3 (27 y 7% respectivamente) fueron relacionados a cambios en la concentración del API. Como se observa en el ejemplo de la Figura 5.4a, las muestras de calibración englobaron a las muestras de predicción, mostrando que el conjunto de calibración es adecuado para la construcción de lo modelo PLS para cuantificar el API. De hecho, el método NIR será utilizado en los mezcladores industriales, por lo cual fue necesario asegurar que el conjunto de calibración recoge la variabilidad de los lotes de producción. Por ejemplo, proyectando los scores de lotes de producción en el PCA del conjunto de calibración. Como se puede observar en la Figura 5.4b, las muestras de producción fueron perfectamente englobadas por el conjunto de calibración, confirmando que el conjunto de calibración es adecuado para las muestras de producción. El estrecho rango de concentración observado en las muestras de producción ($\pm 5\%$ alrededor del valor nominal) es coherente con su agrupación en el centro del gráfico; por el contrario, las muestras de laboratorio abarcaron una amplia gama de concentración y sus scores estuvieron distribuidos a lo largo del eje del PC2.

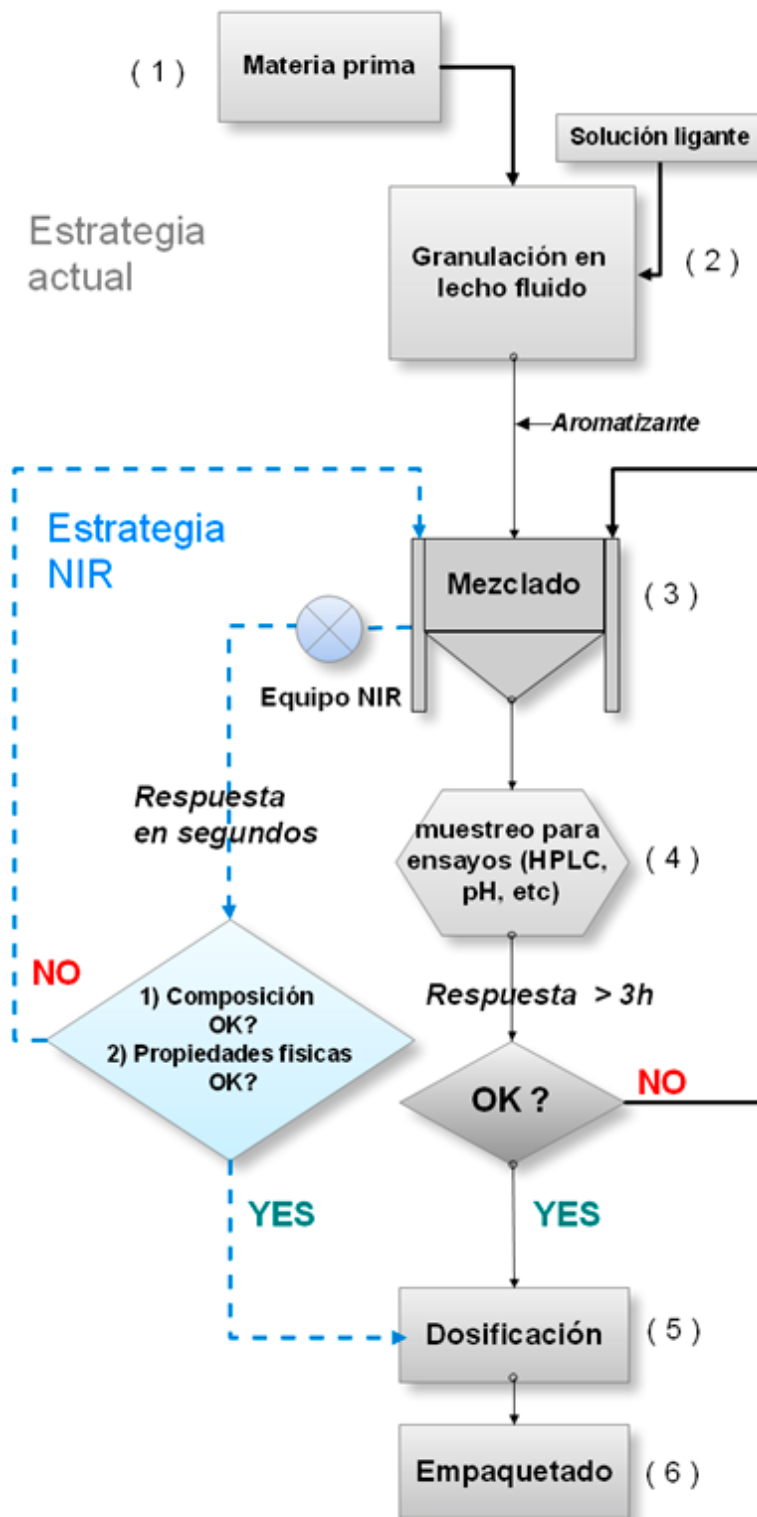


Figura 5.3. Esquema de los pasos durante el proceso de fabricación de granulados farmacéuticos. En línea negra continua se muestran los pasos actuales y en líneas discontinuas azules la nueva estrategia NIR propuesta para la liberación en tiempo real de un lote.

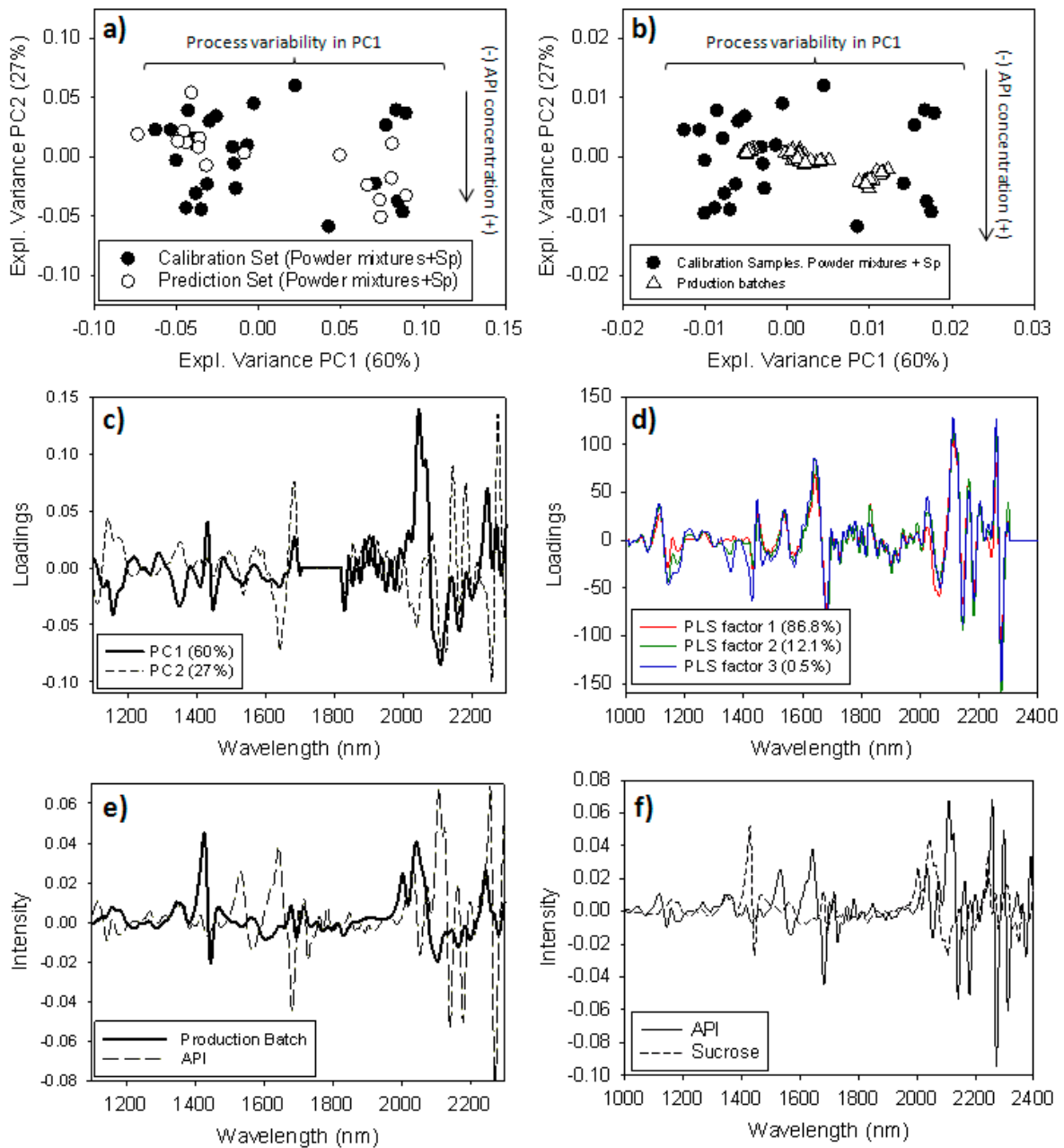


Figura 5.4. Detalles gráficos del análisis multivariante del conjunto de muestras para desarrollar el método NIR que permitirá cuantificar API. a) PCA. Proyección de las muestras de validación en el diagrama de dispersión del PCA del conjunto de calibración, b) PCA. Diagrama de dispersión de muestras de producción y muestras de calibración de laboratorio (mezcla en polvo + S_p), c) PCA. Gráfico de los dos primeros loadings explicando el 87% de la varianza. d) PLS. Tres primeros loadings del modelo PLS para API, e) Espectros NIR de un lote de producción y del API puro, f) Espectros del API y sacarosa (excipiente mayoritario). El modo espectral utilizado en todos los casos fue SNV+1era derivada en el rango espectral de 1100–2300 nm.

La Figura 5.4c muestra los primeros dos loadings del PCA para el conjunto calibración. Si comparamos estos loadings con el espectro de un lote de producción y del API (Figura 5.4e), se observa claramente que el primero loading mostró bandas características del espectro del lote de producción, especialmente en el rango 1400 – 1600 y 2000 – 2100nm (bandas características de la sacarosa, ver Figura 5.4f). En la misma Figura 5.4c se puede observar que el segundo loading estuvo relacionado con el API (Figura 5.4e), debido principalmente a las bandas alrededor de 1500, 1650, 1900 y 2100 – 2300nm. La Tabla 5.2 resume las características más relevantes de los modelos PLS construidos para CQAs primarios.

Tabla 5.2. Figuras de merito de los modelo PLS construidos para la determinación de CQAs primarios

Parámetro	API (mg/g)	pH	Humedad (%)
Conjunto de Calibración			
Nº de muestras	25	39	23
Pretratamiento espectral	SNV+1 ^{era} Derivada	SNV+2 ^{da} Derivada	1 ^{era} Derivada
Rango espectral (nm)	1000 – 2300	1000 – 2260	1300 – 1500 1850 – 2050
Rango de concentración*	34.1 – 66.2	2.9 – 3.3	0.10 – 1.21
Valores nominales (NOC)*	50.0 ± 2.5	3.0 ± 0.5	< 0.5
Nº de factores PLS	3	3	3
Varianza explicada (Y) (%)	99.4	99.1	97.8
Regresión Y^{ref} vs. Y^{NIR}			
<i>Slope</i> ± CI _{α=0.05}	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.07
<i>Offset</i> ± CI _{α=0.05}	0.31 ± 1.72	0.03 ± 0.10	0.01 ± 0.03
RMSEC*	0.68	0.01	0.04
Conjunto de Predicción			
Rango de predicción*	40.8 – 56.2	3.03 – 3.10	0.11 – 0.70
Nº de muestras	19	12	9
RMSEP*	1.0	0.1	0.1

* Los resultados se expresan en sus respectivas unidades

NOC = *Normal Operating Conditions*

CI = Intervalo de confianza (α = 0.05)

RMSEC/P = *Root Mean Square Error of Calibration/Prediction*

Los tres modelos requirieron tres factores PLS cada uno para explicar el 99% de la varianza usando prácticamente el rango completo de longitudes de onda (se eliminó el rango de longitudes de onda de 2300 a 2500nm por el mayor ruido que presentaban los espectros de

derivadas). La Figura 5.4d muestra los tres loadings del modelo PLS para el API, los cuales explicaron el 99.4% de la varianza. Como podemos observar, los dos primeros loadings (86.8% y 12.1% respectivamente) están muy relacionados al API, especialmente en las bandas alrededor de 1150, 1500 – 1700 y 2100 – 2300 nm (Figura 5.4f). El tercer loading (0.5%) está relacionado principalmente a la sacarosa, especialmente en las bandas alrededor de 1300 – 1450 y 1900 – 2100nm (Figura 5.4f). Con respecto al modelo PLS para el pH, la Figura 5.5a muestra los primeros dos loadings, los cuales explicaron el 95.5% de la varianza. Note como el primer loading estuvo estrechamente relacionado al ácido cítrico (Figura 5.5b), especialmente en las bandas de 1420, 1650 – 1750 y 2025 – 2090 nm. El segundo loading estuvo relacionado con ciertas bandas de API (Figura 5.5b), principalmente alrededor de 1675, 1834, and 2150 – 2210nm. Es importante aclarar que las muestras de calibración para el pH contienen principalmente una cantidad variable de ácido cítrico, pero como se mostró, este no es el único componente relacionado al pH, ya que también lo hace el API. Por consecuencia, el pH depende de la proporción de estos dos componentes. El modelo para determinar humedad incluyó las regiones espectrales características del agua (ver Tabla 5.2). Todos los modelos fueron validados utilizando un conjunto externo de muestras de predicción, las cuales no fueron utilizadas en la calibración y todos presentaron errores aceptables de predicción.

La Tabla 5.3 resume las características más relevantes de los modelos PLS construidos para los CQAs secundarios. Los modelos presentaron un mayor número de factores PLS para explicar el 99% de la varianza. La determinación de parámetros físicos por espectroscopia NIR no se pudo asociar a una absorción característica, por lo que se utilizó el rango espectral completo para la construcción de los modelos. A pesar de poseer el mismo orden de factores PLS, los modelos para fluidez y ángulo de reposo presentaron errores más bajos que los modelos para determinar tamaño de partícula. La Figura 5.5c muestra los espectros de calibración utilizados para la construcción del modelo PLS de fluidez,

como se observa, existe una variación a lo largo del espectro completo, sin embargo existen bandas específicas relacionadas a la fluidez, especialmente alrededor de 1400, 1580 – 1640 and 2000 nm. Estas bandas fueron identificadas utilizando el criterio de Jackknifing evaluando la importancia de los coeficientes de regresión, las cuales se encontraron alrededor de 1380 – 1613 y 1980 – 2071 nm. Como se observa, las bandas del agua están ubicadas dentro de estos rangos, como consecuencia de esto se pudo afirmar que el contenido de humedad tiene un efecto sobre la fluidez del granulado y consecuentemente sobre el ángulo de reposo; resultados similares fueron obtenidos por Otsuka⁸ y Sarraguca⁹ en estudios sobre las propiedades físicas en polvos utilizando espectroscopia NIR. Utilizando también el criterio de Jackknifing, los rangos más importantes para el loading relacionado al ángulo de reposo fueron alrededor de 1126 – 1445 y 1880 – 2332 nm. Por otro lado, los loadings del modelo PLS para tamaños de partícula (no se muestran los resultados) fueron similares al espectro promedio de calibración, debido a que cuando el tamaño de partícula aumenta, se produce un desplazamiento positivo de línea base en los espectros.

⁸ M. Otsuka, *Chemometr. Intell. Lab.* 82 (2006) 109–114.

⁹ M. Sarraguca et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 484–492.

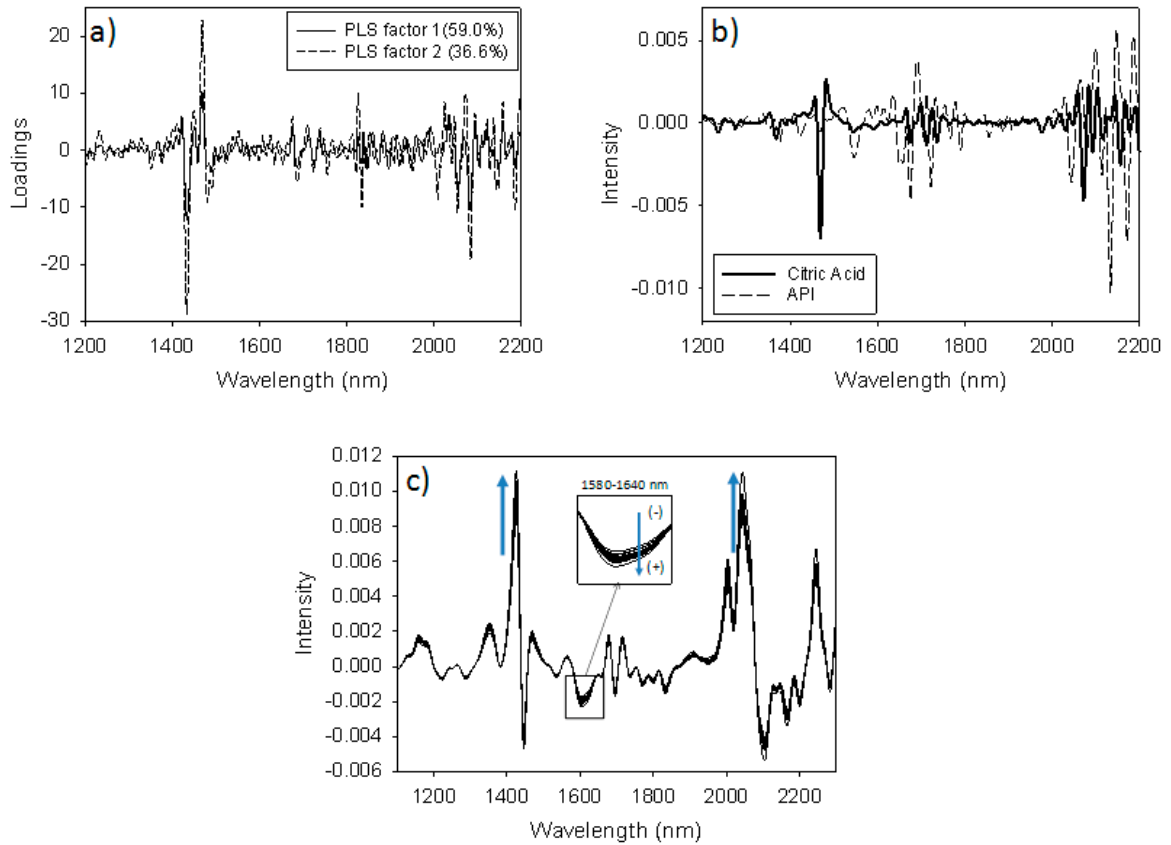


Figura 5.5. Detalles gráficos de los modelos PLS para pH y fluidez. a) Dos primeros loadings del modelo PLS para pH, b) espectros NIR en SNV+2nd derivada del ácido cítrico y API, c) Espectros del conjunto de calibración utilizado en el modelo PLS de fluidez en modo 1^{era} derivada.

Tabla 5.3. Figuras de merito para los modelos PLS de CQAs secundarios

Conjunto	Parámetro	Propiedades de flujo		Tamaños de partícula			
		Fluidez (g/s)	Angulo de reposo (°)	<125 µm (%)	125-250 µm (%)	>250 µm (%)	
Calibración	N° de muestras	17	15	10	9	9	
	Pretratamiento espectral	1 ^{era} Derivada	SNV+1 ^{era} Derivada	1 ^{era} Derivada	SNV	SNV	
	Rango espectral (nm)	1100 – 2330	1000 – 2400	1000 – 2500	1000 – 2400	1000 – 2400	
	Rango de calibración*	4.4 – 9.3	30.3 – 36.3	16.6 – 25.0	35.5 – 43.5	37.1 – 48.0	
	N° de factores PLS	5	6	5	5	6	
	Varianza explicada (Y) (%)	97.9	99.6	99.9	99.4	99.3	
	Regresión Y^{ref} vs Y^{NIR}						
		<i>Slope</i> ± CI _{α=0.05}	0.98 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.07	0.99 ± 0.07
		<i>Offset</i> ± CI _{α=0.05}	0.15 ± 0.56	0.14 ± 1.28	0.01 ± 0.31	0.22 ± 2.60	0.26 ± 2.99
		RMSEC*	0.18	0.11	0.04	0.18	0.24
Predicción	N° de muestras	23	29	4	6	5	
	Rango de predicción*	5.9 – 7.4	30.8 – 35.1	18.4 – 19.7	37.9 – 42.0	40.9 – 46.0	
	RMSEP*	0.6	1.7	2.5	2.4	2.5	

* Los resultados se expresan en sus respectivas unidades

NOC = *Normal Operating Conditions*

CI = Intervalo de confianza (α = 0.05)

RMSEC/P = *Root Mean Square Error of Calibration/Prediction*

Las muestras que se utilizaron para hacer variar el rango de fluidez y tamaño de partícula fueron mezclas con diferentes porcentajes de granulados de diferente tamaño de partícula. Estas muestras se utilizaron para evaluar el coeficiente de correlación entre los valores de fluidez y el tamaño de partícula. Como se esperaba, la fluidez y el ángulo de reposo estuvieron muy correlacionados entre sí (Corr. Coef.= -0.96), ambas son medidas de la misma propiedad, y a su vez están altamente correlacionadas con el porcentaje de partículas finas (<125um) (Corr. Coef.= -0.93) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Coeficientes de correlación de los parámetros físicos

	<125 µm	125-250 µm	>250 µm	Fluidez (g/s)	Angulo de reposo (°)
<125 µm	1				
125-250 µm	-0.50	1			
>250 µm	-0.50	-0.50	1		
Fluidez (g/s)	-0.93	0.56	0.37	1	
Angulo de reposo (°)	0.95	-0.59	-0.36	-0.96	1

El modelo NIR propuesto para cuantificar API fue validado para su utilización en análisis de rutina. Su validación estuvo basada en las directrices de la *International Conference on Harmonisation (ICH)*¹⁰ e incluyeron selectividad, linealidad, exactitud y robustez.

La selectividad de un método NIR es evaluada estableciendo la utilización de bibliotecas espectrales, las cuales permiten la identificación de la preparación farmacéutica como una combinación de API y excipientes, la cual debe ser diferenciada correctamente de los analitos separados. El criterio de identificación utilizado estuvo basado en el coeficiente de correlación (CorrCoef) y un umbral de 0.98. El pretratamiento utilizado fue la segunda derivada en el rango espectral de 1100 – 2200 nm. Todos los lotes de producción fueron positivamente identificados (CorrCoef>0.98) y cada componente puro en la formulación fue discriminado exactamente a un nivel de identificación

¹⁰ ICH Guidelines: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) 1996

por debajo del umbral establecido ($\text{CorrCoef} < 0.98$). Los resultados de identificación se muestran en la Tabla 5.5.

La aplicación de estos métodos NIR reunieron todos los requerimientos de las guías de validación, los cuales confirmaron su idoneidad para su utilización en rutina. La Tabla 5.5 muestra los resultados más relevantes del procedimiento de validación del método NIR para API y su aplicación en el proceso de farmacéutico. Su aplicación en rutina para el resto de los métodos NIR (pH, humedad, fluidez, ángulo de reposo y tamaño de partícula) se encuentran en validación. Estos procedimientos toman algún tiempo, debido a que es necesario realizar un análisis de tamizado de diferentes lotes y estas fracciones necesitan ser analizadas por los respectivos métodos de referencia de la empresa. Sin embargo, la robustez de todos los métodos NIR pudieron ser evaluadas para varios lotes de producción como se describe a continuación.

5.3.2. Validación de la robustez de los métodos NIR propuestos

La robustez de los modelos PLS descritos anteriormente fue evaluada utilizándolos para determinar los CQAs de cincuenta lotes industriales y evaluando su robustez en los análisis de rutina. Para ello, un total de seis espectros NIR por lote fueron registrados y promediados. Los resultados obtenidos se compararon con los valores obtenidos por el método analítico de referencia mediante una prueba t apareada y un nivel de confianza del 95 %. Como se puede observar en la Tabla 5.6, no hubo diferencias estadísticas entre los resultados NIR y los valores de referencia ($t_{\text{obs}} < t_{\text{crit}}$). Esto confirmó que los modelos proporcionaron resultados precisos a partir de medidas no invasivas hechas directamente en el mezclador.

Estos resultados permiten justificar la utilización de los modelos PLS en rutina, lo cual permitirá evaluar su robustez a largo plazo, con un número mayor de lotes. Lo más relevante de esta nueva metodología NIR, es que se pueden determinar más propiedades, tanto físicas como químicas, del mismo producto y con un mismo espectro NIR, haciendo

que algunas determinaciones que antes eran puntuales, ahora puedan ser de rutina.

Tabla 5.5. Parámetros de validación para la cuantificación de API en proceso farmacéutico mediante el método propuesto de NIR

	Compuesto	Coefficiente de correlación
Selectividad	Lote de producción	0.998
	Sacarosa en polvo	0.978
	Sacarosa en cristales	0.955
	Maltodextrina	0.239
	Aroma de naranja	0.200
	Ac. Cítrico	0.064
	Nimesulide	-0.061
Umbral 0.98 (identificación positiva > 0.98)		
	Parámetro	Resultado
Linealidad	N°	9
	Rango de concentración (mg/g)	36.3 - 60.7
	Intercepto	2.23 ± 2.32
	Pendiente	0.96 ± 0.05
	R	0.991
Exactitud	N°	9
	Promedio residuales (mg/g)	0.55
	S.D.	1.42
	t _{exp}	1.17
	t _{crit}	2.31
Repetitividad	Replicados	6
	Media de NIR (mg/g)	50.20
	CV (%)	1.70
Robustez	N°	50
	t _{exp}	1.50
	t _{crit}	2.01

Tabla 5.6. Resultados de la robustez del método NIR para los atributos críticos de calidad (CQAs) del granulado

	Parámetro	REF _{Media}	NIR _{Media}	RES _{Media}	RMSEP	t _{obs}
CQAs Primarios	API (mg/g)	49.83	50.44	0.61	1.34	1.50
	pH	3.09	3.08	-0.01	0.03	0.60
	Humedad (%)	0.21	0.24	0.03	0.05	1.70
CQAs Secundarios	Fluidez (g/s)	6.78	6.82	0.04	0.57	0.31
	Angulo de reposo (°)	33.36	33.04	-0.32	0.94	0.99
	<125 µm (%)	19.18	19.85	0.67	1.46	1.70
	125-250 µm (%)	38.51	38.39	-0.12	1.22	0.27
	>250 µm (%)	42.32	41.84	-0.48	1.39	1.00

t_{crit} = 2.01 (α=0.05 y 49 grados de libertad). Si t_{obs} < t_{crit} las dos medias no son estadísticamente diferentes.

REF_{Media} y NIR_{Media} se refieren al promedio de los valores obtenidos por el método de referencia y por el método NIR para 50 lotes de producción.

RES_{Media} se refiere al promedio de los valores de residuales y RMSEP al *root mean square error of prediction*.

5.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

El sistema instrumental diseñado (que no supone una modificación del procedimiento de trabajo) ha permitido la determinación en tiempo real y no invasiva de parámetros de calidad de un granulado farmacéutico.

La metodología planteada, es una excelente estrategia para un mejor conocimiento del producto, ya que ha permitido obtener la información fisicoquímica del producto con el mismo esfuerzo y en tiempo real (en segundos). La información obtenida permitirá tomar decisiones en un tiempo corto (hasta el presente requerían horas).

La estrategia NIR propuesta, proporcionó resultados para la evaluación cuantitativa de la homogeneidad al final del proceso de granulación y mezclado. Además, los ocho modelos PLS construidos permitieron conocer en tiempo real parámetros relevantes del granulado.

Capítulo 6

Evaluación de métodos quimiométricos para la monitorización no invasiva de un proceso de mezclado por medio de la espectroscopia NIR wireless

6.1. INTRODUCCIÓN.....	183
6.2. MATERIALES Y METODOS.....	187
6.2.1. Materiales	187
6.2.2. Preparación de muestras de calibración en laboratorio	187
6.2.3. Proceso de mezclado y espectrómetro NIR.....	188
6.2.4. Análisis de muestras	189
6.2.4. Adquisición de espectros NIR y análisis de datos.....	190
6.2.5. Pre-tratamientos espectrales y construcción del modelo PLS.....	190
6.2.6. Métodos libres de calibración.....	191
6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	192
6.3.1. Método de calibración	192
6.3.2. Comparación de los métodos.....	197
6.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	201

En este capítulo se presenta un estudio cuyo objetivo principal fue de desarrollar un criterio simple, de fácil aplicación e interpretación y basado en ciencia, para determinar en tiempo real y de forma no invasiva el punto final de mezclado durante un proceso de mezcla farmacéutico. En este estudio se comparan métodos quimiométricos conocidos, como la regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS), bloque móvil de desviación estándar (MBSD) y el análisis de distancias de scores por componentes principales (PC-SDA) con el nuevo parámetro propuesto, el índice de mezclado M . Este índice M se ha utilizado anteriormente en la evaluación de la homogeneidad espacial en imágenes hiperespectrales, sin embargo no se ha utilizado en procesos dinámicos de mezclado farmacéuticos y menos aún en la determinación del punto final de mezclado.

6.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de mezclado es una operación unitaria muy estudiada, debido a su gran importancia en el proceso de fabricación de sólidos farmacéuticos, puesto que de esta etapa dependerá que el producto final tenga un contenido uniforme del principio activo (API). El procedimiento usual para establecer la homogeneidad de una mezcla consiste en extraer muestras en diferentes puntos del interior del mezclador que son posteriormente analizadas por métodos analíticos validados; estos métodos frecuentemente son destructivos, utilizan solventes y consumen tiempo y además existe un riesgo de contaminación de la muestra.

Durante los últimos cincuenta años, diferentes índices de mezclado (M) han sido reportados en la literatura, la mayoría han sido desarrollados para mezclas de dos componentes y se basan en el análisis estadístico, principalmente utilizando la desviación estándar o varianza de la composición entre muestras extraídas de una mezcla.^{1,2} Aplicando este criterio al sector farmacéutico y con la utilización de estos conceptos se puede obtener información del estado de un proceso de mezclado con la aplicación de criterios simples y ampliamente estudiados.

La espectroscopia NIR esta siendo utilizada en la industria farmacéutica en el estudio y seguimiento de procesos de mezclado desde los años 90's. Algunos de esos estudios acerca de la homogeneidad de una mezcla se llevaron a cabo extrayendo una muestra y registrando su espectro NIR.^{3,4} Este tipo de registro es destructivo y la muestra extraída no se reincorpora al mezclador por razones obvias de sanidad. Otros trabajos consistieron en detener el proceso de mezclado para registrar los espectros in-situ,^{5,6,7,8} introduciendo la sonda directamente

¹ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970) 53–66.

² N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow, *Mixing in the process industries*, 2nd. ed., Butterworth-Heinemann, London, 1997.

³ A. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, J.K. Drennen, *J. Pharm. Sci.* 95 (2005) 407–421.

⁴ E.T. Skibsted et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 26–35.

⁵ A. El-Hagrasy et al., *J. Pharm. Sci.* 95 (2005) 407–421.

⁶ E.T. Skibsted et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 26–35.

⁷ P.A. Hailey et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 551–559.

al producto o modificando la geometría de los mezcladores para introducir la sonda NIR. Con la aparición de las directrices PAT para la industria,^{9,10} se ha incentivado la utilización de tecnologías que permitan extraer información en tiempo real de los procesos. En la Tabla 6.1 se lista los trabajos mas destacados en la industria farmacéutica concerniente a la monitorización de un proceso de mezclado. Se han reportado dos tipos de registros de espectros NIR durante el proceso de mezclado: invasivos^{11,12} y no-invasivos.^{13,14} Los equipos convencionales utilizaron sondas de contacto con fibras ópticas de longitud variada. Estos montajes presentan ciertas limitaciones técnicas para su implementación en rutina, como por ejemplo tener que modificar los mezcladores, detener el proceso para registrar los espectros, falta de espacio en reactores industriales para colocar los equipos NIR y ordenadores, además de utilizar sondas de fibra óptica más largas lo que también aumenta el ruido en los espectros. Como solución a estos inconvenientes técnicos acerca de la adaptabilidad de los equipos NIR convencionales al proceso industrial, en los últimos cinco años se han venido utilizando espectrofotómetros NIR con tecnologías wireless (basados en micro *electro mechanical system*, MEMS). Estos equipos tienen la gran ventaja de poseer una batería de larga duración, la cual le otorga al equipo NIR la autonomía necesaria para poder ser utilizado en procesos dinámicos, son de pequeño tamaño y reducido peso y su anclaje en los mezcladores es sencillo y su configuración permite el registro de espectros NIR de forma no invasiva mientras el mezclador se encuentra en movimiento.

⁸ S.S. Sekulic et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285–1309.

⁹ US-FDA, Guidance for Industry, Powder Blends and Finished Dosage Units — Stratified In-Process Dosage Unit Sampling and Assessment, 2003.

¹⁰ US-FDA, Guidance: PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, 2004.

¹¹ S.S. Sekulic et al., *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.

¹² O. Berntsson et al., *Powder Technol.* 123 (2002) 185–193.

¹³ Z. Shi et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 738–745.

¹⁴ C.V Liew, A.D. Karande, P.W. Heng, *Int. J. Pharm.* 386 (2010) 138–148.

Tabla 6.1. Aplicaciones de la espectroscopia NIR en la monitorización de procesos industriales de mezclado

Mezclador	Invasivo	Método ^a	Algoritmo ^b	Parámetro monitorizado	Criterios para determinación de punto final de mezclado, se alcanza la homogeneidad cuando:	Referencias
1) Equipamiento con NIR Convencional (con cables de fibra óptica)						
<i>V-blender y bin blender</i>	Si	2	MBSD	PooledSD	Valores constantes y cercanos a cero	Hailey et al, 1995
<i>V-blender</i>	Si	2	MBSD	MeanSD	Valores constantes y cercanos a cero	Sekulic et al, 1996
<i>Flobin blender</i>	Si	2	a) MBSD b) Dissimilarity c) PCA	PooledSD Dissimilarity mean PC scores	Valores constantes y cercanos a cero Valores constantes y cercanos a cero Los scores se vuelven constantes	Sekulic et al, 1998
<i>Nauta mixer</i>	Si	1	PLS	Contenido API	La media y la SD son constantes Los histogramas de las predicciones están en los intervalos	Berntsson et al, 2001
<i>V-blender</i>	Si	2	a) SIMCA	a) Estadística F	(SIMCA) una relación de F no significativa indica que la muestra pertenece al conjunto de calibración	El-Hagrasy et al, 2005
<i>Bin blender</i>	Si	1 y 2	b) PC-MBEST a) PLS b) HMM c) MBSD	b) Coeficiente Correlación a) Contenido API b) Log(P) c) MeanSD	Valores constantes y cercanos a 1 a) Los valores se vuelven constantes b) Los valores se vuelven constantes c) Los valores son constantes y cercanos a cero	Zhang et al, 2008
<i>Bin blender</i>	No	1 y 2	a) NIPLS	a.1) Contenido API a.2) RMSNV a.3) Valor <i>t</i> de Student	a.1) La RSD de las predicciones es < 5% a.2) Valores de RMSNV <0.05 a.3) Prueba <i>t</i> de Student para cada 12 RMSNV con un intervalo de confianza al 95%	Shi et al, 2008
<i>Pilot IBC blender</i>	No	1	b) MBSD PLS	b) MeanSD Contenido API	b) El primer punto de cruce con cero de la primera derivada de los valores de meanSD Valores en el rango de 100±5% y %RSD < 5%	Liew et al, 2010
2) Equipamiento con NIR Wireless						
<i>V-blender</i>	No	2	a) MBSD b) PCA	a) MeanSD b) T ² de Hotelling	a) Valores constantes cercanos a cero b) Valores de T ² dentro del limite T ² crit al 95%	LaPointe-Garant, 2008
<i>IBC bin blender</i>	No	1	PLS	Contenido API	Valores constantes cercanos al 100%	Sulub, 2009, 2011
<i>Bohle bin blender</i>	No	2	PC-SDA	T ² de Hotelling	Valores de T ² dentro del limite T ² crit al 95%	Puchert, 2011
<i>Bohle bin blender</i>	No	1 y 2	a) Regresión Univariante b) MBSD	a) Contenido API b) MeanSD	a) Valores constantes b) Valores constantes cercanos a cero	Momose, 2011

¹ Método cuantitativo (1) y método cualitativo (2)

² *Moving Block Standard Deviation (MBSD), Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares (PLS), Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA), PC-MBEST (principal component modified bootstrap error-adjusted), Net signal analyte (NAS), Hidden Markov model (HMM), Non-linear interactive PLS (NIPLS), Root mean square from nominal value (RMSNV), Principal Component Scores Distance Analysis (PC-SDA)*

En la Tabla 6.1 se recogen los métodos quimiométricos utilizados en estos trabajos, tanto usando equipos NIR convencionales, como los wireless. Como podemos observar, el tratamiento de datos se ha realizado utilizando métodos cualitativos, cuantitativos o ambos al mismo tiempo. Los métodos cualitativos están basados en el cálculo de la varianza entre espectros continuos registrados durante un proceso de mezclado. Las variables monitorizadas en estos métodos, por lo general, son parámetros estadísticos, como por ejemplo la desviación estándar, varianza y la T^2 de Hotelling,¹⁵⁻²² La ventaja de estos métodos es que no necesitan de un set de calibrado y el calculo de los parámetros estadísticos, por lo general, no es complicado. Su desventaja es que la información recogida, no esta relacionada a la concentración del analito. Por lo contrario, los métodos de calibración requieren de un modelo de calibrado para predecir concentraciones del API i/o excipientes. La regresión PLS es sin duda alguna el método cuantitativo mas reportado; ^{20,23,24-26} aunque también se han reportado otros^{17,24,27,28} (Tabla 6.1). La necesidad de un conjunto de muestras de calibrado (preparadas en laboratorio) y un método de referencia son sus principales inconvenientes; además de que eventualmente puede ser necesaria una recalibración, para incluir variabilidad del proceso. En cuanto al tratamiento de datos espectrales obtenidos con equipos NIR wireless, los métodos quimiométricos más reportados han sido el MBSD,^{29,30} la estadística T^2 de Hotelling,^{29,31} la regresión PLS^{31,32} y

¹⁵ E.T. Skibsted et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 26–35

¹⁶ P.A. Hailey et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 551-559

¹⁷ S.S. Sekulic et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285-1309

¹⁸ S.S. Sekulic et al., *Anal. Chem.* 68 (1996) 509-513.

¹⁹ H. Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 98 (2008) 1487-1498

²⁰ Z. Shi et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 738–745

²¹ Y. Sulub et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48 - 54

²² Y. Sulub, M. Konigsberger, J. Cheney, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 429–434

²³ W. Momose et al., *Powder Technol.* 210 (2011) 122 – 131

²⁴ O. Berntsson et al., *Powder Technol.* 123 (2002) 185–193

²⁷ E.T. Skibsted et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 26–35

²⁸ L. Bellamy, A. Nordon, D. Littlejohn, *Analyst* 133 (2008) 58–64

²⁹ P.P. LaPointe-Garant, J.S. Simard, N. Abatzoglou, in: 1st WSEAS international conference on multivariate analysis and its application in science and engineering (MAASE'08), Turkey, 2008, pp. 109-118.

³⁰ T. Puchert et al., *Eur J Pharm Biopharm.* 78 (2011) 173-182

³¹ Y. Sulub et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48 - 54.

³² Y. Sulub, M. Konigsberger, J. Cheney, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 429–434

regresión univariante.³³ De todos estos métodos, los únicos que permiten determinar el punto final de mezclado (BEP) con criterios estadísticos fueron los que usaban la T^2 de Hotelling. En el resto, el BEP fue determinado empíricamente cuando el valor de la variable monitorizada se mantenía constante y cerca de un valor de referencia, sea este cero para el MBSD y 100% relativo el PLS.

6.2. MATERIALES Y METODOS

6.2.1. Materiales

La formulación utilizada fue una mezcla ternaria, constituida principalmente por dos tipos de pellets, A y B, cuya suma representa el 99.97% p/p y el 0.03% p/p restante corresponde al lubricante. Debido a un acuerdo de no divulgación no estamos autorizados a proporcionar los nombres de API y excipientes.

Los pellets son gastrorresistentes y presentan perfiles de liberación modificada distintos: pellets A con un perfil de liberación rápida y pellets B con un perfil de liberación lenta. Los pellets comprenden un núcleo inerte, una capa con el principio activo, una o más capas intermedias que comprenden al menos un sistema de liberación modificada, y una capa externa de recubrimiento entérico. El tamaño medio de partícula (d_{50}) para ambos pellets esta alrededor de 1.1 - 1.2 mm. El tamaño medio de partícula del lubricante es de unas 10 μm y su función es únicamente facilitar la mezcla y reducir la agregación de los pellets.

6.2.2. Preparación de muestras de calibración en laboratorio

Se prepararon once muestras en el laboratorio pesando exactamente todos los componentes y cubriendo un rango de concentración de pellets A de 0 a 100%p/p y mezclándolas en un recipiente de plástico. El intervalo de concentración entre las muestras fue de

³³ W. Momose et al., *Powder Technol.* 210 (2011) 122 – 131

aproximadamente 10 unidades. Los valores de referencia para estas muestras se obtuvieron de los pesos de cada tipo de pellets. El peso total de cada muestra fue de alrededor de 50g. Posteriormente, las mezclas fueron trasladadas a una cubeta de cuarzo para la posterior obtención de sus espectros NIR estáticos.

6.2.3. Proceso de mezclado y espectrómetro NIR

En un mezclador Bohle PM400 (L.B. Bohle, Ennigerloh, Alemania), con una capacidad de 150 Litros, se mezclaron 90 Kg de mezcla por lote. En total se prepararon 6 lotes a la misma velocidad de mezclado de 6 RPM. La boca de entrada del mezclador fue modificada para ajustar una ventana de zafiro en la que se ancló el equipo NIR (Figura 6.1a).

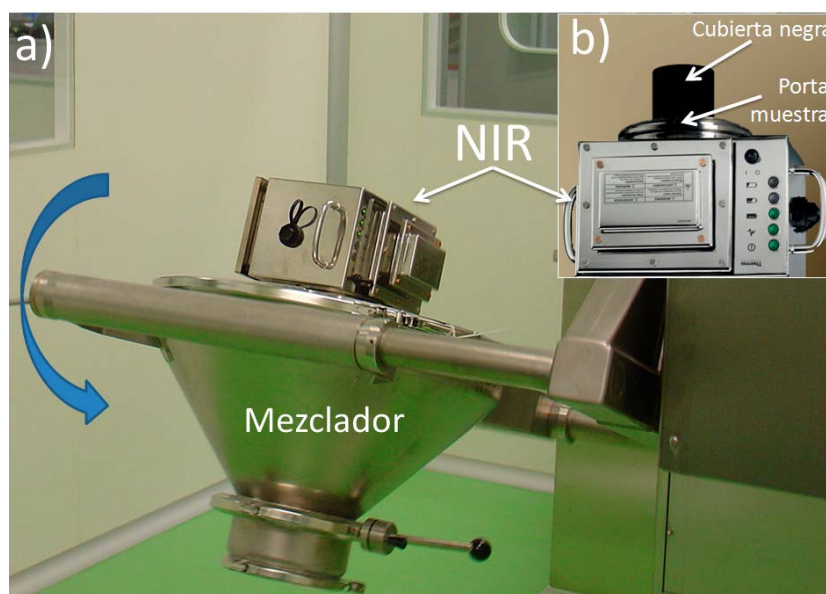


Figura 6.1. Montaje experimental para la adquisición de espectros NIR en modo a) dinámico y b) estático.

Los espectros NIR fueron adquiridos utilizando un espectrómetro Antaris Target Series Blend Analyzer (Thermo Electron Corporation, USA). El equipo NIR está basado en tecnología MEMS (del inglés micro electro mechanical system), presenta un estrecho rango espectral que abarca desde 7400 cm^{-1} hasta 5550 cm^{-1} y una resolución espectral de

4 cm⁻¹. Además, el equipo cuenta con un filtro de Fabry-Perot y un detector de InGaAs. La ventaja de este equipo es que no necesita cables para conectarlo al ordenador (wireless), fibra óptica (el detector está incorporado en el espectrómetro) y los cables de alimentación (el equipo tiene una batería que proporciona autonomía para registrar los espectros NIR durante un proceso dinámico). Además, el espectrómetro utiliza un acelerómetro, basado también en tecnología MEMS, para determinar la posición del mezclador para poder empezar el registro de espectros. Los espectros NIR son registrados cuando la muestra dentro del mezclador se encuentra por encima de la ventana de zafiro y el mezclador se encuentra invertido hacia abajo. Cada espectro producido por el equipo es referenciado a un estándar interno, asegurando una buena reproducibilidad en las medidas de absorbancia.

El diámetro del *spot* fue de 40 mm, el cual corresponde a aproximadamente 600mg de muestra en masa.

Los pellets A fueron siempre añadidos al blender primero, seguidos de los pellets B y el lubricante. Las mezclas preparadas corresponden a tres niveles de concentración de los pellets A y se prepararon 2 lotes de cada concentración (Tabla 6.2).

6.2.4. Análisis de muestras

Durante el mezclado se extrajeron muestras a intervalos de tiempo variables, de las cuales un 75% aproximadamente de ellas se utilizaron para ampliar el conjunto de calibración y otra parte (25%) se utilizó como conjunto de muestras de validación. En cada tiempo de muestreo, se extrajeron 10 alícuotas a diferentes posiciones al interior del mezclador, cada una fue analizada separadamente, determinando su contenido de pellets A% p/p. Los pellets A contienen magnesio (Mg) en su composición, con lo cual el porcentaje de pellets A para cada muestra extraída fue directamente asociada al contenido de Mg de cada muestra. El método utilizado para determinar Mg fue una valoración complexométrica con EDTA a un pH de 10.

Tabla 6.2. Descripción experimental de los lotes de mezclado

Lote	Formulación			Descripción de los procesos	
	Pellets A (%p/p)	Pellets B (%p/p)	Lubricante (%p/p)	Tiempo total de mezclado (min)	Revoluciones totales
1	38.70	61.27	0.03	20	120
2	38.70	61.27	0.03	30	180
3	53.50	46.47	0.03	30	180
4	53.50	46.47	0.03	30	180
5	46.50	53.47	0.03	40	240
6	46.50	53.47	0.03	30	180

6.2.4. Adquisición de espectros NIR y análisis de datos

Todos los espectros fueron registrados utilizando el programa RESULT™ (Thermo Electron Corp., USA). Este equipo permite dos modos de registro de los espectros: estáticos y dinámicos. Los espectros estáticos se registraron invirtiendo el equipo NIR y situando las muestras en una cubeta de cuarzo que se coloca en la ventana del equipo y fueron cubiertas con una tapa negra para protegerla de la luz externa (Figura 6.1b). Esta forma de registro se ha aplicado a las muestras de laboratorio y las muestras extraídas del mezclador (muestras de proceso); cada muestra se ha registrado por triplicado y la cubeta fue agitada entre replicados.

Los espectros dinámicos se registraron mientras el mezclador se encontraba en movimiento (Figura 6.1a). El equipo NIR registra tres espectros cuando el mezclador se encuentra invertido, es decir el equipo NIR se encuentra abajo y la muestra esta cubriendo la ventana de zafiro de la tapa del mezclador. El espectro promedio de esas tres medidas es asignado a cada rotación. Con la velocidad de rotación seleccionada, se obtienen 6 espectros NIR por cada minuto de mezclado. Los datos espectrales registrados son transmitidos desde el espectrofotómetro hacia el laptop mediante una conexión inalámbrica.

6.2.5. Pre-tratamientos espectrales y construcción del modelo PLS

El procesamiento de los datos espectrales se realizó con el programa quimiométrico The Unscrambler v. 9.8 de CAMO (Camo Process AS, Oslo, Noruega). Los pre-tratamientos espectrales ensayados incluyeron

la segunda derivada de Norris, utilizando una ventana de 9 puntos y la corrección por varianza normal estándar (SNV).

Con el objeto de realizar una examinación visual de los espectros NIR, se aplicó un análisis en componentes principales (PCA).

Finalmente, para la construcción de una modelo multivariable, se utilizó la regresión por mínimos cuadrados (PLS). La elección del número apropiado de factores PLS se realizó en base a la validación cruzada y a la suma de los cuadrados de los residuales (*Prediction Residual Error Sum of Squares*, PRESS). La calidad y la capacidad predictiva del modelo fueron examinadas utilizando el error cuadrático medio (*Root Mean Square Error*, RMSE). Para evaluar la calidad de las predicciones de los métodos NIR, con respecto al método de referencia, se utilizó el error estándar relativo de predicción (*relative standard error of prediction*, RSEP).

6.2.6. Métodos libres de calibración

El bloque móvil de desviación estándar (*moving block of standard deviation*, MBSD) es el procedimiento más utilizado en el control de la uniformidad de mezclas.¹⁶³⁴⁻⁴⁰ Este método consiste en desplazar una ventana móvil de n espectros consecutivos hasta el final del proceso. En cada ventana móvil se calcula la desviación estándar media (MeanSD) entre los espectros de la ventana. La variación del valor de MeanSD en función del tiempo es la medida de la evolución de la homogeneización del proceso de mezcla. El cálculo de MeanSD se realizó utilizando funciones propias construidas en MATLAB 7.1 (The Mathworks, Massachusetts).

³⁴ P.A. Hailey et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 551–559.

³⁵ S.S. Sekulic et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1285–1309.

³⁶ S.S. Sekulic et al., *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.

³⁷ H. Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 98 (2008) 1487–1498.

³⁸ Z. Shi et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 738–745.

³⁹ P.P. LaPointe-Garant, J.S. Simard, N. Abatzoglou, in: 1st WSEAS international conference on multivariate analysis and its application in science and engineering (MAASE'08), Turkey, 2008, pp. 109–118.

⁴⁰ W. Momose et al., *Powder Technol.* 210 (2011) 122–131.

El método de análisis de distancias de scores en componentes principales (*PC-Scores Distance Analysis*, PC-SDA)⁴¹ consiste en construir un modelo PCA y calcular el valor de T^2 de Hotelling (al 95%). El PCA se calcula con los espectros que presentan la mínima desviación estándar de las distancias euclideas entre scores. Una explicación mas detallada sobre este método se puede ver en Puchert et al.⁴⁴ El cálculo del modelo PCA se ha realizado usando el programa SIMCA-P+ v.11.5 (Umetrics, Umea) y el de las distancias Euclideas y de las desviaciones estándar se realizó usando funciones propias construidas en MATLAB. El índice de mezclado (M) se ha calculado utilizando una ventana “fija” (a diferencia de MBSD y PC-SDA) que se desplaza a lo largo del conjunto de los espectros registrados (se eligen los tres primeros espectros, luego del cuarto al sexto y así sucesivamente hasta el final del proceso). Para los cálculos del índice M se utilizaron las ecuaciones descritas en el capítulo 2 y sus respectivas funciones fueron construidas en MATLAB.

6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la Figura 6.2 se muestra los espectros NIR de los tres constituyentes de la mezcla, en SNV (Figura 6.2a) y en 2nd derivada + SNV (Figura 6.2b). Como se observa, los espectros de los componentes mayoritarios, pellets A y B, son prácticamente iguales. De hecho, la principal diferencia entre los espectros sólo se encuentra en la banda característica de los pellets A, señalada con una flecha a 7123 cm^{-1} (Figure 6.2a); se observa una mejor diferenciación en los espectros en 2nd derivada (Figure 6.2b).

6.3.1. Método de calibración

Se construyó un modelo PLS inicial, sólo con las once muestras de laboratorio para calibración, al cual fue necesario añadir espectros

⁴¹ T. Puchert et al., *Eur J Pharm Biopharm.* 78 (2011) 173–182.

estáticos de proceso para obtener un intervalo más estrecho en el rango de concentraciones. Sin embargo, el modelo no predijo correctamente los espectros dinámicos obtenidos durante el proceso de mezclado. Esto se debe a la ligera diferencia entre los espectros dinámicos y los espectros estáticos, este fenómeno ya fue descrito en la literatura para este tipo de espectrómetros NIR.^{42,43}

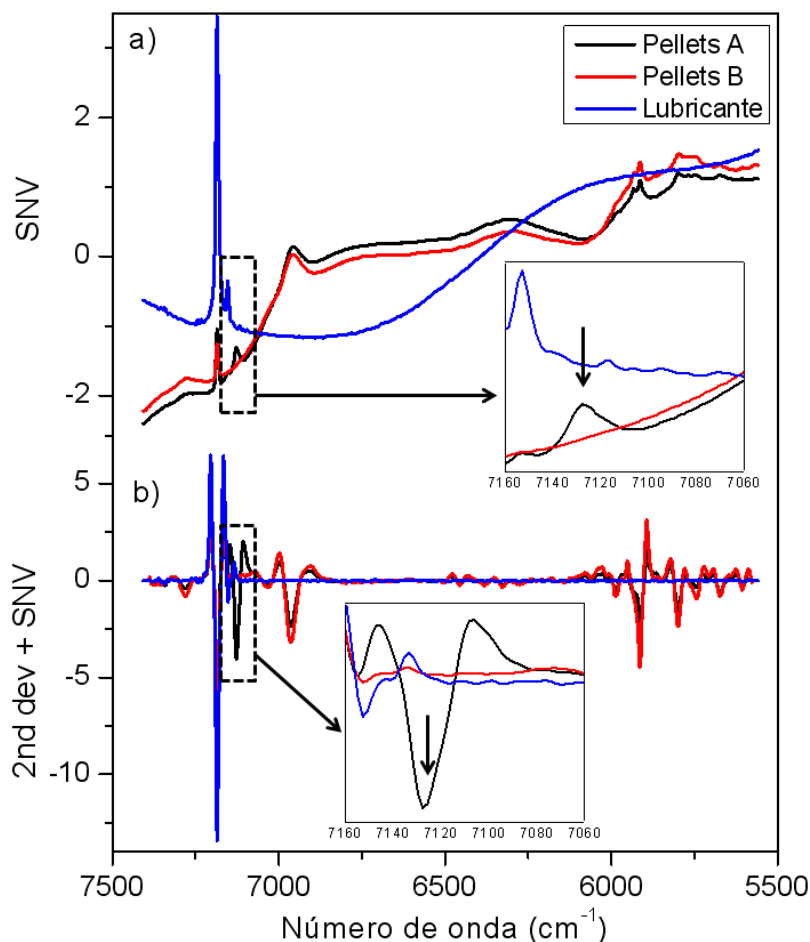


Figura 6.2. Espectros NIR de las tres materias primas de la mezcla en modo (a) SNV y (b) 2nd derivada + SNV.

Esta diferencia se muestra en el diagrama de dispersión de los dos primeros componentes principales de un PCA (Figura 6.3) que muestra diferencias entre los espectros estáticos y dinámicos. Puede observarse

⁴² Y. Sulub et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 48–54.

⁴³ Y. Sulub, M. Konigsberger, J. Cheney, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 429–434.

como las muestras de calibración se distribuyen principalmente a lo largo del PC1 (Var. Expl. 88%), el cual fue asociado a la variación de concentración de pellets A (%p/p); note como las muestras de calibración engloban a las muestras de validación. Por otro lado, los espectros dinámicos se distribuyen alejados de los de calibración, lo que indica que son espectros ligeramente distintos.

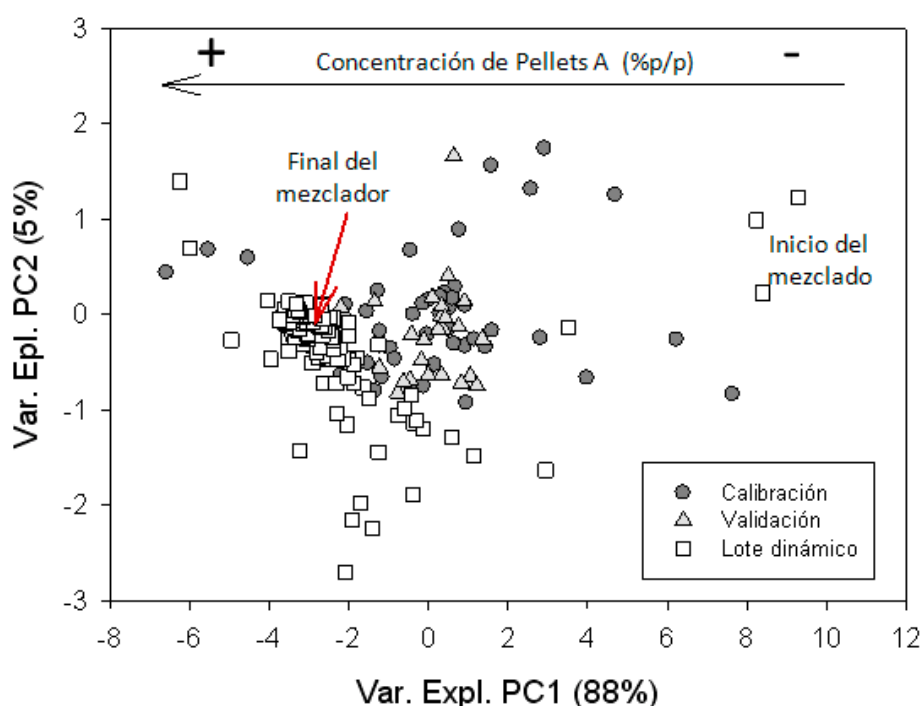


Figura 6.3. Diagrama de dispersión del PCA de las muestras de calibración y proyectando las muestras de validación y los espectros dinámicos del proceso 4. El pre-tratamiento espectral utilizado fue la segunda derivada + SNV.

Con el objeto de obtener un modelo capaz de predecir correctamente la concentración durante el proceso de mezclado, se añadieron espectros dinámicos al conjunto de calibrado. La figuras de merito del modelo final PLS se muestran en la Tabla 6.3. El modelo se construye con 4 factores PLS y produce errores de predicción reducidos, características aceptables considerando las limitaciones debidas al estrecho rango espectral y alta similitud espectral entre los componentes mayoritarios.

Tabla 6.3. Figuras de merito del modelo PLS para determinar el contenido de pellets A

Conjunto	Parámetros	
Calibración	Nº de muestras	52
	Pre-tratamiento espectral	2 ^{da} derivada + SNV
	Rango espectral (cm ⁻¹)	7400 – 5550
	Rango de calibración (%p/p)	0 – 100
	Nº de factores PLS	4
	Varianza explicada (%)	98.7
	RSEC (%)	3.6
Validación (conjunto externo)	RMSEC (% w/w)	1.8
	Nº de muestras	26
	Test <i>t</i> de los residuales	
	Media (%p/p)	-0.8
	SD (%p/p)	2.6
	<i>t</i> _{crit} (95%)	2.1
	<i>t</i> _{cal} (95%)	1.6
RSEP (%)	6.2	
RMSEP (% w/w)	2.7	

Debido a que el mezclador se encuentra en constante movimiento, la muestra que llega al *spot* del equipo NIR se renueva continuamente, con lo cual se asume que cada espectro corresponde a alícuotas diferentes del proceso. Por consecuencia, la cantidad de masa de muestra analizada puede exceder al total de masa analizada en un muestreo típico (*thief sampling*). Para una fácil visualización de la evolución de los perfiles de concentraciones, se decidió graficar la concentración de pellets A en porcentaje relativo (Figuras 4a y 4b) en función del número de revoluciones del mezclador, de manera que se pueda observar cuando la concentraciones predichas por el método NIR alcanzan el valor nominal de pellets A. Como se aprecia, se han elegido dos procesos, los cuales presentaron diferente comportamiento durante el mezclado.

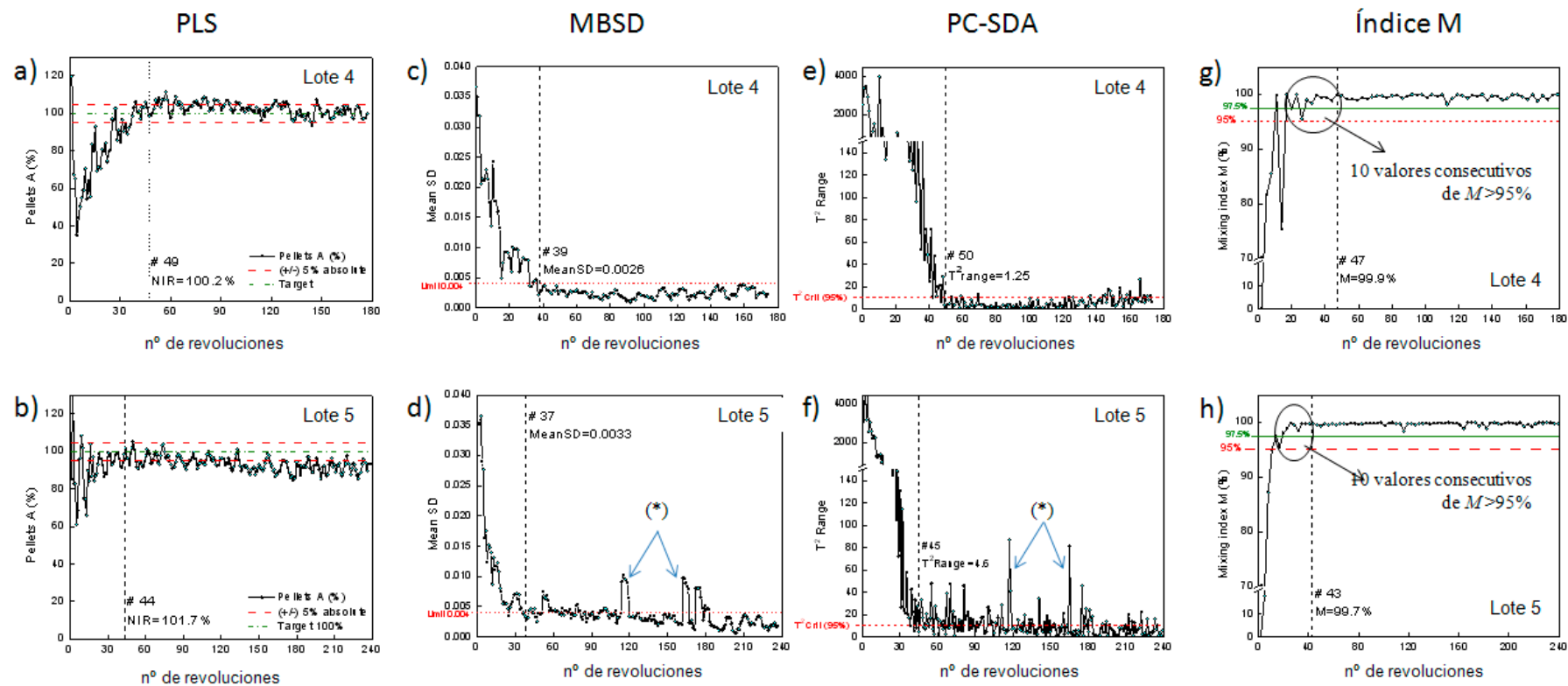


Figura 6.4. Determinación del punto final de mezclado utilizando los métodos quimiométricos PLS (a, b), MBSD (c, d), PC-SDA (e, f) e índice M (g, h). Todos los perfiles están representados en función del número de revoluciones del mezclador. (*) formación de aglomerados del lubricante en la ventana de registro o en la mezcla.

Como ejemplo de la capacidad predictiva del modelo, las estadísticas de las predicciones NIR obtenidas para el último minuto, de cada proceso, presentaron errores aceptables (RSEP = 2.9%) y los valores RSD fueron inferiores al 5% en todos los casos.

6.3.2. Comparación de los métodos

Los métodos MBSD, PC-SDA y el índice M fueron comparados al PLS en términos de punto final de mezclado (BEP). Debido a que se utilizaron el mismo conjunto de espectros para todos los métodos, se debería esperar obtener BEPs muy similares para todos los métodos.

Los límites utilizados en cada gráfico fueron $\pm 5\%$ absoluto del valor nominal de pellets A en el PLS, la desviación estándar media (MeanSD) de los últimos minutos de mezclado, el valor de T^2_{crit} de Hotelling para PC-SDA y finalmente el 95% de homogeneidad para el índice M. Observando los gráficos, la determinación del BEP es muy fácil para el lote n° 4 (Figuras 6.4a,c,e,g), mientras que para el lote n° 5 (Figuras 6.4b,d,f,h) se dificulta mucho, debido a que este lote presentó ciertas variaciones espectrales. Al realizar una comparación de los espectros involucrados en estas variaciones (Figura 6.5), se observó un aumento sensible en la banda correspondiente al lubricante, haciendo suponer que estas variaciones se pudieron deber a la aglomeración puntual del lubricante en la ventana de medida.

Todos los BEPs obtenidos fueron comparados para cada método (Tabla 6.4) en términos de promedio y desviación estándar (SD). El método con menor SD entre los 6 procesos el PLS. Se remarcó además que los métodos cualitativos presentaron SDs muy cercanas, siendo el índice M el que presentó menos variación. En términos generales, los BEPs para el índice M fueron ligeramente mayores que los demás métodos. Curiosamente la principal fuente de variación resultó ser la variabilidad entre lotes, es así que la máxima diferencia entre los métodos fue para los lotes n° 1, 2 y 6 (11, 11 y 13 revoluciones respectivamente).

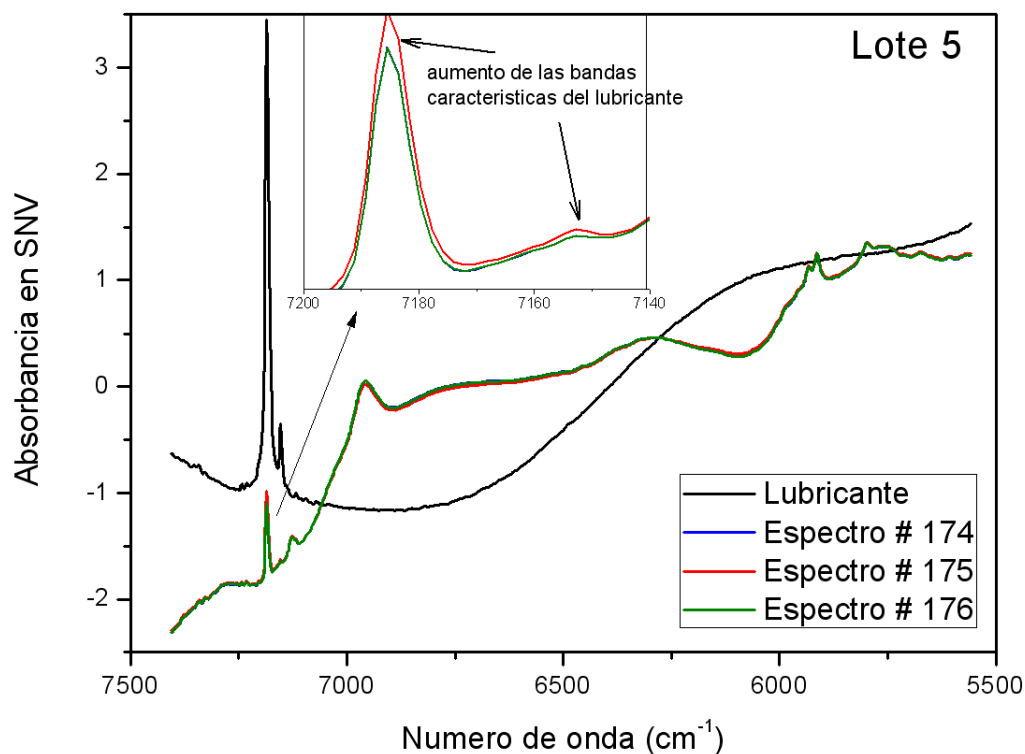


Figura 6.5. Comparación espectral entre el espectro NIR del lubricante y tres espectros consecutivos, donde uno presenta ligeras diferencias, relacionadas a las bandas del lubricante.

Un ANOVA a un factor, los métodos, demostró que existe diferencia significativa ($p=0.016$) entre los BEPs determinados para los 4 métodos quimiométricos evaluados. Por otro lado, un test HSD (*honestly significant difference*) de Tukey evidenció que el método MBSD presento diferencia significativa ($p=0.010$) principalmente comparado con los resultados del índice M. Los resultados indican que el BEP hallado es prematuro y confirman las conclusiones alcanzadas en trabajos anteriores cuando las variaciones espectrales debidas al API son muy reducidas. Sin embargo, la utilización y aplicación de estos métodos, debería ser evaluada en cada formulación. Ya que como se observó, existe cierta variabilidad de un lote a otro, haciendo que la variabilidad del proceso en sí sea la fuente de máxima variación a la hora de determinar los BEPs, esto también se puede explicar debido a que en ciertos procesos se detuvo el proceso para extraer muestra, pudiendo haber afectado la dinámica del mezclado. Para nuestra formulación, el

método PLS fue definitivamente el método que otorgó los resultados más fiables, sin embargo esta mayor confianza va asociada con el principal inconveniente que es la construcción de un modelo de calibración, que implica la necesidad de muestras de calibración y forzosamente de un método de referencia.

Tabla 6.4. Comparación de los BEPs expresados en número de revoluciones para cada método evaluado

Lote	PLS	MBSD	PC-SDA	Índice M	Media	SD
1	45	36	34	59	44	11
2	44	59	64	68	59	11
3	54	39	40	56	47	9
4	49	39	50	56	49	7
5	44	37	45	43	42	4
6	43	32	48	64	47	13
Media	47	40	47	58		
SD	4	10	10	9		

El MBSD tiene la ventaja de ser un método simple y fácil de implementar, no obstante conduce a resultados erróneos a causa de su reducida sensibilidad para determinar el BEP, debido a que la variación entre espectros y el ruido de estos afecta considerablemente su correcta determinación.^{44,45}

El PC-SDA presentó resultados comparables a los obtenidos con PLS, observándose no obstante que las mismas diferencias espectrales o ruido, que afectaron la interpretación de los gráficos MBSD, pueden entorpecer la correcta determinación de los BEPs (Figura 6.4f). Por otro lado, las principales ventajas de este método es que no necesita de un método de referencia y el umbral establecido es calculado estadísticamente, lo cual lo hace reproducible. Sin embargo, para obtener este umbral se necesita de la construcción de un modelo PCA, cuya obtención es el resultado de una serie de pasos los cuales lo hace poco aplicable para este tipo de formulación. La selección de muestras

⁴⁴ H. Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 98 (2008) 1487–1498.

⁴⁵ M. Blanco, R. Cueva, J. Cruz, *Anal. Methods*, (2012). DOI: 10.1039/C2AY25379H.

que formaran parte del modelo es crucial, ya que de estas dependerá la magnitud del límite de aceptación.

En cuanto al índice de mezclado M , la interpretación de los perfiles de M versus el número de revoluciones (Figure 6.4g y 6.4h), otorga información sobre su evolución durante el proceso de mezclado. Para el cálculo de *var* se utilizó una ventana móvil “fija” de 3 espectros consecutivos no superponibles. Por ejemplo, para un lote en el que se registraron 240 espectros, se obtuvieron $240/3 = 80$ valores de Var a lo largo del proceso. No se ha aplicado una ventana móvil como en los otros métodos, debido a que el suavizado era excesivo e infravaloraba el BEP y además para evitar la interferencia de espectros anómalos en puntos consecutivos. Como se observa en la Figura 6.4g, los valores al inicio del mezclado son cercanos a 0, mostrando que el sistema es heterogéneo y conforme avanza el proceso de mezclado aumentan asintóticamente hasta llegar al 100 %, siendo indicativo de una buena homogeneidad. El BEP fue determinado inmediatamente después de 10 valores consecutivos por encima del umbral de 95%. Asimismo, las variaciones espectrales, que afectaron la interpretación de MBSD y PC-SDA, no afectaron al índice M (Figura 6.4h). Lo que muestra que estos cambios espectrales no afectan a los resultados, haciendo de este método robusto frente a cambios que no estén asociados al proceso de mezclado. Además, es un método que no está relacionado con la concentración de cada componente de la mezcla, con lo cual puede ser aplicado a cualquier tipo de mezcla sólida. Los valores de BEPs son comparables a los obtenidos por el método PLS y PC-SDA, haciendo la determinación del BEP fácil, rápida y reproducible y su implementación para realizar medidas en rutina es igualmente posible.

6.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

El éxito de este trabajo radicó en la utilización de un espectrofotómetro NIR wireless y en una mezcla de pellets de liberación controlada y gastroresistentes, cuyo tamaño de partícula y similitud espectral entre sus componentes mayoritarios, en combinación con las limitaciones del reducido rango espectral del equipo NIR, hicieron un ejemplo particular para la aplicación de diversos métodos quimiométricos que permitieron determinar el punto final de mezclado (BEP).

El método PLS fue sin duda el mejor método para determinar el BEP durante un proceso de mezclado. Basta con que las predicciones de las concentraciones se encuentren dentro del $\pm 5\%$ absoluto del valor nominal del API. Sin embargo, su construcción, validación e implementación no son siempre tareas fáciles en un proceso de mezclado industrial.

El índice de mezclado M y el método PC-SDA resultaron ser adecuados para la formulación de pellets estudiada. Siendo, el índice M un excelente método para determinar el BEP, por su simplicidad en el cálculo, no necesita de un proceso completo (como es el caso para PC-SDA), su capacidad de proporcionar resultados en tiempo real, no está relacionado con la concentración de los analitos y además el umbral de aceptación puede ser establecido directamente a 95%.

Todo esto hace que el índice M pueda ser incorporado en cualquier software de control de los equipos NIR wireless, demostrado así, ser una herramienta útil para establecer homogeneidad en una mezcla de sólidos.

Finalmente, el MBSD no proporcionó resultados adecuados a la hora de determinar el punto final de mezclado, con lo cual se concluye que no es un método recomendado para este tipo de formulación.

Si una información cuantitativa no es requerida, el índice M representaría la opción ideal para la monitorización en tiempo real, debido a su rapidez en el cálculo, fácil implementación en rutina, gráficos fácil de interpretar, no está afectado por cambios en los

espectros, no esta relacionado con la concentración, lo que implica que se puede aplicar a cualquier concentración del API.

Capítulo 7

Evaluación de herramientas quimiométricas para la monitorización *in-line* de un proceso de liofilización de una mezcla multi-componente

7.1. INTRODUCCION.....	211
7.2. MATERIALES Y METODOS.....	213
7.2.1. Materiales	213
7.2.2. Descripción del proceso.....	213
7.2.3. Registro <i>In-line</i> de los espectros NIR.....	215
7.2.4. Análisis de datos.....	216
7.2.5. Difracción de rayos X de polvo	217
7.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	218
7.3.1. Examinación de los espectros NIR.....	219
7.3.2. Caracterización de los polimorfos de manitol	221
7.3.3. Comparación de los métodos quimiométricos	224
7.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	233

Lista de abreviaciones

	Ingles	Castellano
API	Active pharmaceutical ingredient	Principio activo
AWA	Apparent Water Absorbance	Absornacia aparente del agua
CorrCoef	Correlation coefficient	Coefficiente de correlacion
DPE	Dynamic Parameters Estimation	estimación dinámica de parámetros
FT-IR	Fourier Transmornation Infrared	Infrarrojo de transformada de Fourier
MCR	Multivariate Curve Resolution	
MTM	Manometric Temperature Measurement	Medidas de temperatura manométricas
M_{ws}	Mean of wavenumbers	Media de numero de ondas
PAT	Process Analytical Technology	Tecnología analítica de procesos
PCA	Principal Component Analysis	Analisis en componentes principales
RGA	Residual Gas Analysis	Analisis de gas residual
SNV	Standard Normal Variate	Varianza normal estándar
TBA	Terbutyl alcohol	Terbutanol
T_c	Crystallization temperature	Temperatura de cristalización
TDLAS	Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy	Espectroscopia de ab sorción con l aser diodo ajustable
TEMPRIS	Temperature Remote Interrogation System	Temperatura del siste ma de acceso remoto
T_{end}	End temperature	Temperatura final
TLC	Thermodynamic Lyophilization Control	Controladores termodinámicos de liofilización
T_p	Product temperature	Temperatura del producto
T_s	Shelf temperature	Temperatura del liofilizador
XRPD	X-ray powder diffraction	Difracción de rayos X de polvo

En este capítulo se presenta los resultados más destacados de un trabajo cuyo objetivo principal fue el examen de la utilización de la espectroscopia NIR en la monitorización in-line de los componentes durante un proceso de liofilización de un sistema multicomponente, fenofibrato en terbutanol (TBA) y manitol en agua. Para lograr este objetivo, diversos pretratamientos espectrales y técnicas de análisis de datos (número de onda seleccionadas, coeficiente de correlación y análisis en componentes principales, PCA) han sido evaluadas y comparadas. Estas técnicas han sido elegidas según su virtud y complejidad para extraer información a partir de los espectros NIR. Esta comparación conducirá a determinar el enfoque adecuado de análisis de datos para este tipo de proceso. Con el fin de observar si las técnicas quimiométricas empleadas diferencian entre los cambios en la configuración del proceso, se realizaron cuatro diferentes procesos de liofilización.

7.1. INTRODUCCION

Actualmente, uno de los procesos de fabricación farmacéuticos, en donde es de interés aplicar herramientas PAT es el proceso de liofilización, debido a que es un proceso complejo y presenta múltiples etapas, en el cual una solución inicial sufre varias transformaciones para finalmente obtener un producto seco.¹ Para lograr los objetivos de PAT en el proceso de liofilización, es necesario aplicar una combinación adecuada de herramientas PAT.²⁻¹² En la actualidad, se han utilizado diversos analizadores para la monitorización *in-line* de los diferentes pasos de la liofilización (Tabla 7.1). Sin embargo, muchas de estas tecnologías clásicas pueden perturbar el normal procedimiento de la liofilización o no permitir supervisar todos los aspectos críticos del proceso. Además, las técnicas citadas no pueden caracterizar los parámetros de calidad de productos intermedios y terminados, lo cual es esencial para la liberación del producto en tiempo real. En este sentido, las técnicas de espectroscopia vibracional, como por ejemplo, el infrarrojo medio (MIR), infrarrojo cercano (NIR) y Raman son atractivas para la industria farmacéutica. Su importancia reside en las conocidas ventajas de estas técnicas (rapidez y naturaleza no invasiva, no requiriendo ninguna preparación de la muestra, suministrando información química y física, etc.) frente a las tecnologías clásicas. Las primeras aplicaciones de la espectroscopia vibracional en procesos de liofilización fueron en estudios *in situ* e invasivos utilizando el infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)¹³ y NIR.¹⁴

¹ T. De Beer et al. *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 32–47.

² T. Jennings, *J. Parenter., Drug. Assoc.* **34** (1980) 62–69.

³ M. Roy, M. Pikal, *J. Parenter. Sci. Technol.* **43** (1989) 60–66.

⁴ P. Cameron, *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*, Interpharm Press Inc., New York, 1997.

⁵ N. Milton et al. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **51** (1997) 7–16.

⁶ G. Oetjen, P. Haseley, K. Klutsch, M. Leineweber, *Method for controlling a freeze drying process*, (2000), United States, Patent number 6163979.

⁷ C. Roth, G. Winter, G. Lee, *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 1345–1355.

⁸ M. Druy, *Spectroscopy* **1** (2006) 1–4.

⁹ S. Schneid, H. Gieseler, *AAPS PharmSciTech* **9** (2008) 729–239.

¹⁰ T.R.M. De Beer et al. *Anal. Chem.* **81** (2009) 7639–7649.

¹¹ S. Velardi, H. Hammouri, *Chem. Eng. Res. Des.* **87** (2009) 1409–1419.

¹² E. Dragoi, S. Curteanu, D. Fissore, *Chem. Eng. Sci.* **72** (2012) 195–204.

¹³ R. Remmele, C. Stushnoff, J. Carpenter, *Pharm. Res.* **14** (1997) 1548–1555.

¹⁴ M. Brülls et al. *Pharm. Res.* **20** (2003) 494–499.

Tabla 7.1. Tecnologías utilizadas para la monitorización de procesos de liofilización¹⁵

a) Tecnologías clásicas			
Tecnología	Medida	Invasivo	Año
Análisis de gas residual (RGA)	Gas Residual	No	1980
Sensor de punto de condensación	Contenido de humedad	Si	1989
Detectores de resistencia térmica	Temperatura del producto	Si	1997
Sistemas de medida de presión (manómetros Pirani, de capacitancia y termopares)	Presión de la cámara	No	1997
Medidas de temperatura manométricas (MTM)	Temperatura del producto	No	1997
Controladores termodinámicos de liofilización (TLC)	Temperatura del hielo	No	2000
Sistemas de pesaje (Microbalanzas)	Perdida de peso de la muestra	No	2001
Espectroscopia de absorción con laser diodo ajustable (TDLAS)	Absorción de radiación	No	2006
Termopares	Temperatura del producto	Si	2008
Temperatura del sistema de acceso remoto (TEMPRIS)	Temperatura del producto	Si	2009
Espectroscopia de emisión de plasma (dispositivos de ionización de plasma frío)	Humedad de la cámara	No	2009
Modelos de estimación dinámica de parámetros (DPE)	Temperatura del producto	No	2009
Soft-sensor (filtros Kalman)	Temperatura del producto	Si	2009
Técnicas neuro evolutivas	Temperatura y contenido residual de hielo	No	2012
b) Espectroscopia vibracional (únicamente enfoques in-line y no-invasivos)			
Objetivos		Método*	Año
Raman	Evaluar la viabilidad del uso de la espectroscopia Raman para la monitorización de la cristalización y transformaciones polimórficas durante la liofilización.	PCA	2007
Raman	Evaluar la idoneidad de la técnica para el control <i>in-line</i> y en tiempo real del proceso de liofilización.	PCA MCR	2007
Raman y NIR	Evaluar simultáneamente las técnicas Raman y NIR para la monitorización <i>in-line</i> y en tiempo real de un proceso de liofilización.	PCA MCR	2009
Raman y NIR	Demostrar la importancia de la utilización de analizadores de procesos complementarios (herramientas PAT) para la monitorización, análisis y comprensión del proceso de liofilización.	PCA MCR	2009
Raman	Dilucidar los mecanismos que determinan el tamaño de los cristales formados durante la liofilización.	PCA	2010
NIR	Evaluar si la NIRS puede proporcionar información relevante sobre la estabilidad de proteínas y en la influencia de lioprotectores durante la liofilización.	AWA	2012

*Principal component analysis (PCA); multivariate curve resolution (MCR); apparent water absorbance (AWA)

¹⁵ J.G. Rosas et al, Anal. Chim. Acta. (2012) enviado

Desde entonces, estudios de monitorización no invasivos utilizando técnicas como Raman²¹⁶⁻²⁰ y NIR^{16,19,21} han venido siendo utilizadas en procesos de liofilización. La principal diferencia entre las mediciones Raman y NIR en estos estudios fue que la sonda Raman se colocó por encima del vial, monitorizando sólo la superficie de la muestra, mientras que la sonda NIR se colocó junto al vial, monitorizando la parte inferior lateral del vial. Una de las ventajas de la espectroscopia Raman sobre la NIR es que los espectros Raman muestran picos estrechos para cada componente individual y por lo general no solapables, haciendo relativamente fácil la monitorización de cambios en la señal para cada componente durante el proceso. Sin embargo, monitorizar un proceso de liofilización solo con la espectroscopia Raman puede no ser suficiente, ya que no se tiene información sobre los cambios producidos en el agua durante el proceso. Una solución a este problema es definitivamente espectroscopia NIR, ya que la señal del agua es intensa. De hecho, la espectroscopia NIR y Raman son complementarias entre sí, sugiriendo que un uso combinado de ambas puede cubrir la mayoría de los aspectos críticos del proceso.

7.2. MATERIALES Y METODOS

7.2.1. Materiales

El API (fenofibrato) y el terbutanol (TBA) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemie (B.V. Zwijndrecht, Holanda). El manitol fue adquirido de VWR international (Fontenay sous Bois, Francia).

7.2.2. Descripción del proceso

Los experimentos de liofilización fueron realizados en un liofilizador Amsco FINN-AQUA GT4 (GEA, Köln, Alemania). El fenofibrato fue

¹⁶ T.R.M. De Beer et al. *Anal. Chem.* **81** (2009) 7639–7649.

¹⁷ S. Romero-Torres et al. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **61** (2007) 131–145.

¹⁸ T. R. M. De Beer et al. *Anal. Chem.* **79** (2007) 7992–8003.

¹⁹ T.R.M. De Beer et al. *J. Pharm. Sci.* **98** (2009) 3430–3446.

²⁰ H. de Waard et al. *The AAPS Journal* (2010) DOI: 10.1208/s12248-010-9215-z.

²¹ S. Pieters et al., *Anal. Chem.* **84** (2012) 947–955.

disuelto en TBA (25 mg/ml) y el manitol en agua (31 mg/ml). Las soluciones fueron calentadas hasta aproximadamente 60°C y 2.4 ml de la solución acuosa fue mezclada con 1.6 ml de la solución de TBA. Inmediatamente después de mezclar las soluciones, los viales fueron congelados a dos velocidades de congelado (variable 1), mediante una rampa o precongelando la cámara del liofilizador a -50 °C (Tabla 7.2). Esta temperatura se mantiene constante por 2h, después de la cual la temperatura al interior de liofilizador (T_s), variable 2, fue incrementada hasta -25 °C o -15 °C en 30 minutos. Esta temperatura se mantuvo durante 7h. La sublimación de los solventes comenzó al disminuir la presión de la cámara hasta 0.8–1.0 mbar en 20 min y las muestras fueron secadas durante 30 h. Finalmente, la T_s fue aumentada gradualmente hasta temperatura ambiente. Para tener una idea sobre la evolución de la temperatura del producto (T_p) durante el proceso de liofilización, en el experimento n° 3 se inserto una sonda de temperatura en otro vial diferente al que fue monitorizado con la sonda NIR.

Tabla 7.2. Condiciones de los procesos de liofilización

Proceso	Variable 1 (velocidad de congelación)	Variable 2 (Temperatura de la cámara del liofilizador °C)
1	Lenta (de 20 a -50 a 1°C/min)	-25
2	Lenta (de 20 a -50 a 1°C/min)	-15
3	Rápida (vial en cámara precongelada (-50°C))	-25
4	Rápida (vial en cámara precongelada (-50°C))	-15

Paso	Etapa del proceso	Duración (h)	Temperatura (°C)	Presión (mbar)
1	Congelado		Variable 1	1000
		2	-50	1000
2	Rampa hasta T_c	0.5	Variable 2	1000
3	Cristalización	7	Variable 2	1000
4	Primer secado	30	Variable 2	0.8–1.0
5	Segundo secado			
		Rampa hasta T_{end}	2	20
7	Final	1	20	0.8–1.0

T_c =temperatura de cristalización

Variable 1 = Velocidad de congelación

Variable 2 = Temperatura de la cámara del liofilizador (T_s)

7.2.3. Registro *in-line* de los espectros NIR

Los espectros NIR en reflectancia difusa fueron registrados continuamente y de forma no invasiva durante la liofilización utilizando un espectrómetro NIR de transformada de Fourier (FT) Nicolet Antaris II near-IR analyzer (Thermo Fisher Scientific) equipado con un detector de InGaAS, una lámpara halógena de cuarzo, y una sonda de fibra óptica (Figura 7.1). Un espectro del proceso fue adquirido cada minuto en un rango espectral de $10000 - 4500 \text{ cm}^{-1}$, siendo este el promedio de 32 scans a una resolución espectral de 8 cm^{-1} .



Figura 7.1. Equipo FT-Nicolet Antaris II NIR analyzer

El carácter no invasivo de las medidas garantiza que ni el proceso ni el producto son influenciados por el contacto con la sonda NIR. El cable de fibra óptica, conectando la sonda NIR al espectrómetro NIR fue introducida a través de un agujero en el lado izquierdo de la cámara del liofilizador (Figura 7.2). La sonda NIR se colocó al lado del vial para monitorizar la pared lateral de la parte inferior de la muestra en el vial. El área de registro de la sonda NIR fue aproximadamente 28 mm^2 . Por lo tanto, el tamaño efectivo de la muestra que es medida por la sonda NIR consiste sólo en una pequeña parte del volumen de la muestra.

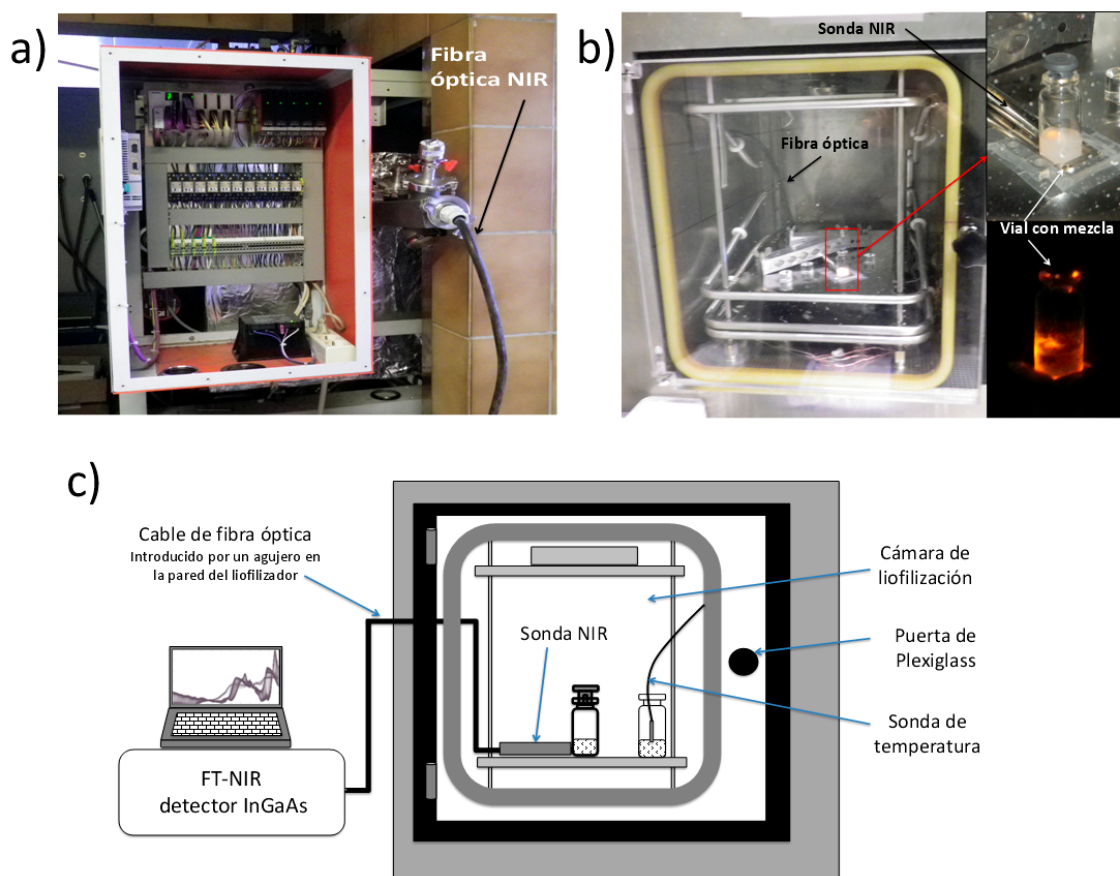


Figura 7.2. Metodología de registro de espectros NIR. a) Parte trasera del liofilizador, b) parte delantera del liofilizador y c) esquema para el experimento n° 3 con un vial adicional con la sonda de temperatura.

7.2.4. Análisis de datos

Los espectros fueron analizados utilizando funciones propias desarrolladas en Matlab 7.1 (The Mathworks, Natick, MA). Los pre-tratamientos espectrales empleadas fueron el SNV para eliminar la interferencia multiplicativa de dispersión y la primera derivada Savitzky-Golay para reducir los desplazamientos de línea base y mejorar la resolución de las bandas espectrales.

Para extraer la información relevante de los espectros NIR fue necesario el uso de herramientas quimiométricas. La complejidad de los métodos evaluados determinara su habilidad para extraer información de cada componente en la formulación durante el proceso. Se decidió evaluar tres técnicas quimiométricas, basadas en diferentes enfoques. Por ejemplo, el método más simple consistió en monitorizar los perfiles de

número de onda ($\bar{\nu}$) durante el proceso. Es conocido, que los espectros NIR consisten en bandas anchas y fuertemente solapadas y altamente correlacionadas, por lo cual la monitorización del promedio de $\bar{\nu}$ específicas (M_{ws}) para cada componente de la mezcla puede proporcionar información sobre cada componente durante el proceso de liofilización.

$$M_{ws} = \frac{A_1 + A_2 + \dots + A_n}{n} \quad (7.1)$$

Donde, A_1, A_2, \dots, A_n son las absorbancias de $\bar{\nu}$ seleccionados para cada componente y n es el número de $\bar{\nu}$ seleccionados. Así, los valores de M_{ws} son monitoreados durante el proceso de liofilización.

El siguiente método es el coeficiente de correlación (CorrCoef). El CorrCoef proporciona una medida de similitud entre los datos espectrales, de los espectros puros de API i/o excipientes y los espectros del proceso (capítulo 2). De hecho, uno de los más interesantes usos del CorrCoef es la correlación en dos dimensiones,²² la cual permite que pequeños cambios espectrales inducidos por una perturbación experimental sea magnificada.

El tercer y último método fue el análisis en componentes principales, PCA (capítulo 2). Este método pertenece a los métodos de reducción de variables y ha demostrado ser un método altamente eficiente para extraer información de un proceso de liofilización,^{23,24} la cual se espera que proporcione información que permita entender el proceso de la mezcla compleja estudiada.

7.2.5. Difracción de rayos X de polvo

La difracción de rayos X (XRPD de sus siglas en inglés) fue utilizada para determinar la cristalinidad y para identificar las formas

²² Y. Peng, P. Wu, *Polymer* **45** (2004) 5295–5299.

²³ T.R.M. De Beer et. *Anal. Chem.* **81** (2009) 7639–7649.

²⁴ T.R.M. De Beer et al. *J. Pharm. Sci.* **98** (2009) 3430–3446.

polimórficas de los solutos. Se utilizó una radiación CuK α con una longitud de onda de 1.5405 Å proveniente de un equipo Bruker D2 Phaser (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con un detector *lynxeye*. La muestra en polvo fue colocada en un soporte de silicio con un fondo cero y escaneada desde 5–70° 2 θ con un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo por paso de 1.0s.

7.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Un examen visual de la evolución de las variables de proceso es útil para clarificar los cambios de temperatura en el producto que se produjeron durante el proceso de liofilización (Figura 7.3). La temperatura y presión de la cámara del liofilizador, T_s y P_s respectivamente; combinados con la T_p , la cual fue medida introduciendo una sonda de temperatura en otro vial (experimento 3), proporcionan información útil del interior del liofilizador y del interior de la muestra. Como se observa, durante la etapa de congelado la T_p desciende hasta -36° C, después la T_p se ve incrementada, siguiendo el incremento de la T_s , manteniéndose constante a -20° C. Luego, al aplicar el vacío y la T_p desciende rápidamente hasta -25° C, indicando que ha comenzado la sublimación. A los 610 minutos, la T_p comienza a incrementarse hasta mantenerse constante (alrededor de los 1300 minutos) y equivalente a la T_s , aunque con una diferencia de 20°C, indicando el fin del primer secado. El segundo secado fue observado debido a que las temperaturas incrementaron hasta temperatura ambiente de 22°C.

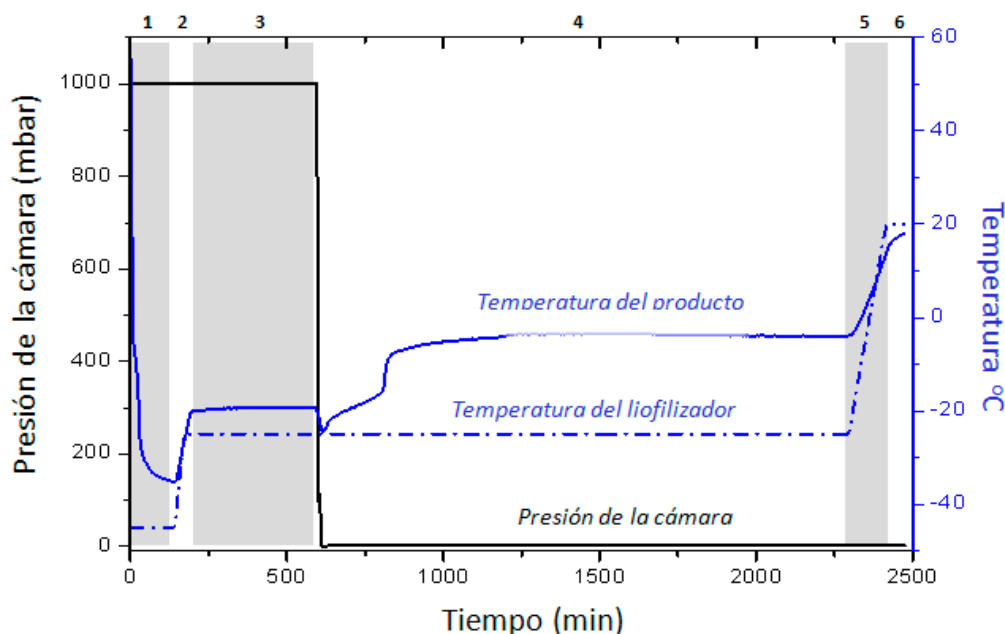


Figura 7.3. Ajustes en las variables de proceso (T_s y P_s) para el experimento 3, combinado con la T_p (registrada utilizando una sonda de temperatura insertada en otro vial). Etapas del proceso: 1 (-50°C , atm); 2 (-50°C a temperatura de cristalización, T_c , atm); 3 (T_c , atm); 4 (T_c , 0,8 mbar); 5 (T_c a 20°C , 0.8 mbar) y 6 (20°C , 0.8 mbar).

Los cambios en las variables del proceso pueden verse reflejadas en los espectros NIR, muchos de estos cambios no pueden ser observables simple vista, por lo cual herramientas quimiométricas deben ser empleadas para extraer la información escondida en los espectros. Sin embargo, una visión general de los espectros de los componentes puros y de la formulación es útil para identificar bandas características y facilitar la aplicación del método quimiométrico apropiado.

7.3.1. Examinación de los espectros NIR

La formulación contiene una gran proporción de agua (alrededor de 55%), la cual no tiene señal NIR en los espectros registrados en modo reflectancia, no obstante cuando el agua se convierte en hielo durante la etapa de congelado, las fuertes bandas del hielo en el espectro NIR son claramente observadas y pueden interferir con la señal de los otros componentes de la mezcla (Figure 7.4). Por lo tanto, la identificación de

regiones específicas para cada componente, que no se solapen con las bandas de hielo puede facilitar el procesamiento de datos. Los espectros NIR en reflectancia fueron adquiridos de los componentes sólidos en polvo, fenofibrato y manitol. Los espectros de reflectancia de los disolventes fueron registrados en su estado congelado, ya que ambos solventes no producen ninguna señal de reflectancia por ser líquidos transparentes (Figure 7.4a). De acuerdo a las estructuras químicas, el fenofibrato es el único compuesto aromático y las bandas características del benceno pueden observarse en el espectro NIR del fenofibrato en las regiones de 9126 – 8659 y 6121 – 5724 cm^{-1} . El TBA congelado tiene un pico característico a 8500 cm^{-1} proveniente del $-\text{CH}_3$ y a 7351 – 6965 cm^{-1} relacionado al grupo funcional $-\text{OH}$, especialmente a 6703 cm^{-1} . Note como la región NIR de 9126 hasta 8659 cm^{-1} engloba la información espectral del fenofibrato y TBA. En el espectro del manitol se puede identificar ciertas regiones características, como por ejemplo a 6970 – 5994 y 4900 – 4509 cm^{-1} , asociados a los grupos funcionales $-\text{OH}-\text{CH}$ y $-\text{CH}$ respectivamente. En el caso del agua, las dos bandas características pueden ser vistas en los rangos 7108 – 6302 cm^{-1} y 5384 – 4744 cm^{-1} . Note como este rango engloba la información espectral del manitol y del agua.

Como un ejemplo de la evolución de las bandas de cada componente durante el proceso, se muestran espectros registrados cada 20 minutos para el experimento 1 (Figure 7.4b). Como se puede observar, las flechas localizadas en las bandas seleccionadas muestran los cambios espectrales a lo largo de las etapas del proceso de liofilización, como son el congelado, especialmente en el rango 7000 – 6500 cm^{-1} (salto marcado en la figura con una flecha y un “*”), y la sublimación de los solventes en las regiones 9126 – 8659, 7108 – 6300 y 5384 – 4744 cm^{-1} .

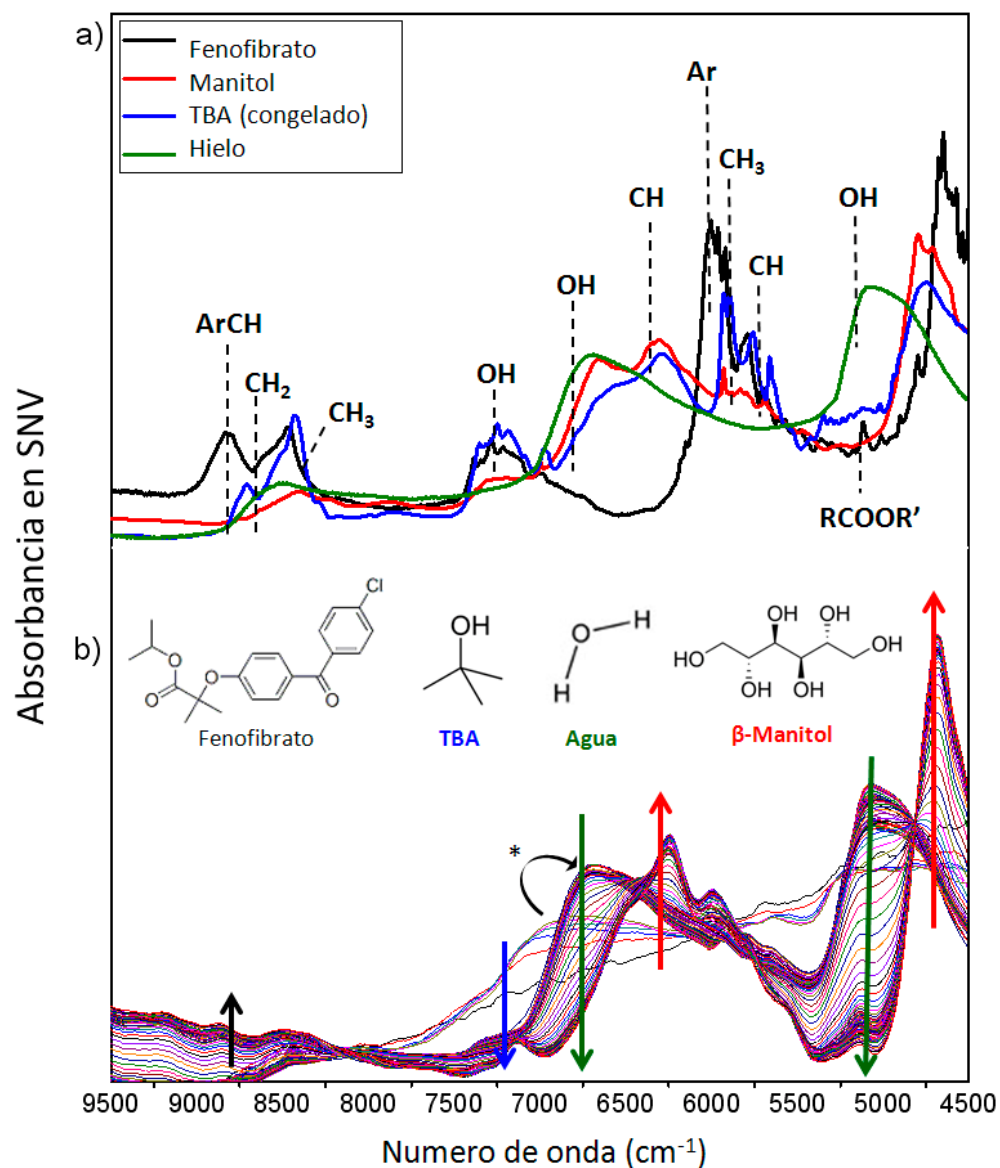


Figure 7.4. Espectros NIR obtenidos durante: a) Experimento de liofilización 1 completo y b) para los componentes puros. Pretratamiento utilizado fue SNV + suavizado Savitzky-Golay. El rango espectral fue de 9500 – 4500 cm⁻¹.

7.3.2. Caracterización de los polimorfos de manitol

Como es bien conocido, durante la liofilización el manitol puede cristalizar como formas anhidras α , β , δ y como manitol semihidratado.^{25,26} Los cambios polimórficos durante la producción de productos farmacéuticos pueden alterar algunas propiedades esenciales

²⁵ T.R.M. De Beer et al. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7992–8003.

²⁶ T.R.M. De Beer et al. *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3430–3446.

(físicoquímicas, bioequivalencia y procesabilidad) en el producto terminado. Es así que se identificaron los polimorfos de manitol en los productos terminados secos en el rango espectral de 7500–5500 cm^{-1} (Figure 7.5) utilizando el método CorrCoef. La utilización del CorrCoef en la espectroscopia NIR para la identificación de polimorfos ya ha sido descrita en la literatura.²⁷ Los espectros NIR de los polimorfos puros α , β , y δ -mannitol se muestran en la Figura 7.5a y 7.5c en modo SNV y 1^{era} derivada Savitzky–Golay respectivamente. Note como el polimorfo δ puede ser visualmente distinguido de los otros dos polimorfos en 6649 cm^{-1} , mientras que el polimorfo β puede ser diferenciado del polimorfo α en 7000 cm^{-1} . Las diferencias se vuelven más evidentes después de derivar los espectros.

Información cualitativa sobre la presencia de los polimorfos puede ser extraída por comparación entre los espectros puros de los polimorfos del manitol y los productos terminados secos para todos los experimentos, en SNV y 1^{era} derivada Savitzky–Golay (Figuras 7.5b y 7.5d respectivamente).

Los resultados del método CorrCoef (Tabla 7.3) muestran una alta correlación para el polimorfo δ (CorrCoef > 0.95). Estos resultados fueron confirmados por XRPD para cada producto terminado (Figura 7.5e). Las difracciones características para el polimorfo δ han sido ampliamente reportadas en la literatura a 9.7° y 24.7° en el gráfico 2 θ .³²⁸⁻³⁰ Sin embargo, se puede observar una difracción relacionada con el manitol hemihidratado en 18°2 θ ^{29,30} y la presencia de una difracción ligeramente deformada, la cual se atribuye a la superposición de las dos difracciones del manitol hemihidratado y δ -manitol en 9.6° y 9.7°2 θ respectivamente (en especial para el experimento 2). De acuerdo con estos resultados, es posible que en los procesos 2 y 4 haya una mezcla de los polimorfos δ - y hemihidratado. Desafortunadamente, no se pudo confirmar este hecho debido a que no se dispuso del espectro NIR del

²⁷ M. Blanco et al. *Anal. Chim. Acta* **567** (2006) 262–268.

²⁸ H. Grohgan et al. *J. Rantanen, J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 2871–2875.

²⁹ L. Yu et al. *J. Pharm. Sci.* **88** (1999) 196–198.

³⁰ Y. Xie et al. *Pharm. Res.* **25** (2008) 2292–2301.

polimorfo hemihidratado, con lo cual no fue posible realizar una comparación con los espectros de los productos terminados.

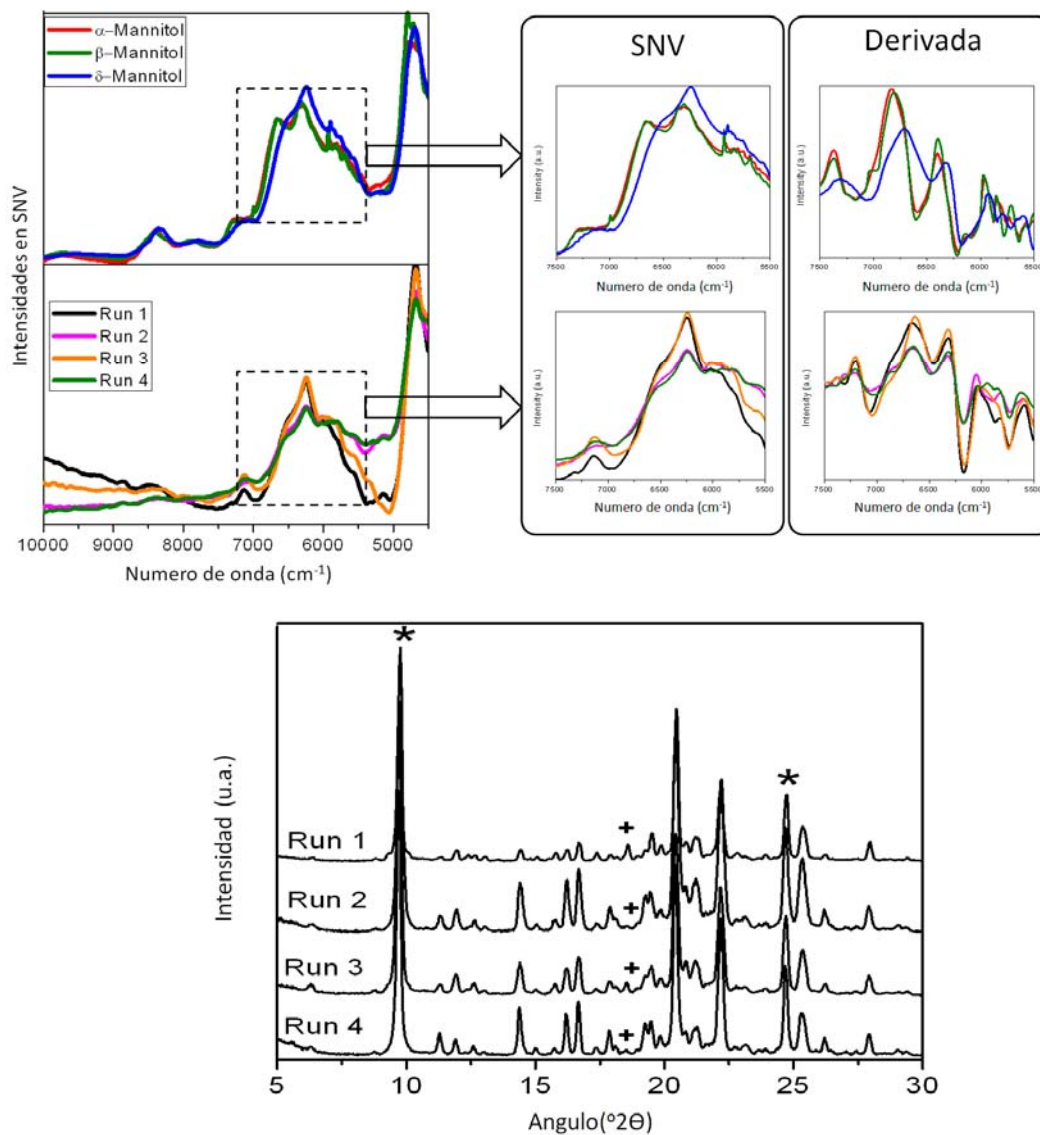


Figura 7.5. Caracterización fisicoquímica de los polimorfos de manitol en los productos terminados secos. (a y c) Espectros NIR de los polimorfos α -, β - y δ -manitol, en SNV y 1^{era} derivada SG respectivamente. (b y d) Espectros NIR de los productos terminados para cada experimento, en modo SNV y 1^{era} derivada SG respectivamente y (e) Difracciones XRPD de los productos terminados secos (*) y (+) son las difracciones características para el manitol δ - y hemihidratado respectivamente.

Tabla 7.3. Valores de *CorrCoef* entre polimorfos de manitol y productos terminados secos.

Proceso	Coeficientes de Correlación *		
	α -Manitol	β -Manitol	δ -Manitol
1	0.89	0.90	0.96
2	0.90	0.90	0.98
3	0.87	0.87	0.97
4	0.88	0.87	0.96

* Rango espectral utilizados 7500-5500 cm^{-1} y en modo SNV.

7.3.3. Comparación de los métodos quimiométricos

La exploración de estos métodos tiene por objeto evaluar sus fortalezas y debilidades para la monitorización *in-line* de procesos de liofilización y su capacidad para diferenciar los cambios de configuración durante el proceso. Primero, discutiremos los resultados para cada método, tomando en cuenta su complejidad, es decir desde el menos complejo (univariante) hasta el mas complejo (multivariante).

Ya que las bandas NIR son difíciles de asignar debido a la superposición de estas y complicadas combinaciones de los modos de vibración, la monitorización de una sola banda sería arriesgada. Sin embargo, como se pudo observar (Figura 7.4), pudieron ser aisladas algunas bandas específicas para cada componente. Por esta razón, el promedio de $\bar{\nu}$ específicos (M_{ws}), ecuación 7.1, fue utilizado para monitorizar los cambios en cada componente durante los procesos de liofilización. Los $\bar{\nu}$ seleccionados fueron: para el fenofibrato 8910, 6028, 5940 y 5809 cm^{-1} ; para el manitol 6541, 6237, 5897 y 4678 cm^{-1} ; para el TBA 8427, 7247 y 6977 cm^{-1} y para el agua 6707 y 5099 cm^{-1} .

Los perfiles M_{ws} para el agua y el TBA, combinados con la T_p , por ejemplo para el experimento 3 (Figura 7.6a) muestra que los valores de M_{ws} se incrementaron como resultado de la cristalización de los solventes. Kasraian y DeLuca³¹ reportaron un diagrama de fases para una mezcla de TBA y agua a diferentes concentraciones de TBA. En

³¹ K. Kasraian, P.P. DeLuca, *Pharm. Res.* **12** (1995) 484-490.

nuestra formulación hay aproximadamente 40% v/v de TBA y cuando la T_p desciende hasta $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 minutos), un incremento en M_{ws} del TBA y de la T_p son observados, indicando que ha ocurrido la cristalización de la mezcla eutéctica de TBA-agua. Después, el TBA hidratado cristalizó a aproximadamente -11°C (20min).

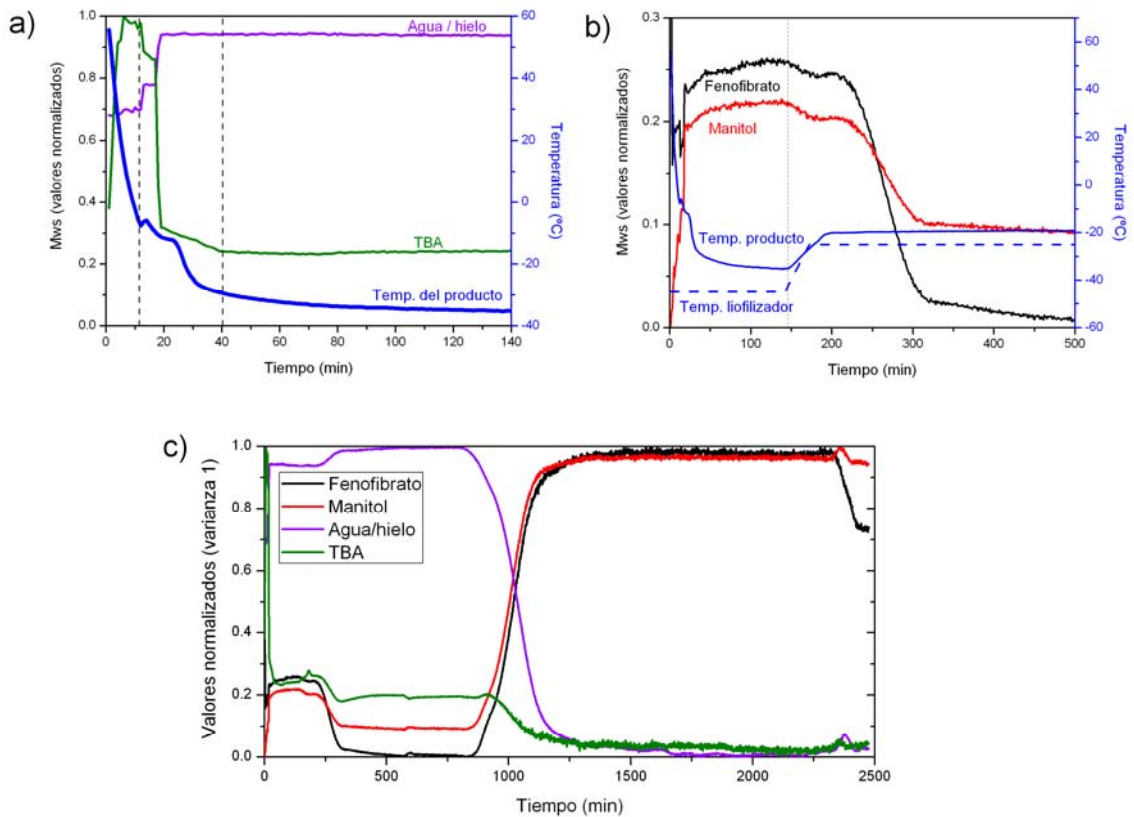


Figura 7.6. (a) Perfiles de M_{ws} del agua y el TBA para los primeros 140 minutos, combinado con el perfil de T_p . (b) perfiles de M_{ws} del fenofibrato y manitol para los primeros 500 minutos, combinado con los perfiles de T_s y T_p . (c) perfiles de M_{ws} para cada componente de la formulación durante el proceso completo (experimento 3).

Los puntos finales de cristalización para el TBA y el agua fueron observados a -12°C (24 min.) y -15°C (40 min.) respectivamente. Por otro lado, los perfiles M_{ws} de los solutos, en combinación con T_s y T_p (Figura 7.6b) muestran cuando la T_s es incrementada, la T_p se ve incrementada también. Note como la T_s aumenta (120 min) y M_{ws} comienza a disminuir a aproximadamente 210 min, indicando que la cristalización de los solutos ha ocurrido. El tiempo en el que la

cristalización del soluto parece haber terminado fue a los 450 min., a este momento las temperaturas del liofilizador y del producto son constantes. Una vista general de los perfiles M_{ws} durante el proceso completo (Figura 7.6c) muestra que los perfiles obtenidos son coherentes con los resultados esperados para solventes y solutos. Los tiempos de cristalización observados (Tabla 7.4) serán comparados con los obtenidos por los otros métodos mas adelante.

Por otro lado, se puede usar la estadística CorrCoef para supervisar los cambios durante el proceso. En la práctica, se incluye el espectro completo, por lo cual es considerado un método multivariante. Un gráfico de perfiles de CorrCoef de los primeros 100 minutos en el experimento 3 (Figura 7.7a) muestra que la cristalización exotérmica de los solventes fue observada entre los 12 y 30 minutos, de hecho la cristalización puede ser observada por un descenso súbito de los valores CoorCoef. Durante el proceso completo, se puede ver que después de que la sublimación comienza, los valores de CorrCoef del TBA se incrementaron y descendieron bruscamente. Una observación similar fue descrita en un estudio previo utilizando las intensidades de pico del TBA en espectroscopia Raman.³²

Como otro ejemplo, el perfil del CorrCoef del fenofibrato (Figura 7.7b) muestra el momento en el que la cristalización comienza, por ejemplo cuando la T_p aumenta, inmediatamente después de que la T_s se incrementa de -50 a -25°C . Los resultados de los tiempos de cristalización para el manitol y agua también fueron obtenidos y mostrados en la Tabla 7.4. En conclusión, los resultados fueron similares a los obtenidos utilizando M_{ws} y permitiendo identificar el tiempo de cristalización para cada componente.

El método multivariante de exploración más utilizado es sin duda el PCA, ya que este descompone la matriz espectral en variables latentes, haciendo mas sencilla la interpretación. Con el objeto de extraer la información del proceso, la monitorización de los scores (t_i) del PCA puede ser de utilidad. Un primer PCA fue calculado utilizando el rango

³² H. de Waard et al. *The AAPS Journal* (2010) DOI: 10.1208/s12248-010-9215-z.

espectral de 9126–8659 cm^{-1} , el cual proporciona información principalmente del fenofibrato y del TBA.

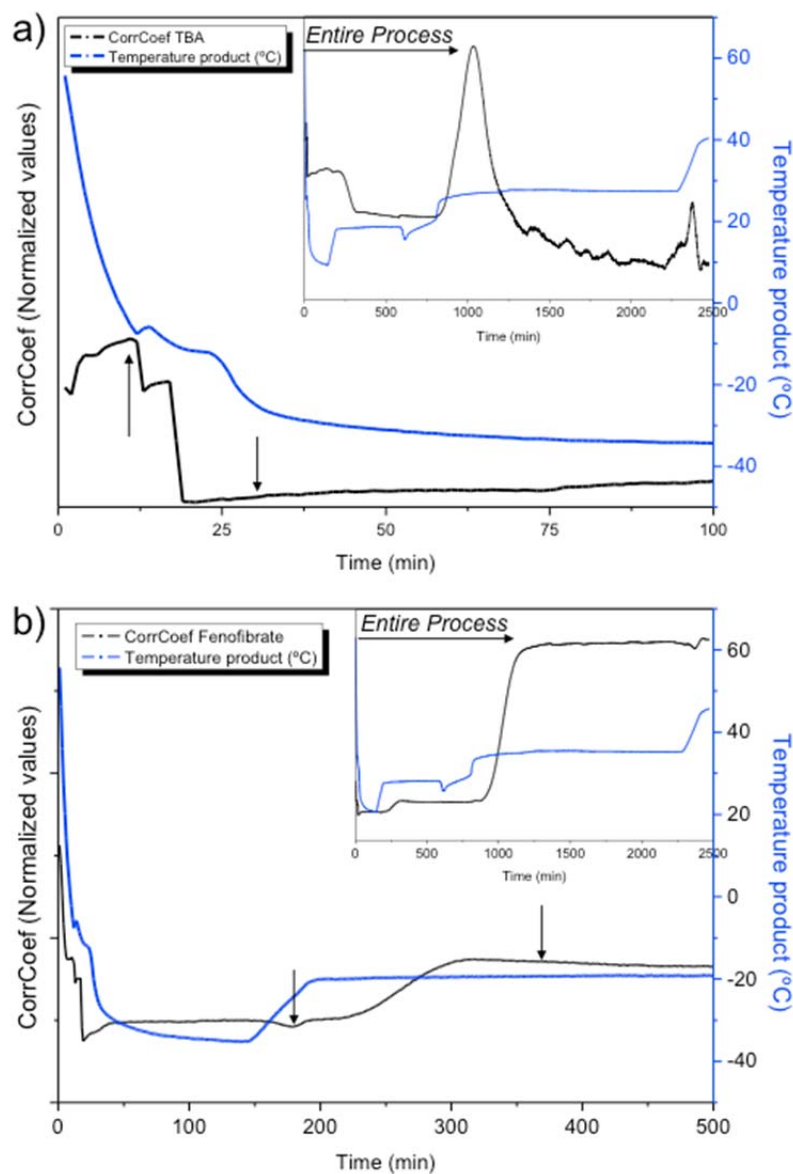


Figura 7.7. Perfiles de CorrCoef (experimento 3) vs. tiempo, (a) del TBA para los primeros 100 minutos y (b) primeros 500 minutos para el fenofibrato. El pretratamiento utilizado fue el SNV en el rango espectral completo.

El pretratamiento espectral empleado fue la primera derivada Savitzky-Golay con 41 puntos de ventana móvil. El loading para el PC1 explicó el 96% de la varianza y fue asociado al fenofibrato y el loading del PC2, el cual explicó el 3% de la varianza fue relacionado al TBA (no se

muestran los gráficos). Con lo cual, graficar los dos primeros scores, t_1 y t_2 , frente al tiempo del proceso (Figuras 7.8a y 7.8b) mostró que al inicio del congelado, los scores del TBA alcanzaron los mayores valores y después decrecieron, mientras los scores del fenofibrato se incrementaban. Otro, significativo cambio en los perfiles de los scores fue observado a los 11 – 43 minutos para el TBA y 213 – 441 minutos para el fenofibrato, estos cambios fueron relacionados al incremento de la T_p y por consecuencia a su cristalización.

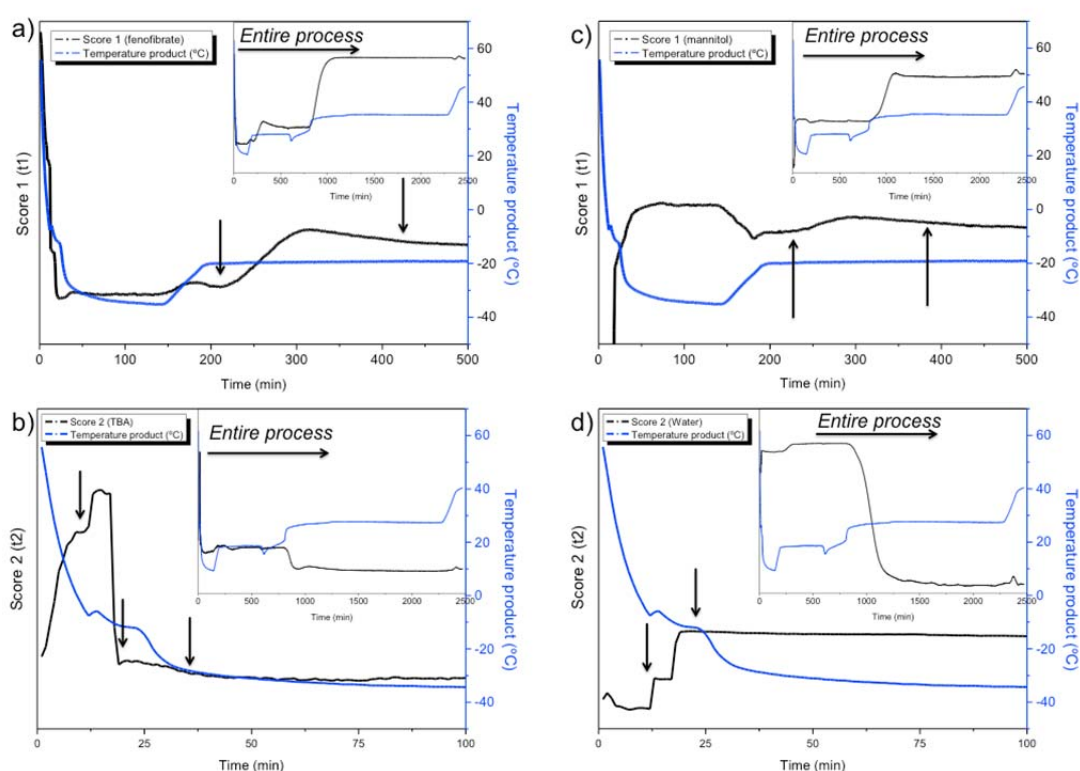


Figure 7.8. Perfiles de los dos primeros scores de PCA combinado con T_p . En el primer PCA se utilizó el rango espectral 9126 – 8659 cm^{-1} en modo 1^{era} derivada SG. (a) score 1, t_1 (Var. Expl. 96%) asociado al fenofibrato y (b) score 2, t_2 (Var. Expl. 2%) fue asociado al TBA. En el segundo PCA los rangos espectrales utilizados fueron 7108 – 6300 y 5384 – 4744 cm^{-1} en modo SNV. (c) score 1, t_1 (Var. Expl. 67%) fue relacionado al manitol y (d) score 2, t_2 (Var. Expl. 32%) fue asociado al agua.

Un segundo PCA fue calculado utilizando los rangos espectrales de 7108–6300 y 5384–4744 cm^{-1} , que se relacionan con las bandas del manitol y al agua respectivamente. El pre-tratamiento espectral utilizado fue el SNV en el rango espectral completo.

Tabla 7.4. Comparación de los tiempos de cristalización observados para cada uno de los tres métodos quimiométricos evaluados

Método	Componente	Proceso 1		Proceso 2		Proceso 3		Proceso 4	
		Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
Media de intensidades	Fenofibrato	246	445	264	320	219	421	191	300
	Manitol	248	450	263	425	225	422	202	302
	TBA	54	70	49	84	12	24	11	32
	Agua	59	81	61	84	17	39	13	33
CorrCoef	Fenofibrato	250	449	243	308	213	457	196	259
	Manitol	247	446	246	425	227	432	200	291
	TBA	59	70	49	87	12	20	12	31
	Agua	58	75	61	90	17	23	13	31
PCA	Fenofibrato	228	487	252	328	213	441	199	265
	Manitol	245	460	245	462	247	432	170	312
	TBA	50	78	48	72	11	43	15	23
	Agua	53	84	54	84	12	34	13	34
Rango de valores	Fenofibrato	228–250	445–487	243–264	308–328	213–219	421–457	191–199	259–300
	Manitol	245–248	446–474	245–263	425–462	225–247	422–432	170–202	291–312
	TBA	50–59	70–78	48–49	72–87	11–12	20–43	11–15	23–32
	Agua	53–59	75–84	54–61	84–90	12–17	23–39	13	31–34

El loading para el PC1, que explica el 67% de la varianza esta asociado al manitol, mientras que el loading del PC2 explicando el 32% de la varianza esta asociado al agua (no se muestran los gráficos). Un gráfico de scores versus el tiempo y combinado con el perfil de la T_p mostró, en una visión general, que a lo largo del proceso t_1 aumenta (Figura 7.8c), mientras t_2 decrece (Figura 7.8d). Al inicio del proceso, cuando la mezcla es aun liquida, los scores son mínimos para los solutos y máximos en la etapa del primer secado. Durante el congelado, los valores de los scores fueron máximos para los solventes, para después descender en el primer secado. Se observaron importantes cambios en los perfiles, los cuales fueron observados a 247 – 432 minutos para el manitol y 12 – 34 minutos para el agua. El repentino cambio en los valores de los scores fue asociado con cambios de T_p , indicando que la cristalización de los solventes y de los solutos ha comenzado.

Como se pudo observar, los tres métodos quimiométricos evaluados presentaron resultados muy similares en cuanto a la estimación de los tiempos de cristalización para cada componente (Tabla 7.4). En términos generales, los rangos de tiempo de cristalización fueron comparables a los obtenidos en un estudio previo con la misma formulación, en donde se monitorizó solamente la intensidad de pico Raman para cada componente.³³

Como se sabe, la espectroscopia NIR y Raman son técnicas espectroscópicas vibracionales, las cuales estudian las transiciones vibracionales de las moléculas y ambas medidas pueden ser adquiridas de forma muy rápida (segundos) y no destructiva. Además, ambas técnicas pueden ser complementarias, teniendo en cuenta sus diferencias en el tipo de actividad (cambios en la polarizabilidad en Raman y cambios en el momento dipolo en NIR),³⁴ por ejemplo, moléculas que producen muy buenas señales en el espectro NIR pueden producir señales débiles en el espectro Raman y vice versa. Ambos espectros, Raman y NIR, contienen información cuali- y cuantitativa

³³ H. de Waard, et al. *The AAPS Journal* (2010) DOI: 10.1208/s12248-010-9215-z.

³⁴ T. De Beer et al. *Int. J. Pharm.* **417** (2011) 32–47.

sobre la composición química y propiedades físicas de las muestras registradas, y las cuales aplicadas a la monitorización de procesos producen una enorme cantidad de datos espectrales a tratar, con lo cual es necesario recurrir a la quimiometría para explicar la variación en los datos y poder extraer información útil del proceso que lleve a su comprensión y optimización.

La diferencia principal entre nuestro estudio con NIR y el estudio previo con Raman³⁵ fue definitivamente el área de muestra irradiada, ya que las medidas Raman se realizaron por la parte superior del vial, es decir solo se irradió la superficie superior de la muestra; mientras que las medidas NIR se realizaron en la parte baja lateral del vial. Además, las mediciones de Raman no fueron afectadas por la altura, debido a que sólo se registró la superficie; en contraste, las mediciones NIR pudieron verse influenciadas por la altura, ya que se analizaron diferentes alturas del soluto cristalizado durante el proceso. En ambas técnicas vibracionales, se pudo identificar bandas características para cada componente, sin embargo, las bandas Raman son más estrechas y selectivas que en NIR. En cuanto a la energía de la radiación, en Raman generalmente puede ocurrir una descomposición térmica, ya que la irradiación en Raman es mucho más intensa que la irradiación en NIR, pudiendo producir calentamiento de la muestra, lo cual podría influir en los resultados.

Según nuestros resultados, todos los métodos quimiométricos empleados en este estudio demostraron que los solventes y solutos cristalizan en diferentes etapas del proceso de liofilización. Durante el paso de congelación sólo cristalizaron los solventes, haciendo que la solución sea más concentrada a medida que avanza la cristalización. Esta solución concentrada puede medirse fácilmente mediante la espectroscopia NIR en modo de reflectancia. En el paso de congelación todos los métodos empleados demostraron que los solutos no cristalizaron. De acuerdo a la velocidad de congelado, se observó que

³⁵ H. de Waard, et al. *The AAPS Journal* (2010) DOI: 10.1208/s12248-010-9215-z.

cuando el congelado se realiza rápidamente (experimentos 3 y 4), se forma un vidrio rígido, el cual no permite que cristalicen ni los solventes ni los solutos. Por otro lado, el congelado en rampa a 1°C/min fue suficiente para evitar que los solutos cristalicen durante la etapa de congelado. Después de 2 horas a -50°C, la T_s fue incrementada hasta -15 (o -25°C), produciéndose la cristalización de los solutos, todos los métodos evidenciaron que la cristalización de los solutos terminó mucho antes de que empiece la etapa del primer secado. Con respecto al primer secado, todos los métodos quimiométricos mostraron que los solventes sublimaron de forma rápida cuando la T_s fue mas baja (-25°C), independientemente de la velocidad de congelación empleada. Sin embargo, se observó que el contenido de humedad residual se vio incrementado en los productos terminados si la duración del segundo secado no es ajustada (experimentos 2 y 4).

En su conjunto la espectroscopia NIR y las técnicas quimiométricas proporcionaron información relevante sobre el proceso de liofilización de una mezcla multicomponente con un fuerte medio de hielo. Por el momento, la principal desventaja de las técnicas espectroscópicas para su aplicación en procesos industriales de liofilización es que sólo 1 vial puede ser controlado. No obstante, están apareciendo en el mercado mini espectrómetros portátiles NIR como resultado de la miniaturización de los sensores (tecnologías MEMS).³⁶ Por otro lado, existen en el mercado equipos NIR inalámbricos, basados también en tecnologías MEMS. La combinación de estas dos tecnologías podría solucionar el problema de la implementación de sondas NIR en procesos industriales en un futuro no muy lejano.

³⁶ www.jdsu.com/ProductLiterature/micronir1700-spectrometer-ds-co-ae.pdf

7.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

La idoneidad de la espectroscopia NIR fue evaluada satisfactoriamente para la monitorización no invasiva durante un proceso de liofilización de un sistema multicomponente. Incluso durante la etapa de congelación donde se esperaba que el hielo abrumara la señal en los espectros de los otros componentes.

Los métodos quimiométricos utilizados permitieron extraer información relevante sobre los cambios en la formulación durante el proceso de liofilización mediante medidas NIR *in-line*.

La estadística del CorrCoef permitió identificar la forma δ -manitol en el producto terminado. Sin embargo, los espectros NIR revelaron evidencia de la presencia del polimorfo hemihidratado en los experimentos 2 y 4 (ambos tuvieron una temperatura de -15°C), desafortunadamente, no se dispuso del espectro NIR para el compuesto puro manitol hemihidratado, y no se pudo realizar la confirmación.

La comparación de los resultados en términos de tiempo de cristalización para los tres métodos quimiométricos, promedio de número de onda (M_{ws}), coeficiente de correlación (CorrCoef) y análisis en componentes principales (PCA) fueron equivalentes. Los tiempos de cristalización fueron identificados debido a cambios en los perfiles de cada componente monitorizados.

Las medidas NIR mostraron que los solventes cristalizaron en la etapa de congelado y los solutos cuando la T_s es subida a -25° o -15°C (en la etapa de cristalización). Además, los experimentos demostraron que las variables de proceso estudiadas, velocidad de congelado y temperatura del liofilizador (T_s) tienen un impacto sobre el contenido final de humedad residual. Finalmente, estos cambios sutiles fueron reflejados en los métodos quimiométricos evaluados.

Capítulo 8

Bases de un nuevo criterio para evaluar la homogeneidad en imágenes hiperespectrales

8.1. INTRODUCCIÓN.....	243
8.2. EXPERIMENTAL	244
8.2.1. Muestras	244
8.2.2. Equipamiento.....	244
8.2.3. Proceso de mezclado y adquisición de las imágenes.....	245
8.2.4. Técnicas utilizadas.....	247
8.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	247
8.3.1. Pre-tratamiento de las imágenes y la estimación de las concentraciones de los componentes	248
8.3.2. Elección del tamaño de macropixel.....	250
8.3.3. Índices de mezclado para mezclas de dos componentes	251
8.3.4. Índices de mezclado para mezclas multicomponentes	255
8.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	259

Lista de abreviaciones

	Ingles	Castellano
CI	Chemical Imaging	Imagen quimica
H%	Homogeneity porcentaje	Porcentaje de homogeneidad
K	Key component	Componente clave
LED	Light-emitting diode	Diodo emisor de luz
M_L	Lacey index M	Indice M de Lacey
M_p	Poole index M	Indice M de Poole
MSI	Multispectral Image	Imagen multiespectral
PAT	Process Analytical Technology	Tecnología analítica de procesos
QbD	Quality by Design	Calidad por diseño
RGB	Red-Green-Blue	Rojo-verde-azul
S	Segregation index	Indice de segregación
WI	Wavelength Image	Image a una longitu de onda
χ^2	Chi-square	Chi cuadrado

La mezcla es un paso crítico en la producción de formulaciones farmacéuticas sólidas y semisólidas. La homogeneidad de la mezcla es esencial a fin de obtener productos de alta calidad y con un contenido uniforme. Todos los procesos de mezclado deben proporcionar una "mezcla perfecta", en la que todos los componentes se distribuyen uniformemente. En la práctica, esto es muy difícil, especialmente con mezclas de polvos, que pueden contener componentes ampliamente diferentes; el tipo de mezclador usado también puede afectar a la uniformidad del producto.

En este capítulo se describe la aplicación de los índices de mezclado para evaluar la homogeneidad de la distribución en imágenes. En primer lugar, se examina la viabilidad de la utilización de varios índices de mezclado y un nuevo parámetro, al cual hemos llamado "porcentaje homogeneidad" ($H\%$) para determinar el punto final de mezclado en procesos de mezcla. Para ello, se han utilizados dos sistemas de monitorización mediante imagen, (1) *at-line* y (2) en tiempo real y no invasivo. Para asegurar la repetibilidad de los procesos de mezclado, se utilizó un robot mezclador en miniatura, construido exclusivamente para los experimentos.

8.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de fabricación de formas farmacéuticas sólidas engloba diversas etapas, llamadas operaciones unitarias, por ejemplo mezclado, granulación, secado, compactación, lacado, etc). La iniciativa PAT¹ fomenta la determinación de atributos críticos de calidad (CQAs) en cada operación unitaria para asegurar la calidad de los productos finales, la cual depende del correcto desarrollo de cada operación unitaria. Uno de estos CQAs es la homogeneidad, siendo definida como la distribución uniforme del principio activo (API) entre muestras extraídas.²

La definición más común de una mezcla perfectamente aleatoria es aquella en que la probabilidad de encontrar una partícula de un constituyente de la mezcla es la misma para todos los puntos de la mezcla.³ La homogeneidad en las mezclas sólidas generalmente se evalúa en términos de índices de mezclado, que son medidas del grado de mezclado. Estos índices deben ser independientes de los procesos de mezclado y fácilmente interpretables.³ Una serie de índices han sido reportados en los últimos cincuenta años, la mayoría de los cuales son para mezclas de dos componentes y se basan en el análisis estadístico, principalmente en la desviación estándar o varianza de la composición entre muestras de la misma mezcla.⁴

La imagen química (CI) es una técnica emergente que utiliza la combinación de las técnicas de imagen y las espectroscópicas para extraer información fisicoquímica de las muestras. A pesar de la expansión de las técnicas de imagen, ningún criterio claro para la homogeneidad de la mezcla hasta la fecha ha sido establecido. Sin embargo, los criterios clásicos ampliamente probados (índices de

¹ U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, Rockville, 2004

² U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units— Stratified In-Process Dosage Units Sampling and Assessment, Rockville, 2003

³ L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970) 53–66

⁴ N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow, *Mixing in the process industries*, 2nd ed. ed., Butterworth-Heinemann, London, 1997.

mezclado), pueden proporcionar información sobre el estado de un proceso de mezclado de manera rápida y eficiente.

8.2. EXPERIMENTAL

8.2.1. Muestras

Para este estudio se utilizaron mezclas de oxido de silicio (SiO_2) de colores y con tres tamaños de partícula. El diámetro medio de las partículas pequeñas, medianas y grandes fueron 380, 600 y 2000 μm respectivamente y sus tamaños en área de píxeles fueron 26, 180 y 1000 píxeles respectivamente. Las mezclas binarias y ternarias fueron preparadas teniendo en cuenta el porcentaje en peso de cada componente.

8.2.2. Equipamiento

Con el objeto de examinar y comprender el proceso de mezclado mediante técnicas de imagen, así como para asegurar la repetibilidad en la mezcla, se utilizó un robot mezclador en miniatura, el cual estuvo controlado por MATLAB (MATLAB v. 7.9, The Matworks, Massachusetts, USA). El robot fue construido utilizando accesorios LEGO (Billund, Dinamarca) como los Mindstorms NXT 2.0.

Los montajes experimentales para la monitorización at-line (Montaje1) y en tiempo real y no invasiva (Montaje 2) para el registro de imágenes durante el proceso de mezclado se muestra esquemáticamente en la Figura 8.1.

En el Montaje 1 (Figura 8.1a), se registraron imágenes multiespectrales (MSI) utilizando una cámara VideometerLab (Videometer A/S, Hørsholm, Dinamarca). El sistema adquiere imágenes multiespectrales mediante iluminación estroboscópica rápida de los LEDs en hasta 18 diferentes longitudes de onda (de 430 a 970 nm con una resolución

espectral variable) y con una resolución espacial de $75 \times 75 \mu\text{m}$ por pixel. La resolución de la cámara fue de 1280×960 pixeles.

En el Montaje 2 (Figura 8.1b), la imágenes digitales fueron obtenidas mediante una cámara web convencional (Logitech International, Apples, Suiza), la cual fue posicionada verticalmente a una distancia de 5 cm de la muestra. La resolución de la cámara fue de 480×640 pixeles y la resolución espacial fue de $75 \times 75 \mu\text{m}$ por cada pixel. Debido a que el tamaño de las imágenes multiespectrales y RGB fue diferente; las imágenes originales se recortaron a 400×400 pixeles para cálculos.

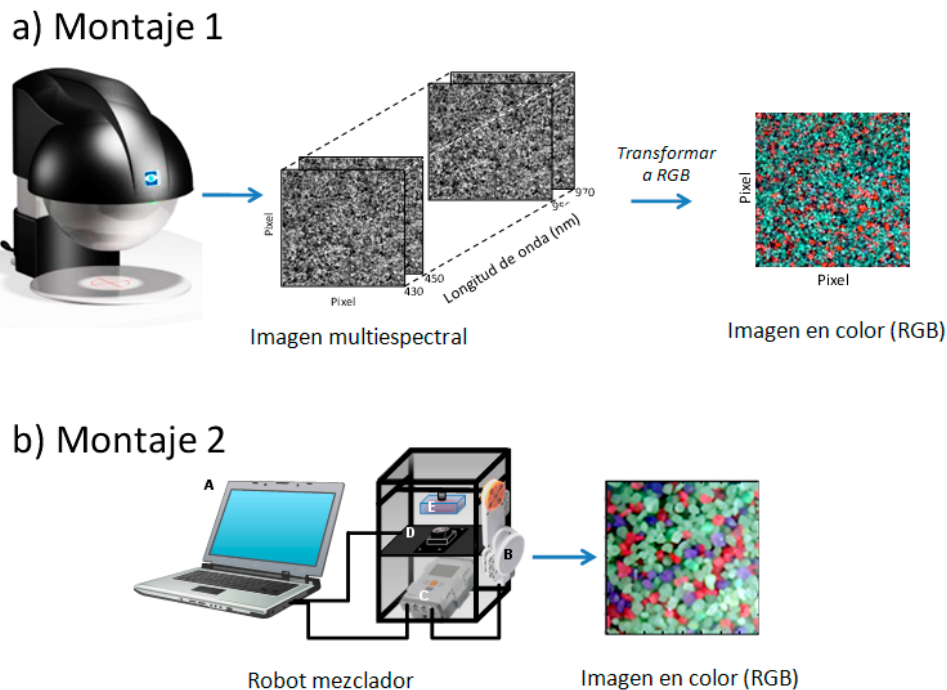


Figura 8.1. Diagrama de las dos configuraciones utilizadas para el registro de imágenes de los procesos de mezclado, a) Montaje 1, con una cámara multiespectral y b) Montaje 2, mediante un robot mezclador en miniatura. (A) Ordeador con MATLAB v 7.9 (The MatWorks, Massachusetts, USA), (B) Servo Motor interactivo y (C) NXT Intelligent Brick (Mindstorms NXT 2.0, Lego group, Dinamarca), (D) Webcam (Logitech International S.A., USA) y (E) un mezclador transparente para la muestra.

8.2.3. Proceso de mezclado y adquisición de las imágenes

Para llevar a cabo los procesos de mezclado, se utilizó un mezclador rectangular transparente con una capacidad total de 20 g. Para facilitar el movimiento de las partículas, el mezclador fue cargado al 75% de su

capacidad, es decir, con 15 g de muestra. Se realizaron un total de 10 experimentos, simulando procesos de mezclas binarios y ternarios, la velocidad de rotación utilizada para todos los experimentos fue de 180 rpm. Además, se utilizaron tres diferentes tamaños de partícula en las mezclas.

Respecto al Montaje 1, la estructura del robot mezclador no permite el registro de imágenes de forma no invasiva con la cámara VideometerLab, en consecuencia se ha decidido extraer la muestra manualmente. Considerando que retirar y volver a introducir la muestra del mezclador produce un efecto adicional de mezclado; sólo 40 imágenes fueron registradas de forma *at-line* y después de 3 rotaciones del mezclador durante el proceso de mezclado. En el Montaje 2, el robot mezclador se encargó de mezclar y registrar automáticamente y de forma no invasiva las imágenes digitales (RGB) de las muestras ternarias. Cada imagen RGB fue registrada después de 3 rotaciones del mezclador. Para cada proceso se registraron 100 imágenes digitales. El montaje y las condiciones para los procesos de mezclado son descritos en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Descripción y condiciones de los procesos de mezclado

Proceso	Tamaño de partícula ^a	Mezcla	Componente clave (%)	Adquisición de imagen ^b	Nº de imágenes adquiridas ^c	Tipo de imagen ^d
1	Pequeño	Binaria	30	1	40	A
2	Pequeño	Binaria	40	1	40	A
3	Medio	Binaria	10	1	40	A
4	Medio	Binaria	20	1	40	A
5	Medio	Binaria	40	1	40	A
6	Grande	Ternaria	20	2	100	B
7	Grande	Ternaria	45	2	100	B
8	Grande	Ternaria	20	2	100	B
9	Grande	Ternaria	20	2	100	B
10	Grande	Ternaria	50	2	100	B

Todos los procesos fueron realizados a 180 RPM

^aPequeño = 26; medio = 180 y grande = 1000 pixeles por partícula

^b *at-line* (1), No invasivo (2)

^c imágenes adquiridas durante un proceso entero

^d Multiespectral (A), RGB (B)

8.2.4. Técnicas utilizadas

Las técnicas de imagen utilizadas en este estudio han sido descritas en el capítulo 2 (Quimiometría), por lo cual no entraremos en detalle en este capítulo y sólo las nombraremos. Estas técnicas fueron: el análisis por macropíxel, el clustering con K-means y los índices de mezclado, dentro de los cuales, el índice de Lacey (M_L), de Poole (M_P) y el de segregación (S).

8.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La metodología general seguida en este estudio es resumida de forma esquemática en la Figura 8.2.

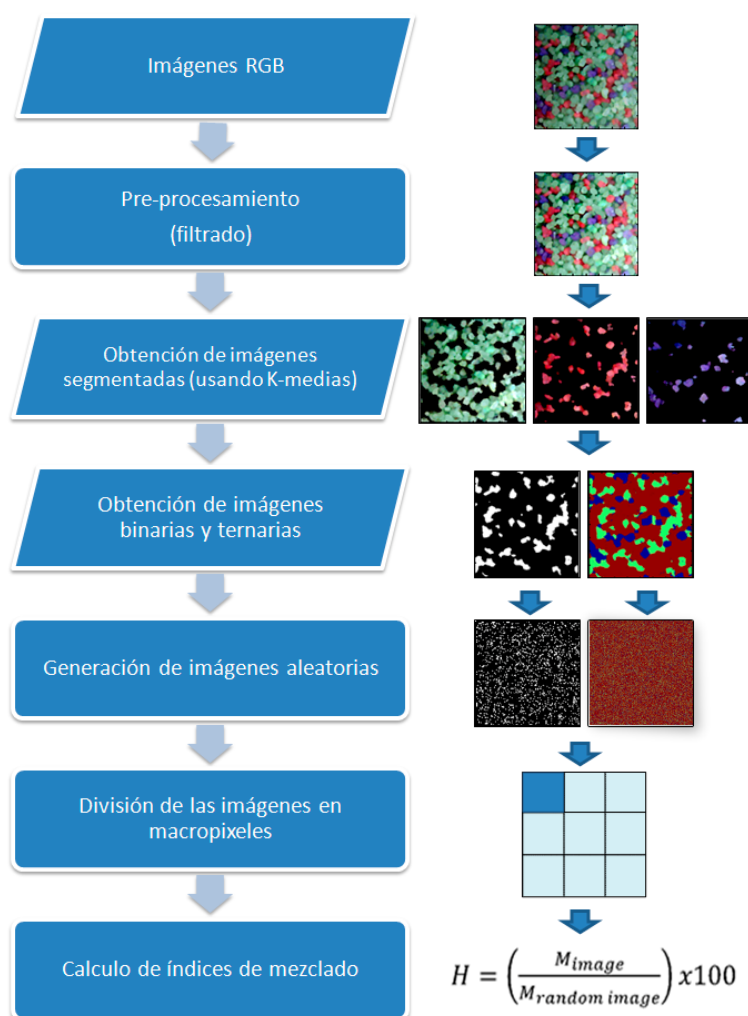


Figura 8.2. Resumen de los pasos para determinar la homogeneidad en imágenes.

8.3.1. Pre-tratamiento de las imágenes y la estimación de las concentraciones de los componentes

En las imágenes multispectrales, se pueden utilizar las imágenes en escala de intensidades (WI) a longitudes de onda específicas, por ejemplo en la Figura 8.3 se muestra que las partículas rojas, componente de interés (K), fueron correctamente diferenciadas a 700nm (WI_{700}). En la misma figura se muestran también los espectros de los componentes puros y de las tres mezclas binarias (espectro medio) a diferentes concentraciones del componente K . Las imágenes fueron filtradas y normalizadas, es decir la escala de intensidades fue establecida en el rango de 0 a 1.

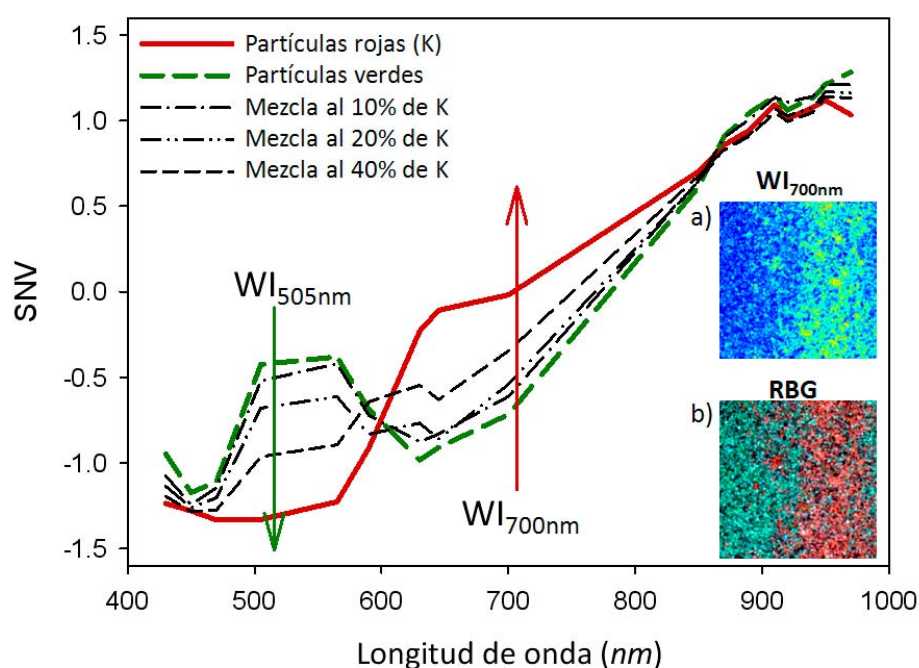


Figura 8.3. Espectros promedio de mezclas binarias (procesos n° 3, 4 y 5) y de los componentes puros rojo (K) y verde. a) imagen a una longitud de onda específica para el componente K (WI_{700}) y b) Imagen RGB obtenida a partir de las MSI. Las imágenes fueron registradas después de 6 revoluciones de un proceso al 40% del componente K.

Las imágenes RGB (Figura 8.3b) fueron obtenidas a partir de las imágenes MSI por combinación de las correspondientes longitudes de onda para los colores primarios rojo ($\lambda_r=630nm$), verde ($\lambda_g=505nm$) y

azul ($\lambda_b=470\text{nm}$). Posteriormente, se aplicó el algoritmo de K-means a las imágenes RGB para clasificar los píxeles (un clúster para cada componente de las mezclas); finalmente se obtuvieron imágenes segmentadas para cada componente (como se muestra en la Figura 8.2). La relación entre el número de píxeles por cada grupo y el número total de píxeles de la imagen nos permitió estimar las concentraciones de cada componente. La estimación de estas concentraciones se muestra en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Estimación de las concentraciones (%) durante el proceso de mezclado por medio de segmentación de imágenes

Proceso	Concentración teórica K-E1-E2	Etapas del proceso de mezclado								
		Inicio (L1)			Mitad (L2)			Final (L3)		
		K	E1	E2	K	E1	E2	K	E1	E2
1	30-70	89.5	10.5	-	29.7	70.3	-	28.5	71.5	-
2	40-60	90.2	9.8	-	35.8	64.2	-	37.3	62.7	-
3	10-90	33.4	66.6	-	12.2	87.8	-	12.4	87.6	-
4	20-80	32.7	67.3	-	15.7	84.3	-	20.9	79.1	-
5	40-60	23.1	76.9	-	46.1	53.9	-	36.4	63.6	-
6	20-75-05	58.4	4.1	37.4	22.3	73.2	4.5	21.8	73.4	4.8
7	45-40-15	41.5	13.6	45.0	43.9	39.5	16.6	45.8	37.7	16.5
8	20-65-15	60.6	21.8	17.6	22.8	62.5	14.6	23.7	58.4	17.6
9	20-70-10	29.1	8.9	61.8	22.6	62.6	14.5	17.4	71.5	11.0
10	50-40-10	48.1	39.5	12.0	50.9	34.2	14.7	50.8	33.9	15.1

K=componente clave; E1 y E2 = excipientes

Como puede verse en los resultados, las concentraciones estuvieron muy cerca de los valores teóricos (especialmente al final del proceso). Estos valores serán utilizados más adelante en el enfoque del chi-cuadrado para calcular los índices de mezclado en mezclas multicomponentes. Finalmente, las imágenes RGB fueron binarizadas y ternarizadas, utilizando los resultados de los análisis de K-means.

8.3.2. Elección del tamaño de macropixel

Antes de dividir una imagen en macropixels, es necesario establecer el tamaño óptimo del macropixel que permita discriminar con precisión imágenes homogéneas y no homogéneas. Para este fin, se dividieron las imágenes binarias obtenidas en macropixeles cuadrados ($n \times n$) no solapables. Las varianzas y los índices de mezclado de tres imágenes fueron calculados y representados gráficamente en función del tamaño de macropixel. La Figura 8.4 muestra el criterio utilizado para seleccionar el tamaño del macropixel (M_s) para tres procesos de mezclado envolviendo diferentes tamaños de partícula (procesos 1, 4 y 9) y la aplicación del índice de Lacey (M_L) y varianzas (σ^2) entre macropixeles.

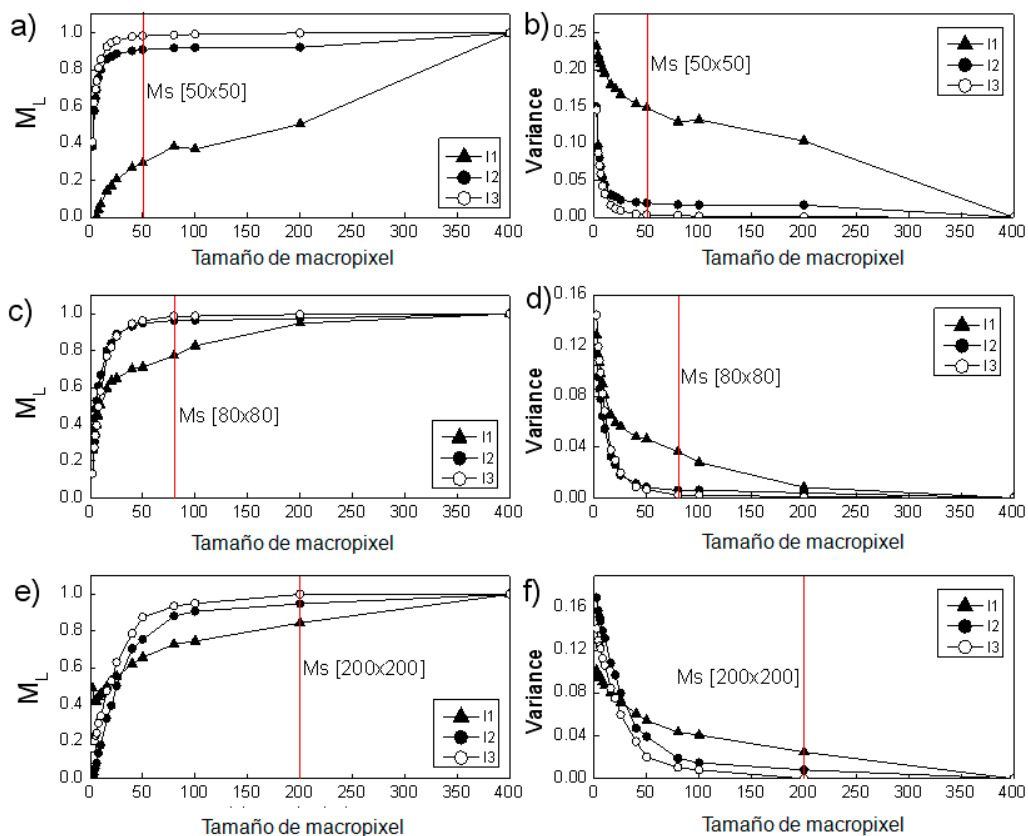


Figura 8.4. Criterio para la elección del tamaño de macropixel (M_s) óptimo en los procesos de mezclado envolviendo diferentes tamaños de partículas. a) Índice de Lacey (M_L) y b) varianza (σ^2) respectivamente versus el M_s para el proceso 1 (tamaño de partículas pequeñas), c) M_L y d) σ^2 respectivamente versus el M_s para el proceso 4 (tamaño de partícula medio), y finalmente e) M_L y f) σ^2 respectivamente versus el M_s para el proceso 9 (tamaño de partícula grande). I1=inicio, I2=mitad y I3= final de proceso de mezclado.

Como se puede apreciar, cada gráfico comprende tres imágenes binarias obtenidas al inicio, I_1 (muestra no homogénea), a la mitad (I_2), y al final del proceso de mezclado, I_3 (muestra cercana a la homogeneidad). El final del proceso de mezclado se determinó inmediatamente después de 40 y 100 imágenes para los experimentos *at-line* y no invasivos respectivamente. Un valor de unidad de M_L corresponde a una mezcla perfectamente aleatoria y un valor cercano a cero corresponde a una mezcla no homogénea. Como se puede observar en las figuras 8.4a, c y e, los valores de M_L para I_1 fueron significativamente diferentes de I_2 y I_3 (valores cercanos a 1), mostrando que el grado de homogeneidad se incrementa con la evolución del proceso de mezclado; esto indica que el índice M_L discrimina correctamente la etapas del proceso, es decir el grado de homogeneidad. La varianza (Figuras 8.4b, d, y f) debe ser cercano a cero tanto como sea posible. Como se observa la varianza para I_1 decrece durante el proceso de mezclado conforme el tamaño de macropíxel aumenta. El tamaño óptimo de macropíxel identificado depende del tamaño de partícula; con lo cual, las partículas pequeñas requirieron un macropíxel de 50×50 píxeles, las de tamaño intermedio 80×80 píxeles y las partículas mas grandes 200×200 píxeles.

Se obtuvieron resultados similares con M_P y S índices (no se muestran los gráficos). Un macropíxel muy grande no discrimina correctamente entre muestras homogéneas y heterogéneas en términos de M_L y en varianza.

8.3.3. Índices de mezclado para mezclas de dos componentes

Se calcularon los índices de mezclado para todos los experimentos a partir de las imágenes binarizadas. Cada cálculo se realizó utilizando el tamaño óptimo de macropíxel para cada tamaño de partícula. Las imágenes de mezclas ternarias (procesos 6–10) fueron transformadas en imágenes “pseudo-binarias”, donde los píxeles correspondiente al componente K fueron igual a 1 y se asumió el resto como excipientes (valor de píxeles igual a 0).

Con el objeto de estimar los índices de mezclado (M_L , M_P y S), se obtuvieron las correspondientes imágenes aleatorias (Irdn), a partir de imágenes reales. Las Irdn se obtuvieron por triplicado para dar una estimación robusta de la desviación estándar.

El único índice que comparó las desviaciones estándar de una imagen con las de su respectiva imagen aleatoria fue índice de Poole (capítulo 2). Como se mencionó anteriormente, uno de nuestros objetivos fue expresar la homogeneidad relativa de una imagen, comparándola con su imagen aleatoria. A esta relación la hemos llamado “porcentaje de homogeneidad” ($H\%$), el cual puede proporcionar un criterio cuantitativo sobre la homogeneidad de una imagen. Los resultados de los índices de mezclado y $H\%$ al inicio, mitad y al final de los procesos de mezclado se muestran en la Tabla 8.3. Note como los valores de M_L y M_P se incrementaron durante el proceso, mientras el S decreció.

Los valores de $H\%$ fueron utilizados para expresar la homogeneidad de las imágenes, este valor puede ser calculado para imágenes binarias e imágenes a escala de intensidades específicas para cada longitud de onda (WI_{700nm}), donde el componente K absorbe, permitiendo la diferenciación de los dos componentes de la mezcla. Como se puede ver en la figura 8.5a, utilizando $H\%_{Lacey}$, la homogeneidad fue alcanzada antes para las imágenes WI_{700nm} que para las imágenes binarizadas. Por otro lado, para $H\%_{Poole}$, ambas imágenes se comportaron de manera similar. Por lo tanto, $H\%_{Lacey}$ parece no ser apropiada para imágenes a escala de intensidades, mientras que $H\%_{Poole}$ fue apropiado para ambas imágenes. Una conclusión similar fue obtenida para $H\%_{Lacey}$ y $H\%_{Poole}$ con partículas de tamaño medio (Figura 8.5b). Además, para las partículas pequeñas, $H\%_{Lacey}$ sólo fue útil con imágenes binarias, mientras que $H\%_{Poole}$ pudo emplearse con ambos tipos de imágenes, sea cual sea el tamaño de partícula.

El efecto del tamaño de partícula sobre $H\%_{Poole}$ y $H\%_{Lacey}$ fue evaluado utilizando concentraciones similares de componente K (40–45%). Como se ve en la Figura 8.5a, $H\%_{Lacey}$ fue cercano al 100% después

Tabla 8.3. Índices de homogeneidad para todos los procesos de mezclado utilizado imágenes binarizadas

Etapa	Indices	Procesos de mezclado									
		Partículas pequeñas		Partículas medias			Partículas grandes				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inicio	Lacey (M_L)	0.29	0.59	0.83	0.93	0.64	0.54	0.66	0.48	0.85	0.06
	$H\%_{Lacey}$	29.4	58.9	83.0	93.2	63.7	54.4	65.6	47.9	84.5	5.6
	Poole (M_P)	0.54	0.68	0.96	0.97	0.75	0.42	0.60	0.85	0.65	0.38
	$H\%_{Poole}$	54.1	68.2	96.1	97.4	74.8	42.3	60.2	85.0	65.0	37.7
	Segregación (S)	0.71	0.41	0.17	0.07	0.36	1.54	0.34	0.52	0.15	1.06
Mitad	Lacey (M_L)	0.91	0.97	0.99	0.96	0.98	0.99	0.99	0.98	0.95	0.97
	$H\%_{Lacey}$	90.8	96.6	98.5	96.3	97.8	98.8	99.1	98.0	94.8	97.3
	Poole (M_P)	0.94	0.98	0.99	0.96	0.99	0.99	1.00	0.99	0.97	0.99
	$H\%_{Poole}$	94.4	98.1	98.7	95.8	98.9	99.1	99.6	99.1	97.4	99.0
	Segregación (S)	0.09	0.03	0.01	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.05	0.03
Final	Lacey (M_L)	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	1.00	0.97	1.00	0.99
	$H\%_{Lacey}$	97.7	97.7	98.6	98.6	98.2	99.2	99.6	96.6	99.9	98.6
	Poole (M_P)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00	0.98	1.00	0.99
	$H\%_{Poole}$	98.5	98.7	98.7	98.9	99.0	99.4	99.8	98.4	99.9	99.5
	Segregación (S)	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.03	0.00	0.01
Componente clave (%)		30	40	10	20	40	20	40	20	20	50

de 45 rotaciones para los tamaños de partícula pequeño y medio, pero para partículas grandes la homogeneidad fue alcanzada después de 63 rotaciones. Por otro lado, $H\%_{Poole}$ fue idéntico para los tres tamaños de partícula después de 45 rotaciones.

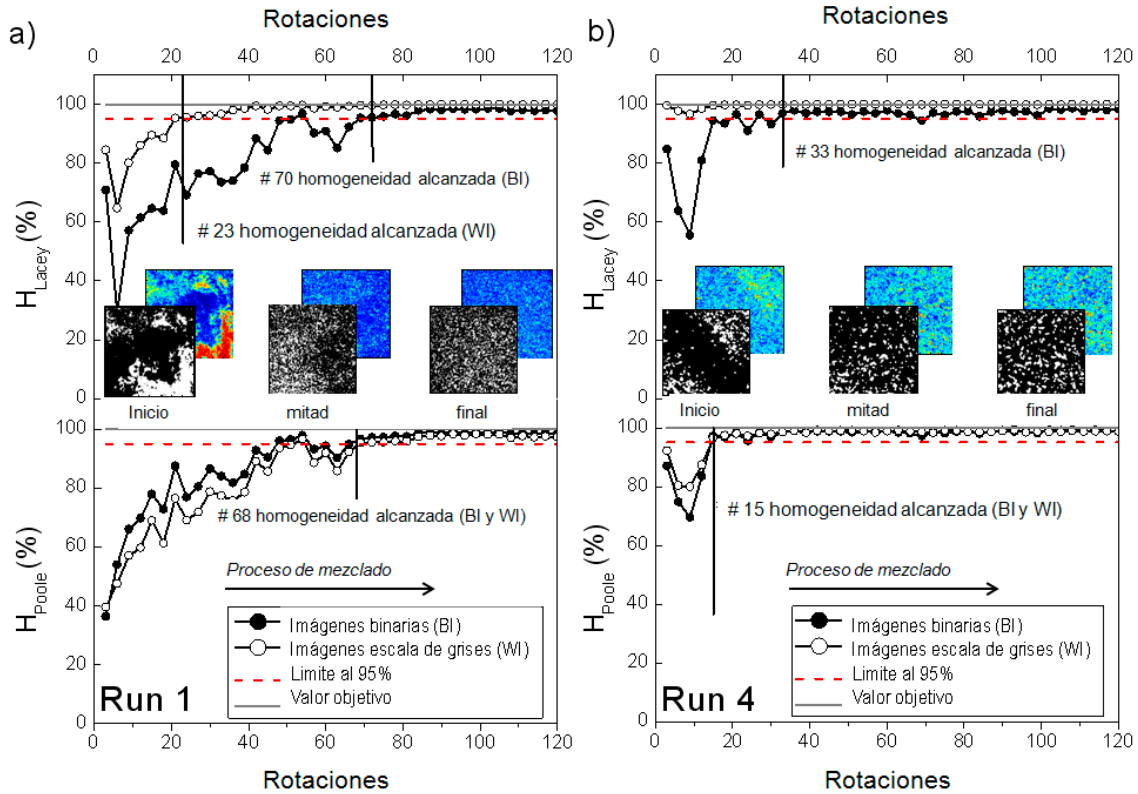


Figura 8.5. Porcentajes de homogeneidad ($H\%_{Lacey}$ y $H\%_{Poole}$) utilizando imagines binarias y en escala de grises: a) procesos de mezclado con tamaño de particular pequeño (proceso 1) y b) proceso de mezclado con tamaño medio de partícula (proceso 4).

Se evaluó el efecto del contenido del componente K sobre los índices de mezclado por la observación de procesos de mezclado con tres concentraciones (10, 20 y 40%) y usando un tamaño medio similar de partícula. En todos los casos utilizamos un Ms de 80×80 pixeles. La Figura 8.6b muestra como $H\%_{Lacey}$ y $H\%_{Poole}$ se mantuvieron constantes después de la rotación 30 para el 40% de componente K (en círculos blancos), mientras al 20% del componente K (circulo negro) se

mantuvieron constantes después de la rotación 70; estos cambios probablemente se debieron a la variabilidad en el proceso o a la desviación natural en el $H\%_{Poolle}$. Por lo tanto, la concentración del componente K no tuvo efecto importante sobre $H\%_{Lacey}$ o $H\%_{Poolle}$ en mezclas con un tamaño de partícula similar.

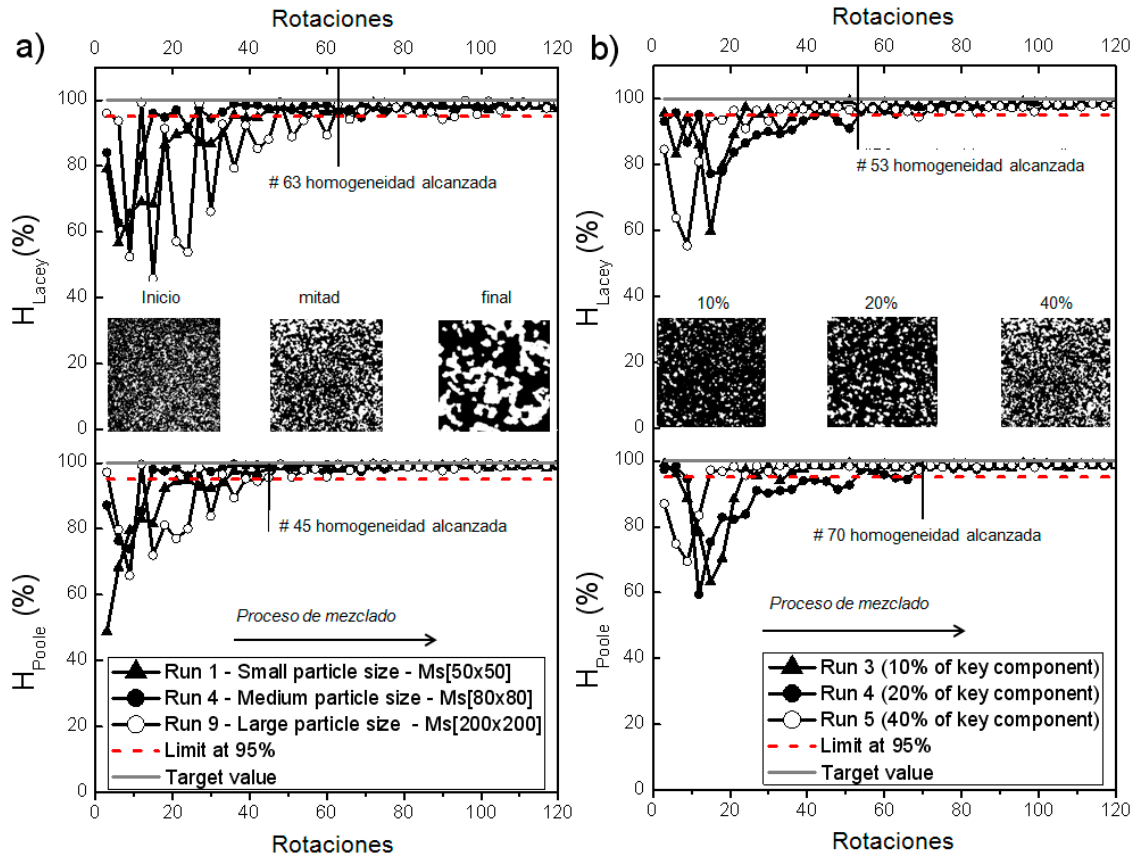


Figura 8.6. Comparación de los valores de $H\%$ durante el proceso de mezclado de acuerdo al: a) tamaño de partícula en los procesos con una concentración similar del componente K y b) mismo tamaño de partícula y diferente concentración del componente K.

8.3.4. Índices de mezclado para mezclas multicomponentes

Los índices descritos anteriormente han sido ampliamente utilizados en mezclas binarias; Sin embargo, es mucho más complicado calcular las varianzas teóricas en mezclas multicomponentes, es decir ternarias o de orden superior.⁵ Gayle et al.⁶ utilizaron el método del chi-cuadrado para

⁵ K. Stange, *Chem. Ing. Tech.* 35 (1963) 580–582.

calcular el índice de segregación en mezclas ternarias (para más detalle ver capítulo 2). Nosotros hemos aplicado este criterio a nuestras mezclas ternarias y en comparación con las concentraciones estimadas (utilizando K-means) de cada componente dentro de cada macropíxel con sus homólogos teóricas. La concentración total para cada macropíxel fue fijada al 100%, por consecuencia cuando las concentraciones de dos componentes son determinadas, la del tercer componente puede ser determinada por diferencia. Por lo tanto, cada macropíxel contribuye 2 grados de libertad, donde para un total de 4 macropíxeles de [200 x 200] sería 2 x 4, i.e. $\chi_r^2 = 8$. El valor del chi-cuadrado al inicio del proceso de mezclado (cero revoluciones) es por consecuencia 100 x 8 ($\chi_o^2 = 800$). A modo de ejemplo, la Tabla 8.4 muestra el cálculo del chi cuadrado para la última imagen del proceso 9.

Tabla 8.4. Ejemplo del cálculo del Chi-cuadrado para la imagen n° 100 del proceso 9.

Macropíxel [200x200]	Concentración ^a			χ^2
	K (%)	E1 (%)	E2 (%)	
M1	18	71	11	0.38
M2	20	66	15	2.47
M3	18	70	11	0.34
M4	17	73	10	0.69
			Total	3.88

^a Concentración teórica para este proceso; K = 20, E1 = 70 and E2 = 10%

Miyanami⁷ sugirió analizar las mezclas ternarias como si fueran binarias (es decir, mezclas del componente K y el resto de los excipientes), con el fin de facilitar el cálculo de índices de mezclado. La Tabla 8.5 muestra los resultados de la aplicación de los índices de

⁶ J. Gayle, O. Lacey, J. Gary, *Eng. Chem.* 50 (1958) 1279–1282

⁷ K. Miyanami, Mixing, in: K. Gotoh, H. Masuda, K. Higashitani (Eds.) Powder Technology Handbook, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 609–625.

mezclado a imágenes ternarizadas, note como durante el proceso de mezclado M_x y $H\%_{Lacey}$ tienden a la unidad y a 100% respectivamente; llegando a valores por encima del umbral de 0,95 y el 95% a partir de la mitad del proceso. Además, S_x logra un nivel cercano a cero conforme avanza el proceso de mezclado. Hemos observado que valor de Chi cuadrado para una imagen completa y su correspondiente aleatoria fue el mismo, porque es el resultado de la suma del cuadrado de cada componente en cada macropixel; por esta razón, no pudimos utilizar el índice de Poole con Chi-cuadrado.

Tabla 8.5. Índices de mezclado calculados a partir de valores del Chi cuadrado para mezclas ternarias utilizando imágenes ternarias.

Etapa	Indices	Procesos de mezcla				
		6	7	8	9	10
Inicio	Lacey (M_x)	0.21	0.34	0.20	0.83	0.28
	$H\%_{Lacey}$	36.5	42.7	43.8	92.0	32.1
	Segregación (S_x)	1.21	0.66	0.80	0.17	0.72
Mitad	Lacey (M_x)	0.94	0.98	0.99	0.97	0.99
	$H\%_{Lacey}$	98.5	97.5	98.2	97.3	98.6
	Segregación (S_x)	0.06	0.02	0.01	0.03	0.01
Final	Lacey (M_x)	0.99	0.98	0.98	1.01	0.99
	$H\%_{Lacey}$	98.6	97.3	98.3	99.8	99.4
	Segregación (S_x)	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01

Un ANOVA de un factor demostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de $H\%_{Lacey}$ provenientes de imágenes pseudo-binarizadas y las imágenes ternarizadas (procesos 6-10). La Figura 8.7 muestra los valores de $H\%_{Lacey}$ para el proceso 8, como se puede observar, la principal diferencia entre los valores de $H\%_{Lacey}$ fue al inicio del proceso de mezclado, donde existe mayor variación para las imágenes pseudo-binarizadas que para las imágenes ternarizadas. Note como los valores de $H\%_{Lacey}$ para las imágenes ternarizadas excedieron el umbral del 95% aproximadamente en la rotación 60, mientras que para las imágenes pseudo-binarizadas fue en la rotación 120.

Curiosamente, parece que el criterio más adecuado para mezclas multicomponentes fue utilizando el chi cuadrado, debido a que se consideran las concentraciones de cada componente. Sin embargo, es necesario contar con un valor de referencia, por ejemplo, en nuestro caso utilizamos las concentraciones estimadas utilizando K-means, pero lamentablemente en la práctica esto puede no ser siempre posible.

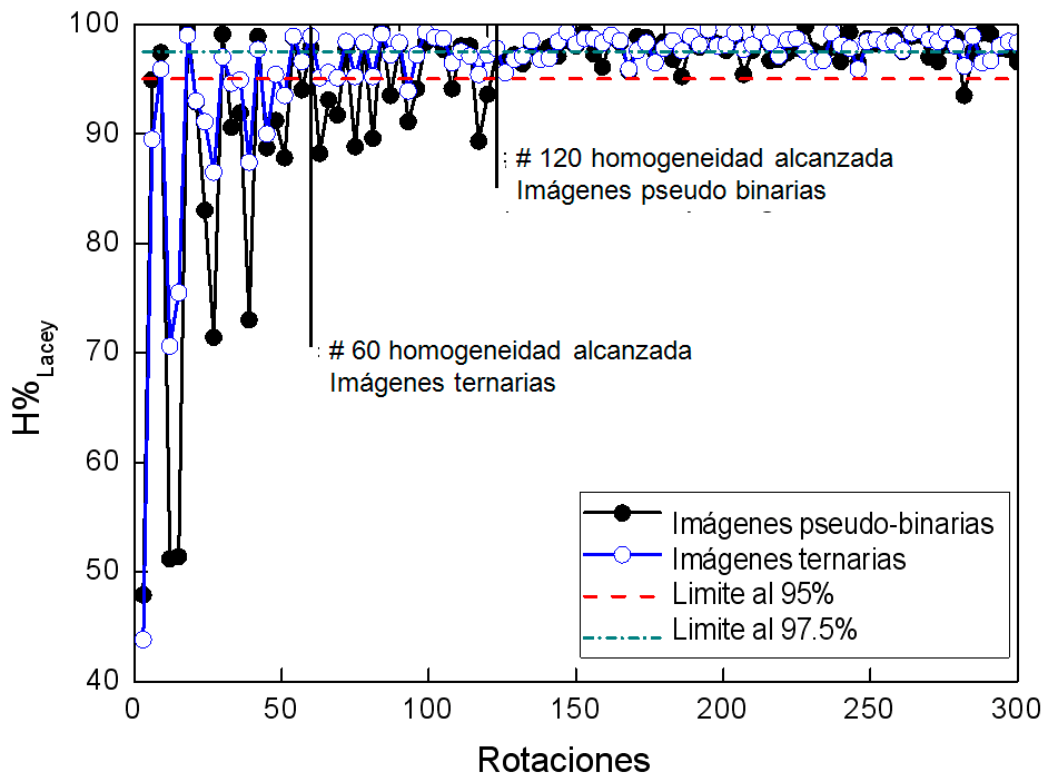


Figura 8.7. Comparación de los valores de $H\%_{Lacey}$ para el proceso 8 empleando imágenes pseudo-binarias y ternarias

En conclusión, los índices de mezclado adaptados a imagen pudieron ser utilizados en imágenes binarizadas como un criterio cualitativo para evaluar la homogeneidad en las imágenes. Es recomendable observar en paralelo, por ejemplo, el índice Poole o $H\%_{Poole}$ de una imagen a una longitud de onda específica (WI_λ); con estos dos valores es posible obtener una buena aproximación para la homogeneidad en la imagen.

8.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

En este capítulo, hemos establecido una forma de determinar el tamaño óptimo máximo de macropíxel (M_s) para el análisis de imagen en mezclas, a partir de variaciones del índice de Lacey (M_L) y de la varianza con respecto al M_s . Hemos encontrado que partículas con una superficie alrededor de 26, 180 y 1000 píxeles requieren un M_s óptimo de 50 x 50, 80 x 80 y 200 x 200 respectivamente.

El índice propuesto, “porcentaje de homogeneidad $H\%$ ”, fue utilizado con éxito para monitorizar un proceso de mezclado. El índice de $H\%_{Lacey}$ resultó no ser adecuado para imágenes en escala de grises, pero el $H\%_{Poole}$ demostró ser apropiado para imágenes en escala de grises e imágenes binarizadas.

Además, $H\%_{Lacey}$ no se vio afectada por la concentración del componente principal, siempre y cuando se mantenga constante el tamaño de partícula.

Los mejores resultados para mezclas multicomponentes, en nuestro caso ternaria, fueron obtenidos utilizando la estadística del chi cuadrado. El índice $H\%$ proporcionó un criterio objetivo para evaluar la homogeneidad en imágenes, no viéndose afectado por la concentración de los componentes y el tamaño de partícula; esta información se obtiene por comparación directa con de la imagen real con su contraparte aleatoria.

Capítulo 9

Aplicación de índices de homogeneidad en el estudio de la homogeneidad de las formas farmacéuticas sólidas

9.1. INTRODUCCIÓN.....	269
9.2. EXPERIMENTAL	270
9.2.1. Muestras	270
9.2.2. Instrumentación	271
9.2.3. Programas para el tratamiento de datos.....	273
9.2.4. Procesamiento de datos	273
9.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	273
9.3.1. En imágenes binarias.....	274
9.3.2. Elección del tamaño óptimo de macropíxel	275
9.3.3. Método 1. Cálculo de M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de desviaciones estándar espectrales.....	280
9.3.4. Método 2. Cálculo del M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de CorrCoef.....	283
9.3.5. Método 3. Cálculo de M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de mapa de concentraciones	284
9.3.6. Método 4. Cálculo de M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de imágenes binarias	286
9.3.7. Grado de homogeneidad.....	286
9.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO	289

Lista de abreviaciones

	Inglés	Castellano
AA	Ascorbic acid	Ac. Ascórbico
API	Active pharmaceutical ingredient	Principio activo
ASA	Acetylsalicylic acid	Ac. Acetil salicílico
CorrCoef	Correlation coefficient	Coefficiente de correlación
FDA	Food and drugs administration	Administración de drogas y alimentos
GMSD	Global mean Standard deviation	Desviación estándar media total
GPA	Grade point average	Punto medio de calificación
H%_{Poole}	Homogeneity porcentaje for Poole index	Porcentaje de homogeneidad para Poole
MCC	Microcrystalline Cellulose	Celulosa microcristalina
MCR-ALS	Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares	Resolución Multivariante de Curvas - Mínimos Cuadrados Alternados
MeanSD	Mean Standard deviation	Desviación estándar media
M_p	Poole index M	Índice M de Poole
M_s	Macropixel size	Tamaño de macropíxel
NIR-CI	Near Infrared Chemical Imaging	Imagen química en infrarrojo cercano
PLS	Partial least square regression	Regresión por mínimos cuadrados parciales
RSD	Relative standard deviation	Desviación estándar relativa
SD	Standard deviation	Desviación estándar
SNV	Standar Normal Variate	Varianza normal estándar

El objetivo del estudio presentado en este capítulo fue confirmar que el criterio desarrollado y expuesto en el capítulo 8 podría aplicarse a las NIR-CI provenientes de formas farmacéuticas sólidas, como polvos o productos terminados (tabletas recubiertas, sin recubrir y efervescentes) utilizando el análisis por macropíxeles en combinación con los índices M_P y $H\%_{Pool}$. Para este fin, hemos utilizado matrices en dos dimensiones, $M \times N$, (imágenes binarizadas y mapa de concentraciones) o en tres dimensiones, $M \times N \times \lambda$ (imágenes hiperespectrales NIR). Además, se procuró establecer un criterio preciso para calificar la homogeneidad de la imagen, basándose únicamente en la información espacial y espectral, proporcionada por la propia imagen.

9.1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de análisis de la espectroscopia vibracional y el poder de visualización de las técnicas de imagen pueden ser combinadas para obtener una descripción más completa sobre la concentración y distribución de los ingredientes en formulaciones farmacéuticas sólidas. En imagen química (CI) el término “homogeneidad” es usualmente utilizado cuando la concentración de API es casi la misma en cada píxel, es decir la distribución es muy estrecha en sí.¹ La herramienta más comúnmente utilizada para evaluar esta homogeneidad es el histograma de los mapas de concentración. Sin embargo, el histograma no puede dar información sobre la distribución espacial de los analitos, ya que el histograma de una imagen real y el de su imagen con una distribución completamente aleatoria es el mismo.^{1,2} Este problema a sido abordado por muchos grupos de investigación,³⁻⁸ sin encontrar respuestas de como evaluar la distribución espacial en imágenes. Recientemente, un interesante intento para evaluar la distribución espacial en Raman-mapping fue propuesto por Vajna et al.⁹ El parámetro estadístico que se utilizó en su trabajo fue la desviación estándar relativa (RSD) entre los valores de cada punto en el mapa, sin embargo este método no es apropiado si se forman grandes aglomerados de ingredientes dentro de una imagen. En el presente capítulo nos centraremos en la distribución espacial en imágenes e intención ofrecemos una solución al problema.

¹ J.M. Amigo, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 93–109.

² J.G. Rosas, M. Blanco, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2012) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.037>.

³ M.B. Lopes et al., *Anal. Chem.* 82 (2010) 1462–1469.

⁴ J.M. Amigo, C. Ravn, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76–82.

⁵ W. Li et al., *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 369–373.

⁶ M.L. Hamad et al., *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3390–3401.

⁷ C. Gendrin et al., *Talanta* 73 (2007) 733–741.

⁸ T. Puchert et al., *Eur. J. Pharm. And Biopharm.* 78 (2011) 117–124.

⁹ B. Vajna et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 30–38.

9.2. EXPERIMENTAL

9.2.1. Muestras

El conjunto de muestras incluyeron seis comprimidos y una mezcla en polvo. Cuatro comprimidos (nº. 1–4) fueron tabletas Comerciales conteniendo ácido acetil salicílico (ASA) como API, estas imágenes fueron cortesía de Cruz et al.¹⁰ El contenido nominal de ASA de las tabletas fue calculado dividiendo el contenido nominal por el peso de cada una. La Tabla 9.1 resume las características de cada tableta utilizada en este estudio. Como excipientes mayoritarios, la tableta 1 contiene celulosa microcristalina (MCC), y la tableta 2 manitol. Los comprimidos 3 y 4 son tabletas efervescentes y contienen ácido ascórbico como segundo API y otros excipientes (ácido cítrico, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio anhidro).

Tabla 9.1. Descripción de las formas farmacéuticas sólidas utilizadas en este estudio

Muestra	Nombre comercial	API	API (%) Nominal	API (%) Calculado
Tableta 1	Bayer 500	ASA	82	81.6
Tableta 2	AAS 500	ASA	58	54.9
Tableta 3 (efervescente)	Dolmen	ASA – AA	15**	16.4
Tableta 4 (efervescente)	Aspirina C	ASA – AA	12**	12.9
Tableta 5	Tableta 5*	API*	35	34.5
Tableta 6 (Núcleo)	Tableta 6*	API*	25	22.7
Mezcla en polvo	Finasteride	Finasteride	3.6	3.7

ASA= Ac. Acetilsalicílico, AA=Ac. Ascorbico

* El nombre de la tableta y API no pueden ser divulgados por cláusulas de confidencialidad.

** Concentraciones para ASA

La tableta 5 no presenta lacado, esta imagen fue cortesía de Palou et al.¹¹ El nombre del API no puede ser divulgado debido a que el producto se encuentra en etapa de desarrollo, no obstante su composición fue de 35% API y 65% excipientes (ver Tabla 9.1).

¹⁰ J. Cruz, M. Blanco, *Talanta* 80 (2009) 473–478.

¹¹ A. Palou et al. *J. Pharm. Anal.* 2 (2012) 90–97.

La tableta 6 fue una tableta lacada (con recubrimiento), la cual también se encuentra en etapa de desarrollo, con lo cual solo podemos divulgar el contenido del API, el cual fue de 25%.

La última muestra fue una mezcla en polvo, cuya imagen fue adquirida a partir de una muestra extraída al final de un proceso de mezclado y asumiendo que la mezcla estaba correctamente homogenizada, esta imagen fue cortesía de Blanco et al.¹² El API utilizado en la mezcla fue Finasterida a una concentración del 3.6%, siendo la lactosa el excipiente mayoritario.

Note como el contenido nominal de API de las formulaciones estudiadas abarcó un amplio rango de 3 a 82%.

9.2.2. Instrumentación

Las imágenes hiperespectrales de las superficies de las tabletas 1–4 y las mezclas en polvo fueron obtenidas en modo de reflectancia utilizando un espectrómetro NIR-CI Think Spectrally Roda-25 (Think Spectrally, Valencia, España), provisto de un detector HgCdTe cubriendo un rango espectral de 1000 a 2400 nm. El equipo tiene una resolución espectral de 7 nm y una resolución espacial de 100 × 100 µm por pixel. El tiempo de adquisición de cada imagen fue alrededor de 2 min. Con el fin de obtener imágenes con el menor ruido posible, cuatro lámparas halógenas fueron colocadas en un ángulo de 45° alrededor de la muestra. Antes de registrar las imágenes, el instrumento fue calibrado con seis estándares (FOSS AP-0200 NIR) cubriendo un rango de reflectancia de 99% a 0.2%.

Las imágenes hiperespectrales para las tabletas 5 y 6 fueron adquiridas con una cámara hiperespectral SyNIRgy (Malvern, UK). La cámara está equipada con un detector InSb. Las muestras se colocaron en la placa y se iluminaron con lámparas de halógeno dispuestas en ángulos apropiados alrededor de la placa, la distancia de la lente fue ajustada

¹² M. Blanco, R. Cueva, J. Cruz. *Anal. Methods*, (2012). DOI: 10.1039/C2AY25379H

según el tamaño del objeto. Las imágenes obtenidas tienen una resolución espectral de 10 nm y una resolución espacial de $40 \times 40 \mu\text{m}$. La adquisición de las imágenes en modo reflectancia a lo largo del rango espectral tomó unos 3 min. Antes de registrar las imágenes para una muestra S, se registró el fondo B (una placa de cerámica de referencia del 99% de reflectancia) y una referencia oscura D (un espejo). La imagen para la muestra S, fue convertida en una matriz de datos en reflectancia, R, utilizando la ecuación $R = (S - D)/(B - D)$. Este cálculo fue hecho en cada píxel de cada imagen. Los datos así obtenidos fueron luego convertidos a unidades de absorbancia. Mayor detalle sobre la configuración de estas dos cámaras hiperespectrales NIR puede ser encontrado en la bibliografía.^{13,14}

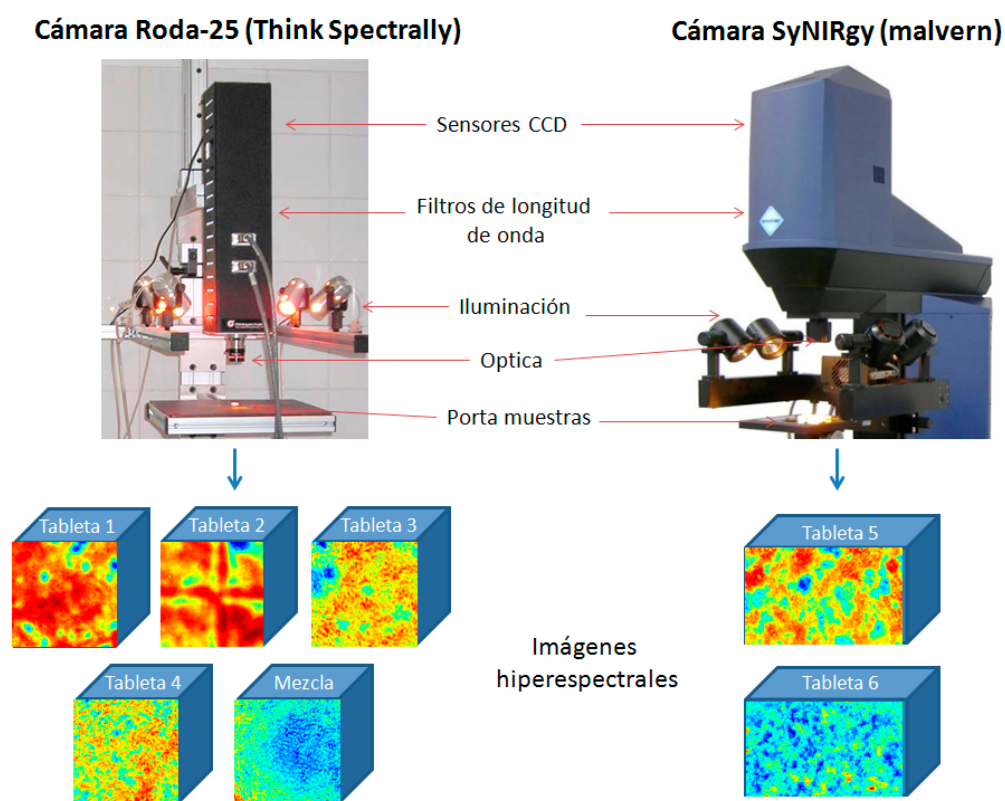


Figura 9.1. Cámaras hiperespectrales utilizadas para en el estudio y las muestras registradas con cada una.

¹³ C. Cairos, Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo, Tesis doctoral, UAB, 2009.

¹⁴ J. Cruz, Desarrollo de nuevas metodologías de espectroscopia NIR en aplicaciones industriales. Estudio y aplicación de técnicas de imagen química (NIR-CI), Tesis doctoral, UAB, 2010.

9.2.3. Programas para el tratamiento de datos

Los índices de homogeneidad fueron calculados utilizando funciones y scripts propios desarrollados en Matlab 7.1 (The Matworks, Massachusetts). Los tratamientos espectrales fueron aplicados utilizando la PLS-Toolbox 6.0 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA). Las imágenes hiperespectrales fueron analizadas con los programas MCR-ALS¹⁵ e ISys 5.0 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

9.2.4. Procesamiento de datos

Antes de la aplicación de cualquier tratamiento espectral o algoritmo para extraer la información necesaria, el cubo de datos $M \times N \times \lambda$ (donde M y N representan las dimensiones espaciales y λ denota la información espectral) fue desdoblado en una matriz bidimensional para poder aplicar correctamente los tratamientos y algoritmos. En este trabajo, dos pre-tratamientos espectrales fueron utilizados, la varianza normal estándar (SNV) y el suavizado Savitzky–Golay con una ventana móvil de 11-puntos y ajustado a un polinomio de segundo grado. Estos tratamientos fueron seguidos por la aplicación de los algoritmos. Teniendo un espectro por cada pixel en cada imagen, nos permitió utilizar MCR-ALS y PLS para calcular las concentraciones de API. Las concentraciones predichas por los modelos fueron utilizadas para obtener los mapas de concentraciones, donde cada pixel representa una concentración de API obtenida a partir del espectro del respectivo pixel.

9.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se afirmó en el capítulo 8, el éxito en la utilización de los índices de mezclado depende del tipo de imagen utilizada para el análisis. El índice que se vio menos afectado por factores como la concentración de API o el tamaño de partícula fue el índice de Poole, M_P , por lo cual fue el índice que se utilizó en este capítulo.

¹⁵ J. Jaumot et al., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101–110.

La falta de métodos que permitan establecer cuando la distribución del API en una imagen es heterogénea, nos llevó a realizar varias pruebas basadas en análisis de macropíxel¹⁶ en combinación con M_{Pool} y $H\%_{Pool}$. Como se muestra a continuación, el procedimiento utilizado para calcular el M_P fue adaptado a diferentes tipos de superficies incluyendo imágenes binarias, mapas de concentración y de correlación. Sin embargo, no solamente fue aplicado a matrices en dos dimensiones ($M \times N$), sino también al cubo tridimensional de las imágenes hiperespectrales ($M \times N \times \lambda$).

9.3.1. En imágenes binarias

Las imágenes binarias se obtuvieron aplicando los siguientes tratamientos:

- (a) Las imágenes hiperespectrales ($M \times N \times \lambda$) fueron desdobladas a matrices bidimensionales ($M \times N, \lambda$) y sujetas a un suavizado Savitzky – Golay con 11 puntos de ventana y ajustado a un polinomio de segundo grado, seguido por un SNV.
- (b) Las imágenes desdobladas pretratadas ($M \times N, \lambda$) fueron reconvertidas en matrices tridimensionales ($M \times N \times \lambda$) y algunas imágenes ($M \times N$), a longitudes de onda específicas, fueron seleccionadas; estas imágenes son donde el API i/o excipientes mayoritarios presentaron máxima absorción.
- (c) Estas imágenes fueron utilizadas para obtener imágenes en color RGB (ver Figura 9.2). Las imágenes RGB para las tabletas 3 y 4 fueron obtenidas a partir de la absorbancia de los dos APIs, ASA y del ácido ascórbico. En el caso de la mezcla en polvo no fue posible obtener imágenes RGB, debido a la baja concentración del API (3.6%) y la ausencia de picos característicos bien definidos para el mismo, que estaban ocultos por las bandas de los excipientes más concentrados.

¹⁶ M.L. Hamad et al., *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3390–3401.

(d) Los píxeles de las imágenes RGB fueron agrupados en dos clústeres (uno para el API y el otro para los excipientes) utilizando el algoritmo de K-means (ver capítulo 2), estos clústeres fueron convertidos en imágenes binarias, en donde todos los píxeles correspondientes al API y excipientes se les asignó un valor de 1 y 0 respectivamente. En la Figura 9.2, el API y los excipientes están representados por el blanco y negro respectivamente. Las imágenes binarias resultantes fueron utilizadas para calcular M_P y $H\%_{Poole}$.

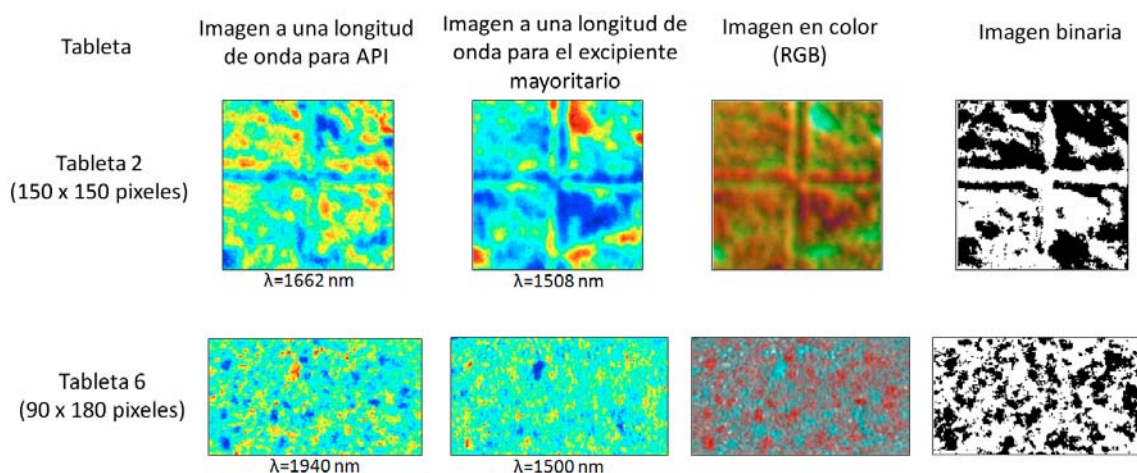


Figura 9.2. Obtención de imágenes binarias a partir de imágenes RGB, las cuales fueron obtenidas por concatenación de imágenes a longitudes de onda específicas (I_λ) para el API y excipientes mayoritarios. En las imágenes binarias el API y excipientes mayoritarios están en blanco y negro respectivamente.

9.3.2. Elección del tamaño óptimo de macropíxel

Una vez que se obtuvieron las imágenes binarias, el siguiente paso fue elegir un tamaño de macropíxel adecuado para el análisis. Los macropíxeles deben de ser de un tamaño que permita obtener información útil sobre la heterogeneidad de la superficie de la imagen, es decir, lo suficientemente pequeño como para evitar la homogeneidad total pero lo suficientemente grande como para evitar la heterogeneidad total. En el capítulo 8, se demostró que un gráfico de M_P contra el

tamaño de macropíxel y utilizando un umbral de 0.95 puede ser altamente recomendable para establecer el mejor tamaño de macropíxel para nuestros propósitos; así, un tamaño de macropíxel dando como resultado un valor de M_P que sobrepase el umbral sería indicativo de una distribución homogénea y por lo tanto no proporcionaría ninguna información útil sobre la heterogeneidad. Por lo tanto, un tamaño de macropíxel cercano al valor del umbral debe ser adecuado para nuestros análisis de imagen.

Con la finalidad de encontrar un rango óptimo de tamaños de macropíxeles para evaluar la homogeneidad en imágenes, la Figura 9.3 muestra los perfiles de M_P contra el tamaño del macropíxel para la imagen binaria para la tableta 4 y su correspondiente imagen aleatoria. El criterio aplicado debe recoger los límites inferior y superior, permitiendo establecer la homogeneidad entre macropíxeles. El límite inferior fue el tamaño de macropíxel de la imagen aleatoria por debajo del cual la imagen será siempre heterogénea ($M_p < 0.95$), en nuestro caso fue de [5x5]. El límite superior fue el tamaño de macropíxel por encima del cual la imagen aparecerá siempre homogénea ($M_p > 0.95$), en nuestro ejemplo fue [50 x 50]. El tamaño óptimo de macropíxel estará dentro de estos dos límites y su elección dependerá de la exigencia del analista para evaluar la homogeneidad en la imagen.

Para este estudio hemos evaluado dos tamaños de macropíxel dentro del rango óptimo, [30 x 30] y [50 x 50]. Se utilizó un procedimiento idéntico con las otras tabletas de aspirina (resultados no mostrados). Para las tabletas 5 y 6, el tamaño máximo aceptable de macropíxel fue de [45x45], mientras que el mínimo fue también de [5 x 5], estas imágenes fueron 90 × 180 píxeles.

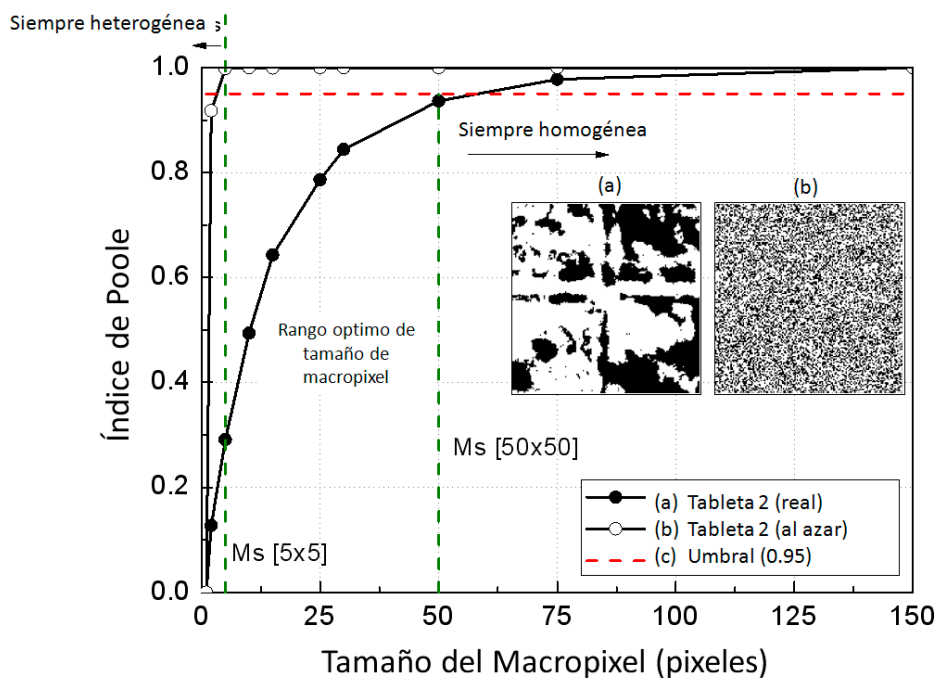


Figura 9.3. Perfil del índice de Poole (M_{Poole}) contra el tamaño de macropíxel. Criterio para la elección del tamaño óptimo de macropíxel en imágenes binarias.

Finalmente, el tamaño de macropíxel utilizado para la mezcla en polvo fue de $[50 \times 50]$, el tamaño de la imagen total fue 150×150 píxeles. Como puede verse, hemos optado por utilizar los tamaños de macropíxel que permitan dividir las imágenes de forma exacta, es decir sin macropíxeles superpuestos o solapados. Definitivamente, el tamaño de la imagen limita el número de macropíxeles no solapados y se recomienda elegir imágenes con tamaños que permitan su división en el mayor número de macropíxeles posible.

En Cruz et al.¹⁷ se utilizó MCR-ALS para predecir las concentraciones de ASA en las tabletas 1–4. Hemos utilizado esos mapas de concentraciones para confirmar que la elección del tamaño de macropíxel fue la adecuada. Con la finalidad de evaluar la distribución del contenido de API, se dividieron los mapas de concentraciones en macropíxeles de $[30 \times 30]$ y $[50 \times 50]$ para las tabletas 1–4 y la mezcla

¹⁷ J. Cruz, M. Blanco, *Talanta* 80 (2009) 473–478

METODOLOGIA Y DISCUSION DE RESULTADOS

en polvo. Para las tabletas 5 y 6 fueron $[30 \times 30]$ y $[45 \times 45]$ respectivamente. El contenido de los macropixeles fue utilizado para calcular el promedio de las concentraciones y la desviación estándar.

La Figura 9.4 muestra los mapas de concentraciones para las tabletas 1–4 divididos teniendo en cuenta el tamaño del macropixel. Además, también se muestran los histogramas de la concentración del API, este histograma no es un resultado del análisis por macropixel. El mismo procedimiento utilizado para las tabletas 5 y 6 se muestra en la Figura 9.5. Como puede verse, cada macropixel fue enumerado de tal manera que facilite la identificación de la zona donde la concentración de API superó un umbral de aceptación.

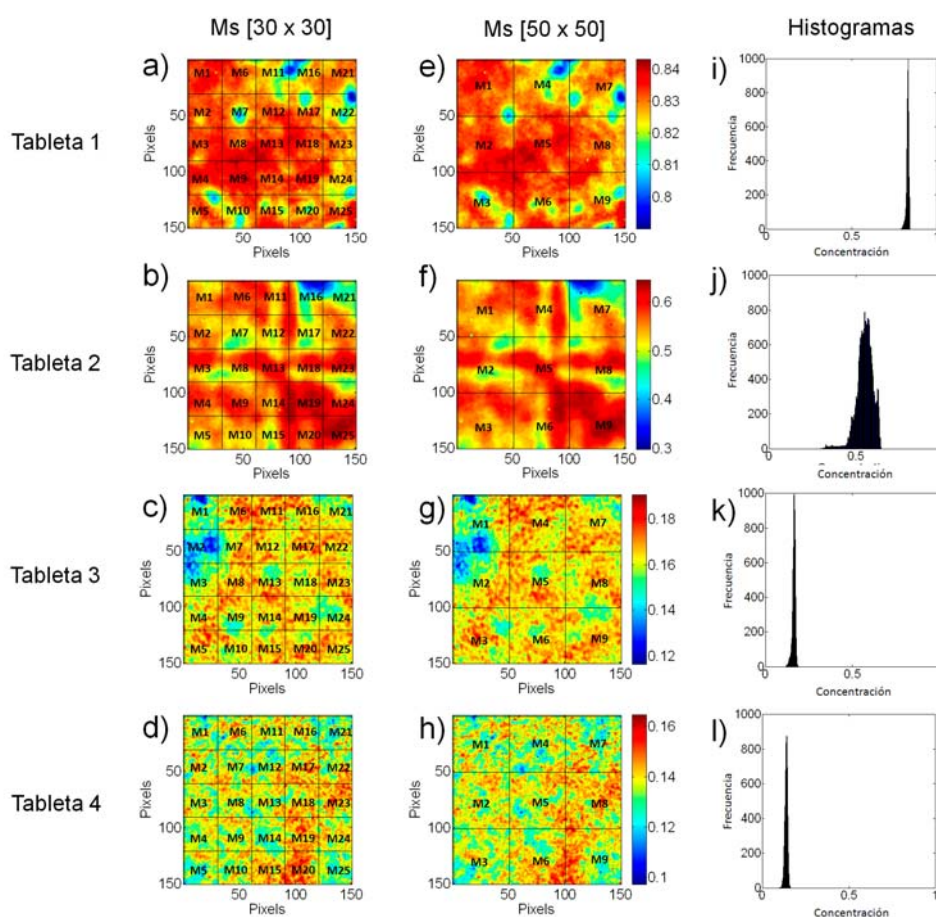


Figura 9.4. Tamaños de macropixel (Ms) basados en los mapas de concentraciones del ASA en tabletas comerciales de aspirina. a-b) Tableta 1-4 con un Ms de $[30 \times 30]$, e-h) con un Ms de $[50 \times 50]$ y finalmente i-l) son los histogramas de las concentraciones para cada tableta.

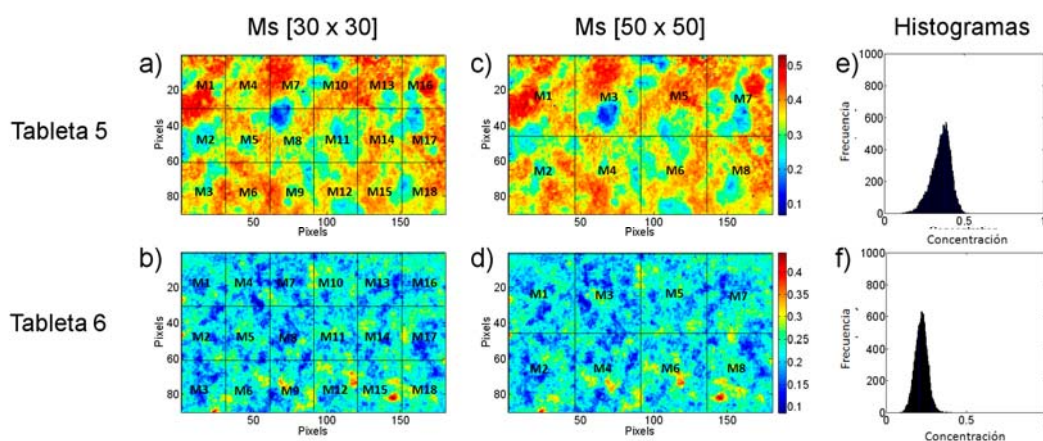


Figura 9.5. Tamaño de macropíxel (Ms) basado en los mapas de concentraciones. a) Tableta 5 (sin recubrimiento) y b) tableta 6 (con recubrimiento) con un Ms de [30x30], c) y d) Tableta 5 y 6 con un Ms de [50x50]. También se muestran los histogramas de concentraciones por cada comprimido.

La Tabla 9.2 muestra los rangos de aceptación para todas las imágenes. La elección del Ms depende de varios factores, incluyendo la ausencia de valores atípicos o desviación estándar relativa (RSD) superior al 5 % (la FDA recomienda utilizar la RSD para evaluar la homogeneidad en mezclas en polvo¹⁸). Si se cumplen ambas condiciones, entonces el Ms utilizado es correcto. El único macropíxel que estuvo fuera de los límites de aceptación ($3 \times \text{SD}$) fue el n° 2 para la tableta 3 (M2 [30 × 30] en la figura 9.3c). Como se puede ver para la tableta 3, todos los valores de RSD obtenidos con un Ms de [50 × 50], excepto para tableta 2, fueron inferiores al 5%. Además, la tableta 2 presenta un amplio rango de aceptación comparado a las otras, lo que sugiere una falta de homogeneidad y se puede evidenciar por su histograma apenas uniforme en la figura 9.4b.

Basados en estos resultados, hemos seleccionado un Ms de [50 × 50] para las tabletas 1–4 y para la mezcla en polvo, y uno de [45 × 45] para

¹⁸ U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units– Stratified In-Process Dosage Units Sampling and Assessment, Rockville, 2003

las tabletas 5 y 6. Estos tamaños son consistentes con los seleccionados de la gráfica de M_p vs. M_s de la Figura 9.3. Por lo tanto, todos los resultados que a continuación se muestran refieren a estos tamaños de macropixel.

Tabla 9.2. Estadísticas de las concentraciones de API dentro de los macropíxeles como un criterio para escoger el máximo M_s

Muestra	Tamaño de Macropíxel	Nº de macropíxeles	Media \pm 3*SD	RSD (%)
Tableta 1	30x30	25	82.94 \pm 1.3	0.53
	50x50	9	82.94 \pm 1.1	0.44
Tableta 2	30x30	25	55.37 \pm 10.1	6.09
	50x50	9	55.37 \pm 8.7	5.25
Tableta 3	30x30	25	16.25 \pm 1.8	3.65
	50x50	9	16.25 \pm 1.3	2.71
Tableta 4	30x30	25	13.74 \pm 1.1	2.64
	50x50	9	13.74 \pm 0.7	1.71
Tableta 5	30x30	18	35.29 \pm 6.7	6.32
	45x45	8	35.29 \pm 3.0	2.87
Tableta 6	30x30	18	21.78 \pm 3.0	4.64
	45x45	8	21.78 \pm 2.5	3.80
Mezcla en polvo	30x30	25	3.61 \pm 0.5	4.31
	50x50	9	3.61 \pm 0.4	4.05

SD = desviación estandar; RSD = desviación estándar relativa

9.3.3. Método 1. Calculo de M_p y $H\%_{Poole}$ a partir de desviaciones estándar espectrales

Hemos evaluado también la homogeneidad en imágenes $M \times N \times \lambda$, específicamente en términos de desviación estándar de los espectros NIR dentro de cada macropíxel. El procedimiento, que se ilustra en la Figura 9.6, fue el siguiente:

(a) Las imágenes hiperespectrales ($M \times N \times \lambda$) fueron desdobladas y sujetas a un suavizado Savitzky–Golay con 11 puntos de ventana y ajustado a un polinomio de segundo grado, seguido por un SNV.

(b) Se obtuvo una imagen aleatoria ($M \times N \times \lambda$) por reagrupamiento de los espectros de forma aleatoria de la imagen hiperespectral original. La aleatorización de la imagen original se hizo tres veces con el fin de obtener una estimación robusta de las estadísticas.

(c) Las imágenes, original y aleatoria, fueron divididas en m macropíxeles (mismos tamaños que en las figuras 9.4 y 9.5) y la desviación estándar entre espectros en cada macropíxel desdoblado fue calculada utilizando las ecuaciones 9.1 y 9.2.

$$SD_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_i)^2}{n-1}} \quad (\text{Ec. 9.1})$$

$$\text{MeanSD} = \frac{\sum_{j=1}^h SD_i}{h} \quad (\text{Ec. 9.2})$$

Donde, A_{ij} es la absorbancia a la longitud de onda i en el espectro j y \bar{A}_i es la absorbancia media para los n espectros a las mismas longitudes de onda dentro de un macropíxel. Esta ecuación proporciona un vector que consiste en la desviación estándar (SD_i) obtenido para cada macropíxel. Luego, la desviación estándar media de los macropíxeles (MeanSD_i) para cada vector, SD , fue calculada (para las h longitudes de onda). A continuación, se repiten los cálculos para todos los macropíxeles en toda la imagen.

(d) Se calculo la desviación estándar media global (GMSD) de las imágenes original y aleatoria para sus m macropíxeles

$$\text{GMSD} = \frac{\sum_{j=1}^m \text{MeanSD}_i}{m} \quad (\text{Ec. 9.3})$$

(e) Finalmente, el índice M_P fue calculado dividiendo las GMSD obtenidas para cada imagen y multiplicando por 100 para obtener $H\%_{\text{Pool}}e$.

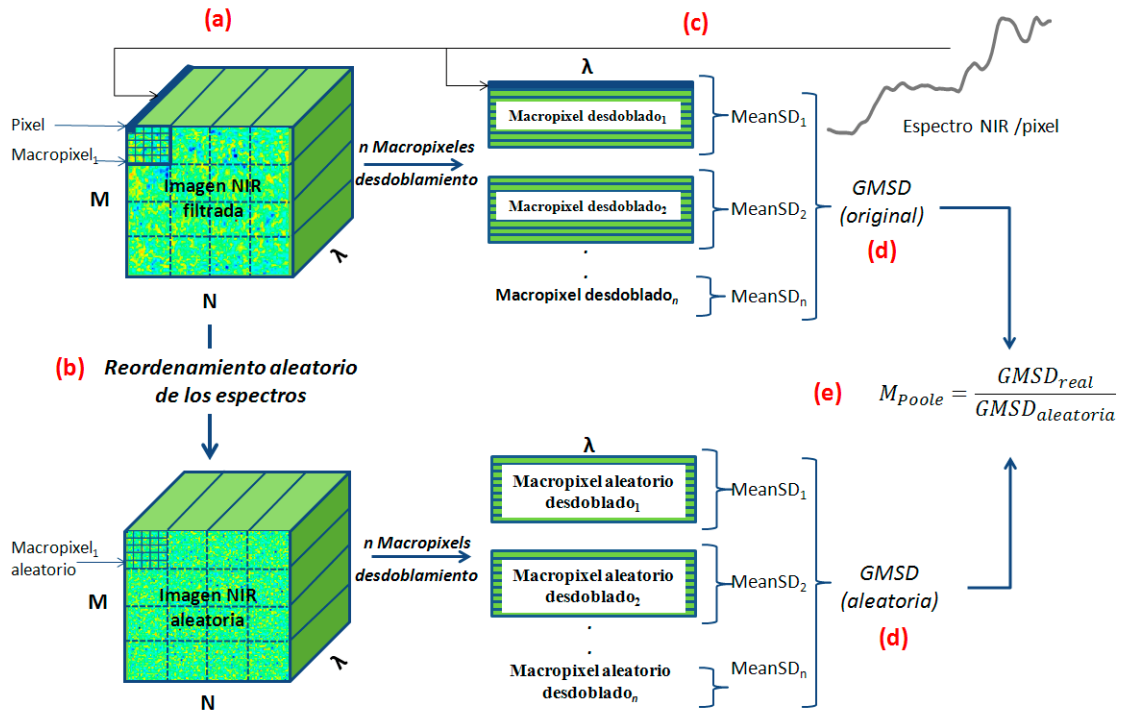


Figura 9.6. Obtención del índice M_{Pool} basado en la desviación estándar de los espectros dentro de cada macropixel y entre macropixeles para una imagen hiperespectral.

La Tabla 9.4 proporciona los valores de M_{Pool} y $H\%_{\text{Pool}}e$ obtenidos utilizando los dos tamaños de macropixel. Como se puede ver, los macropixeles de $[30 \times 30]$ proporcionaron valores mas bajos de homogeneidad que lo macropixeles de $[45 \times 45]$ para las tabletas 1–4 (74–84% vs 83–93%). La diferencia es consistente con lo observado en los mapas de concentración y confirma que el índice de homogeneidad aumenta con el aumento de tamaño de macropixel. Ambos tamaños de macropixeles dieron valores de homogeneidad superiores al 89% para las tabletas 5 y 6; además, ambas muestras fueron altamente homogéneas, especialmente la tableta 6. Por otro lado, los macropixeles

de $[30 \times 30]$ y $[50 \times 50]$ dieron valores muy similares, 81% y 86% respectivamente, para la mezcla en polvo; Esto indica que la mezcla fue casi idénticamente homogénea con ambos tamaños de macropixel.

9.3.4. Método 2. Calculo del M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de CorrCoef

En este estudio hemos desarrollado un procedimiento para utilizar el CorrCoef en el calculo de M_P y $H\%_{Poole}$.

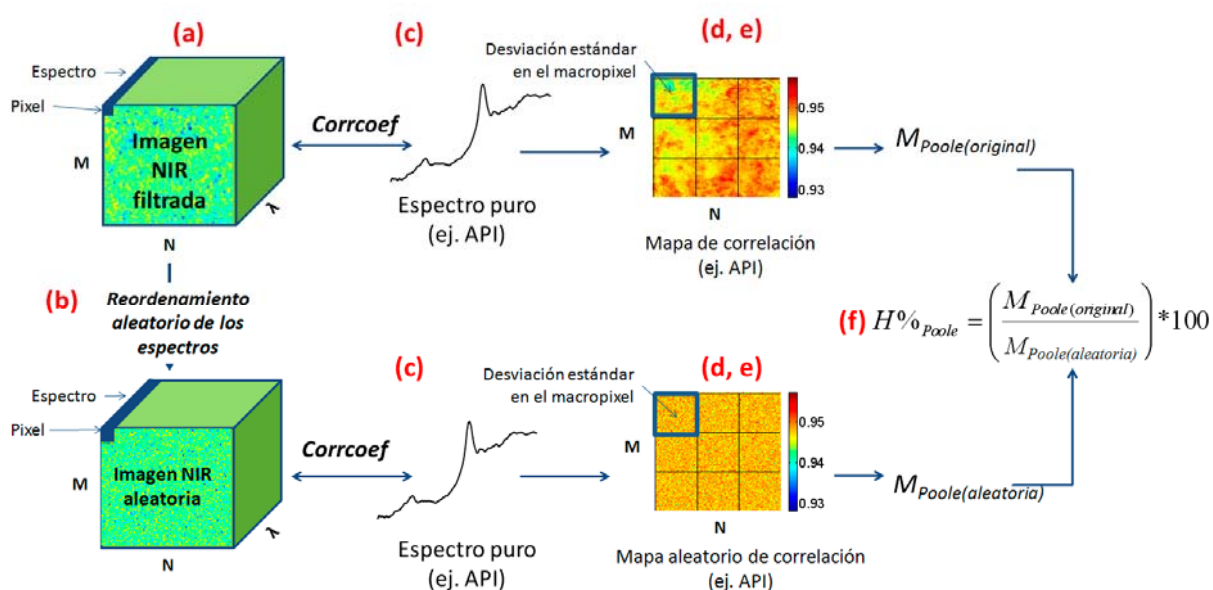


Figura 9.7. Obtención de los índices M_{Poole} y $H\%_{Poole}$ basándose en los CorrCoef.

El procedimiento, resumido en la Figura 9.7, involucra los siguientes pasos:

- Las imágenes hiperespectrales y los espectros de los componentes puros fueron sujetos un suavizado Savitzky–Golay con 11 puntos de ventana y ajustado a un polinomio de segundo grado, seguido por un SNV.
- Se obtuvo una imagen aleatoria ($M \times N \times \lambda$) por reagrupamiento aleatorio de los espectros de la imagen original.
- Se calculó los valores de CorrCoef para el API en cada espectro, para la imagen original y aleatoria.

- (d) Se construyó el mapa de coeficientes de correlación respectivo.
- (e) El mapa fue dividido en macropíxeles de $[30 \times 30]$ y $[50 \times 50]$ para las imágenes de tamaño 150×150 píxeles y en macropíxeles de $[30 \times 30]$ y $[45 \times 45]$ para las de tamaño de 90×180 píxeles.
- (f) Finalmente, se calcularon los valores de M_P y $H\%_{Poole}$ para cada imagen.

Como se puede observar en la Tabla 9.4, los resultados para el método 2 fueron similares a los obtenidos utilizando la desviación estándar de los espectros (método 1); con excepción de las tabletas 3 y 4, las cuales fueron muy diferentes, por ejemplo los valores de $H\%_{Poole}$ fueron mas bajos con el método 2. El rango de $H\%_{Poole}$ fue de 72 a 90% con macropíxeles de $[30 \times 30]$, y de 84 a 94% con macropíxeles de $[50 \times 50]$. Por lo contrario, las tabletas 5 y 6 tuvieron valores mas altos de $H\%_{Poole}$ con el método 1, independientemente del tamaño de macropíxel. Por último, la mezcla de polvo tuvo valores muy similares con ambos métodos.

9.3.5. Método 3. Calculo de M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de mapa de concentraciones

Como se vio en la sección 9.3.2, los mapas de concentraciones fueron divididos en macropíxeles no solapables y utilizados para calcular M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de las desviaciones estándar de las concentraciones. Al igual que los otros métodos, los resultados están recogidos en la Tabla 9.4. Los valores de $H\%_{Poole}$ obtenidos para la mezcla en polvo y las tabletas 2 y 3 fueron inferiores a los proporcionados por los métodos 1 y 2, independientemente del tamaño de la macropíxel. Por otro lado, los valores $H\%_{Poole}$ de las tabletas 5 y 6 fueron muy similares a los obtenidos con estos métodos.

Tabla 9.4. Resultados para el índice de Poole (M_{Poole}) y porcentaje de homogeneidad ($H\%_{Poole}$) utilizando diferentes métodos

Muestra	Tamaño de Macropíxel	N° de Macropíxeles	Método 1. Desviación estándar espectral		Método 2. Coeficiente de correlación con API		Método 3. Mapas de concentraciones		Método 4. Imágenes binarias	
			M_{Poole}	$H\%_{Poole}$	M_{Poole}	$H\%_{Poole}$	M_{Poole}	$H\%_{Poole}$	M_{Poole}	$H\%_{Poole}$
Tableta 1	30x30	25	0.74	74.1	0.72	72.0	0.71	71.7	0.80	80.2
	50x50	9	0.83	83.3	0.85	84.8	0.83	83.6	0.92	91.7
Tableta 2	30x30	25	0.75	74.8	0.73	72.9	0.64	64.6	0.88	87.8
	50x50	9	0.87	86.5	0.87	86.8	0.74	75.0	0.97	96.8
Tableta 3	30x30	25	0.75	75.4	0.91	90.8	0.74	73.9	0.91	90.6
	50x50	9	0.85	84.7	0.94	94.5	0.85	84.5	0.93	93.3
Tableta 4	30x30	25	0.87	87.3	0.78	78.1	0.89	89.3	0.80	80.5
	50x50	9	0.93	93.0	0.85	85.2	0.91	90.2	0.96	95.8
Tableta 5	30x30	18	0.89	89.1	0.96	95.9	0.92	91.6	0.93	92.8
	45x45	8	0.94	94.4	0.97	97.0	0.98	97.6	0.99	99.3
Tableta 6	30x30	18	0.97	97.1	0.98	98.1	0.96	96.4	0.99	99.2
	45x45	8	0.98	98.3	0.99	99.1	0.98	97.6	0.99	99.8
Mezcla en polvo	30x30	25	0.81	81.3	0.83	83.5	0.75	75.2		
	50x50	9	0.86	85.9	0.88	88.1	0.80	80.4		

9.3.6. Método 4. Calculo de M_P y $H\%_{Poole}$ a partir de imágenes binarias

Los dos índices se calcularon también para las imágenes binarias, sin embargo, como se mencionó anteriormente, para la mezcla en polvo no se pudo obtener las imágenes binarias, debido a su muy baja concentración y absorción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, M_P y $H\%_{Poole}$ se vieron incrementados con el aumento del Ms. También, ambos índices fueron ligeramente superiores a los obtenidos con los otros tres métodos, lo que sugiere que la binarización de las imágenes tiene algún efecto en ellos.

9.3.7. Grado de homogeneidad

Debido a que no existe una escala universal para medir el grado de homogeneidad de una imagen, hemos creído conveniente utilizar alguna escala que permita calificar la homogeneidad de una imagen. La ausencia de tal escala nos llevó a probar el *Grade Point Average* (GPA)¹⁹ como referencia. La Tabla 9.5 resume el criterio utilizado para evaluar el grado de homogeneidad de una imagen, en términos de $H\%_{Poole}$. Los resultados obtenidos con el Ms seleccionado se muestran en la Tabla 9.6. Como puede verse, los cuatro métodos difieren ligeramente, pero, según reveló un análisis de varianza, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.18$). Las mayores diferencias fueron para la tableta 2, cuyo histograma observado en la Figure 9.4b exhibió una distribución no normal de las concentraciones del API; además, como se observó en la Tabla 9.3, esta tableta mostró valores de desviación estándar mayores a las otras tabletas. Esto indica que el método 3 es altamente sensible a las oscilaciones de la API en la superficie de la imagen.

¹⁹ D. Bouyssou, Evaluation and decision models: a critical perspective, Kluwer Academic Publishers, USA, 2000

Tabla 9.5. Clasificación del grado de homogeneidad de una imagen basado en el GPA

Valor de $H\%_{Poole}$	Grado equivalente	Grado de Homogeneidad
90–100	A	Excelente
80–89	B	Muy buena
70–79	C	Buena
60–69	D	Baja
0–59	E	No homogenea

Las tabletas 3–6 y la mezcla en polvo presentaron un grado de homogeneidad virtualmente idéntico, especialmente las tabletas 5 y 6, las cuales presentaron un grado excelente de homogeneidad para todos los métodos.

Note como a diferencia del método 3, los otros tres métodos no requieren de ningún modelo para cuantificar el API. Esto facilitaría su utilización para establecer un criterio de calificación objetiva del grado de homogeneidad de una imagen. Los métodos 1–3 son útiles para extraer información espectral contenida en cada píxel, mientras que el método 4 es preferible para obtener información de la superficie de la imagen. Estos criterios pueden aplicarse también a los excipientes, si su homogeneidad ha de ser evaluada simultáneamente con la del API.

Tabla 9.6. Grado de homogeneidad basado en $H\%_{Poole}$ para cada muestra y utilizando los diferentes métodos

Muestra	Tamaño de Macropixel	Nº de Macropixeles	Método 1. Desviación estándar espectral	Método 2. Coeficiente de correlacion con API	Método 3. Mapas de concentraciones	Método 4. Imágenes binarias
Tableta 1	50x50	9	Muy buena	Muy buena	Excelente	Excelente
Tableta 2	50x50	9	Muy buena	Muy buena	Buena	Excelente
Tableta 3	50x50	9	Muy buena	Excelente	Muy buena	Excelente
Tableta 4	50x50	9	Excelente	Muy buena	Excelente	Excelente
Tableta 5	45x45	8	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Tableta 6	45x45	8	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Mezcla en polvo	50x50	9	Muy buena	Muy buena	Muy buena	

9.4. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

El criterio para seleccionar el Ms, basado en el grafico de M_{Poole} frente al Ms, resulto ser muy útil para determinar el tamaño máximo de macropixel. La determinación de los índices M_{Poole} y $H\%_{Poole}$ basados en el cálculo de la desviación estándar de espectros en cada macropixel (método 1) y el coeficiente de correlación con el API de cada espectro dentro de cada macropixel (método 2) proporcionaron resultados adecuados y muy similares a los obtenidos utilizando las concentraciones del API (método 3). La gran ventaja es que estos métodos pueden ser aplicados directamente sobre cualquier imagen hiperespectral en sus tres dimensiones ($M \times N \times \lambda$) proporcionando información completa de toda la imagen y no necesitan el cálculo de la concentración.

El método 4, basado en el análisis de la superficie de una imagen binaria proporcionó resultados muy alentadores. Sin embargo, tiene como inconveniente que cuando el API se encuentra en baja concentración y además no presenta un pico característico (suficientemente distinto al de los excipientes) en la región del NIR, es prácticamente imposible construir una imagen binaria; en estos casos se pueden aplicar los otros métodos.

Los cuatro métodos no presentaron diferencia significativa, con lo cual se puede afirmar que son comparables, y su utilización dependerá de la elección del evaluador.

La determinación del porcentaje de homogeneidad ($H\%$) para evaluar imágenes hiperespectrales, constituye una información cualitativa muy útil para evaluar el grado de homogeneidad de la distribución de un API a partir de una imagen.

M_{Poole} y $H\%_{Poole}$ demostraron ser herramientas para el estudio de la homogeneidad de muestras farmacéuticas usando NIR-CI, con lo cual son métodos adecuados para ser utilizados en proyectos (PAT) dentro de la industria farmacéutica.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y discutidos en esta memoria se extraen las siguientes conclusiones:

1 - Se han propuesto nuevas estrategias para el desarrollo de métodos de análisis en la industria farmacéutica, aplicando la Espectroscopia NIR y el análisis de imagen química NIR.

2 - Se han determinado exitosamente principios activos (API) en distintos preparados farmacéuticos, en forma de sólidos granulados, pellets, productos liofilizados y preparaciones semi-sólidas (geles).

3 - Se han aplicado exitosamente los fundamentos de la calidad mediante diseño (QbD) de un proceso de fabricación farmacéutico destinado a la fabricación de un gel:

- Los métodos NIR contruidos han permitido determinar atributos críticos de calidad (CQA) durante el proceso de gelificación, tales como viscosidad, pH y contenido de API, agua y etanol.
- Este estudio permitió determinar las variables del proceso y determinar el espacio de diseño (DS), que es la combinación de condiciones del proceso que garantizan la calidad del producto.

4 - Se han desarrollado métodos multivariantes NIR para determinar diversos CQAs en granulados y mezclas de pellets:

- Los CQAs determinados exitosamente para los granulados fueron el contenido de API, humedad, pH, tamaño de partícula

CONCLUSIONES

y propiedades de flujo. El éxito de este trabajo fue su implementación en rutina en el proceso de fabricación de la empresa y realizando las medidas en tiempo real, de forma no invasiva y en una zona no calificada, reduciendo considerablemente el tiempo de almacenaje de los lotes y facilitando su liberación en tiempo cuasi-real; estas determinaciones no eran posibles hasta el momento.

- Se demuestra la capacidad de analizar muestras del proceso de producción farmacéutico mediante modelos de calibración desarrollados únicamente con muestras preparadas en el laboratorio y añadiendo la variabilidad del proceso (espectro de proceso, S_p). Los modelos obtenidos son más simples (requieren menos factores) y tienen mejor capacidad predictiva que los obtenidos mediante estrategias habituales (incorporando muestras de producción en el conjunto de calibración).
- En cuanto al proceso de mezcla de pellets, se construyó un método NIR para cuantificar un API, además se desarrolló un nuevo método matemático para determinar la homogeneidad de la mezcla en tiempo real, es decir durante el mezclado. La novedad más relevante del estudio es la utilización de un equipo NIR inalámbrico, controlado a distancia por un ordenador, permitiendo así que el equipo forme parte del proceso.

5 - Se ha evaluado la idoneidad de la espectroscopia NIR en la monitorización *in-line* de un proceso de liofilización de una mezcla de multicomponente.

- Se han empleado diversos métodos quimiométricos, los cuales permitieron extraer información útil del proceso, a partir de los espectros NIR.

CONCLUSIONES

- Todos los métodos utilizados, permitieron observar que la cristalización de los solventes se realiza durante el congelado, mientras que los solutos cristalizan después de incrementar la temperatura de -50 a -15 o -25°C.

6 - Se han desarrollado algoritmos capaces de extraer información de homogeneidad en cualquier imagen, sea digital ($M \times N$) o hiperespectral ($M \times N \times \lambda$). Estos métodos proporcionan información de la uniformidad de muestras farmacéuticas solidas, tales que comprimidos de diversos tipos (recubiertos, sin recubrimiento y efervescentes) y mezclas en polvo.

- El criterio y la escala propuestos para evaluar la homogeneidad de una imagen, permiten clasificar una imagen según su homogeneidad de distribución de sus componentes claves.

7 - Las metodologías desarrolladas en esta memoria han aportado soluciones al problema de la mejora continua de la calidad de los procesos farmacéuticos durante su fabricación y algunas se utilizan satisfactoriamente como herramienta para el control de calidad rutinario en la industria farmacéutica.

Conclusions

Based on the experimental results, obtained and discussed throughout this PhD dissertation, the conclusions can be summarized as:

1 - New strategies have been proposed for the development of analysis methods in the pharmaceutical industry, by applying the NIR spectroscopy and NIR chemical imaging combined with multivariate data analysis techniques.

2 - The active pharmaceutical ingredients (APIs) have been successfully determined in different pharmaceutical formulations, such as granules, pellets, freeze dried products and semi-solid formulations (gels).

3 - Principles of quality-by-design (QbD) have been successfully applied in a semi-solid pharmaceutical manufacturing process:

- The obtained NIR methods have allowed determining the critical quality attributes (CQA), such as viscosity, pH and API, ethanol and water contents during the manufacturing process.
- This study allowed determining the control process parameters (CPP) and defining the design space (DS), which is the combination of process conditions that guarantee the quality of the end-product.

4 - NIR multivariate methods have been developed to determine various CQAs in blending operations:

- The CQAs successfully determined for the pharmaceutical granules were the API and moisture content, pH, particle size and flow properties. The success of this work was its implementation in the routine control of the manufacturing

CONCLUSIONS

process of the pharmaceutical company. The real time and non-invasive measurements in a non-classified area allowed considerably reducing the storage time of manufactured batches, facilitating their quasi-real time release.

- It has been demonstrated the ability to analyse process samples by means of calibration models developed only with laboratory samples, including the the variability of the process (process spectrum, S_p). The obtained models are simpler (require less PLS factors) and provide better predictive capacity than those obtained using common strategies (including process samples in the calibration set).
- NIR method was developed to determine one API during blending operations of pellets In addition, a new mathematic method was developed to assess the homogeneity of the blend in real-time. The relevant novelty of this study is the use of a wireless NIR equipment, remotely controlled by a computer without disturb the process.

5 - The suitability of the NIR Spectroscopy for in-line monitoring of a freeze drying-process of a multicomponent mixture has been evaluated.

- Various chemometric methods, which allowed extracting useful information from the process by means of NIR spectra have been used.
- The evaluated methods allowed observing that solvents crystallize during the freezing phase, while solutes crystallize after increasing the temperature from - 50 to - 15 or - 25 ° C.

6 - Algorithms capable of extracting homogeneity information from any image, whether digital ($M \times N$) or hyperspectral ($M \times N \times \lambda$) were developed. These methods provide information about the uniformity of solid pharmaceutical samples, such as powder blends, coated, uncoated

CONCLUSIONS

and effervescent tablets. The criterion and the scale proposed for the assessment of homogeneity in images, allow classifying an image according to its homogeneous distribution of their key components.

7 - The developed methodologies mentioned in this dissertation have provided solutions to the problem of the continuous improvement of the quality of pharmaceutical processes during their manufacture and some are successfully used as routine tools for the quality control in the pharmaceutical industry.

Bibliografía por capítulos

- A. de Juan, and R. Tauler. "Multivariate Curve Resolution (Mcr) from 2000: Progress in Concepts and Applications." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 163–70.
- A. El-hagrasy, H. Morris, F. D'amico, R. Lodder, and J. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298–307.
- A. Palou, J. Cruz, M. Blanco, J. Tomàs, J. de los Ríos, and M. Alcalà. "Determination of Drug, Excipients and Coating Distribution in Pharmaceutical Tablets Using Nir-Ci." *J. Pharm. Anal.* 2 (2012): 90–97.
- C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, and C. Collet. "Monitoring Galenical Process Development by near Infrared Chemical Imaging: One Case Study." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2008): 828–37.
- C. Ravn, E. Skibsted, and R. Bro. "Near-Infrared Chemical Imaging (Nir-Ci) on Pharmaceutical Solid Dosage Forms—Comparing Common Calibration Approaches." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008): 554–61.
- D.A. Skoog, F.J. Holler, and T.A. Nieman. *Principios De Análisis Instrumental*. 5ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
- E. Ciurczak. "Near-Infrared Spectroscopy: Why It Is Still the Number One Technique in Pat." *Journal of Process Analytical Technologies* 3 (2006): 19–21.
- E. Ciurczak. "Uses of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis." *Appl. Spectrosc. Rev.* 23 (1987): 147–63.
- E. Lee, W.X. Huang, P. Chen, E.N. Lewis, and R.V. Vivilecchia. "Highthroughput Analysis of Pharmaceutical Tablet Content Uniformity by near-Infrared Chemical Imaging." *Spectrosc.* 21 (2006): 24–32.
- E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, and L.H. Kidder. "Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool." In *Process Analytical Technology*, edited by K.A. Bakeev. 187–225. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- F. Clarke, and S. Hammond. "Nir Microscopy of Pharmaceutical Dosage Forms." *Eur. Pharma Rev.* 1 (2003): 41-50.
- F. Clarke. "Extracting Processrelated Information from Pharmaceutical Dosage Forms Using near Infrared Microscopy." *Vib. Spectrosc.* 34 (2004): 25–35.
- H. Ma, and C.A. Anderson. "Characterization of Pharmaceutical Powder Blends by Nir Chemical Imaging." *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 3305–20.
- H.W. Siesler. "Near-Infrared Spectroscopy." <http://www.nir-spektroskopie.de>.
- J. Cruz, and M. Blanco. "Nir-Chemical Imaging Study of Acetylsalicylic Acid in Commercial Tablets." *Talanta* 80 (2009): 473–78.
- J. Dubois, J.-C. Wolff, J. K. Warrack, J. Schoppelrei, and E. Lewis. "Nir Chemical Imaging for Counterfeit Pharmaceutical Products Analysis." *Spectrosc.* 22 (2007): 40-50.
- J. Johansson, S. Pettersson, and L. Taylor. "Infrared Imaging of Laser-Induced Heating During Raman Spectroscopy of Pharmaceuticals." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 1223-31.
- J. Workman. "Review of Process and Non-Invasive near-Infrared and Infrared Spectroscopy: 1993–1999." *Appl. Spectrosc. Rev.* 34 (1999): 1–89.
- J.A. Jones, I. R. Last, B. F. MacDonald, and K. A. Prebble. "Development and Transferability of near-Infrared Methods for Determination of Moisture in a Freeze-Dried Injection Product." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993): 1227–31.
- J.D. Kirsch, and J.K. Drennen. "Nondestructive Tablet Hardness Testing by near-Infrared Spectroscopy: A New and Robust Spectral Best-Fit Algorithm." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999): 351–62.
- J.G. Rosas, and M. Blanco. "A Criterion for Assessing Homogeneity Distribution in Hyperspectral Images. Part 2: Application of Homogeneity Indices to Solid Pharmaceutical Dosage Forms." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012): 691–99.
- J.G. Rosas, H. de Waard, C. Vervaet, J. P. Remon, W. Hinrichs, H. W. Frijlink, M. Blanco, and T. De Beer. "Nir Spectroscopy for the in-Line Monitoring of a Multicomponent Formulation During the Entire Freeze-Drying Process." (por enviar) (2012).
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. Gonzalez, and M. Alcalá. "Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process. Part II: Nir Monitoring of Composition and Physical Parameters." *J. Pharm. Sci.* 100 (2011): 4442–51.
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. Gonzalez, and M. Alcalá. "Real-Time Determination of Critical Quality Attributes Using near-Infrared Spectroscopy: A Contribution for Process Analytical Technology (Pat)." *Talanta* 97 (2012): 163-70.
- J.L. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson. "Determination of Particle Size in Powders by Scatter Correction in Diffuse near-Infrared Reflectance." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 722–28.

Bibliografía - Capítulo 1

- J.M. Amigo, and C. Ravn. "Direct Quantification and Distribution Assessment of Major and Minor Components in Pharmaceutical Tablets by Nir-Chemical Imaging." *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009): 76–82.
- J.M. Amigo. "Practical Issues of Hyperspectral Imaging Analysis of Solid Dosage Forms." *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010): 93–109.
- K.M. Morisseau, and C.T. Rhodes. "Near-Infrared Spectroscopy as a Nondestructive Alternative to Conventional Tablet Hardness Testing." *Pharm. Res.* 14 (1997): 108–11.
- L. Zhang, M. J. Henson, and S. S. Sekulic. "Multivariate Data Analysis for Raman. Imaging of a Model Pharmaceutical Tablet." *Anal. Chim. Acta.* 545 (2005): 262–78.
- L.J. Makein, L.H. Kidder, E.N. Lewis, and M. Valleri. "Non-Destructive Evaluation of Manufacturing Process Changes Using near Infrared Chemical Imaging." *NIR news* 19 (2008): 11–15.
- L.R. Hilden, C. J. Pommier, S. I. Badawy, and E. M. Friedman. "Nir Chemical Imaging to Guide/Support Bms-561389 Tablet Formulation Development." *Int. J. Pharm.* 353 (2008): 283–90.
- M. Blanco, and A. Peguero. "An Expedient Method for Determination of Particle Size Distribution by near Infrared Spectroscopy: Comparison of Pls2 and Ann Models." *Talanta* 77 (2008): 647–51.
- M. Blanco, and I. Villarroya. "Nir Spectroscopy: A Rapid-Response Analytical Tool." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 21 (2002): 240–50.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Content Uniformity and Tablet Hardness Testing of Intact Pharmaceutical Tablets by near Infrared Spectroscopy. A Contribution to Process Analytical Technologies." *Anal. Chim. Acta.* 557 (2006): 353–59.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Nir Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis: Off-Line and at-Line Pat Applications." In *Process Analytical Technology*, edited by K.A. Bakeev. 482–85. United Kingdom: Lackwell Publishing, 2010.
- M. Blanco, and M. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, D. Valdés, M.S. Bayod, F. Fernández-Mari, and I. Llorente. "Characterization and Analysis of Polymorphs by near-Infrared Spectrometry." *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004): 221–27.
- M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, F. Gonzalez, and R. Pous. "Near Infrared Spectroscopy." In *Bridging the Gap between Data Analysis and Nir Applications* edited by K. Hildrum, T. Isaksson, T. Næs and A. Tandberg. Chichester: Ellis Horwood, 1992.
- M. Blanco, M. Alcalá, J. M. González, and E. Torras. "Determination of Dissolution Profiles in Intact Pharmaceutical Tablets by Nir Spectroscopy." *J. Proc. Anal. Tech.* 3 (2006): 25–28.
- M. Blanco, M. Alcalá, J.M. Gonzalez, and E. Torras. "Non-Destructive Dissolution Testing by Nir Spectroscopy." *NIR news* 18 (2007): 10–12.
- M. Simpson. "Near-Infrared Spectroscopy for Process Analytical Technology: Theory, Technology and Implementation." In *Process Analytical Technology*, edited by K. Bakeev. 39–41. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
- M.A. Veronin, E. Lee, and E.N. Lewis. "“Insight” into Drug Quality: Comparison of Simvastatin Tablets from the Us and Canada Obtained Via the Internet." *Ann. Pharmacother.* 41 (2007): 1111–15.
- M.S. Kamat, R.A. Lodder, and P.P. DeLuca. "Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose through Intact Glass Vials." *Pharm. Res.* 6 (1989): 961–65.
- N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, and M. Ulmschneider. "Characterizing Process Effects on Pharmaceutical Solid Forms Using near-Infrared Spectroscopy and Infrared Imaging." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005): 100–10.
- N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, and W. Jiskoot. "Near-Infrared Imaging for Studying Homogeneity of Protein-Sugar Mixtures." *Pharm. Res.* 23 (2006): 2002–13.
- O. Rodionova, L. Houmøller, A. Pomerantsev, P. Geladi, J. Burger, V. Dorofeyev, and A. Arzamastsev. "Nir Spectrometry for Counterfeit Drug Detection. A Feasibility Study." *Anal. Chim. Acta.* 549 (2005): 151–58.
- P. Hindle. "Historical Development." In *Handbook of near-Infrared Analysis*, edited by D.A. Burns and E.W. Ciurczak. 4–6. New York: Marcel Dekker Inc., 2008.
- R. C. Lyon, E. H. Jefferson, C. D. Ellison, L. F. Buhse, J. A. Spencer, M. M. Nasr, and A. S. Hussain. "Exploring Pharmaceutical Applications of near-Infrared Technology." *Am. Pharm. Rev.* 6 (2003): 62–70.
- R. Goddu, and D. Delker. "Spectra-Structure Correlations for near-Infrared Region." *Anal. Chem.* 32 (1960): 140–41.
- R. Lyon, D. Lester, E. Lewis, E. Lee, L. Yu, E. Jefferson, and A. Hussain. "Near-Infrared Spectral Imaging for Quality Assurance of Pharmaceutical Products: Analysis of Tablets to Assess Powder Blend Homogeneity." *AAPS PharmSciTech.* 3 (2002): 1–15.

Bibliografía - Capítulo 1

- S. Sasic. "Chemical Imaging of Pharmaceutical Granules by Raman Global Illumination and near-Infrared Mapping Platforms." *Anal. Chim. Acta.* 611 (2008): 73–79.
- S.J. Hamilton, A. E. Lowell, and R. A. Lodder. "Hyperspectral Techniques in Analysis of Oral Dosage Forms." *J. Biomed. Opt.* 7 (2002): 561–70.
- T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, and S. Ochiai. "Evaluation of Homogeneity of Binary Blends of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly (L-Lactic Acid) Studied by near Infrared Chemical Imaging." *Anal. Sci.* 23 (2007): 871–76.
- US-FDA. "Guidance for Industry Pat-a Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance." 2004.
- W. Abney, and E.R. Festing. "The Influence of the Atomic Grouping in the Molecules of the Spectrum." *Philos. Trans. R. Soc.* 172 (1881): 887–918.
- W. Hershel, W. "Nvestigation of the Power of the Prismatic Colours to Heat and Illuminate Objects." *Philos. Trans. R. Soc.* 90 (1800): 255–83.
- W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, and D. Winstead. "Measurement of Drug Agglomerates in Powder Blending Simulation Samples by near Infrared Chemical Imaging." *Int. J. Pharm.* 350 (2008): 369–73.
- X. Zhou, P. Hines, and M.E. Borer. "Moisture Determination in Hygroscopic Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 219–25.
- Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, and M. Ulmschneider. "Infrared Hyperspectral Imaging for Qualitative Analysis of Pharmaceutical Solid Forms." *Anal. Chim. Acta.* 535 (2005): 79–87.

- A. Barros, and D. Rutledge. "Principal Components Transform-Partial Least Squares: A Novel Method to Accelerate Cross-Validation in Pls Regression." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004): 245–55.
- A. De Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, and R. Tauler. "Local Rank Analysis for Exploratory Spectroscopic Image Analysis. Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005): 64–74.
- A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, and R. Tauler. "Use of Local Rank-Based Spatial Information for Resolution of Spectroscopic Images." *J. Chemometr.* 22 (2008): 291–98.
- A. Höskuldsson. "Pls Regression Methods." *J. Chemometr.* 2 (1988): 211–28.
- A. Palou, J. Cruz, M. Blanco, J. Tomàs, J. de los Ríos, and M. Alcalà. "Determination of Drug, Excipients and Coating Distribution in Pharmaceutical Tablets Using Nir-Ci." *J. Pharm. Anal.* 2 (2012): 90–97.
- A. Savitzky, and M. Golay. "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." *Anal. Chem.* 36 (1964): 1627–39.
- A.L. Pomerantsev, and O.Y. Rodionova. "Process Analytical Technology: A Critical View of the Chemometricians." *J. Chemometr.* 26 (2012): 299–310.
- A.S. El-Hagrasy, H. R. Morris, F. D'Amico, R. A. Lodder, and J. K. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298–307.
- Adams, M. J. *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1995.
- B. Kowalski, and C. Bender. "Pattern Recognition. A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data." *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972): 5632–39.
- B. Kowalski. *Chemometrics: Theory and Application*. Washington, DC: American Chemical Society, 1977.
- B. Vajna, A. Farkas, H. Pataki, Z. Zsigmond, T. Igricz, and G. Marosi. "Testing the Performance of Pure Spectrum Resolution from Raman Hyperspectral Images of Differently Manufactured Pharmaceutical Tablets." *Anal. Chim. Acta* 712 (2012): 45–55.
- B. Vajna, G. Patyi, Z. Nagy, A. Bódis, A. Farkas, and G. Marosi. "Comparison of Chemometric Methods in the Analysis of Pharmaceuticals with Hyperspectral Raman Imaging." *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011): 1977–86.
- B. Vajna, I. Farkas, A. Szabó, Z. Zsigmond, and G. Marosi. "Raman Microscopic Evaluation of Technology Dependent Structural Differences in Tablets Containing Imipramine Model Drug." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010): 30–38.
- B. Walczak. *Wavelets in Chemistry*. New York: Elsevier, 2000.
- B.J. Westenberger, C. D. Ellison, A. S. Fussner, S. Jenney, R. E. Kolinski, T. G. Lipe, R. C. Lyon, et al. "Quality Assessment of Internet Pharmaceutical Products Using Traditional and Non-Traditional Analytical Techniques". *Int. J. Pharm.* 306 (2005): 56–70.
- C. Andersson. "Direct Orthogonalization." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 47 (1999): 51–63.
- C. Gendrin, Y. Roggo, and C. Collet. "Content Uniformity of Pharmaceutical Solid Dosage Forms by near Infrared Hyperspectral Imaging: A Feasibility Study." *Talanta* 73 (2007): 733–41.
- C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, and C. Collet. "Monitoring Galenical Process Development by near Infrared Chemical Imaging: One Case Study." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008): 828–37.
- C. Miller. "Chemometrics in Process Analytical Technology (Pat)." In *Process Analytical Technology*, edited by K.A. Bakeev. 354–438. UK: Lackwell Publishing, , 2010.
- D. Coomans, M. Jonckheer, D.L. Massart, I. Broeckeaert, and P. Blockx. "The Application of Linear Discriminant Analysis in the Diagnosis of Thyroid Diseases." *Anal. Chim. Acta* 103 (1978): 409–15.
- D.F. Specht. "Probabilistic Neural Networks." *Neural Networks* 3 (1990): 109–18.
- D.L. Massart, A. Dijkstra, and L. Kaufman. *Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, a Survey of Statistical and Mathematical Techniques*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1978.
- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, and S.M. Deming. *Chemometrics: A Textbook*. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier, 1997.

Bibliografía - Capítulo 2

- D.L. Massart, C. Janssens, L. Kaufman, and R. Smits. "Application of the Theory of Graphs to the Optimization of Chromatographic Separation Schemes for Multicomponent Samples." *Anal. Chem.* 44 (1972): 2390–93.
- D.L. Massart, R. Brereton, R. Dessy, P. Hopke, C. Spiegelman, and W. Wegscheider. *Chemometrics Tutorials*. Amsterdam: Elsevier, 1990.
- E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, and L.H. Kidder. "Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool." Chap. 187–225 In *Process Analytical Technology*, edited by K.A. Bakeev. Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- E.S. Huang. "Predicting Ligands for Orphan Gpcrs." *Drug Discov.* 10 (2005): 69–73.
- F. Clarke. "Extracting Process-Related Information from Pharmaceutical Dosage Forms Using near Infrared Microscopy." *Vib. Spectrosc.* 34 (2004): 25–35.
- F.J. Muzzio, A. Alexander, C. Goodridge, E. Shen, and T. Shinbrot. "Part A: Fundamentals of Solids Mixing." In *Handbook of Industrial Mixing*, edited by E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng and S.M. Kresta. 887–940. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- F.W. Koehler, E. Lee, L.H. Kidder, and E.N. Lewis. "Near-Infrared Spectroscopy: The Practical Imaging Solution." *Spectrosc. Eur.* 14 (2002): 12–19.
- H. Goicoechea, and A. Olivieri. "A Comparison of Orthogonal Signal Correction and Net Analyte Preprocessing Methods. Theoretical and Experimental Study." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001): 73–81.
- H. Hotelling. "Analysis of a Complex of Statistical Variables into Principal Components." *J. Educ. Psychol.* 24 (1933): 417–41, 98–520.
- H. Martens, and E. Stark. "Extended Multiplicative Signal Correction and Spectral Interference Subtraction: New Preprocessing Methods for near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991): 625–35.
- H. Martens, and S.A. Jensen. "Partial Least Squares Regression : A New Two-Stage Nir Calibration Method." In *Progress in Cereal Chemistry and Technology*, edited by J. Holas and J. Kratochvil. 607–47. Amsterdam: Elsevier, 1983.
- H. Martens, and T. Naes. *Multivariate Calibration*. England: John Wiley & Sons, 1989.
- H. Shinzawa, K. Awa, T. Okumura, S. Morita, M. Otsuka, Y. Ozaki, and H. Sato. "Raman Imaging Analysis of Pharmaceutical Tablets by Two-Dimensional (2d) Correlation Spectroscopy." *Vib. Spectrosc.* 51 (2009): 125–31.
- H. Swierenga, F. Wulfert, O. E. de Noord, A. P. de Weijer, A. K. Smilde, and L. M. C. Buydens. "Development of Robust Calibration Models in near Infra-Red Spectrometric Applications." *Anal. Chim. Acta* 411 (2000): 121–35.
- H. Wold. *Multivariate Analysis*. New York: Krishnalaha, 1966.
- H. Wold. *Soft Modelling. The Basic Design and Some Extensions*. In *Systems under Indirect Observation*. Edited by K. G. Jöreskog and H. Wold. Amsterdam 1982.
- H. Wu, D. L. Massart, and S. de Jong. "The Kernel Pca Algorithms for Wide Data. Part I: Theory and Algorithms." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 36 (1997): 165–72.
- H.L. Mark, and D. Tunnell. "Qualitative near-Infrared Reflectance Analysis Using Mahalanobis Distances." *Anal. Chem.* 57 (1985): 1449–56.
- ICH. "Q8 (R2): Pharmaceutical Development ", 2009.
- J. A. Lopes, P.F. Costa, T.P. Alves, and J.C. Menezes. "Chemometrics in Bioprocess Engineering: Process Analytical Technology (Pat) Applications." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 74 (2004): 269–75.
- J. Burger, and P. Geladi. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend." *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007): 29–37.
- J. Ferré, and F. X. Rius. "Constructing D-Optimal Designs from a List of Candidate Samples." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 16 (1997): 70–73.
- J. Gayle, O. Lacey, and J. Gary. "Mixing of Solids. Chi Square as a Criterion." *Eng. Chem.* 50 (1958): 1279–82.
- J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, and R. Tauler. "A Graphical User-Friendly Interface for Mcr-Als: A New Tool for Multivariate Curve Resolution in Matlab." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005): 101–10.
- J. Trygg, and S. Wold. "Orthogonal Projections to Latent Structures (O-Pls)." *J. Chemometr.* 16 (2002): 119–28.
- J. Trygg, and S. Wold. "Pls Regression on Wavelet Compressed Nir Spectra." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998): 209–20.
- J. Westerhuis, S. De Jong, and A. K. Smilde. "Direct Orthogonal Signal Correction." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001): 13–25.
- J.C. Noordam, W.H. van den Broek, P. Geladi, and L.M.C. Buydens. "A New Procedure for the Modelling and Representation of Classes in Multivariate Images." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 75 (2005): 115–26.
- J.G. Rosas, and M. Blanco. "A Criterion for Assessing Homogeneity Distribution in Hyperspectral Images. Part 2: Application of Homogeneity Indices to Solid Pharmaceutical Dosage Forms." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012): 691–99.

Bibliografía - Capítulo 2

- J.G. Rosas, H. de Waard, C. Vervaet, J. P. Remon, W. L.J. Hinrichs, H. W. Frijlink, M. Blanco, and T. De Beer. "Nir Spectroscopy for the in-Line Monitoring of a Multicomponent Formulation During the Entire Freeze-Drying Process." *Por enviar* (2012).
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. González, and M. Alcalá. "Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process. Part I: Determination of the Design Space." *J. Pharm. Sci.* 100 (2011): 4432–41.
- J.J. Walker, and D. K. Rollins. "Detecting Powder Mixture Segregation for Multicomponent Mixtures." *Chem. Eng. Sci.* 53 (1997): 651–55.
- J.L. Makein, L. H. Kidder, E. N. Lewis, and M. Valleri. "Non-Destructive Evaluation of Manufacturing Process Changes Using near Infrared Chemical Imaging." *NIR News* 19 (2008): 11–15.
- J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. Maspocho, J. Coello, and M. Blanco. "Study of Pharmaceutical Samples by Nir Chemical-Image and Multivariate Analysis". *TrAC Trend. Anal. Chem.* 27 (2008): 696 – 713.
- J.M. Roger, F. Chauchard, and V. Bellon-Maurel. "Epo-Pls External Parameter Orthogonalisation of Pls Application to Temperature-Independent Measurement of Sugar Content of Intact Fruits." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 66 (2003): 191–204.
- K. Miyanami. "Mixing." In *Powder Technology Handbook*, edited by K. Gotoh, H. Masuda and K. Higashitani. 609–25. New York: Marcel Dekker, 1997.
- K. Norris, and J. Hart. "Direct Spectrophotometric Determination of Moisture Content of Grain and Seeds." In *Humidity and Moisture: 4, Principles and Methods of Measuring Moisture in Liquids and Solids*, edited by A. Wexter. 19–25. New York: Reinhold, 1965.
- K. Stange. "Mixing Quality in a Random Mixture of Three or More Components." *Chem. Eng. Technol.* 35 (1963): 580–82.
- K.H. Norris, and P. C. Williams. "Optimization of Mathematical Treatments of Raw near Infrared Signal in the Measurement of Protein in Hard Red Spring Wheat: I. Influence of Particle Size." *Cereal Chemistry* 61 (1984): 158–65.
- K.R. Poole, R. F. Taylor, and G. P. Wall. "Mixing Powders to Fine-Scale Homogeneity: Studies of Batch Mixing." *Trans. Inst. Chem. Eng.* 42 (1964): 305–15.
- L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, and J. P. Huvenne. "Multivariate Curve Resolution Methods in Imaging Spectroscopy." *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003): 2057–67.
- L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikstrom, and S. Wold. *Design of Experiments-Principles and Applications*. 3rd ed. Umea, Sweden: Umetrics AB, 2008.
- L. Stahle, and S. Wold. "Partial Least Squares Analysis with Cross-Validation for the Two-Class Problem: A Monte Carlo Study." *J. Chemometr.* 1 (1987): 185–94.
- L. Zhang, M.J. Henson, and S.S. Sekulic. "Multivariate Data Analysis for Raman Imaging of a Model Pharmaceutical Tablet." *Anal. Chim. Acta* 545 (2005): 262–78.
- L.A. Chan, N. Elkhider, and S.G. Kazarian. "Spectroscopic Imaging of Compacted Pharmaceutical Tablets." *Chem. Eng. Res. Des.* 83 (2005): 1303–10.
- L.R. Hilden, C.J. Pommier, S.I.F. Badawy, and E.M. Friedman. "Nir Chemical Imaging to Guide/Support Bms-561389 Tablet Formulation Development." *Int. J. Pharm.* 253 (2008): 283–90.
- L.T. Fan, S. J. Chen, and C. A. Watson. "Solid Mixing." *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970): 53–66.
- M. Andersson. "A Comparison of Nine Pls1 Algorithms." *J. Chemometr.* 23 (2009): 518–29.
- M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, and J. Pagès. "Nir Calibration in Non-Linear Systems: Different Pls Approaches and Artificial Neural Networks." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 50 (2000): 75–82.
- M. Daszykowski, B. Walczak, and D. L. Massart. "Looking for Natural Patterns in Data: Part 1. Density-Based Approach." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 56 (2001): 83–92.
- M. L. Hamad, C. D. Ellison, M. A. Khan, and R. C. Lyon. "Drug Product Characterization by Macropixel Analysis of Chemical Images." *J. Pharm. Sci.* 96 (2007): 3390–401.
- M. Lopes, J. C. Wolff, J. M. Bioucas-Dias, and M. A. T. Figueiredo. "Near-Infrared Hyperspectral Unmixing Based on a Minimum Volume Criterion for Fast and Accurate Chemometric Characterization of Counterfeit Tablets." *Anal. Chem.* 82 (2010): 1462–69.
- M. Toivainen, F. Corona, J. Paaso, and P. Teppola. "Blind Source Separation in Diffuse Reflectance Nir Spectroscopy Using Independent Component Analysis." *J. Chemometr.* 24 (2010): 514–22.
- M. Ulmschneider, and Y. Roggo. "Process Analytical Technology." In *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Regulations and Quality*, edited by S. Cox Gad. 353 – 410. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- M. Zeaiter, and D. Rutledge. *Preprocessing Methods. Comprehensive Chemometrics*. Oxford: Elsevier, 2009.

Bibliografía - Capítulo 2

- M. Zeaiter, and J. M. Roger. "Dynamic Orthogonal Projection. A New Method to Maintain the on-Line Robustness of Multivariate Calibrations. Application to Nir-Based Monitoring of Wine Fermentations." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006): 227–35.
- M. Zeaiter, J. M. Roger, V. Bellon-Maurel, and D. N. Rutledge. "Robustness of Models Developed by Multivariate Calibration. Part I: The Assessment of Robustness." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 23 (2004): 157–70.
- M.P. Derde, L. Buydens, C. Guns, D.L. Massart, and P.K. Hopke. "Comparison of Rule-Building Expert Systems with Pattern Recognition for the Classification of Analytical Data." *Anal. Chem.* 59 (1987): 1868–71.
- N. Harnby, M.F. Edwards, and A.W. Nienow. *Mixing in the Process Industries*. 2nd ed. London: Butterworth-Heinemann, 1997.
- N. Jovanović, A. Gerich, A. Bouchard, and W. Jiskoot. "Near-Infrared Imaging for Studying Homogeneity of Protein-Sugar Mixtures." *Pharm. Res.* 23 (2006): 2002–13.
- P. Geladi, and K. Esbensen. "The Start and Early History of Chemometrics: Selected Interviews. Part 1." *J. Chemometr.* 4 (1990): 337–54.
- P. Geladi. "Chemometrics in Spectroscopy. Part 1. Classical Chemometrics." *Spectrochimica Acta Part B* 58 (2003): 767–82.
- P. Geladi. "Notes on the History and Nature of Partial Least Squares (Pls) Modelling." *J. Chemometr.* 2 (1988): 231–46.
- P. Hansen. "Pre-Processing Method Minimizing the Need for Reference Analyses." *J. Chemometr.* 15 (2001): 123–31.
- P. Hopke. "The Evolution of Chemometrics." *Anal. Chim. Acta* 500 (2003): 365–77.
- P.J. Gemperline. "Rugged Spectroscopic Calibration for Process Control." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 39 (1997): 29–40.
- P.M.C. Lacey. "Developments in the Theory of Particulate Mixing." *J. Appl. Chem.* 4 (1954): 257–68.
- P.V. Dankwertz, P.V. "The Definition and Measurement of Some Characteristics of Mixing." *Appl. Sci. Res.* 3 (1952): 279–89.
- Q. Guo, W. Wu, and D. Massart. "The Robust Normal Variate Transform for Pattern Recognition with near-Infrared Data." *Anal. Chim. Acta* 382 (1999): 87–103.
- Q. Shen, J. H Jiang, G.I. Shen, and R R. Q. Yu. "Edge Estimated Orthogonal Signal Correction for Data Preprocessing Prior to Pls Modeling: Qsar Studies of Cyclooxygenase-2 Inhibitors." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 82 (2006): 44–49.
- R. Bro. "Multiway Calibration. Multilinear Pls." *J. Chemometr.* 10 (1996): 47–61.
- R. Feudale, H. Tan, and S. Brown. "Improved Piecewise Orthogonal Signal Correction Algorithm." *Appl. Spectrosc.* 57 (2003): 1201–06.
- R. Kramer. *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*. New Cork: Marcel Dekker, 1998.
- R. Tauler, A. Smilde, and B. R. Kowalski. "Selectivity, Local Rank, Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution." *J. Chemometr.* 9 (1995): 31–58.
- R. Tauler, B. R. Kowalski, and S. Flemming. "Multivariate Curve Resolution Applied to Spectral Data from Multiple Runs of an Industrial Process ". *Anal. Chem.* 65 (1993): 2040–47.
- R. Tauler. "Multivariate Curve Resolution Applied to Second Order Data." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 133–46.
- R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L. X. Yu, E. H. Jefferson, and A. S. Hussain. "Near-Infrared Spectral Imaging for Quality Assurance of Pharmaceutical Products: Analysis of Tablets to Assess Powder Blend Homogeneity." *AAPS PharmSciTech.* 3 (2002): 1–15.
- R.E. Shaffer, S.L. Rose-Pehrsson, and R.A. McGill. "A Comparison Study of Chemical Sensor Array Pattern Recognition Algorithms." *Anal. Chim. Acta* 384 (1999): 305–17.
- R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, and S. J. Lister. "Correction of the Description of Standard Normal Variate (S_{nv}) and De-Trend Transformations in Practical Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis." *J. Near Infrared Spectrosc.* 1 (1993): 185–86.
- R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, and S.J. Lister. "Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra." *Appl. Spectrosc.* 43 (1989): 772–77.
- S: Wold. "Pattern Recognition by Means of Disjoint Principal Components Models." *Pattern Recogn.* 8 (1976): 127–39.
- S. Chang, E. Baughman, and B. McIntosh. "Implementation of Locally Weighted Regression to Maintain Calibrations on Ft-Nir Analyzers for Industrial Processes." *Appl. Spectrosc.* 55 (2001): 1199–206.
- S. Šašić, D. Clark, J. Mitchell, and M. Snowden. "Analyzing Raman Maps of Pharmaceutical Products by Sample-Sample Two-Dimensional Correlation." *Appl. Spectrosc.* 59 (2005): 630–38.

Bibliografía - Capítulo 2

- S. Šašić. "An in-Depth Analysis of Raman and near-Infrared Chemical Images of Common Pharmaceutical Tablets." *Appl. Spectrosc.* 61 (2007): 239–50.
- S. Theodoridis, and K. Koutroumbas. *Pattern Recognition*. New York: Academic Press 1999.
- S. Wold, and M. Sjostrom. "Statistical Analysis of the Hammett Equation: 1. Methods and Model Calculations." *Chem. Scripta* 2 (1972): 49–55.
- S. Wold, H. Antti, F. Lindgren, and J. Öhman. "Orthogonal Signal Correction of near-Infrared Spectra." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 44 (1998): 175–85.
- S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi. "Principal Component Analysis." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987): 37–52.
- S.J. Haswell, and A.D. Walmsley. "Chemometrics: The Issues of Measurement and Modelling." *Anal. Chem. Acta* 400 (1999): 399–412.
- S.R. Miles. "Heterogeneity in Seed Lots." *Inst. Seed Test. Assoc. Proc.* 27 (1962): 407–12.
- T. Fearn. "On Orthogonal Signal Correction." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 50 (2000): 47–52.
- T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, and S. Ochiai. "Evaluation of Homogeneity of Binary Blends of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(L-Lactic Acid) Studied by near Infrared Chemical Imaging (Nirci)." *Anal. Sci.* 23 (2007): 871–76.
- T. Isaksson, and T. Naes. "The Effect of Multiplicative Scatter Correction (Msc) and Linearity Improvement in Nir Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 1273–84.
- T. Kohonen. "The Self-Organizing Map." *Proc. IEEE* 78 (1990): 1464–80.
- T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, and A. M. C. Davies. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester, UK: NIR Publications, 2002.
- T. Puchert, C. V. Holzhauser, J. C. Menezes, D. Lochmann, and G. Reich. "A New Pat/Qbd Approach for the Determination of Blend Homogeneity: Combination of on-Line Nirs Analysis with Pc Scores Distance Analysis (Pc-Sda)." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011): 117–24.
- U. Thissen, M. Peppers, B. Üstün, W. J. Melssen, and L. M. C. Buydens. "Comparing Support Vector Machines to Pls for Spectral Regression Applications." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004): 169–79.
- W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, and D. Winstead. "Measurement of Drug Agglomerates in Powder Blending Simulation Samples by near Infrared Chemical Imaging." *Int. J. Pharm.* 350 (2008): 369–73.
- W. Vos, and L. Evers. "Msc in Bioinformatics: Statistical Data Mining." In *MSc in Bioinformatics: Statistical Data Mining*, 2004.
- Y. Chen, S. S. Thosar, R. A. Forbess, M. S. Kemper, R. L. Rubinovitz, and A. J. Shukla. "Prediction of Drug Content and Hardness of Intact Tablets Using Artificial Neural Network and near-Infrared Spectroscopy." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001): 623–31.
- Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, and M. Ulmschneider. "Infrared Hyperspectral Imaging for Qualitative Analysis of Pharmaceutical Solid Forms ". *Anal. Chim. Acta* 535 (2005): 79–87.
- Y. Roggo, C. Roeseler, and M. Ulmschneider. "Near Infrared Spectroscopy for Qualitative Comparison of Pharmaceutical Batches." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004): 777–86.
- Y. Takane, and T. Shibayama. "Principal Component Analysis with External Information on Both Subjects and Variables." *Psychometrika* 56 (1991): 97-120.

- A. Gupta, G. E. Peck, R. W. Miller, and K. R. Morris. "Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by near-Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 93 (2004): 1047–53.
- A. Peindado, J. Hammond, and A. Scott. "Development, Validation and Transfer of a near Infrared Method to Determine in-Line the End Point of a Fluidised Drying Process for Commercial Production Batches of an Approved Oral Solid Dose Pharmaceutical Product." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2010): 13–20.
- A. Pomerantsev, and O. Rodionova. "Process Analytical Technology: A Critical View of A. S. El-Hagrasy, H. R. Morris, F. D'Amico, R. A. Lodder, and J. K. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298–307.
- A.C. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A. M. Juppo, and J. Yliruusi. "Comparison of Torque Measurements and near-Infrared Spectroscopy in Characterization of a Wet Granulation Process." *J. Pharm. Sci.* 93 (2004): 2232–43.
- A.S. El-Hagrasy, and J. K. Drennen III. "A Process Analytical Technology Approach to near-Infrared Process Control of Pharmaceutical Powder Blending. Part Iii: Quantitative near-Infrared Calibration for Prediction of Blend Homogeneity and Characterization of Powder Mixing Kinetics." *J. Pharm. Sci.* 95 (2006): 422–34.
- A.S. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, and J. K. Drennen III. "A Process Analytical Technology Approach to near-Infrared Process Control of Pharmaceutical Powder Blending: Part Ii: Qualitative near-Infrared Models for Prediction of Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 95 (2006): 407–21.
- A.S. Hussain. "Emerging Science Issues in Pharmaceutical Manufacturing: Process Analytical Technologies, Paper Presented at the Science Board Presentations to Fda." Rockville, MD, 2001.
- C. C. Sun, H. Hou, P. Gao, C. Ma, C. Medina, and F. J. Alvarez. "Development of a High Drug Load Tablet Formulation Based on Assessment of Powder Manufacturability: Moving Towards Quality by Design." *J Pharm. Sci.* 98 (2009): 239–47.
- D.C. Watts. "Pat-an Fda Paper Presented at the the Heidelberg Pat Conference, ." Heidelberg, Germany, 2006.
- D.L. Illman. "CPAC: An Industry—University Cooperative Research Center for Process Analytical Chemistry." *TrAC Trends Anal. Chem.* 5 (1986): 164–72.
- E. Skibsted, and S. Engelsen. "Spectroscopy for Process Analytical Technology (Pat)." In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, edited by J. Lindon, G. Tranter and D. Koppenaal. 2651–61. Oxford,: Elsevier, 2010.
- E. Skibsted, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and D. T. Wite. "Examples of Nir Based Real Time Release in Tablet Manufacturing." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007): 1297–305.
- European Medicines Agency. "Final Guideline on Real Time Release Testing (2012)." edited by Pharmaceutical cGMP for the 21st Century: A Risk-Based Approach FDA, Department of Health and human services. Roskilde, 2004.
- G. X. Zhou, L. Crocker, J. Xu, J. Tabora, and Z. Ge. "In-Line Measurement of a Drug Substance Via near Infrared Spectroscopy to Ensure a Robust Crystallization Process." *J. Pharm. Sci.* 95 (2006): 2337–47.
- H. Wu, M. Tawakkul, M. White, and M. A. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Multivariate Approach for the Component Quantification in Powder Blends." *Int. J. Pharm.* 372 (2009): 39–48.
- ICH. "Pharmaceutical Development. Ich Harmonised Tripartite Guideline Q8 (R2)." 2009.
- ICH. "Pharmaceutical Quality System, Ich Harmonised Tripartite Guideline Q10." (2008).
- ICH. "Quality Risk Management. Ich Harmonised Tripartite Guideline Q9." (2005).
- ISO 9000. "Quality Management Systems - Fundamentals and Vocabulary." 2005.
- J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, and A. Nagi. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariate Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23–32.
- J. Rantanen, S. Lehtola, P. Rämetsä, J.-P. Mannermaa, and J. Yliruusi. "On-Line Monitoring of Moisture Content in an Instrumented Fluidized Bed Granulator with a Multi-Channel Nir Moisture Sensor." *Powder Technol.* 99 (1998): 163–70.
- J.B. Callis, D. L. Illman, and B. R. Kowalski. "Process Analytical Chemistry." *Anal. Chem.* 59 (1987): 624A–37A.
- J.G. Rosas, H. de Waard, C. Vervaet, J. P. Remon, W. Hinrichs, H. W. Frijlink, M. Blanco, and T. De Beer. "Nir Spectroscopy for the in-Line Monitoring of a Multicomponent Formulation During the Entire Freeze-Drying Process." (por enviar) (2012).

Bibliografía - Capítulo 3

- J.G. Rosas, M. Blanco, F. Santamaria, and M. Alcalá. "Assessment of Chemometric Methods for the Non-Invasive Monitoring of Solid Blending Processes Using Wireless NIR Spectroscopy." *J. Near Infrared Spectrosc.* (2012): (enviado).
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. Gonzalez, and M. Alcalá. "Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process. Part II: Nir Monitoring of Composition and Physical Parameters." *J. Pharm. Sci.* 100 (2011): 4442–51.
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. González, and M. Alcalá. "Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process. Part I: Determination of the Design Space." *J. Pharm. Sci.* 100 (2011): 4432–41.
- J.G. Rosas, M. Blanco, J. M. Gonzalez, and M. Alcalá. "Real-Time Determination of Critical Quality Attributes Using near-Infrared Spectroscopy: A Contribution for Process Analytical Technology (Pat)." *Talanta* 97 (2012): 163–70.
- J.K. Drennen, and R.A. Lodder. *Pharmaceutical Applications of near-Infrared Spectrometry* Greenwich: JAI Press, 1993.
- K. Kogermann, J. Aaltonen, C. J. Strachan, K. Pöllänen, J. Heinämäki, J. Yliruusi, and J. Rantanen. "Establishing Quantitative in-Line Analysis of Multiple Solid-State Transformations During Dehydration." *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 4983–99.
- L. Rodrigues, L. Vieira, J. Cardoso, and J. Menezes. "The Use of Nir as Multi-Parametric in-Situ Monitoring Technique in Filamentous Fermentation Systems." *Talanta* 75 (2008): 1356–61.
- L.X. Yu, R. A. Lionberger, A. S. Raw, R. D'Costa, H. Wu, and A. S. Hussain. "Applications of Process Analytical Technology to Crystallization Processes." *Adv. Drug Delivery Rev.* 56 (2004): 349–69.
- M. Andersson, S. Folestad, J. Gottfries, M.O. Johansson, M. Josefson, and K.G. Wahlund. "Quantitative Analysis of Film Coating in a Fluidized Bed Process by in-Line Nir Spectrometry and Multivariate Batch Calibration." *Anal. Chem.* 72 (2000): 2099–108.
- M. Blanco, A. C. Peinado, and J. Mas. "Monitoring Alcoholic Fermentation by Joint Use of Soft and Hard Modelling Methods." *Anal. Chim. Acta* 556 (2006): 364–73.
- M. Blanco, A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Lee, C. Park, A. Kim, B. Kwon, K. Bang, Y. Cho, M. Jeong, and G. Choi. "Dynamic Calibration for the in-Line Nir Monitoring of Film Thickness of Pharmaceutical Tablets Processed in a Fluid-Bed Coater." *J. Pharm. Sci.* 99 (2009): 325–35.
- M. Römer, J. Heinämäki, I. Miroshnyk, N. Kivikero, N. Sandler, J. Rantanen, and J. Yliruusi. "Phase Transformation of Erythromycin a Dihydrate During Fluid Bed Drying." *J. Pharm. Sci.* 97 (2007): 246–52.
- O. Berntsson, G. Zackrisson, and G. Östlingb. "Determination of Moisture in Hard Gelatin Capsules Using near-Infrared Spectroscopy: Applications to at-Line Process Control of Pharmaceuticals." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997): 895–900.
- P. Frake, D. Greenhalgh, S. Grierson, J. Hempenstall, and D. Rudd. "Process Control and End-Point Determination of a Fluid Bed Granulation by Application of near Infra-Red Spectroscopy, ." *Int. J. Pharm.* 151 (1997): 75–80.
- S. Pieters, T. De Beer, J. C. Kasper, D. Boulpaep, O. Waszkiewicz, M. Goodarzi, C. Tistaert, et al. "Near-Infrared Spectroscopy for in-Line Monitoring of Protein Unfolding and Its Interactions with Lyoprotectants During Freeze-Drying." *Anal. Chem.* 84 (2012): 947–55.
- S. Tabasi, R. Fahmy, D. Bensley, C. O'Brien, and S. Hoag. "Quality by Design, Part I: Application of Nir Spectroscopy to Monitor Tablet Manufacturing Process ". *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 4040–51.
- S. Tosi, M. Rossi, E. Tamburini, G. Vaccari, A. Amaretti, and D. Matteuzzi. "Assessment of in-Line near Infrared Spectroscopy for Continuous Monitoring of Fermentation Processes." *Biotechnol. Prog.* 19 (2003): 1816–21.
- S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, and D. Burgess. "Quality by Design Approach to Understand the Process of Nanosuspension Preparation." *Int. J. Pharm.* 377 (2009): 185–98.
- S.S. Sekulic, H. W. Ward, D. R. Brannegan, E. D. Stanley, C. L. Evans, S. T. Sciavolino, P. A. Hailey, and P. K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 68 (1996): 509–13.
- T. De Beer, A. Burggraefe, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, and C. Vervaet. "Near Infrared and Raman Spectroscopy for the in-Process Monitoring of Pharmaceutical Production Processes." *Int. J. Pharm.* 417 (2011): 32–47.
- T. Norris, P. K. Aldridge, and S. S. Sekulic. "Determination of End-Points for Polymorph Conversions of Crystalline Organic Compounds Using on-Line near-Infrared Spectroscopy." *Analyst* 122 (1997): 549–52.
- T. R. M. De Beer, M. Allesø, F. Goethals, A. Coppens, Y. Van der Heyden, H. Lopez De Diego, J. Rantanen, et al. "Implementation of a Process Analytical Technology System in a

Bibliografía - Capítulo 3

- Freeze-Drying Process Using Raman Spectroscopy for in-Line Process Monitoring." *Anal. Chem.* 79 (2007): 7992–8003.
- T.R.M. De Beer, P. Vercruysse, A. Burggraeve, T. Quinten, J. Ouyang, X. Zhang, C. Vervaet, J.P. Remon, and W.R.G. Baeyens. "In-Line and Real-Time Process Monitoring of a Freeze Drying Process Using Raman and Nir Spectroscopy as Complementary Process Analytical Technology (Pat) Tools." *J. Pharm. Sci.* 98 (2009): 3430–46.
- V. S. Tumuluria, M. S. Kemperb, I. R. Lewisb, S. Prodduturic, S. Majumdara, B. A. Averya, and M. A. Repka. "Off-Line and on-Line Measurements of Drug-Loaded Hot-Melt Extruded Films Using Raman Spectroscopy." *Int. J. Pharm.* 357 (2008): 77–84.
- V. Tumuluri, S. Proddutori, M. Crowley, S. Stodghill, M. Repka, and B. Avery. "The Use of near-Infrared Spectroscopy for the Quantitation of a Drug in Hot-Melt Extruded Films." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 (2004): 505–11.

- A. Cavinato, D. Mayes, Z. Ge, and J. Callis. "Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 62 (1990): 1977–82.
- A. Mouazen, J. De Baerdemaeker, and H. Ramon. "Towards Development of on-Line Soil Moisture Content Sensor Using a Fibre-Type Nir Spectrophotometer." *Soil and Tillage Research* 80 (2005): 171–83.
- A. Ordoñez, R. Ordoñez, I. Zampini, and M. Isla. "Design and Quality Control of a Pharmaceutical Formulation Containing Natural Products with Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties." *Int. J. Pharm.* 378 (2009): 51–58.
- C. Ackermann, N. Rodríguez-Hornedo, M. Islam, and S. Ciotti. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- C. Calvin, H. Hou, P. Gao, C. Ma, C. Medina, and F. Alvarez. "Development of a High Drug Load Tablet Formulation Based on Assessment of Powder Manufacturability: Moving Towards Quality by Design." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 1 (2009): 239–47.
- E. Ciurczak. "Growth of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical and Medical Sciences." *American Pharmaceutical Reviews* 5 (2002): 68–73.
- E. Ciurczak. "Uses of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis ". *Appl. Spectrosc. Rev.* 23 (1987): 147–63.
- G. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Design*. New York: Marcel Dekker, 1999.
- H. Bjørsvik. "Reaction Monitoring in Explorative Organic Synthesis Using Fiber-Optical Nir Spectroscopy and Principal Component Analysis." *Appl. Spectrosc.* 50 (1996): 1541–44.
- H. Wu, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Approach for Evaluation of Powder Blending Process Kinetics and Determination of Powder Blending End Point. ." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 8 (2009): 2784–98.
- H. Wu, M. Tawakkul, M. White, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Multivariable Approach for the Component Quantification in Power Blends." *Int. J. Pharm.* 372 (2009): 39–48.
- ICH. "ICH-Topic Q8(R2): Pharmaceutical Development." 2009.
- J. Drennen, and R. Loddner. *Pharmaceutical Applications of near-Infrared Spectrometry* Greenwich, CT, UK: JAI Press: , 1993.
- J. Goupy. *Plans D'expériences Pour Surfaces De Réponse*. Paris: Dunod, 1999.
- J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, and A. Nagi. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariate Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23–32.
- J. Huang. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariable Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23–32.
- J. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson. "Determination of Particle Size in Powders by Scatter Correction in Diffuse near-Infrared Reflectance." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 722–28.
- J. Jones, I. Last, B. MacDonald, and K. Prebble. "Development and Transferability of near-Infrared Methods for Determination of Moisture in a Freeze-Dried Injection Products." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993): 1227–31.
- J.M. Juran and A.B. Godfrey. *Juran's Quality Handbook*. 5th ed.: McGraw-Hill, 1999.
- K. Morisseau, and C. Rhodes. "Near-Infrared Spectroscopy as a Nondestructive Alternative to Conventional Tablet Hardness Testing." *Pharm. Res.* 14 (1997): 108–11.
- M. Blanco, and M. A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries." edited by K. Bakeev. 463–91: John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- M. Blanco, and M. Romero. "Near Infrared Transflectance Spectroscopy: Determination of Dexketoprofen in a Hydrogel." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 467–72.
- M. Blanco, D. Valdes, M. Bayod, F. Fernandez-Mari, and I. Llorente. "Characterization and Analysis of Polymorphs by near-Infrared Spectrometry." *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004): 221–27.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Analysis of Neutralizer–Carbomer and Surfactant–Carbomer Interactions in Aqueous, Hydroalcoholic, and Anhydrous Gel Formulations." *The AAPS Journal* 6 (2004): 61–67.
- M. Islam. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.

Bibliografía - Capítulo 4

- M. Kamat, R. Lodder, and P. DeLuca. "Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose through Intact Glass Vials ". *Pharm. Res.* 6 (1989): 961-65.
- M. Kemper, E. Magnuson, S. Lowry, W. McCarthy, N. Aksornkoe, D. Watts, J. Johnson, and A. Shukla. "Use of Ft-Nir Transmission Spectroscopy for the Quantitative Analysis of an Active Ingredient in a Translucent Pharmaceutical Topical Gel Formulation." *The AAPS Journal* 3 (2001): 81-85.
- M. Ulmschneider, G. Barth, and E. Trenka. "Building Transferable Cluster Calibrations for the Identification of Different Solid Excipients with near-Infrared Spectroscopy." *Drugs* 43 (2000): 71-73.
- P. Luner, S. Majuru, J. Seyer, and M. Kemper. "Quantifying Crystalline Form Composition in Binary Powder Mixtures Using near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000): 231-46.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multi-Way Partial Least Squares in Monitoring Batch Processes." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 97-108.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multivariate Spc Charts for Monitoring Batch Processes." *Technometrics* 37 (1995): 41-59.
- R. Batti, A. Kamoun, M. Chaabouni, M. Sergent, and R. Phan.Tan.Luu. "Screening and Optimization of Factors of a Detergent Admixture Preparation." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006): 198-208.
- R. E. Schirmer. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*. 2nd ed.: CRC Press, 1991.
- R. Mackison, S. Brinkworth, R. Belchamber, R. Aries, D. Cutler, C. Deeley, and H. Mould. "A Demonstration of Truly Remote in-Line near-Infrared Process Analysis." *Appl. Spectrosc.* 46 (1992): 1020-24.
- R. Maesschalck, F. Sanchez, D. Massart, P. Doherty, and P. Hailey. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52 (1998): 725-31.
- R.H. Myres, and D. C. Montgomery. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, . New York: Wiley, 1995.
- S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, and D. Burgess. "Quality by Design Approach to Understand the Process of Nanosuspension Preparation." *Int. J. Pharm.* 377 (2009): 185-98.
- S. Wold, N. Kettaneh, H. Fridén, and A. Holmberg. "Modelling and Diagnostics of Batch Processes and Analogous Kinetic Experiments." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 44 (1998): 331-40.
- T. Kourti. "Process Analytical Technology Beyond Real-Time Analyzers: The Role of Multivariate Analysis." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 257-78.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q10 Quality Systems Approach to Pharmaceutical Cgmp Regulations." Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q8 Pharmaceutical Development." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q9 Quality Risk Management." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "PAT Guidance for Industry—a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance." edited by Department of Health and Human Services. Rockville, MD, 2004.
- V. W. Uhl, and J. B. Gray. *Mixing: Theory and Practice*. New York 1967.
- X. Zhou, P. Hines, and M. Borer. "Moisture Determination in Hygroscopic Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 219-25.

- A. Cavinato, D. Mayes, Z. Ge, and J. Callis. "Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 62 (1990): 1977–82.
- A. Gupta, G.E. Peck, R.W. Miller, and K.R. Morris. "Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by near-Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 4 (2004): 1047-53.
- A. Jaakko, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, et al. "Polymorph Screening Using near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 75, no. 19 (2003): 5267-73.
- A. Mouazen, J. De Baerdemaeker, and H. Ramon. "Towards Development of on-Line Soil Moisture Content Sensor Using a Fibre-Type Nir Spectrophotometer." *Soil and Tillage Research* 80 (2005): 171–83.
- A. Ordoñez, R. Ordoñez, I. Zampini, and M. Isla. "Design and Quality Control of a Pharmaceutical Formulation Containing Natural Products with Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties." *Int. J. Pharm.* 378 (2009): 51–58.
- A. Patel, P.E. Luner, and M.S. Kemper. "Low-Level Determination of Polymorph Composition in Physical Mixtures by near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 3 (2001): 360-70.
- A.C. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A.M. Juppo, and J. Yliruusi. "Comparison of Torque Measurements and near-Infrared Spectroscopy in Characterization of a Wet Granulation Process." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 9 (2004): 2232-43.
- A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, and J.K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 9 (2001): 1298-307.
- C. Ackermann, N. Rodriguez-Hornedo, M. Islam, and S. Ciotti. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- C. Calvin, H. Hou, P. Gao, C. Ma, C. Medina, and F. Alvarez. "Development of a High Drug Load Tablet Formulation Based on Assessment of Powder Manufacturability: Moving Towards Quality by Design." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 1 (2009): 239–47.
- C. Ufret, and K. Morris. "Modeling of Powder Blending Using on-Line near-Infrared Measurements." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 719-29.
- D.J. Wargo, and J.K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopic Characterization of Pharmaceutical Powder Blends." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 11 (1996): 1415-23.
- E. Ciurczak. "Growth of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical and Medical Sciences." *American Pharmaceutical Reviews* 5 (2002): 68–73.
- E. Ciurczak. "Uses of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis ". *Appl. Spectrosc. Rev.* 23 (1987): 147–63.
- E.W. Ciurczak. "Pharmaceutical Mixing Studies Using Nearinfrared Spectroscopy." *Pharm. Technol.* 15 (1991): 140-45.
- F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D.L. Massart, S. S. Dive, and P. Hailey. "Monitoring Powder Blending by Nir Spectroscopy." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 352, no. 7 (1995): 771-78.
- G. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Design*. New York: Marcel Dekker, 1999.
- G. Reich. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging: Basic Principles and Pharmaceutical Applications." *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, no. 8 (2005): 1109-43.
- H. Bjørsvik. "Reaction Monitoring in Explorative Organic Synthesis Using Fiber-Optical Nir Spectroscopy and Principal Component Analysis." *Appl. Spectrosc.* 50 (1996): 1541–44.
- H. Wu, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Approach for Evaluation of Powder Blending Process Kinetics and Determination of Powder Blending End Point. ." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 8 (2009): 2784–98.
- H. Wu, M. Tawakkul, M. White, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Multivariable Approach for the Component Quantification in Power Blends." *Int. J. Pharm.* 372 (2009): 39–48.
- H.J. Venables and J.I. Wells. "Powder Mixing." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 599.
- ICH. "Ich-Topic Q8(R2): Pharmaceutical Development." 2009.
- J. Berman and J.A. Planchard. "Blend Uniformity and Unit Dose Sampling." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, no. 11 (1995): 1257-83.
- J. Berman, A. Schoeneman and J.T. Shelton. "Unit Dose Sampling: A Tale of Two Thieves." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 11 (1996): 1121-32.

Bibliografía - Capítulo 5

- J. Drennen, and R. Lodder. *Pharmaceutical Applications of near-Infrared Spectrometry* Greenwich, CT, UK: JAI Press: , 1993.
- J. Goupy. *Plans D'expériences Pour Surfaces De Réponse*. Paris: Dunod, 1999.
- J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, and A. Nagi. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariate Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23–32.
- J. Huang. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariable Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23–32.
- J. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson. "Determination of Particle Size in Powders by Scatter Correction in Diffuse near-Infrared Reflectance." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 722–28.
- J. Jones, I. Last, B. MacDonald, and K. Prebble. "Development and Transferability of near-Infrared Methods for Determination of Moisture in a Freeze-Dried Injection Products." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993): 1227–31.
- J. Lopes, P. Cost, T. Alaves, and J. Menezes. "Chemometrics in Bioprocess Engineering: Process Analytical Technology (Pat) Applications." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 74, no. 2 (2004): 7.
- J. Pérez-Ramos, W. Findlay, Garnet Peck, and Kenneth Morris. "Quantitative Analysis of Film Coating in a Pan Coater Based on in-Line Sensor Measurements." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 1 (2005): E127-E36.
- J.M. Juran, and A. B. Godfrey. *Juran's Quality Handbook*. 5th ed.: McGraw-Hill, 1999.
- K. Morisseau, and C. Rhodes. "Near-Infrared Spectroscopy as a Nondestructive Alternative to Conventional Tablet Hardness Testing." *Pharm. Res.* 14 (1997): 108–11.
- M. Blanco and A. Peguero. "Analysis of Pharmaceuticals by Nir Spectroscopy without a Reference Method." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 29, no. 10 (2010): 1127–36.
- M. Blanco and M. A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126, no. 12 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries." edited by K. Bakeev. 463–91: John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- M. Blanco, and M. Romero. "Near Infrared Transflectance Spectroscopy: Determination of Dexketoprofen in a Hydrogel." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 467–72.
- M. Blanco, D. Valdes, M. Bayod, F. Fernandez-Mari, and I. Llorente. "Characterization and Analysis of Polymorphs by near-Infrared Spectrometry." *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004): 221–27.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Analysis of Neutralizer–Carbomer and Surfactant–Carbomer Interactions in Aqueous, Hydroalcoholic, and Anhydrous Gel Formulations." *The AAPS Journal* 6 (2004): 61–67.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- M. Kamat, R. Lodder, and P. DeLuca. "Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose through Intact Glass Vials ". *Pharm. Res.* 6 (1989): 961–65.
- M. Kemper, E. Magnuson, S. Lowry, W. McCarthy, N. Aksornkoae, D. Watts, J. Johnson, and A. Shukla. "Use of Ft-Nir Transmission Spectroscopy for the Quantitative Analysis of an Active Ingredient in a Translucent Pharmaceutical Topical Gel Formulation." *The AAPS Journal* 3 (2001): 81–85.
- M. Ulmschneider, G. Barth, and E. Trenka. "Building Transferable Cluster Calibrations for the Identification of Different Solid Excipients with near-Infrared Spectroscopy." *Drugs* 43 (2000): 71–73.
- N.H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, and S. Reynolds. "A Homogeneity Study Using Nir Spectroscopy: Tracking Magnesium Stearate in Bohle Bin-Blender." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, no. 6 (2003): 679–87.
- O. Berntsson, L. G. Danielsson, B. Lagerholm, and S. Folestad. "Quantitative in-Line Monitoring of Powder Blending by near Infrared Reflection Spectroscopy." *Powder Technol.* 123, no. 2-3 (2002): 185–93.
- P. Luner, S. Majuru, J. Seyer, and M. Kemper. "Quantifying Crystalline Form Composition in Binary Powder Mixtures Using near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000): 231–46.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multi-Way Partial Least Squares in Monitoring Batch Processes." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 97–108.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multivariate Spc Charts for Monitoring Batch Processes." *Technometrics* 37 (1995): 41–59.

Bibliografía - Capítulo 5

- P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, and P. K. Aldridge. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy Part I. System Development and Control." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 5 (1996): 551-59.
- R. Batti, A. Kamoun, M. Chaabouni, M. Sergent, and R. Phan.Tan.Luu. "Screening and Optimization of Factors of a Detergent Admixture Preparation." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006): 198-208.
- R. Chang, J. Shukla and J. Buehler. "An Evaluation of a Unit-Dose Compacting Sample Thief and a Discussion of Content Uniformity Testing and Blending Validation Issues." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 9-10 (1996): 1031-35.
- R. Cogdill, C. Anderson, M. Delgado-Lopez, D. Molseed, R. Chisholm, R. Bolton, T. Herkert, A. Afnán, and J. Drennen. "Process Analytical Technology Case Study Part I: Feasibility Studies for Quantitative near-Infrared Method Development." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 2 (2005): E262-E72.
- R. De Maesschalck, F. Cuesta Sanchez, D.L. Massart, P. Doherty, and Hailey P. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52, no. 5 (1998): 725-31.
- R. Mackison, S. Brinkworth, R. Belchamber, R. Aries, D. Cutler, C. Deeley, and H. Mould. "A Demonstration of Truly Remote in-Line near-Infrared Process Analysis." *Appl. Spectrosc.* 46 (1992): 1020-24.
- R. Maesschalck, F. Sanchez, D. Massart, P. Doherty, and P. Hailey. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52 (1998): 725-31.
- R.E. Schirmer. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*. 2nd ed.: CRC Press, 1991.
- R.H. Myres, and D. C. Montgomery. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, . New York: Wiley, 1995.
- S. Doherty, and C. Kettler. "On-Line Applications on the Pharmaceutical Industry." In *Process Analytical Technology*, edited by Katherine A. Bakeev. 329-58: Lackwell Publishing, 2005.
- S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, and D. Burgess. "Quality by Design Approach to Understand the Process of Nanosuspension Preparation." *Int. J. Pharm.* 377 (2009): 185-98.
- S. Wold, N. Kettaneh, H. Fridén, and A. Holmberg. "Modelling and Diagnostics of Batch Processes and Analogous Kinetic Experiments." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 44 (1998): 331-40.
- S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and P.K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 68, no. 3 (1996): 509-13.
- S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, and P.A. Hailey. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy: Part II. Qualitative Approaches to Blend Evaluation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, no. 8 (1998): 1285-309.
- T. Garcia, M.K. Taylor, and G.S. Pande. "Comparison of the Performance of Two Sample Thieves for the Determination of the Content Uniformity of a Powder Blend." *Pharm. Dev. Technol.* 3, no. 1 (1998): 7-12.
- T. Kourti. "Process Analytical Technology Beyond Real-Time Analyzers: The Role of Multivariate Analysis." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 257-78.
- T. R. M. De Beer, C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Vercruyssen, A. Burggraeve, A. Lemos, et al. "Raman Spectroscopy as a Process Analytical Technology (Pat) Tool for the in-Line Monitoring and Understanding of a Powder Blending Process." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, no. 3 (2008): 772-79.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q10 Quality Systems Approach to Pharmaceutical Cgmp Regulations." Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q8 Pharmaceutical Development." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q9 Quality Risk Management." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry. Pat—a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance." (september 2004 2004).
- US-FDA. "Pat Guidance for Industry—a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance." edited by Department of Health and Human Services. Rockville, MD, 2004.
- V.W. Uhl, and J. B. Gray. *Mixing: Theory and Practice*. New York 1967.
- X. Zhou, P. Hines, and M. Borer. "Moisture Determination in Hygroscopic Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 219-25.

- A. Cavinato, D. Mayes, Z. Ge, and J. Callis. "Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 62 (1990): 1977–82.
- A. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, and J.K. Drennen. "A Process Analytical Technology Approach to near-Infrared Process Control of Pharmaceutical Powder Blending: Part II: Qualitative near-Infrared Models for Prediction of Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 95 (2005): 407–21.
- A. Gupta, G.E. Peck, R.W. Miller, and K.R. Morris. "Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by near-Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 4 (2004): 1047–53.
- A. Jaakko, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, et al. "Polymorph Screening Using near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 75, no. 19 (2003): 5267–73.
- A. Mouazen, J. De Baerdemaeker, and H. Ramon. "Towards Development of on-Line Soil Moisture Content Sensor Using a Fibre-Type Nir Spectrophotometer." *Soil and Tillage Research* 80 (2005): 171–83.
- A. Ordoñez, R. Ordoñez, I. Zampini, and M. Isla. "Design and Quality Control of a Pharmaceutical Formulation Containing Natural Products with Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties." *Int. J. Pharm.* 378 (2009): 51–58.
- A. Patel, P.E. Luner, and M.S. Kemper. "Low-Level Determination of Polymorph Composition in Physical Mixtures by near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 3 (2001): 360–70.
- A.C. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A.M. Juppo, and J. Yliruusi. "Comparison of Torque Measurements and near-Infrared Spectroscopy in Characterization of a Wet Granulation Process." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 9 (2004): 2232–43.
- A.D. Karande, P.W. Sia Heng, and C.V. Liew. "In-Line Quantification of Micronized Drug and Excipients in Tablets by near Infrared (Nir Spectroscopy: Real Time Monitoring of Tableting Process." *Int. J. Pharm.* 396 (2010): 63–74.
- A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, and J.K. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298–307.
- C. Ackermann, N. Rodriguez-Hornedo, M. Islam, and S. Ciotti. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- C. Calvin, H. Hou, P. Gao, C. Ma, C. Medina, and F. Alvarez. "Development of a High Drug Load Tablet Formulation Based on Assessment of Powder Manufacturability: Moving Towards Quality by Design." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 1 (2009): 239–47.
- C. Ufret and K. Morris. "Modeling of Powder Blending Using on-Line near-Infrared Measurements." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 719–29.
- C.V Liew, A.D. Karande, and P.W. Heng. "In-Line Quantification of Drug and Excipients in Cohesive Powder Blends by near Infrared Spectroscopy." *Int. J. Pharm.* 386 (2010): 138–48.
- D. Wargo and J.K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopic Characterization of Pharmaceutical Powder Blends." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 11 (1996): 1415–23.
- D.M. Koller, A. Posch, G. Horl, C. Voura, S. Radl, N. Urbanetz, S.D. Fraser, et al. "Continuous Quantitative Monitoring of Powder Mixing Dynamics by near-Infrared Spectroscopy." *Powder Technol.* 205 (2011): 87–96.
- De Beer, T. R. M., C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Verduyck, A. Burggraeve, A. Lemos, et al. "Raman Spectroscopy as a Process Analytical Technology (Pat) Tool for the in-Line Monitoring and Understanding of a Powder Blending Process." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, no. 3 (2008): 772–79.
- E. Ciurczak. "Growth of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical and Medical Sciences." *American Pharmaceutical Reviews* 5 (2002): 68–73.
- E. Ciurczak. "Pharmaceutical Mixing Studies Using Nearinfrared Spectroscopy." *Pharm. Technol.* 15 (1991): 140–45.
- E. Ciurczak. "Uses of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis ". *Appl. Spectrosc. Rev.* 23 (1987): 147–63.
- E.T. Skibsted, H.F. Boelens, J.A. Westerhuis, D.T. Witte, and A.K. Smilde. "A Simple Assessment of Homogeneity in Pharmaceutical Mixing Processes Using a near-Infrared Reflectance Probe and Control Charts." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006): 26–35.

Bibliografía - Capítulo 6

- El-Hagrasy, Arwa S., Hannah R. Morris, Frank D'Amico, Robert A. Lodder, and James K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 9 (2001): 1298-307.
- F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D. L. Massart, S. S. Dive, and P. Hailey. "Monitoring Powder Blending by Nir Spectroscopy." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 352, no. 7 (1995): 771-78.
- G. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Design*. New York: Marcel Dekker, 1999.
- G. Reich. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging: Basic Principles and Pharmaceutical Applications." *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, no. 8 (2005): 1109-43.
- H. Bjørsvik. "Reaction Monitoring in Explorative Organic Synthesis Using Fiber-Optical Nir Spectroscopy and Principal Component Analysis." *Appl. Spectrosc.* 50 (1996): 1541-44.
- H. Wu, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Approach for Evaluation of Powder Blending Process Kinetics and Determination of Powder Blending End Point. ." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 8 (2009): 2784-98.
- H. Wu, M. Tawakkul, M. White, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Multivariable Approach for the Component Quantification in Power Blends." *Int. J. Pharm.* 372 (2009): 39-48.
- H. Zhang, Z. Jiang, J. Pi, H. Xu, and R. Du. "On-Line Monitoring of Pharmaceutical Production Processes Using Hidden Markov Model." *J. Pharm. Sci.* 98 (2008): 1487-98.
- H.J. Venables and J.I. Wells. "Powder Mixing." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 599.
- ICH. "Ich-Topic Q8(R2): Pharmaceutical Development." 2009.
- J. Berman and J.A. Planchard. "Blend Uniformity and Unit Dose Sampling." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, no. 11 (1995): 1257-83.
- J. Berman, A. Schoeneman, and J.T. Shelton. "Unit Dose Sampling: A Tale of Two Thieves." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 11 (1996): 1121-32.
- J. Berman, D.E. Elinski, C.R. Gonzales, J.D. Hofer, P.J. Jimenez, J.A. Planchard, R.J. Tlachac, and P.F. Vogel. "Blend Uniformity Analysis: Validation and in-Process Testing. Technical Report No. 25. Pda (Parenteral Drug Association).". *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997): 1-99.
- J. Drennen, and R. Lodder. *Pharmaceutical Applications of near-Infrared Spectrometry* Greenwich, CT, UK: JAI Press: , 1993.
- J. Goupy. *Plans D'expériences Pour Surfaces De Réponse*. Paris: Dunod, 1999.
- J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, and A. Nagi. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariate Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23-32.
- J. Huang. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariable Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23-32.
- J. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson. "Determination of Particle Size in Powders by Scatter Correction in Diffuse near-Infrared Reflectance." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 722-28.
- J. Jones, I. Last, B. MacDonald, and K. Prebble. "Development and Transferability of near-Infrared Methods for Determination of Moisture in a Freeze-Dried Injection Products." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993): 1227-31.
- J. Lopes, P. Cost, T. Alaves, and J. Menezes. "Chemometrics in Bioprocess Engineering: Process Analytical Technology (Pat) Applications." *Chemometr. Intell. lab. Syst.* 74, no. 2 (2004): 7.
- J. Pérez-Ramos, W. Findlay, G. Peck, and K. Morris. "Quantitative Analysis of Film Coating in a Pan Coater Based on in-Line Sensor Measurements." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 1 (2005): E127-E36.
- J.G. Rosas, and M. Blanco. "A Criterion for Assessing Homogeneity Distribution in Hyperspectral Images. Part 2: Application of Homogeneity Indices to Solid Pharmaceutical Dosage Forms. ." *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2012).
- J.M. Juran and A. B. Godfrey. *Juran's Quality Handbook*. 5th ed.: McGraw-Hill, 1999.
- K. Morisseau, and C. Rhodes. "Near-Infrared Spectroscopy as a Nondestructive Alternative to Conventional Tablet Hardness Testing." *Pharm. Res.* 14 (1997): 108-11.
- L. Bellamy, A. Nordon, and D. Littlejohn. "Real-Time Monitoring of Powder Mixing in a Convective Blender Using Non-Invasive Reflectance Nir Spectrometry." *Analyst* 133 (2008): 58-64.
- L.T. Fan, S.J. Chen, and C.A. Watson. "Solids Mixing." *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970): 53-66.
- M. Blanco and A. Peguero. "Analysis of Pharmaceuticals by Nir Spectroscopy without a Reference Method." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 29, no. 10 (2010): 1127-36.
- M. Blanco and M.A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126, no. 12 (2001): 2212-17.

Bibliografía - Capítulo 6

- M. Blanco, and M. A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries." edited by K. Bakeev. 463–91: John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- M. Blanco, and M. Romero. "Near Infrared Transflectance Spectroscopy: Determination of Dexketoprofen in a Hydrogel." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 467–72.
- M. Blanco, D. Valdes, M. Bayod, F. Fernandez-Mari, and I. Llorente. "Characterization and Analysis of Polymorphs by near-Infrared Spectrometry." *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004): 221–27.
- M. Blanco, M. Bautista, and M. Alcalá. "Preparing Calibration Sets for Use in Pharmaceutical Analysis by Nir- Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 1236– 45.
- M. Blanco, R. Cueva, and J. Cruz. "Critical Evaluation of Methods for End-Point Determination in Pharmaceutical Blending Processes." *Anal. Methods* (2012).
- M. Blanco, R. Gozalez, and E. Bertran. "Monitoring Powder Blending in Pharmaceutical Processes by Use of near Infrared Spectroscopy." *Talanta* 56 (2002): 203–12.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Analysis of Neutralizer–Carbomer and Surfactant–Carbomer Interactions in Aqueous, Hydroalcoholic, and Anhydrous Gel Formulations." *The AAPS Journal* 6 (2004): 61–67.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- M. Kamat, R. Lodder, and P. DeLuca. "Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose through Intact Glass Vials ". *Pharm. Res.* 6 (1989): 961–65.
- M. Kemper, E. Magnuson, S. Lowry, W. McCarthy, N. Aksornkoae, D. Watts, J. Johnson, and A. Shukla. "Use of Ft-Nir Transmission Spectroscopy for the Quantitative Analysis of an Active Ingredient in a Translucent Pharmaceutical Topical Gel Formulation." *The AAPS Journal* 3 (2001): 81–85.
- M. Sullivan. "The Use of Nir as a Pat Tool for Measuring Blend Uniformity.". Supplement to *Spectroscopy* (February 2006): 22–30.
- M. Ulmschneider, G. Barth, and E. Trenka. "Building Transferable Cluster Calibrations for the Identification of Different Solid Excipients with near-Infrared Spectroscopy." *Drugs* 43 (2000): 71–73.
- N. Harnby, M.F. Edwards, and A.W. Nienow. *Mixing in the Process Industries*. 2nd. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1997.
- N.H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, and S. Reynolds. "A Homogeneity Study Using Nir Spectroscopy: Tracking Magnesium Stearate in Bohle Bin-Blender." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, no. 6 (2003): 679-87.
- O. Berntsson, L. G. Danielsson, B. Lagerholm, and S. Folestad. "Quantitative in-Line Monitoring of Powder Blending by near Infrared Reflection Spectroscopy." *Powder Technol.* 123, no. 2-3 (2002): 185-93.
- O. Berntsson, L.G. Danielsson, B. Lagerholm, and S. Folestad. "Quantitative in-Line Monitoring of Powder Blending by near Infrared Reflection Spectroscopy." *Powder Technol.* 123 (2002): 185–93.
- P. Luner, S. Majuru, J. Seyer, and M. Kemper. "Quantifying Crystalline Form Composition in Binary Powder Mixtures Using near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000): 231–46.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multi-Way Partial Least Squares in Monitoring Batch Processes." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 97–108.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multivariate Spc Charts for Monitoring Batch Processes." *Technometrics* 37 (1995): 41–59.
- P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, and P. K. Aldridge. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy Part I. System Development and Control." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 5 (1996): 551-59.
- P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, and P.K. Aldridge. "Automated System for the on-Line Monitoring of Poder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy Part I. System Development and Control." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996): 551-59.
- P.P. LaPointe-Garant, J.S. Simard, and N. Abatzoglou. "Real-Time Nir Monitoring of a Pharmaceutical Blending Process through Multivariate Analysis-Derived Models." Paper presented at the 1st WSEAS international conference on multivariate analysis and its application in science and engineering (MAASE'08), Turkey, 2008.
- R. Batti, A. Kamoun, M. Chaabouni, M. Sergent, and R. Phan.Tan.Luu. "Screening and Optimization of Factors of a Detergent Admixture Preparation." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006): 198–208.

Bibliografía - Capítulo 6

- R. Cogdill, C. Anderson, M. Delgado-Lopez, D. Molseed, R. Chisholm, R. Bolton, T. Herkert, A. Afán, and J. Drennen. "Process Analytical Technology Case Study Part I: Feasibility Studies for Quantitative near-Infrared Method Development." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 2 (2005): E262-E72.
- R. De Maesschalck, F. Cuesta Sanchez, D.L. Massart, P. Doherty, and Hailey P. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52, no. 5 (1998): 725-31.
- R. Mackison, S. Brinkworth, R. Belchamber, R. Aries, D. Cutler, C. Deeley, and H. Mould. "A Demonstration of Truly Remote in-Line near-Infrared Process Analysis." *Appl. Spectrosc.* 46 (1992): 1020-24.
- R. Maesschalck, F. Sanchez, D. Massart, P. Doherty, and P. Hailey. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52 (1998): 725-31.
- R.E. Schirmer. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*. 2nd ed.: CRC Press, 1991.
- R.H. Myres, and D. C. Montgomery. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, . New York: Wiley, 1995.
- R.K. Chang, J. Shukla, and J. Buehler. "An Evaluation of a Unit-Dose Compacting Sample Thief and a Discussion of Content Uniformity Testing and Blending Validation Issues." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 9-10 (1996): 1031-35.
- S. Doherty and C. Kettler. "On-Line Applications on the Pharmaceutical Industry." In *Process Analytical Technology*, edited by Katherine A. Bakeev. 329-58: Lackwell Publishing, 2005.
- S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, and D. Burgess. "Quality by Design Approach to Understand the Process of Nanosuspension Preparation." *Int. J. Pharm.* 377 (2009): 185-98.
- S. Wold, N. Kettaneh, H. Fridén, and A. Holmberg. "Modelling and Diagnostics of Batch Processes and Analogous Kinetic Experiments." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 44 (1998): 331-40.
- S.R. Miles. "Homogeneity of Seeds Lots." *Inst. Seed Test. Assoc. Proc.* 27 (1962): 407-12.
- S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and P.K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy". *Anal. Chem.* 68 (1996): 509-13.
- S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and P.K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 68, no. 3 (1996): 509-13.
- S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, and P.A. Hailey. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy. Part II. Qualitative Approaches to Blend Evaluation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 1285-309.
- S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, and P.A. Hailey. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy: Part II. Qualitative Approaches to Blend Evaluation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, no. 8 (1998): 1285-309.
- T. Garcia, M.K. Taylor, and G.S. Pande. "Comparison of the Performance of Two Sample Thieves for the Determination of the Content Uniformity of a Powder Blend." *Pharm. Dev. Technol.* 3, no. 1 (1998): 7-12.
- T. Kourti. "Process Analytical Technology Beyond Real-Time Analyzers: The Role of Multivariate Analysis." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 257-78.
- T. Puchert, C.V. Holzhauer, J.C. Menezes, D. Lochmann, and G. Reich. "A New Pat/Qbd Approach for the Determination of Blend Homogeneity: Combination of on-Line Nirs Analysis with Pc Scores Distance Analysis (Pc-Sda)." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011): 173-82.
- US-FDA. "Guidance for Industry, Powder Blends and Finished Dosage Units — Stratified in-Process Dosage Unit Sampling and Assessment." 2003.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q10 Quality Systems Approach to Pharmaceutical Cgmp Regulations." Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q8 Pharmaceutical Development." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q9 Quality Risk Management." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance: Pat – a Framework for Innovative Pharmaceutical Development." 2004.
- US-FDA. "Pat Guidance for Industry—a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance." edited by Department of Health and Human Services. Rockville, MD, 2004.
- V. W. Uhl, and J. B. Gray. *Mixing: Theory and Practice*. New York 1967.
- W. Momose, K. Imai, S. Yokota, E. Yonemochi, and K. Terada. "Process Analytical Technology Applied for End-Point Detection of Pharmaceutical Blending by Combining Two

Bibliografía - Capítulo 6

- Calibration-Free Methods: Simultaneously Monitoring Specific near-Infrared Peak Intensity and Moving Block Standard Deviation." *Powder Technol.* 210 (2011): 122 – 31.
- X. Zhou, P. Hines, and M. Borer. "Moisture Determination in Hygroscopic Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 219–25.
- Y. Sulub, B. Wabuyele, P. Gargiulo, J. Pazdan, J. Cheney, J. Berry, A. Gupta, et al. "Real-Time on-Line Blend Uniformity Monitoring Using near-Infrared Reflectance Spectrometry: A Noninvasive Off-Line Calibration Approach." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009): 48 - 54.
- Y. Sulub, M. Konigsberger, and J. Cheney. "Blend Uniformity End-Point Determination Using near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011): 429–34.
- Z. Shi, R. Cogdill, S. Short, and C. Anderson. "Process Characterization of Powder Blending by near-Infrared Spectroscopy: Blend End-Points and Beyond." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008): 738–45.

- A. Bardat, J. Biguet, E. Chatenet, and F. Courteille. "Moisture Measurement: A New Method for Monitoring Freeze-Drying Cycles." *J. Parenter. Sci. Technol.* 47 (1993): 293-99.
- A. Cavinato, D. Mayes, Z. Ge, and J. Callis. "Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 62 (1990): 1977-82.
- A. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, and J.K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 9 (2001): 1298-307.
- A. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, and J.K. Drennen. "A Process Analytical Technology Approach to near-Infrared Process Control of Pharmaceutical Powder Blending: Part II: Qualitative near-Infrared Models for Prediction of Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 95 (2005): 407-21.
- A. Gupta, Garnet E. Peck, Ronald W. Miller, and Kenneth R. Morris. "Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by near-Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 4 (2004): 1047-53.
- A. Jaakko, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, et al. "Polymorph Screening Using near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 75, no. 19 (2003): 5267-73.
- A. Mouazen, J. De Baerdemaeker, and H. Ramon. "Towards Development of on-Line Soil Moisture Content Sensor Using a Fibre-Type Nir Spectrophotometer." *Soil and Tillage Research* 80 (2005): 171-83.
- A. Ordoñez, R. Ordoñez, I. Zampini, and M. Isla. "Design and Quality Control of a Pharmaceutical Formulation Containing Natural Products with Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Properties." *Int. J. Pharm.* 378 (2009): 51-58.
- A.C. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A.M. Juppo, and J. Yliruusi. "Comparison of Torque Measurements and near-Infrared Spectroscopy in Characterization of a Wet Granulation Process." *J. Pharm. Sci.* 93, no. 9 (2004): 2232-43.
- A.D. Karande, P.W. Sia Heng, and C.V. Liew. "In-Line Quantification of Micronized Drug and Excipients in Tablets by near Infrared (Nir Spectroscopy: Real Time Monitoring of Tableting Process." *Int. J. Pharm.* 396 (2010): 63-74.
- A.D. Patel, P.E. Luner, and M.S. Kemper. "Low-Level Determination of Polymorph Composition in Physical Mixtures by near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 90, no. 3 (2001): 360-70.
- A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, and J.K. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298-307.
- C. Ackermann, N. Rodriguez-Hornedo, M. Islam, and S. Ciotti. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192-99.
- C. Calvin, H. Hou, P. Gao, C. Ma, C. Medina, and F. Alvarez. "Development of a High Drug Load Tablet Formulation Based on Assessment of Powder Manufacturability: Moving Towards Quality by Design." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 1 (2009): 239-47.
- C. Nunes, R. Suryanarayanan, C. E. Botez, and P. W. Stephens. "Characterization and Crystal Structure of D-Mannitol Hemihydrate." *J. Pharm. Sci.* 93 (2004): 2800-09.
- C. Roth, G. Winter, and G. Lee. "Continuous Measurement of Drying Rate of Crystalline and Amorphous Systems During Freeze-Drying Using an in Situ Microbalance Technique." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1345-55.
- C. Ufret and K. Morris. "Modeling of Powder Blending Using on-Line near-Infrared Measurements." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 719-29.
- C.V Liew, A.D. Karande, and P.W. Heng. "In-Line Quantification of Drug and Excipients in Cohesive Powder Blends by near Infrared Spectroscopy." *Int. J. Pharm.* 386 (2010): 138-48.
- D.C. Hinz. "Process Analytical Technologies in the Pharmaceutical Industry: The Fda's Pat Initiative." *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006): 1036-1042.
- D.J. Wargo and J.K. Drennen. "Near-Infrared Spectroscopic Characterization of Pharmaceutical Powder Blends." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 11 (1996): 1415-23.
- D.M. Koller, A. Posch, G. Horl, C. Voura, S. Radl, N. Urbanetz, S.D. Fraser, et al. "Continuous Quantitative Monitoring of Powder Mixing Dynamics by near-Infrared Spectroscopy." *Powder Technol.* 205 (2011): 87-96.
- E. Ciurczak. "Growth of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical and Medical Sciences." *American Pharmaceutical Reviews* 5 (2002): 68-73.

Bibliografía - Capítulo 7

- E. Ciurczak. "Pharmaceutical Mixing Studies Using Nearinfrared Spectroscopy." *Pharm. Technol.* 15 (1991): 140-45.
- E. Ciurczak. "Uses of near-Infrared Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis ". *Appl. Spectrosc. Rev.* 23 (1987): 147-63.
- E. Dragoi, S. Curteanu, and D. Fissore. "Freeze-Drying Modeling and Monitoring Using a New Neuro-Evolutive Technique." *Chem. Eng. Sci.* 72 (2012): 195-204.
- E.T. Skibsted, H.F. Boelens, J.A. Westerhuis, D.T. Witte, and A.K. Smilde. "A Simple Assessment of Homogeneity in Pharmaceutical Mixing Processes Using a near-Infrared Reflectance Probe and Control Charts." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006): 26-35.
- F. Cuesta Sánchez, J. Toft, B. Bogaert, D. L. Massart, S. S. Dive, and P. Hailey. "Monitoring Powder Blending by Nir Spectroscopy." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 352, no. 7 (1995): 771-78.
- G Zhou, Z. Ge, J. Dorwart, B. Izzo, J. Kukura, G. Bicker, and J. Wyvratt. "Determination and Differentiation of Surface and Bound Water in Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 92 (2003): 1058-65.
- G. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu. *Pharmaceutical Design*. New York: Marcel Dekker, 1999.
- G. Oetjen, P. Haseley, K. Klutsch, and M. Leineweber. "Method for Controlling a Freeze Drying Process." United States, 2000.
- H. Bjørsvik. "Reaction Monitoring in Explorative Organic Synthesis Using Fiber-Optical Nir Spectroscopy and Principal Component Analysis." *Appl. Spectrosc.* 50 (1996): 1541-44.
- H. Costantino, and M. Pikal. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA: AAPS Press, 2004.
- H. de Waard, T. De Beer, W.L. J. Hinrichs, C. Vervae, J-P. Remon, and H.W. Frijlink. "Controlled Crystallization of the Lipophilic Drug Fenofibrate During Freeze-Drying: Elucidation of the Mechanism by in-Line Raman Spectroscopy." *The AAPS Journal* (2010).
- H. de Waard, W.L.J. Hinrichs, and H.W. Frijlink. "A Novel Bottom-up Process to Produce Drug Nanocrystals: Controlled Crystallization during Freeze-Drying." *J. Controlled Release.* 128 (2008): 179-83.
- H. Grohgan, D. Gildemyn, E. Skibsted, J.M. Flink, and J. Rantanen. "Rapid Solid-State Analysis of Freeze-Dried Protein Formulations Using Nir and Raman Spectroscopies." *J. Pharm. Sci.* 100 (2011): 2871-75.
- H. Wu, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Approach for Evaluation of Powder Blending Process Kinetics and Determination of Powder Blending End Point. ." *J. Pharm. Sci.* 98, no. 8 (2009): 2784-98.
- H. Wu, M. Tawakkul, M. White, and M. Khan. "Quality-by-Design (Qbd): An Integrated Multivariable Approach for the Component Quantification in Power Blends." *Int. J. Pharm.* 372 (2009): 39-48.
- H. Zhang, Z. Jiang, J. Pi, H. Xu, and R. Du. "On-Line Monitoring of Pharmaceutical Production Processes Using Hidden Markov Model." *J. Pharm. Sci.* 98 (2008): 1487-98.
- H.J. Venables and J.I. Wells. "Powder Mixing." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, no. 7 (2001): 599.
- ICH. "Ich-Topic Q8(R2): Pharmaceutical Development." 2009.
- J. Berman and J.A. Planchard. "Blend Uniformity and Unit Dose Sampling." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, no. 11 (1995): 1257-83.
- J. Berman, A. Schoeneman, and J.T. Shelton. "Unit Dose Sampling: A Tale of Two Thieves." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 11 (1996): 1121-32.
- J. Berman, D.E. Elinski, C.R. Gonzales, J.D. Hofer, P.J. Jimenez, J.A. Planchard, R.J. Tlachac, and P.F. Vogel. "Blend Uniformity Analysis: Validation and in-Process Testing. Technical Report No. 25. Pda (Parenteral Drug Association)". *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997): 1-99.
- J. Drennen, and R. Lodder. *Pharmaceutical Applications of near-Infrared Spectrometry* Greenwich, CT, UK: JAI Press: , 1993.
- J. Goupy. *Plans D'expériences Pour Surfaces De Réponse*. Paris: Dunod, 1999.
- J. Huang, G. Kaul, C. Cai, R. Chatlapalli, P. Hernandez-Abad, K. Ghosh, and A. Nagi. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariate Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23-32.
- J. Huang. "Quality by Design Case Study: An Integrated Multivariable Approach to Drug Product and Process Development." *Int. J. Pharm.* 382 (2009): 23-32.
- J. Ilari, H. Martens, and T. Isaksson. "Determination of Particle Size in Powders by Scatter Correction in Diffuse near-Infrared Reflectance." *Appl. Spectrosc.* 42 (1988): 722-28.
- J. Jones, I. Last, B. MacDonald, and K. Prebble. "Development and Transferability of near-Infrared Methods for Determination of Moisture in a Freeze-Dried Injection Products." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993): 1227-31.

Bibliografía - Capítulo 7

- J. Lopes, P. Cost, T. Alaves, and J. Menezes. "Chemometrics in Bioprocess Engineering: Process Analytical Technology (Pat) Applications." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 74, no. 2 (2004): 7.
- J. Mercado, M. Alcalá, K. M. Karry, J. L. Ríos-Steiner, and R. J. Románach. "Design and in-Line Raman Spectroscopic Monitoring of a Protein Batch Crystallization Process." *J. Pharm. Innov.* 3 (2008): 271–79.
- J. Pérez-Ramos, W. Findlay, G. Peck, and K. Morris. "Quantitative Analysis of Film Coating in a Pan Coater Based on in-Line Sensor Measurements." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 1 (2005): E127-E36.
- J.G. Rosas, and M. Blanco. "A Criterion for Assessing Homogeneity Distribution in Hyperspectral Images. Part 2: Application of Homogeneity Indices to Solid Pharmaceutical Dosage Forms. ." *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2012).
- J.M. Juran and A. B. Godfrey. *Juran's Quality Handbook*. 5th ed.: McGraw-Hill, 1999.
- J.M. Roger, F. Chauchard, and V. Bellon-Maurel. "Epo-Pls External Parameter Orthogonalisation of Pls Application to Temperature-Independent Measurement of Sugar Content of Intact Fruits." *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 66 (2003): 191–204.
- K. Kasraian, and P.P. DeLuca. "Thermal Analysis of the Tertiary Butyl Alcohol–Water System and Its Implications on Freeze-Drying." *Pharm. Res.* 12 (1995): 484–90.
- K. Morisseau, and C. Rhodes. "Near-Infrared Spectroscopy as a Nondestructive Alternative to Conventional Tablet Hardness Testing." *Pharm. Res.* 14 (1997): 108–11.
- L. Bellamy, A. Nordon, and D. Littlejohn. "Real-Time Monitoring of Powder Mixing in a Convective Blender Using Non-Invasive Reflectance Nir Spectrometry." *Analyst* 133 (2008): 58–64.
- L. Yu, N. Milton, E. G. Groleau, D. S. Mishra, and R. E. Vansickle. "Existence of a Mannitol Hydrate During Freeze-Drying and Practical Implications." *J. Pharm. Sci.* 88 (1999): 196–98.
- L.T. Fan, S.J. Chen, and C.A. Watson. "Solids Mixing." *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970): 53–66.
- M. Blanco and A. Peguero. "Analysis of Pharmaceuticals by Nir Spectroscopy without a Reference Method." *TrAC Trend. Anal. Chem.* 29, no. 10 (2010): 1127–36.
- M. Blanco and M.A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126, no. 12 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. A. Romero. "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: A Solution for Identity Confirmation." *Analyst* 126 (2001): 2212–17.
- M. Blanco, and M. Alcalá. "Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries." edited by K. Bakeev. 463–91: John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- M. Blanco, and M. Romero. "Near Infrared Transflectance Spectroscopy: Determination of Dexametopfen in a Hydrogel." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 467–72.
- M. Blanco, D. Valdes, M. Bayod, F. Fernandez-Mari, and I. Llorente. "Characterization and Analysis of Polymorphs by near-Infrared Spectrometry." *Anal. Chim. Acta.* 502 (2004): 221–27.
- M. Blanco, M. Alcalá, J. M. González, and E. Torras. "Nir Spectroscopy in the Study of Polymorphic Transformations." *Anal. Chim. Acta* 567 (2006): 262–68
- M. Blanco, M. Bautista, and M. Alcalá. "Preparing Calibration Sets for Use in Pharmaceutical Analysis by Nir- Spectroscopy." *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 1236– 45.
- M. Blanco, R. Cueva, and J. Cruz. "Critical Evaluation of Methods for End-Point Determination in Pharmaceutical Blending Processes." *Anal. Methods* (2012).
- M. Blanco, R. Gozalez, and E. Bertran. "Monitoring Powder Blending in Pharmaceutical Processes by Use of near Infrared Spectroscopy." *Talanta* 56 (2002): 203–12.
- M. Brülls, S. Folestad, A. Sparen, and A. Rasmuson. "In-Situ near-Infrared Spectroscopy Monitoring of the Lyophilization Process." *Pharm. Res.* 20 (2003): 494–99.
- M. Druy. "From Laboratory Technique to Process Gas Sensor: The Maturation of Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy." *Spectroscopy* 1 (2006): 1–4.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Analysis of Neutralizer–Carbomer and Surfactant–Carbomer Interactions in Aqueous, Hydroalcoholic, and Anhydrous Gel Formulations." *The AAPS Journal* 6 (2004): 61–67.
- M. Islam, N. Rodríguez-Hornedo, S. Ciotti, and C. Ackermann. "Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different Ph." *Pharm. Res.* 21 (2004): 1192–99.
- M. Kamat, R. Lodder, and P. DeLuca. "Near-Infrared Spectroscopic Determination of Residual Moisture in Lyophilized Sucrose through Intact Glass Vials ". *Pharm. Res.* 6 (1989): 961–65.
- M. Kemper, E. Magnuson, S. Lowry, W. McCarthy, N. Aksornkoae, D. Watts, J. Johnson, and A. Shukla. "Use of Ft-Nir Transmission Spectroscopy for the Quantitative Analysis of an Active Ingredient in a Translucent Pharmaceutical Topical Gel Formulation." *The AAPS Journal* 3 (2001): 81–85.

Bibliografía - Capítulo 7

- M. Roy, and M. Pikal. "Process Control in Freeze Drying: Determination of the End Point of Sublimation Drying by an Electronic Moisture Sensor." *J. Parenter. Sci. Technol.* 43 (1989): 60–66.
- M. S. Kemper, and L. M. Luchetta. "A Guide to Raw Material Analysis Using near Infrared Spectroscopy." *J. Near Infrared Spectrosc.* 11 (2003): 155–74.
- M. Sullivan. "The Use of Nir as a Pat Tool for Measuring Blend Uniformity." *Supplement to Spectroscopy* (February 2006): 22–30.
- M. Ulmschneider, G. Barth, and E. Trenka. "Building Transferable Cluster Calibrations for the Identification of Different Solid Excipients with near-Infrared Spectroscopy." *Drugs* 43 (2000): 71–73.
- N. Harnby, M.F. Edwards, and A.W. Nienow. *Mixing in the Process Industries*. 2nd. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1997.
- N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, and W. Jiskoot. "Near-Infrared Imaging for Studying Homogeneity of Protein-Sugar Mixtures." *Pharm. Res.* 23 (2006): 2002–13.
- N. Milton, M. J. Pikal, M. L. Roy, and S. L. Nail. "Evaluation of Manometric Temperature Measurement as a Method of Monitoring Product Temperature During Lyophilization." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997): 7–16.
- N.H. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, and S. Reynolds. "A Homogeneity Study Using Nir Spectroscopy: Tracking Magnesium Stearate in Bohle Bin-Blender." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, no. 6 (2003): 679–87.
- O. Berntsson, L. G. Danielsson, B. Lagerholm, and S. Folestad. "Quantitative in-Line Monitoring of Powder Blending by near Infrared Reflection Spectroscopy." *Powder Technol.* 123, no. 2-3 (2002): 185–93.
- O. Berntsson, L.G. Danielsson, B. Lagerholm, and S. Folestad. "Quantitative in-Line Monitoring of Powder Blending by near Infrared Reflection Spectroscopy." *Powder Technol.* 123 (2002): 185–93.
- P. Cameron. *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*. New York: Interpharm Press Inc., 1997.
- P. Luner, S. Majuru, J. Seyer, and M. Kemper. "Quantifying Crystalline Form Composition in Binary Powder Mixtures Using near-Infrared Reflectance Spectroscopy." *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000): 231–46.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multi-Way Partial Least Squares in Monitoring Batch Processes." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 97–108.
- P. Nomikos, and J. MacGregor. "Multivariate SPC Charts for Monitoring Batch Processes." *Technometrics* 37 (1995): 41–59.
- P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, and P. K. Aldridge. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy Part I. System Development and Control." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, no. 5 (1996): 551–59.
- P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, and P.K. Aldridge. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy Part I. System Development and Control." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996): 551–59.
- P.P. LaPointe-Garant, J.S. Simard, and N. Abatzoglou. "Real-Time Nir Monitoring of a Pharmaceutical Blending Process through Multivariate Analysis-Derived Models." Paper presented at the 1st WSEAS international conference on multivariate analysis and its application in science and engineering (MAASE'08), Turkey, 2008.
- Pittcon. "New Nir Products at Pittcon 2012." *NIR news* 23 (2012): 14–22.
- R. Batti, A. Kamoun, M. Chaabouni, M. Sergent, and R. Phan.Tan.Luu. "Screening and Optimization of Factors of a Detergent Admixture Preparation." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006): 198–208.
- R. Cogdill, C. Anderson, M. Delgado-Lopez, D. Molseed, R. Chisholm, R. Bolton, T. Herkert, A. Afán, and J. Drennen. "Process Analytical Technology Case Study Part I: Feasibility Studies for Quantitative near-Infrared Method Development." *AAPS PharmSciTech* 6, no. 2 (2005): E262–E72.
- R. De Maesschalck, F. Cuesta Sanchez, D.L. Massart, P. Doherty, and Hailey P. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52, no. 5 (1998): 725–31.
- R. H. Myres, and D. C. Montgomery. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, . New York: Wiley, 1995.
- R. Johnson, M. Oldroyd, S. Ahmed, H. Gieseler, and L. Lewis. "Use of Manometric Temperature Measurements (Mtm) to Characterize the Freeze-Drying Behavior of Amorphous Protein Formulations." *J. Pharm. Sci.* 99 (2010): 2863–73.
- R. K. Suryanarayanan. "Crystallization Behavior of Mannitol in Frozen Aqueous Solutions." *Pharm. Res.* 19 (2002): 894–900.

Bibliografía - Capítulo 7

- R. Mackison, S. Brinkworth, R. Belchamber, R. Aries, D. Cutler, C. Deeley, and H. Mould. "A Demonstration of Truly Remote in-Line near-Infrared Process Analysis." *Appl. Spectrosc.* 46 (1992): 1020–24.
- R. Maesschalck, F. Sanchez, D. Massart, P. Doherty, and P. Hailey. "On-Line Monitoring of Powder Blending with near-Infrared Spectroscopy." *Appl. Spectrosc.* 52 (1998): 725–31.
- R. Remmele, C. Stushnoff, and J. Carpenter. "Real-Time in Situ Monitoring of Lysozyme During Lyophilization Using Infrared Spectroscopy Dehydration Stress in the Presence of Sucrose." *Pharm. Res.* 14 (1997): 1548–55.
- R.E. Schirmer. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*. 2nd ed.: CRC Press, 1991.
- R.K. Chang, J. Shukla, and J. Buehler. "An Evaluation of a Unit-Dose Compacting Sample Thief and a Discussion of Content Uniformity Testing and Blending Validation Issues." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, no. 9-10 (1996): 1031-35.
- Reich, Gabriele. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging: Basic Principles and Pharmaceutical Applications." *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, no. 8 (2005): 1109-43.
- S. Amat-Tosello, N. Dupuy, and J. Kister. "Contribution of External Parameter Orthogonalisation for Calibration Transfer in Short Waves—near Infrared Spectroscopy Application to Gasoline Quality." *Anal. Chim. Acta* 642 (2009): 6–11.
- S. Bosca, and D. Fissore. "Design and Validation of an Innovative Soft-Sensor for Pharmaceuticals Freeze-Drying Monitoring." *Chem. Eng. Sci.* 66 (2011): 5127–36.
- S. Doherty and C. Kettler. "On-Line Applications on the Pharmaceutical Industry." In *Process Analytical Technology*, edited by Katherine A. Bakeev. 329-58: Lackwell Publishing, 2005.
- S. Patel, T. Doen, and M. Pikal. "Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control." *AAPS PharmSciTech* 11 (2009).
- S. Pieters, T. De Beer, J. C. Kasper, D. Boulpaep, O. Waszkiewicz, M. Goodarzi, C. Tistaert, et al. "Near-Infrared Spectroscopy for in-Line Monitoring of Protein Unfolding and Its Interactions with Lyoprotectants During Freeze-Drying." *Anal. Chem.* 84 (2012): 947–55.
- S. Romero-Torres, H. Wikström, E. Grant, and L. Taylor. "Monitoring of Mannitol Phase Behavior During Freeze-Drying Using Non-Invasive Raman Spectroscopy." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 61 (2007): 131–45.
- S. Schneid, and H. Gieseler. "Evaluation of a New Wireless Temperature Remote Interrogation System (Tempris) to Measure Product Temperature During Freeze Drying." *AAPS PharmSciTech* 9 (2008): 729–239.
- S. Velardi, and H. Hammouri. "In-Line Monitoring of the Primary Drying Phase of the Freeze-Drying Process in Vial by Means of a Kalman Filter Based Observer." *Chem. Eng. Res. Des.* 87 (2009): 1409–19.
- S. Velardi, V. Rasetto, and A. Barresi. "Dynamic Parameters Estimation Method: Advanced Manometric Temperature Measurement Approach for Freeze- Drying Monitoring of Pharmaceutical Solutions." *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 (2008): 8445–57.
- S. Verma, Y. Lan, R. Gokhale, and D. Burgess. "Quality by Design Approach to Understand the Process of Nanosuspension Preparation." *Int. J. Pharm.* 377 (2009): 185–98.
- S. Wold, N. Kettaneh, H. Fridén, and A. Holmberg. "Modelling and Diagnostics of Batch Processes and Analogous Kinetic Experiments." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 44 (1998): 331–40.
- S.R. Miles. "Homogeneity of Seeds Lots." *Inst. Seed Test. Assoc. Proc.* 27 (1962): 407-12.
- S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and P.K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy". *Anal. Chem.* 68 (1996): 509-13.
- S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, and P.A. Hailey. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy. Part II. Qualitative Approaches to Blend Evaluation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 1285-309.
- S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, and P.A. Hailey. "Automated System for the on-Line Monitoring of Powder Blending Processes Using near-Infrared Spectroscopy: Part II. Qualitative Approaches to Blend Evaluation." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, no. 8 (1998): 1285-309.
- S.S. Sonja, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, and P.K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 68, no. 3 (1996): 509-13.
- T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, and C. Vervaet. "Near Infrared and Raman Spectroscopy for the in-Process Monitoring of Pharmaceutical Production Processes." *Int. J. Pharm.* 417 (2011): 32–47.

Bibliografía - Capítulo 7

- T. Garcia, M.K. Taylor, and G.S. Pande. "Comparison of the Performance of Two Sample Thieves for the Determination of the Content Uniformity of a Powder Blend." *Pharm. Dev. Technol.* 3, no. 1 (1998): 7-12.
- T. Jennings, and H. Duan. "Calorimetric Monitoring of Lyophilization." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 49 (1995): 272-82.
- T. Jennings, and J. Parenter. "Residual Gas Analysis and Vacuum Freeze Drying." *Drug. Assoc.* 34 (1980): 62-69.
- T. Kourti. "Process Analytical Technology Beyond Real-Time Analyzers: The Role of Multivariate Analysis." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 257-78.
- T. Puchert, C.V. Holzhauer, J.C. Menezes, D. Lochmann, and G. Reich. "A New Pat/Qbd Approach for the Determination of Blend Homogeneity: Combination of on-Line Nirs Analysis with Pc Scores Distance Analysis (Pc-Sda)." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011): 173-82.
- T. R. M. De Beer, M. Allesø, F. Goethals, A. Coppens, Y. Vander Heyden, H. Lopez De Diego, J. Rantanen, et al. "Implementation of a Process Analytical Technology System in a Freeze-Drying Process using Raman Spectroscopy for in-Line Process Monitoring." *Anal. Chem.* 79 (2007): 7992-8003.
- T.R.M. De Beer, C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Vercruysse, A. Burggraeve, A. Lemos, et al. "Raman Spectroscopy as a Process Analytical Technology (Pat) Tool for the in-Line Monitoring and Understanding of a Powder Blending Process." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, no. 3 (2008): 772-79.
- T.R.M. De Beer, M. Wiggernhorn, R. Veillon, C. Debacq, Y. Mayeresse, B. Moreau, A. Burggraeve, et al. "Importance of Using Complementary Process Analyzers for the Process Monitoring, Analysis, and Understanding of Freeze Drying." *Anal. Chem.* 81 (2009): 7639-49.
- T.R.M. De Beer, P. Vercruysse, A. Burggraeve, T. Quinten, J. Ouyang, X. Zhang, C. Vervae, J.P. Remon, and W.R. Baeyens. "In-Line and Real-Time Process Monitoring of a Freeze Drying Process Using Raman and Nir Spectroscopy as Complementary Process Analytical Technology (Pat) Tools." *J. Pharm. Sci.* 98 (2009): 3430-46.
- US-FDA. "Guidance for Industry Pat-a Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance." 2004.
- US-FDA. "Guidance for Industry, Powder Blends and Finished Dosage Units — Stratified in-Process Dosage Unit Sampling and Assessment." 2003.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q10 Quality Systems Approach to Pharmaceutical Cgmp Regulations." Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q8 Pharmaceutical Development." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Q9 Quality Risk Management." edited by Department of Health and Human Service. Rockville, MD, 2006.
- US-FDA. "Guidance: Pat – a Framework for Innovative Pharmaceutical Development." 2004.
- US-FDA. "Pat Guidance for Industry—a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance." edited by Department of Health and Human Services. Rockville, MD, 2004.
- V. W. Uhl, and J. B. Gray. *Mixing: Theory and Practice.* New York 1967.
- W. Momose, K. Imai, S. Yokota, E. Yonemochi, and K. Terada. "Process Analytical Technology Applied for End-Point Detection of Pharmaceutical Blending by Combining Two Calibration-Free Methods: Simultaneously Monitoring Specific near-Infrared Peak Intensity and Moving Block Standard Deviation." *Powder Technol.* 210 (2011): 122 - 31.
- X. Liao, R. Krishnamurthy, and R. Suryanarayanan. "Influence of Processing Conditions on the Physical State of Mannitol—implications in Freeze-Drying." *Pharm. Res.* 24 (2006).
- X. Tang, S. Nail, and M. Pikal. "Freeze-Drying Process Design by Manometric Temperature Measurement: Design of a Smart Freeze-Dryer." *Pharm. Res.* 22 (2005): 685-700.
- X. Zhou, P. Hines, and M. Borer. "Moisture Determination in Hygroscopic Drug Substances by near Infrared Spectroscopy." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998): 219-25.
- Y. Mayeresse, and R. Veillon. "On the Way to Rational Freeze-Drying." *Am. Pharm. Rev.* 9 (2006): 37-42.
- Y. Mayeresse, R. Veillon, P. Sibille, and C. Nomine. "Freeze-Drying Process Monitoring Using a Cold Plasma Ionization Device." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 61 (2007): 160-74.
- Y. Sulub, B. Wabuyele, P. Gargiulo, J. Pazdan, J. Cheney, J. Berry, A. Gupta, et al. "Real-Time on-Line Blend Uniformity Monitoring Using near-Infrared Reflectance Spectrometry: A Noninvasive Off-Line Calibration Approach." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009): 48 - 54.
- Y. Sulub, M. Konigsberger, and J. Cheney. "Blend Uniformity End-Point Determination Using near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011): 429-34.

Bibliografía - Capítulo 7

- Y. Xie, W. Cao, S. Krishnan, H. Lin, and N. Cauchon. "Characterization of Mannitol Polymorphic Forms in Lyophilized Protein Formulations Using a Multivariate Curve Resolution (Mcr)-Based Raman Spectroscopic Method." *Pharm. Res.* 25 (2008): 2292-301.
- Y.Y. Lee, J. X. Wub, M. Yang, P. M. Young, F. van den Berg, and J. Rantanen. "Particle Size Dependence of Polymorphism in Spray-Dried Mannitol." *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011): 41-48.
- Z. Shi, R. Cogdill, S. Short, and C. Anderson. "Process Characterization of Powder Blending by near-Infrared Spectroscopy: Blend End-Points and Beyond." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008): 738-45.

CAPITULOS 8 Y 9

- A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, and R. Tauler. "Local Rank Analysis for Exploratory Spectroscopic Image Analysis. Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005): 64–74.
- A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, and R. Tauler. "Use of Local Rank-Based Spatial Information for Resolution of Spectroscopic Images." *J. Chemometr.* 22 (2008): 291–98.
- A. de Juan, and R. Tauler. "Multivariate Curve Resolution (Mcr) from 2000: Progress in Concepts and Applications." *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006): 163–76.
- A. Palou, J. Cruz, M. Blanco, J. Tomas, J. De los Rios, and M. Alcala. "Determination of Drug, Excipients and Coating Distribution in Pharmaceutical Tablets Using Nir-Ci." *J. Pharm. Anal.* 2 (2012): 90–97.
- A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, and J.K. Drennen III. "Near-Infrared Spectroscopy and Imaging for the Monitoring of Powder Blend Homogeneity." *J. Pharm. Sci.* 90 (2001): 1298–307.
- B. Vajna, A. Farkas, H. Pataki, Z. Zsigmond, T. Igricz, and G. Marosi. "Testing the Performance of Pure Spectrum Resolution from Raman Hyperspectral Images of Differently Manufactured Pharmaceutical Tablets." *Anal. Chim. Acta* 712 (2012): 45–55.
- B. Vajna, G. Patyi, Z. Nagy, A. Farkas, and G. Marosi. "Comparison of Chemometric Methods in the Analysis of Pharmaceuticals with Hyperspectral Raman Imaging." *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011): 1977–86.
- B. Vajna, I. Farkas, A. Szabó, Z. Zsigmond, and G. Marosi. "Raman Microscopic Evaluation of Technology Dependent Structural Differences in Tablets Containing Imipramine Model Drug." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010): 30–38.
- B. Walczak. *Wavelets in Chemistry*. New York: Elsevier, 2000.
- B.J. Westenberger, C.D. Ellison, A.S. Fussner, S. Jenney, R.E. Kolinski, T.G. Lipe, R.C. Lyon, *et al.* "Quality Assessment of Internet Pharmaceutical Products Using Traditional and Non-Traditional Analytical Techniques." *Int. J. Pharm.* 306 (2005): 56–70.
- C. Gendrin, Y. Roggo, and C. Collet. "Content Uniformity of Pharmaceutical Solid Dosage Forms by near Infrared Hyperspectral Imaging: A Feasibility Study." *Talanta* 73 (2007): 733–41.
- C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, and C. Collet. "Pharmaceutical Applications of Vibrational Chemical Imaging and Chemometrics: A Review." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008): 828–37.
- C. Ravn, E. Skibstedb, and R. Bro. "Near-Infrared Chemical Imaging (Nir-Ci) on Pharmaceutical Solid Dosage Forms—Comparing Common Calibration Approaches." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58 (2008): 554–61.
- D. Bouyssou. *Evaluation and Decision Models: A Critical Perspective*. USA: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- E. Lee, W.X. Huang, P. Chen, E.N. Lewis, and R.V. Vivilecchia. "Highthroughput Analysis of Pharmaceutical Tablet Content Uniformity by near-Infrared Chemical Imaging." *Spectroscopy* 21 (2006): 24–32.
- E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, and L.H. Kidder. "Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool." In *Process Analytical Technology*, edited by K.A. Bakeev. 187–225: Blackwell Publishing Ltd, 2005.
- E.N. Lewis, L.H. Kidder, and E. Lee. "Nir Chemical Imaging as a Process Analytical Tool." *Innov. Pharm. Technol.* (2005): 107–11.
- E.W. Ciurczak, and J.K. Drennen. *Pharmaceutical and Medical Applications of near-Infrared Spectroscopy*. New York: Marcel Dekker Inc., 2002.
- F. Clarke. "Extracting Process-Related Information from Pharmaceutical Dosage Forms Using near Infrared Microscopy." *Vib. Spectrosc.* 34 (2004): 25–35.
- F.J. Muzzio, A. Alexander, C. Goodridge, E. Shen, and T. Shinbrot. "Handbook of Industrial Mixing." edited by E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng and S.M. Kresta. 887–940. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2004.
- F.W. Koehler, E. Lee, L.H. Kidder, and E.N. Lewis. "Near-Infrared Spectroscopy: The Practical Imaging Solution." *Spectrosc. Eur.* 14 (2002): 12–19.
- H. Ma, and C.A. Anderson. "Characterization of Pharmaceutical Powder Blends by Nir Chemical Imaging." *J. Pharm. Sci.* 97 (2008): 3305–20.
- H. Shinzawa, K. Awa, T. Okumura, S. Morita, M. Otsuka, Y. Ozaki, and H. Sato. "Raman Imaging Analysis of Pharmaceutical Tablets by Two-Dimensional (2d) Correlation Spectroscopy." *Vib. Spectrosc.* 51 (2009): 125–31.
- J. Burger, and P. Geladi. "Spectral Pre-Treatments of Hyperspectral near Infrared Images: Analysis of Diffuse Reflectance Scattering." *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007): 29–37.

Bibliografía - Capítulos 8 y 9

- J. Cruz, and M. Blanco. "Nir-Chemical Imaging Study of Acetylsalicylic Acid in Commercial Tablets." *Talanta* 80 (2009): 473–78.
- J. Dubois, J.C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrei, and E. Lewis. "Nir Chemical Imaging for Counterfeit Pharmaceutical Products Analysis." *Spectroscopy* 22 (2007): 40–50.
- J. Gayle, O. Lacey, and J. Gary. "Mixing of Solids. Chi Square as a Criterion." *Eng. Chem.* 50 (1958): 1279–82.
- J. J. Walker, and D. K. Rollins. "Detecting Powder Mixture Segregation for Multicomponent Mixtures." *Chem. Eng. Sci.* 53 (1997): 651–55.
- J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, and R. Tauler. "A User Friendly Interface for Mcr-Als: A New Tool for Multivariate Curve Resolution in Matlab." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005): 101–10.
- J. Johansson, S. Pettersson, and L.S. Taylor. "Infrared Imaging of Laser-Induced Heating During Raman Spectroscopy of Pharmaceuticals." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002): 1223–31.
- J. M. Prats-Montalbán, J. I. Jerez-Rozo, R. J. Románach, and A. Ferrer. "Mia and Nir Chemical Imaging for Pharmaceutical Product Characterization." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* (2012).
- J.C. Noordam, W.H.A.M. van den Broek, P. Geladi, and L.M.C. Buydens. "A New Procedure for the Modelling and Representation of Classes in Multivariate Images." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 75 (2005): 115–26.
- J.G. Rosas, and M. Blanco. "Criterion to Assess Homogeneity Distribution on Hyperspectral Images. Part 1: Homogeneity Indices Bases and Blending Process." *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012): 691–99.
- J.M. Amigo. "Practical Issues of Hyperspectral Imaging Analysis of Solid Dosage Forms." *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010): 93–109.
- J.M. Amigo, and C. Ravn. "Direct Quantification and Distribution Assessment of Major and Minor Components in Pharmaceutical Tablets by Nir-Chemical Imaging." *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009): 76–82.
- J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. Maspoch, J. Coello, and M. Blanco. "Study of Pharmaceutical Samples by Nir Chemical-Image and Multivariate Analysis." *TrAC, Trend. Anal. Chem.* 27 (2008): 696 – 713.
- K. Miyunami. "Mixing." In *Powder Technology Handbook*, edited by K. Gotoh, H. Masuda and K. Higashitani. 609–25. New York: Marcel Dekker, 1997.
- K. Stange. "Mixing Quality in a Random Mixture of Three or More Components." *Chem. Ing. Tech.* 35 (1963): 580–82.
- K.L.A. Chan, N. Elkhider, and S.G. Kazarian. "Spectroscopic Imaging of Compacted Pharmaceutical Tablets." *Chem. Eng. Res. Des.* 83 (2005): 1303–10.
- K.R. Poole, R.F. Taylor, and G.P. Wall. "Mixing Powders to Fine-Scale Homogeneity: Studies of Batch Mixing." *Trans. Instn. Chem. Eng.* 42 (1964): 305–15.
- L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, and J.P. Huvenne. "Multivariate Curve Resolution Methods in Imaging Spectroscopy: Influence of Extraction Methods and Instrumental Perturbations." *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003): 2057-67.
- L. Makein, L.H. Kidder, E.N. Lewis, and M. Valleri. "Non-Destructive Evaluation of Manufacturing Process Changes Using near Infrared Chemical Imaging." *NIR news* 19 (2008): 11–15.
- L. Zhang, M.J. Henson, and S.S. Sekulic. "Multivariate Data Analysis for Raman Imaging of a Model Pharmaceutical Tablet." *Anal. Chim. Acta* 545 (2005): 262–78.
- L.R. Hilden, C.J. Pommier, S.I. Badawy, and E.M. Friedman. "Nir Chemical Imaging to Guide/Support Bms-561389 Tablet Formulation Development." *Int. J. Pharm.* 253 (2008): 283–90.
- L.T. Fan, S.J. Chen, and C.A. Watson. "Solids Mixing." *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970): 53–66.
- M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, and J. Cruz. "Critical Evaluation of Methods for End Point Determination in Mixture Blending of Pharmaceuticals." *Anal. Methods* 4 (2012): 2694–703.
- M.B. Lopes, J.-C. Wolff, J.M. Bioucas-Dias, and M.A.T. Figueiredo. "Near-Infrared Hyperspectral Unmixing Based on a Minimum Volume Criterion for Fast and Accurate Chemometric Characterization of Counterfeit Tablets." *Anal. Chem.* 82 (2010): 1462-69.
- M.L. Hamad, C.D. Ellison, M.A. Khan, and R.C. Lyon. "Drug Product Characterization by Macropixel Analysis of Chemical Images." *J. Pharm. Sci.* 96 (2007): 3390–401.
- N. Harnby, M.F. Edwards, and A.W. Nienow. *Mixing in the Process Industries*. 2nd ed. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1997.
- N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, and W. Jiskoot. "Near-Infrared Imaging for Studying Homogeneity of Protein-Sugar Mixtures." *Pharm. Res.* 23 (2006): 2002–13.
- O. Roionova, L. Houmller, A. Pomerantsev, P. Geladi, J. Burger, V. Dorofeyev, and A. Arzamastsev. "Nir Spectrometry for Counterfeit Drug Detection: A Feasibility Study." *Anal. Chim. Acta* 549 (2005): 151–58.

Bibliografía - Capítulos 8 y 9

- P.M.C. Lacey. "Developments on the Theory of Particle Mixing." *J. Appl. Chem.* 4 (1954): 257–68.
- P.V. Dankwertz. "The Definition and Measurement of Some Characteristics of Mixing." *Appl. Sci. Res.* 3 (1952): 279–81.
- R. Tauler. "Multivariate Curve Resolution Applied to Second Order Data." *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995): 133–46.
- R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, and A.S. Hussain. "Near-Infrared Spectral Imaging for Quality Assurance of Pharmaceutical Products: Analysis of Tablets to Assess Powder Blend Homogeneity." *AAPS PharmSciTech.* 3 (2002): 1-15.
- S.S. Sekulic, H. W. Ward, D. R. Brannegan, E. D. Stanley, C. L. Evans, S. T. Scivolino, P. A. Hailey, and P. K. Aldridge. "On-Line Monitoring of Powder Blend Homogeneity by near-Infrared Spectroscopy." *Anal. Chem.* 68 (1996): 509-13.
- S. Sasic. "Chemical Imaging of Pharmaceutical Granules by Raman Global Illumination and near-Infrared Mapping Platforms." *Anal. Chim. Acta.* 611 (2008): 73–79.
- S. Sasic. "An in-Depth Analysis of Raman and near-Infrared Chemical Images of Common Pharmaceutical Tablets." *Appl. Spectrosc.* 61 (2007): 239–50.
- S. Sasic, D.A. Clark, J.C. Mitchell, and M.J. Snowden. "Analyzing Raman Maps of Pharmaceutical Products by Sample-Sample Two-Dimensional Correlation." *Appl. Spectrosc.* 59 (2005): 630-38.
- S. Sasic, W. Yu, and L. Zhang. "Monitoring of Api Particle Size During Solid Dosage Form Manufacturing Process by Chemical Imaging and Particle Sizing." *Anal. Methods* 3 (2011): 568-74.
- S. Theodoridis, and K. Koutroubas. *Pattern Recognition*. New York: Academic, Press, 1999.
- S.J. Hamilton, A.E. Lowell, and R.A. Lodder. "Hyperspectral Techniques in Analysis of Oral Dosage Forms." *J. Biomed. Opt.* 7 (2002): 561-70.
- T. Bozdog, and C. Karpuz. "Development of a Particle Size Distribution Analysis System by Digital Image Processing." *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment* 11 (1997): 59-67.
- T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, and S. Ochiai. "Evaluation of Homogeneity of Binary Blends of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(L-Lactic Acid) Studied by near Infrared Chemical Imaging (Nirci)." *Anal. Sci.* 23 (2007): 871–76.
- T. Puchert, D. Lochmann, J.C. Menezes, and G. Reich. "A Multivariate Approach for the Statistical Evaluation of near-Infrared Chemical Images Using Symmetry Parameter Image Analysis (Spia)." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011): 117–24.
- US-FDA. PAT — a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance." Rockville, 2004.
- US-FDA. "Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units– Stratified in-Process Dosage Units Sampling and Assessment." Rockville, 2003.
- United States Pharmacopeia (USP-RF). <905> *Uniformity of Dosage Units*. 2009.
- W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, and D. Winstead. "Measurement of Drug Agglomerates in Powder Blending Simulation Samples by near Infrared Chemical Imaging." *Int. J. Pharm.* 350 (2008): 369–73.
- Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, and M. Ulmschneider. "Infrared Hyperspectral Imaging for Qualitative Analysis of Pharmaceutical Solid Forms." *Anal. Chim. Acta* 535 (2005): 79–87.
- Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, and M. Ulmschneider. "Characterizing Process Effects on Pharmaceutical Solid Forms Using near-Infrared Spectroscopy and Infrared Imaging." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005): 100-10.
- Z. Wu, O. Taoa, W. Chenga, L. Yu, X. Shi, and Y. Qiao. "Visualizing Excipient Composition and Homogeneity of Compound Liquorice Tablets by near-Infrared Chemical Imaging." *Spectrochimica Acta Part A* 86 (2012): 631– 36.

ANEXOS

- I) Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part I: Determination of the design space.
- II) Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part II: NIR monitoring of composition and physical parameters.
- III) Real-time determination of critical quality attributes using near-infrared spectroscopy: a contribution for Process Analytical Technology (PAT).
- IV) Assessment of chemometric methods for non-invasive solid blending monitoring by using wireless NIR spectroscopy.
- V) NIR spectroscopy for the in-line monitoring of a multicomponent formulation during the entire freeze-drying process.
- VI) A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 1: Homogeneity index bases and blending processes.
- VII) A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 2: Application of homogeneity indices to solid pharmaceutical dosage forms.

ANEXO I

Quality by Design approach of a
pharmaceutical gel manufacturing
process. Part I: Determination of
the design space

Juan G. Rosas, Marcel Blanco, Josep M^a.
González and Manel Alcalá

Journal of Pharmaceutical Sciences **100** (2011) 4432 – 4441.

Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process, Part 1: Determination of the Design Space

JUAN G. ROSAS,¹ MARCEL BLANCO,¹ JOSEP M. GONZÁLEZ,² MANEL ALCALÁ¹

¹Grup de Quimiometria Aplicada, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

²Laboratorios Menarini, Badalona, Catalonia, Spain

Received 13 December 2010; revised 8 April 2011; accepted 19 April 2011

Published online 12 May 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.22611

ABSTRACT: This work was conducted in the framework of a quality by design project involving the production of a pharmaceutical gel. Preliminary work included the identification of the quality target product profiles (QTPPs) from historical values for previously manufactured batches, as well as the critical quality attributes for the process (viscosity and pH), which were used to construct a D-optimal experimental design. The experimental design comprised 13 gel batches, three of which were replicates at the domain center intended to assess the reproducibility of the target process. The viscosity and pH models established exhibited very high linearity and negligible lack of fit (LOF). Thus, R^2 was 0.996 for viscosity and 0.975 for pH, and LOF was 0.53 for the former parameter and 0.84 for the latter. The process proved reproducible at the domain center. Water content and temperature were the most influential factors for viscosity, and water content and acid neutralized fraction were the most influential factors for pH. A desirability function was used to find the best compromise to optimize the QTPPs. The body of information was used to identify and define the design space for the process. A model capable of combining the two response variables into a single one was constructed to facilitate monitoring of the process. © 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 100:4432–4441, 2011

Keywords: quality by design; process analytical technology; design of experiments; design space; analytical chemistry; viscosity; hydrogel

INTRODUCTION

Process understanding, which encompasses all operations and variables connecting raw materials to the end product, is one of the key goals of pharmaceutical production processes in as much as it is essential with a view to ensuring quality in the end product and continuous improvement in its production. Properly understanding a production process is a complex,

arduous task requiring the use of a combination of chemometric treatments including design of experiments (DoEs), response surface analysis (RSA), and multivariate analysis (MVA).^{1–6} A number of authors have noted the usefulness of using an experimental design; in contrast, its combined use with MVA is poorly documented and virtually unexplored in pharmaceutical processes. The importance of multivariate techniques lies in their ability to simultaneously deal with a large number of variables relative to DoE and RSA.

Attempts at improving pharmaceutical products and increasing the robustness of their production processes have led to the development of novel concepts such as quality by design (QbD) and process analytical technology (PAT).^{7–11} In accordance with QbD criteria, establishing the knowledge base for a production process requires understanding the variability in its raw materials, defining its critical quality

Abbreviations used: QbD, quality by design; DS, design space; DoEs, design of experiments; PAT, process analytical technology; RSA, response surface analysis; MVA, multivariate analysis; CQAs, critical quality attributes; QTPP, quality target product profile; QRA, quantified risk assessment; FMEA, failure mode and effects analysis; CPP, critical process parameter; NIR, near infrared; TRIS, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Correspondence to: Manel Alcalá (Telephone: +34-93-581-4899; Fax: +34-93-581-4899; E-mail: manel.alcala@uab.cat)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 100, 4432–4441 (2011)

© 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

attributes (CQAs), and identifying the relationship between its CQAs and the clinical characteristics of the target product.⁸

The International Conference on Harmonization (ICH) has issued two guidelines (Q8 and Q9) that contribute ideas for the implementation of the QbD philosophy. Thus, Q8 (pharmaceutical development) is intended to help in the pursuit of quality products by using an appropriate product design⁸ and Q9 (quality risk management) in reducing quality-influencing risks.⁹ Figure 1 illustrates the principal holistic steps of the QbD approach to the development of a pharmaceutical product in accordance with the ICH guidelines. The holistic approach to QbD starts with the definition of a quality target product profile (QTPP) and the subsequent application of various principles and tools in different steps of the process.^{8–10} Some tools such as quantified risk assessment (QRA), risk analysis, fishbone plots, and failure mode and effects analysis (FMEA) are used to identify a tentative list of potential CQAs and critical process parameters (CPPs). The next step involves using the previously identified CPPs to establish an experimental design and selecting those with a significant effect on the process or its product. The results thus obtained can then be used to facilitate the definition of the design space (DS) with tools such as CQAs, DoE and RSA, risk assessment, or PAT with a view to developing an effective pharmaceutical production process. Therefore, quality is generated during the process rather than established in the end product.^{1–6}

The DS concept provides an essential tool for implementing the QbD philosophy in the production of pharmaceuticals. The US Food and Drug Administration and the ICH Q8 guideline define DS as “the multidimensional combination and interaction of input variables (e.g., material attributes) and process parameters that have been demonstrated to provide assurance of quality. Working within the design space is not considered as a change. Movement out of the design space is considered to be a change and would normally initiate a regulatory post approval change process. Design space is proposed by the applicant and is subject to regulatory assessment and approval.”⁸ A DS is delimited by the influential factors identified

with a DoEs. A DoE is a structured, organized method allowing the relationship between the influential factors for a process and the process responses to be determined. As a result, it facilitates the identification and classification of the parameters of a process influencing the quality of its product.^{1–3}

Once the sources of variability of a process are identified, a PAT tool can be used to control the process in the previously established DS. The primary goal of PAT is to enhance process knowledge and understanding. In summary, a DS is defined by the CPPs identified during the process, which will be those of use for on-, in-, and at-line monitoring of the process. In addition to its obvious use for ensuring that a process will develop within the approved DS, PAT can also help in expanding the DS if needed.

In this work, we assessed the production process for a semisolid formulation (a pharmaceutical gel) with a view to identifying and estimating the CQAs for the process and product. To this end, we used a D-optimal design to evaluate the effect of five CPPs (viz. the ethanol, water and polymer concentration, acid neutralized fraction, and reactor temperature) on the quality-related responses (CQAs) gel viscosity and pH. Also, we used the principles of QbD to identify CQAs, define CPPs, and examine them within an appropriate D-optimal framework in order to obtain a comprehensive knowledge and understanding of the gelling process with a view to establishing the DS for the production process.

MATERIALS AND METHODS

Composition of the Formulation

The target formulation was a transparent, colorless hydroalcoholic gel containing 12.5 mg/g active pharmaceutical ingredient (API) (Dexketoprofen, acid form, Lusochimica SpA, Pisa, Italia), a mixture of water and ethanol as vehicle, and a polymer (Carbopol® 980 NF, Lubrizol Advanced Materials, Antwerpen, Belgium), which acts as a gelling agent upon the addition of tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Angus Chemie GmbH Ibbenbüren, Germany) to partially ionize carboxyl groups in the polymer.

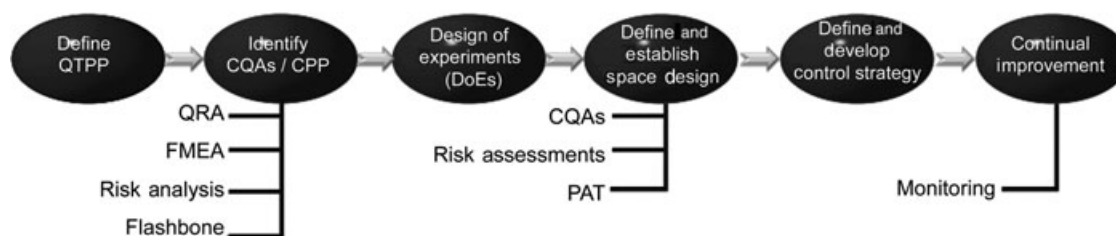


Figure 1. Steps in the development of a pharmaceutical product and the creation of a space design from the holistic approach.

Carbopol is a cross-linked polymer of acrylic acid and pentaerythritol allyl ethers of a high-molecular weight. It is a hydrophilic substance that swells and forms a colloid in water. Its ability to swell up to 1000 times in volume in water is a result of its carboxyl groups being ionized at a high enough pH (4.0–6.0). Gelling is accomplished by adding a base (TRIS) to the medium.¹²

Process and Equipment

The material used consisted of several batches of gel obtained in a stainless steel reactor operating at the pilot plant. The reactor was model M-15L from IPROCOMSA (Castelao, Spain) and 15 L in volume. It was equipped with a central anchor stirring device operating at 8–80 rpm and having stirring blades furnished with Teflon oscillating scrapers and a radially inserted Turrax-type stirrer–emulsifier working at 3000 rpm. The reactor can withstand vacuum down to 760 mbar and allows samples to be withdrawn during the process. All batches studied were produced at the 1:100 scale compared with the routine manufacturing site.

The responses (viscosity and pH) were measured following the validated analytical protocol for this product using a Rheomat RM180 viscometer from Rheometric Scientific (shear rate 42.1 s^{-1} , Maple Instruments Ltd., Ontario, Canada) and a Metrohm 691 pH-meter (Herisau, Switzerland), respectively. Both responses were measured at room temperature (23°C – 24°C) for the withdrawn samples during the process.

The production process was as follows: the reactor was loaded with ethanol, the API was added and thoroughly dissolved, and the required volume of water was added. Then, the mixture was supplied with the carbomer and stirring continued to complete dissolution. The total acidity of the solution was combination of the concentrations of API and carbomer. Finally, the solution was supplied with TRIS in an excess amount relative to the API in order to initiate gelling. The TRIS solution was added in several frac-

tions, the mixture being rehomogenized and samples withdrawn for analysis after each addition. A series of approximately 15 samples was withdrawn after 0%, 2%, 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60% of 70% the total acid concentration was neutralized. The material studied consisted of 13 gel batches containing the component proportions prescribed by the experimental design. Figure 2 summarizes the experimental procedure followed, starting from the examination of historical values, continuing with the establishment of a DoE, and ending with the construction of mathematical models.

All experimental work was conducted at the pilot plant of Laboratorios Menarini in Badalona (Spain).

Design of Experiments

The DoE study was conducted by using a D-optimal design (initially calculated following a Box–Behnken design) involving the following factors: ethanol content (X_1), water content (X_2), and polymer content (X_3). Each factor was studied at three different levels. The response variables (so-called QTPPs) studied were viscosity (Y_1) and pH (Y_2). The factors and QTPPs were based on historical data. A total of 13 batches (runs) were performed following this D-optimal design. Three replicate experiments at the domain center were used to estimate the pure error in the variance. Table 1 shows the characteristics of the experimental domain and the factor levels used. Data were analyzed statistically with the software JMP[®] version 7 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina).

The number of batches was chosen as the minimum experiments that encompassed as much process variability as possible. Two factors [acid neutralized fraction (X_4) and reactor temperature (X_5)] were included to better understand the process. X_4 was included with three levels (fractions of the neutralized acid, 50%, 60%, and 70%). X_5 is the temperature inside the reactor for the fractions of neutralized acid of 32°C , 36°C , and 40°C . At the end, we obtained an augmented total design of five factors and 39 experimental batches.

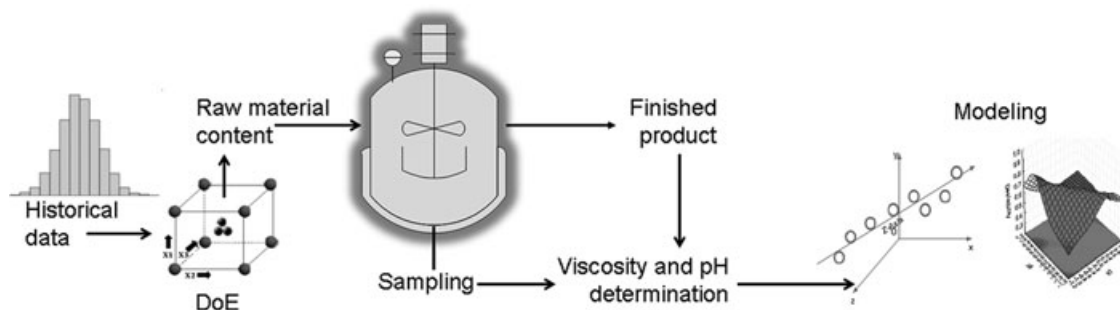


Figure 2. Steps in the development to establish a design space and to apply PAT of a pharmaceutical gel.

Table 1. Experimental Domain for the D-Optimal Design

Variable	Factor	Low Level (-)	Center Level (0)	High Level (+)
X_1	Ethanol (%)	27.0	32.0	37.0
X_2	Water (%)	58.0	63.0	68.0
X_3	Polymer (%)	1.3	1.5	1.7
X_4	Acid neutralized fraction (%)	50.0	60.0	70.0
X_5	Reactor temperature (°C)	32.0	36.0	40.0
Y1	Viscosity (Pa·s)	2.7	3.0	3.3
Y2	pH	6.0	6.2	6.4

Multiple linear regression analysis and analysis of variance (ANOVA) were used to model the data, derive a mathematical expression for the responses, and evaluate the significance of each experimental factor. Each response was described by a second-order polynomial, Eq. 1, affording its prediction within the experimental region. The models only included binary interactions because higher-order ones were highly unlikely under the experimental conditions considered.

$$\begin{aligned}
 Y = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 \\
 & + \beta_{11} (X_1)^2 + \beta_{22} (X_2)^2 + \beta_{33} (X_3)^2 + \beta_{44} (X_4)^2 \\
 & + \beta_{55} (X_5)^2 + \beta_{12} (X_1 X_2) + \beta_{13} (X_1 X_3) + \beta_{23} (X_2 X_3) \\
 & + \beta_{14} (X_1 X_4) + \beta_{24} (X_2 X_4) + \beta_{34} (X_3 X_4) + \beta_{15} (X_1 X_5) \\
 & + \beta_{25} (X_2 X_5) + \beta_{35} (X_3 X_5) + \beta_{45} (X_4 X_5) \quad (1)
 \end{aligned}$$

where Y denotes the response variable (viscosity or pH); X_1 – X_5 (ethanol, water, polymer, acid neutralized, and temperature) are the coded independent factors or variables; β_0 is the independent term; and β_1 – β_5 , estimated with the least-squares method, are the empirical coefficients explaining the relation between the factors X_i or their interactions with the response variables, Y .

Each model was statistically fitted with the F -test in order to compare the variance due to lack of fit (LOF) in the pure error of the variance. The fitted models were judged appropriate if the variance due to LOF was not significantly different from the pure error in the variance.^{13–15} Identifying the best conditions for simultaneously optimizing Y1 and Y2 required using a desirability function, which in turn entailed transforming the measured properties for each response into a dimensionless desirability value d_i defined as a partial function of desirability. This allowed us to combine the results obtained from properties measured on different scales. The desirability function can range from $d = 0$ for a completely undesirable function to $d = 1$ for one having exactly the desired value. A total function D representing the overall desirability was then obtained from the d_i functions for the individual target responses. Such a function was originally proposed by Derringer

and Suich (1980)¹⁶. By considering all requirements for each response, one can thus select the particular conditions for the design variables leading to the maximum possible value in D . Obviously, D can only be high if every individual d_i function is also high. The D values thus obtained for the responses allowed us to identify the optimum experimental region.

RESULTS AND DISCUSSION

We selected five factors with a potential significant influence on the target process for study. Table 1 shows the experimental domain for the proposed D-optimal design, which prescribed the conduct of 13 experiments. Table 2 lists the factor's levels and responses considered in the experimental domain for the 13 production batches, which appear on left in increasing order of acid neutralized fraction (50%, 60%, and 70%). A total of 15 samples withdrawn from the gel production process following addition of TRIS were used for each batch. The samples were allowed to stand at room temperature (21°C–23°C) prior to measurement of their pH and viscosity, and recording of their near infrared (NIR) spectra. NIR spectral modeling is discussed in Part 2 of this series of papers.

The response variables were considered from the historical values for product batches manufactured over the previous 4 years. On the basis of the results, all viscosity and pH values followed a normal distribution. The mean viscosity and pH were 3.0 Pa·s and 6.2, respectively.

With regard to the production process, the TRIS solution first neutralized the acid groups in the API (the stronger, with $pK_a = 4.6$) and then those of the polymer ($pK_a = 6.0$) then. About 20% of the amount of TRIS added was used to neutralize the API and the remainder to neutralize the polymer, the total proportion of acid neutralized being 70%. Figure 3 shows the variation of viscosity and pH during the neutralization process; as can be seen, the viscosity increased rapidly up to an acid neutralized fraction of 15%, and then leveled off and eventually decreased slightly at the end of the process. On the contrary, the pH increased as the neutralizing solution was added.

Table 2. Experimental Conditions of D-Optimal Design and Statistical Analysis

Batches	Factors					Viscosity (Y1)			pH (Y2)			
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Obs. (Pa·s)	Pred. (Pa·s)	Res. (%)	Obs.	Pred.	Res. (%)	
At 50% of total acid neutralized	01	-1	-1	-1	-1	0	3.24	3.29	-1.54	5.94	5.89	0.84
	02	-1	1	1	-1	1	5.32	5.26	1.13	5.72	5.72	0.00
	03	1	1	1	-1	1	4.47	4.37	2.24	5.58	5.65	-1.25
	04	-1	1	-1	-1	0	3.05	3.14	-2.95	5.77	5.84	-1.21
	05	1	1	-1	-1	0	5.92	5.92	0.00	5.70	5.71	-0.18
	06	1	-1	-1	-1	0	2.00	2.02	-1.00	6.09	6.08	0.16
	07	-1	-1	1	-1	0	2.10	2.09	0.48	6.19	6.25	-0.97
	08	1	-1	1	-1	1	4.38	4.26	2.74	5.81	5.76	0.86
	09	0	0	0	-1	0	3.82	3.80	0.52	5.93	5.84	1.52
	10	0	0	0	-1	0	3.86	3.80	1.55	5.78	5.84	-1.04
	11	0	0	0	-1	-1	3.75	3.76	-0.27	5.88	5.86	0.34
	12	0	1	0	-1	0	3.49	3.53	-1.15	5.76	5.73	0.52
	13	1	0	0	-1	-1	3.08	3.07	0.32	5.94	5.94	0.00
At 60% of total acid neutralized	01	-1	-1	-1	0	0	3.27	3.29	-0.61	6.15	6.23	-1.30
	02	-1	1	1	0	1	5.24	5.26	-0.38	5.94	5.94	0.00
	03	1	1	1	0	1	4.21	4.37	-3.80	5.90	5.87	0.51
	04	-1	1	-1	0	0	3.14	3.14	0.00	6.23	6.18	0.80
	05	1	1	-1	0	1	5.92	5.76	2.70	5.92	5.88	0.68
	06	1	-1	-1	0	-1	1.85	1.83	1.08	6.38	6.40	-0.31
	07	-1	-1	1	0	0	2.02	2.09	-3.47	6.48	6.48	0.00
	08	1	-1	1	0	1	4.30	4.26	0.93	6.05	5.99	0.99
	09	0	0	0	0	0	3.63	3.80	-4.68	6.17	6.12	0.81
	10	0	0	0	0	0	3.82	3.80	0.52	6.01	6.12	-1.83
	11	0	0	0	0	0	3.69	3.80	-2.98	6.10	6.12	-0.33
	12	0	1	0	0	0	3.60	3.53	1.94	6.05	6.02	0.50
	13	1	0	0	0	0	2.92	2.94	-0.68	5.96	5.95	0.17
At 70% of total acid neutralized	01	-1	-1	-1	1	0	3.36	3.29	2.08	6.62	6.57	0.76
	02	-1	1	1	1	1	5.20	5.26	-1.15	6.17	6.17	0.00
	03	1	1	1	1	1	4.43	4.37	1.35	6.14	6.10	0.65
	04	-1	1	-1	1	0	3.25	3.14	3.38	6.53	6.52	0.15
	05	1	1	-1	1	1	5.61	5.76	-2.67	6.19	6.23	-0.65
	06	1	-1	-1	1	-1	1.82	1.83	-0.55	6.76	6.74	0.30
	07	-1	-1	1	1	0	2.16	2.09	3.24	6.77	6.71	0.89
	08	1	-1	1	1	1	4.10	4.26	-3.90	6.11	6.22	-1.80
	09	0	0	0	1	0	3.84	3.80	1.04	6.46	6.41	0.77
	10	0	0	0	1	-1	3.75	3.76	-0.27	6.40	6.42	-0.31
	11	0	0	0	1	0	3.99	3.80	4.76	6.35	6.41	-0.94
	12	0	1	0	1	0	3.48	3.53	-1.44	6.30	6.30	0.00
	13	1	0	0	1	0	2.94	2.94	0.00	6.22	6.23	-0.16

Obs., experimental response; Pred., least-squares prediction; Res., % residual.

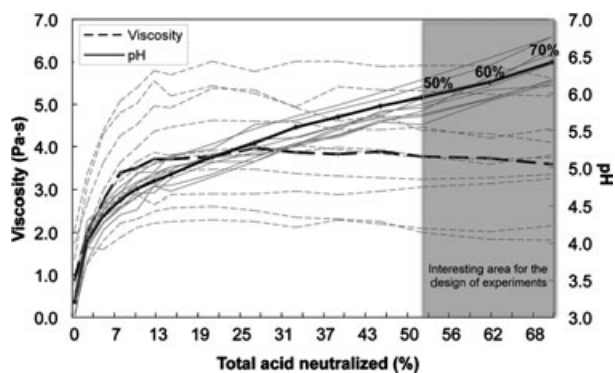


Figure 3. Viscosity and pH trend plot during gelation process for different experimental process. (Normal operating condition batch in bold type lines and other compositions in thin lines.)

Models Fitting and Statistical Analysis

The proposed model was assessed, and the coefficients for its factors determined, by least squares fitting. Some first-, second- and higher-order interactions were not significant ($p > 0.05$) and were thus excluded from the final analysis. The models for viscosity (Y1) and pH (Y2) were defined in mathematical terms as follows:

$$\begin{aligned}
 Y1 = & 3.80 - 0.45X_1 + 0.94X_2 - 1.43X_3 + 1.76X_5 \\
 & + 1.01X_1X_2 - 0.82X_1X_3 - 0.18X_1X_5 \\
 & - 1.89X_2X_5 + 1.56X_3X_5 - 0.42(X_1)^2 \\
 & - 1.21(X_2)^2 + 1.71(X_5)^2
 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 6.12 + 0.16X_1 - 0.10X_2 + 0.27X_3 + 0.28X_4 \\
 & - 0.23X_5 - 0.08X_1X_2 + 0.14X_1X_3 - 0.26X_1X_5 \\
 & + 0.12X_2X_5 - 0.06X_3X_4 - 0.42X_3X_5 - 0.33(X_1)^2 \\
 & + 0.69(X_3)^2 - 0.22(X_5)^2 \quad (3)
 \end{aligned}$$

The ANOVA of regression coefficients revealed that the previous equations fitted the initially proposed linear equation. Thus, Eq. 2 for Y_1 and Eq. 3 for Y_2 were very highly linear, with an R^2 value of 0.996 for the former and 0.972 for the latter. Also, neither model exhibited significant LOF ($\text{LOF}_{Y_1} = 0.94$, $\text{LOF}_{Y_2} = 0.93$). The models were checked for linearity and their residuals were explored. As can be seen from Table 2, the predictions were quite accurate (residuals were all less than 5%, which indicates that the proposed equations fitted the experimental values very closely).

The total data set was split in two groups (75%/25%) for training and test sets. After the calculation of the models, the predictive ability is verified with the test set. The prediction errors (root mean standard error of prediction, RMSEP) for the two models were very low ($\text{RMSEP}_{Y_1} = 0.059$ and $\text{RMSEP}_{Y_2} = 0.064$). As extra information, the calibration models presented 15 and 14 degrees of freedom for the residuals of Y_1 and Y_2 , respectively.

A Pareto diagram allowed us to easily envisage the most significant effects of the factors and their interactions. Figure 4a shows the diagram for only the statistically significant factors and interactions in relation to Y_1 for $p = 0.05$. As can be seen, factors X_2 and X_5 had highly significant effects on Y_1 , whereas the other three factors had a weaker influence. Figure 4b shows the Pareto diagram for Y_2 ; as can be seen, X_4 was the individual factor most strongly influencing this response variable, followed by X_5 , X_2 , and X_1 .

Response Surface Analysis

The information derived with the models (Eq. 4 and 5) was expanded by using isoresponse curves that were obtained plotting changes in the responses with the two significant factors on constancy of all others at their stated levels. Thus, an ethanol content of 32% and a temperature of 36°C (the central values, see Table 1) were used to obtain the isoresponse curves for the polymer and water content shown in Figure 5 (red lines for viscosity and blue lines for pH). The combination of areas A2 and A3 represents the zone of acceptance for pH alone, and A3 for viscosity alone. However, A3 was the acceptance zone for both responses (Y_1 and Y_2), so any value falling in it will meet the specifications and the zone can be assumed to bound our DS. The isoresponse curves for the other pairs of factors were obtained similarly. Figure 5a shows the isoresponse curve between X_3 and X_5 —the most influential factors for Y_1 —obtained with $X_1 = X_4 =$

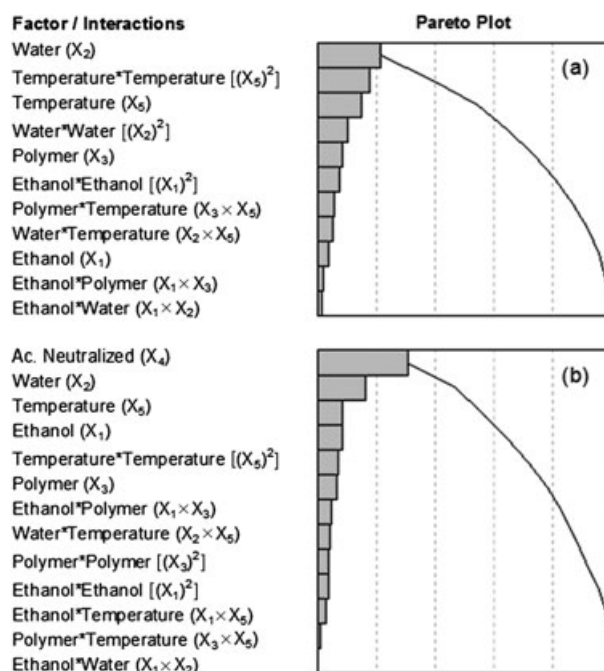


Figure 4. Pareto plot of the transformed orthogonalized estimates, demonstrating the relative importance of the main effects and interaction for (a) viscosity and (b) pH. Absolute effect values from higher to lower. The p values were generated by using Lenth's method.

$X_5 = 0$; as can be seen, any point falling in the white area (A3) will contain Y_1 and Y_2 within the established tolerance limits. An especially interesting area was that observed at a water content of approximately 61% and a polymer content of 1.52%, where the viscosity and pH curves crossed over each other. Figure 5b shows the isoresponse curve between X_2 and X_4 —the most influential factors for Y_2 —obtained with $X_1 = X_3 = X_5 = 0$. As can be seen, any point falling in the area bounded by acid neutralized fractions of 53%–63% and water content of approximately 61% will meet the desired viscosity and pH specifications.

The previous plots contain a rectangle shaded in light blue, which represents the DS for the selected factors; any point within the rectangle will meet the viscosity and pH specifications. As can be seen, the rectangle coincided for both plots (Figs. 5a and 5b). The resulting DS was bounded by the following coordinates: $X_1 = 32 \pm 1\%$, $X_2 = 61\%$, $X_3 = 1.5\%$, $X_4 = 60 \pm 6\%$, and $X_5 = 36^\circ\text{C}$. By adapting our design to these conditions, we can be certain that the Y_1 and Y_2 values obtained will invariably fall within the desired tolerance range. As can be seen, factors X_1 , X_3 , X_4 , and X_5 were very close to the central values in the experimental design and X_2 only departed slightly from its central counterpart.

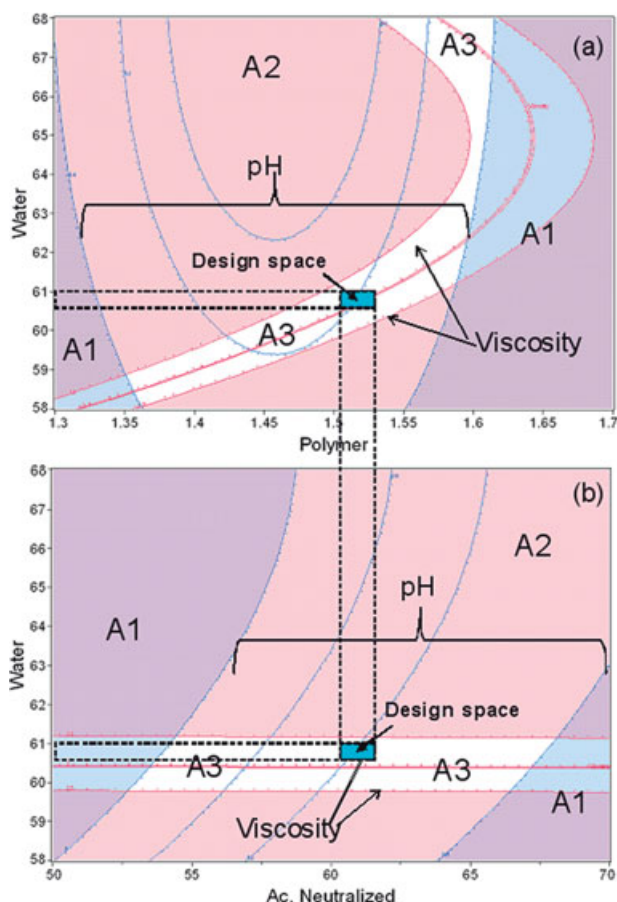


Figure 5. Isoresponse curves in the plane for significant factors on viscosity and pH. (Red line shows viscosity and blue line shows pH. Ethanol and temperature are fixed at center point. A1, unacceptable zone for pH; A2, unacceptable zone for viscosity; A3, acceptable zone for viscosity and pH.)

Optimization Via the Desirability Function

So far we have simply explored the results, analyzed the data, and confirmed the goodness of the proposed models. However, the primary aim of this study was to optimize the process in relation to its historical values. The next step was conducted with a simple, highly effective tool for determining the optimum conditions with provision for constraints on the two responses: a desirability function.

The procedure involved establishing the partial desirability for the two responses. The aim was to obtain a gel with the CQAs $Y1 = 3 \pm 0.3$ Pa·s and $Y2 = 6.2 \pm 0.2$. At this viscosity value, the rheological properties of the gel are optimal for dermal application as they facilitate transport of the API. Also, the pH should be higher than 6.0 in order to minimize the formation of by-products.

Using a desirability function provides a mathematical argument to select the best possible combination of formulation and CPPs. Such a function is especially

useful with a view to finding the best compromise between several responses. Our function was simultaneously applied to both responses (viscosity and pH). This allows one to establish the best possible compromise in the presence of constraints on each response, as was indeed our case. If the overall desirability is unity, then all compromises will have been accomplished. On the contrary, if the overall desirability is 0, then at least one compromise will have not been fulfilled and, if it is greater than 0 but less than unity, then all compromises will have been fulfilled at least partly some may even have been accomplished in full. The best compromise will be that corresponding to the greatest overall desirability.

Simultaneously calculating the desirability of two or more functions is facilitated by using a model considering both responses at one; such a model should not differ much from those established from Eq. 2 and 3. Basically, this involved preserving the same coefficients for both responses (viscosity and pH) or, in other words, if a factor was not significantly influential on viscosity, but it was on pH—which was the case with X_4 —then the factor in question was included in the simultaneous analysis and the nonsignificant coefficients for both responses were excluded. In this way, the following two equations were obtained:

$$\begin{aligned}
 Y1 = & 3.80 - 0.45X_1 + 0.93X_2 - 1.42X_3 + 0.01X_4 \\
 & + 1.76X_5 + 1.01X_1X_2 - 0.81X_1X_3 \\
 & - 0.04X_1X_4 - 0.12X_1X_5 - 1.88X_2X_5 \\
 & - 0.01X_3X_4 + 1.52X_3X_5 - 0.05X_4X_5 \\
 & - 0.41(X_1) - 1.21(X_2)^2 - 0.01(X_3)^2 + 1.72(X_5)^2
 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned}
 Y2 = & 6.11 + 0.14X_1 - 0.11X_2 + 0.25X_3 + 0.28X_4 \\
 & - 0.23X_5 - 0.08X_1X_2 + 0.13X_1X_3 \\
 & - 0.02X_1X_4 - 0.22X_1X_5 + 0.14X_2X_5 \\
 & - 0.05X_3X_4 - 0.40X_3X_5 - 0.01X_4X_5 \\
 & - 0.29(X_1)^2 + 0.04(X_2)^2 + 0.60(X_3)^2 - 0.20(X_5)^2
 \end{aligned} \quad (5)$$

which exhibited very high linearity ($R^2_{Y1} = 0.99$, $R^2_{Y2} = 0.97$, $LOF_{Y1} = 0.44$, $LOF_{Y2} = 0.91$). These equations were used to calculate the overall desirability for both responses at once in order to optimize the process. By way of example, Figure 6 shows one of the many optimal conditions leading to an overall desirability $D_{Y1\&Y2} = 1$. The statistical software was used to perform a large number of simulations that allowed a prediction profile to be obtained; such a profile

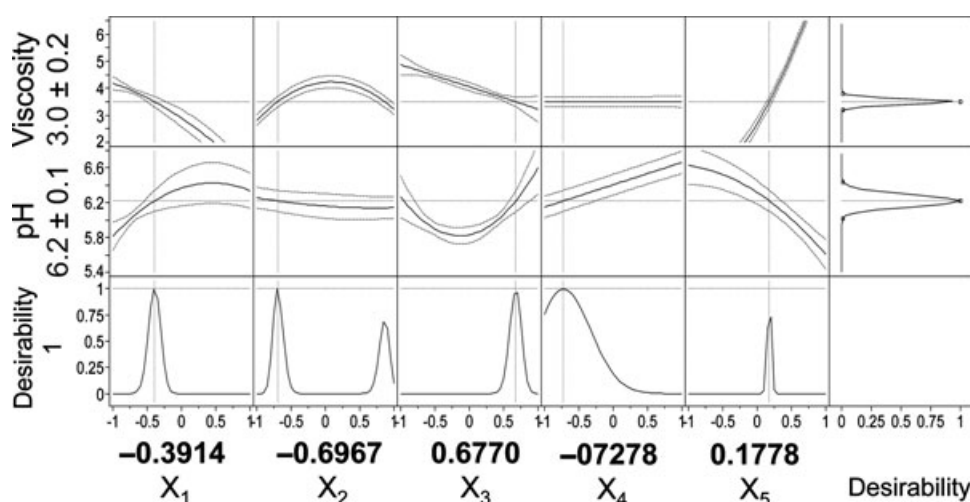


Figure 6. Desirability function application for viscosity and pH using the QTPPs of formulation.

represented one of the many possible ways of optimizing the process. Using the factor coordinates of Figure 6 following transformation into real values should allow the factor values needed to obtain a product with a viscosity and pH meeting its CQA requirements. Such values were found to be as follows: 30% ethanol, 59% water, 1.6% polymer, a reactor temperature of approximately 36°C, and the amount of solution required to neutralize about 53% of the total amount of acid. Substituting these values into Eq. 4 and 5 would in theory allow us to obtain a product of viscosity 3 ± 0.2 Pa·s and pH 6.2 ± 0.1 . As can be seen, the equations were slightly different from Eq. 2 and 3 as a result of simultaneously using two samples with the same number of coefficients for both responses.

Combining Viscosity and pH into a New Desired Response

All models described so far were constructed by assigning both responses (viscosity and pH) an identical importance (i.e., a desirability of 1); however, identifying the more influential response required calculating the desirability with variable weights for Y1 and Y2 in order to check their significance against the calculated response.

As shown above, the previous models accurately explained Y1 and Y2 as two independent responses. This allowed us to use the desirability function to identify the appropriate levels for our compromise; in practice, however, we could combine both responses into a single one in order to avoid the need for two expressions to predict the variables. We designated the combined response DR_n . This response, based on the desirability function, allowed us to assess our experimental design with a single equation. This required normalizing our responses with respect to our QTPPs (Eq. 6 and 7) and then examining their mutual rela-

tionships. There were three different possibilities in this respect, namely: (a) Y1 and Y2 might have an identical weight in the response (DR_1), (b) Y1 might have a greater weight than Y2 (DR_2), and (c) Y2 might have a greater weight than Y1 (DR_3).

$$\text{Visc}_{\text{Norm}} = \frac{\text{Viscosity (Pa} \cdot \text{s)}}{3.00 \text{ Pa} \cdot \text{s}} \quad (6)$$

$$\text{pH}_{\text{Norm}} = \frac{\text{pH}}{6.22} \quad (7)$$

$$\text{DR}_1 = (\text{Visc}_{\text{Norm}} \times 0.5) + (\text{pH}_{\text{Norm}} \times 0.5) \quad (8)$$

$$\text{DR}_2 = (\text{Visc}_{\text{Norm}} \times 0.8) + (\text{pH}_{\text{Norm}} \times 0.2) \quad (9)$$

$$\text{DR}_3 = (\text{Visc}_{\text{Norm}} \times 0.3) + (\text{pH}_{\text{Norm}} \times 0.7) \quad (10)$$

On the basis of the ANOVA of the models for the three responses (Table 3), DR_3 was the only model exhibiting significant LOF ($p = 0.010$); on the contrary, DR_2 was that exhibiting the lowest LOF. Therefore, viscosity has a greater weight (importance) than pH in our desired response (DR), so it should be the CPP to be monitored closely. Table 3 shows the significant individual, combined, and quadratic effects of the three DRs. As can be seen, the effect of X_4 was only influential on DR_1 and DR_3 ; and the interaction X_1/X_5 and the quadratic effect of X_1 only on DR_3 . Equation 11 describes the validated model for DR_2 as

Table 3. Summary of Models Fit for DR₁, DR₂, and DR₃

Parameter		DR ₁	DR ₂	DR ₃
Statistics	R^2	0.995	0.996	0.992
	R^2 -adjusted	0.989	0.992	0.983
	RMSE	0.016	0.024	0.012
	p value	<.0001	<.0001	<.0001
	Lack of fit	0.144	0.380	0.010
Significant effects	Factor	X_1, X_2, X_3, X_4, X_5	X_1, X_2, X_3, X_5	X_1, X_2, X_3, X_4, X_5
	Interaction	$X_1/X_2, X_1/X_3, X_2/X_5, X_3/X_5$	$X_1/X_2, X_1/X_3, X_2/X_5, X_3/X_5$	$X_1/X_2, X_1/X_3, X_1/X_5, X_2/X_5, X_3/X_5$
	Quadratic	X_2, X_5	X_2, X_5	X_1, X_2, X_5

Table 4. Comparison of Design Spaces

Factor	Code	Using Viscosity and pH Values	Using Desired Response DR ₂
Ethanol (%)	X_1	32.4	32
Water (%)	X_2	61	61
Polymer (%)	X_3	1.51	1.58
Acid neutralized fraction (%)	X_4	60 ± 6	60 ± 9
Reactor temperature (°C)	X_5	36	37

follows:

$$\begin{aligned}
 DR_2 = & 1.21 - 0.12X_1 + 0.25X_2 - 0.38X_3 + 0.01X_4 \\
 & + 0.46X_5 + 0.27X_1X_2 - 0.22X_1X_3 \\
 & - 0.01X_1X_4 - 0.04X_1X_5 - 0.50X_2X_5 \\
 & - 0.01X_3X_4 + 0.42X_3X_5 - 0.11(X_1)^2 \\
 & - 0.32(X_2)^2 + 0.66(X_3)^2 + 0.45(X_5)^2 \quad (11)
 \end{aligned}$$

As can be seen, the equation contained the coefficients X_4 , X_1/X_4 , X_1/X_5 , and X_3/X_4 , which proved not significant in the previous DoE but were retained in as much as they were pH-dependent and their suppression would have detracted from robustness in the model.

The DS for DR₂ was defined by optimizing Eq. 11. This provided the following coordinates: $32 \pm 1\%$ for the ethanol content, $60 \pm 1\%$ for water, 1.6% for the polymer, $60 \pm 9\%$ for the acid neutralized fraction, and 37°C for the temperature. Table 4 compares this DS with that previously obtained by using viscosity and pH simultaneously. As can be seen, both were very similar. This has a strong practical significance because it allows one to monitor the process via single response variable (DR₂) previously assigned a weight of 0.8 in viscosity and 0.2 in pH, and encompassing the two most important CPPs with a view to checking whether a given batch meets the specifications.

CONCLUSIONS

The contents in ethanol (X_1), water (X_2) and polymer (X_3), and the temperature inside the reactor (X_5), were found to significantly affect viscosity in the studied pharmaceutical production process. In addition, X_1 , X_2 , X_3 , and the proportion of acid neutralized, X_4 , affected the pH of the resulting gel.

On the basis of the results, factors X_1 , X_3 , X_4 , and X_5 in the DS were very close to the central values of the experimental design; on the contrary, X_2 was smaller than its central counterpart. X_4 was the only factor with a variation range of $\pm 6\%$, which should provide ample space for completing the production process and obtaining a quality end product.

The process for a batch obtained under normal operating conditions was found to have neutralized about 70% of total acid initially present in the mixture. The factor acid neutralized fraction (X_4) was not significantly influential on viscosity. Viscosity had a greater weight in the overall desirability function. We can therefore assume that neutralizing about 60% of all acid groups will allow a product with acceptable properties to be obtained.

Combining viscosity with a weight of 0.8 and pH with one of 0.2 into a single DR allowed us to define a DS nearly identical with that established from both responses simultaneously. The merge of the responses Y1 and Y2 in a single response DR allows the process to be monitored in an easier manner.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this research as part of Project CTQ2009-08312 and to Laboratorios Menarini (Badalona, Spain) for supporting the conduct of this work.

REFERENCES

1. Wu H, Tawakkul M, White M, Khan M. 2009. Quality-by-design (QbD): An integrated multivariable approach for the component quantification in power blends. *Int J Pharm* 372: 39–48.

2. Huang J. 2009. Quality by design case study: An integrated multivariable approach to drug product and process development. *Int J Pharm* 382:23–32.
3. Verma S, Lan Y, Gokhale R, Burgess D. 2009. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *Int J Pharm* 377:185–198.
4. Ordoñez A, Ordoñez R, Zampini I, Isla M. 2009. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *Int J Pharm* 378:51–58.
5. Calvin Sun C, Hou H, Gao P, Ma C, Medina C, Alvarez F. Development of a high drug load tablet formulation based on assessment of powder manufacturability: moving towards Quality by design. *J Pharm Sci* 98(1):239–247.
6. Wu H, Khan M. Quality-by-design (QbD): An integrated approach for evaluation of powder blending process kinetics and determination of powder blending end point. *J Pharm Sci* 98(8):2784–2798.
7. Juran JM, Godfrey AB. 1999. *Juran's Quality Handbook* (5th Edition). McGraw-Hill, New York.
8. Guidance for industry: Q8 pharmaceutical development, US Department of Health and Human Service. FDA, Rockville, MD, May 2006.
9. Guidance for industry: Q9 quality risk management, US Department of Health and Human Service FDA, Rockville, MD, June 2006.
10. Guidance for industry: Q10 quality systems approach to pharmaceutical cGMP regulations FDA, Rockville, MD, September 2006.
11. US Food and Drug Administration. PAT guidance for industry—a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Office of Regulatory Affairs, Rockville, MD, September, 2004.
12. Ackermann C, Rodriguez-Hornedo N, Islam M, Ciotti S. 2004. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm, Res.* 21(7):1192–1199.
13. Lewis G, Mathieu D, Phan-Tan-Luu (Eds.)1999. *Pharmaceutical Design*, Marcel Dekker, New York.
14. Myres, R.H., Montgomery D.C. (Eds.). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, Wiley, New York. 1995.
15. Batti R, Kamoun A, Chaabouni M, Sergent M, Phan.Tan.Luu R. 2006. Screening and optimization of factors of a detergent admixture preparation. *Chemom Int Lab Syst* 80:198–208.
16. Derringer G, Ronald S. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology.* 12:214–219.

ANEXO II

Quality by Design approach of a pharmaceutical gel manufacturing process. Part II: NIR monitoring of composition and physical parameters

Juan G. Rosas, Marcel Blanco, Josep M^a.
González and Manel Alcalá

Journal of Pharmaceutical Sciences **100** (2011) 4432 – 4441.

Quality by Design Approach of a Pharmaceutical Gel Manufacturing Process, Part 2: Near Infrared Monitoring of Composition and Physical Parameters

JUAN G. ROSAS,¹ MARCEL BLANCO,¹ JOSEP M. GONZÁLEZ,² MANEL ALCALÁ¹

¹Grup de Quimiometria Aplicada, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

²Laboratorios Menarini, Badalona, Spain

Received 13 December 2010; revised 8 March 2011; accepted 19 April 2011

Published online 5 May 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.22607

ABSTRACT: We applied the principles of quality by design to the production process of a pharmaceutical gel by using the near infrared spectroscopy (NIRS) technique in combination with multivariate chemometric tools. For this purpose, we constructed a D-optimal experimental design having normal operational condition (NOC) batches as central point. The primary aim here was to develop an expeditious NIRS method for determining the composition of a pharmaceutical gel and assess the temporal changes in major physical factors affecting the quality of the product (specifically, viscosity and pH). Gel components were quantified by using partial least squares (PLS) calibration models of the PLS1 type. The study was completed by using the batch statistical process control method to compare product batches included in the experimental design with NOC batches. Similarities and differences between the two types of batches were identified by using control charts for residuals (*Q*-statistic) and Hotelling's *T*₂ (*D*-statistic). The ensuing models, which were subject to errors less than 5%, allowed the gel production process to be effectively monitored. As shown in this work, the NIRS technique is a highly suitable tool for process analytical technology. © 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 100:4442–4451, 2011

Keywords: quality by design; process analytical technologies; design space; analytical chemistry; near-infrared spectroscopy; partial least squares; multivariate analysis; hydrogel; normal operation conditions

INTRODUCTION

Assuring quality in a pharmaceutical entails the determination of various physical and chemical properties prior to its release in the market by the manufacturer. Nonconformity in a production batch, which is usually determined at the end of the production process, prevents its commercial release and obviously has an adverse economic impact. New methodologies have been developed to assure quality at every step of a production process, and hence in the end product.^{1–3} The physical properties of a pharmaceutical gel can be considerably altered by uncontrolled changes in the proportions of the components of the formulation. In this work, we developed a fast, robust method for

the real-time monitoring of the physical and chemical parameters during the production of a pharmaceutical in gel form.

There have been some attempts at improving pharmaceutical production processes by using quality by design (QbD) and process analytical technology (PAT) concepts.^{4–9} The QbD philosophy requires that the knowledge base for a product include a sound description of the variability in the raw material, the relationship between its production process and critical quality attributes (CQAs), and the association of CQAs with the clinical properties of the product.⁹ Gathering this information requires an exchange of information between pharmacutists and chemists; thus, pharmacutists have a profound knowledge of the variables involved and the problems faced in drug manufacturing processes, and such knowledge is essential for chemists to develop robust models for each particular process and close the PAT feedback cycle.

Correspondence to: Manel Alcalá (Telephone: +34-93-581-4899; Fax: +34-93-581-4899; E-mail: manel.alcala@uab.cat)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 100, 4442–4451 (2011)
© 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

Once every source of variability in a process has been identified, one can use a variety of analytical tools for process analytical control in a previously constructed design space. On the basis of the foregoing, PAT essentially involves product and process understanding.⁷ In addition to its obvious use for ensuring that a process will operate within its associated design space, PAT can be of assistance in expanding a previously established design if needed. Because the analysis of process data is crucial with a view of understanding a process under multivariate data control,⁷ PAT relies heavily on multivariate analysis and design of experiments (DoE) treatments.

Near infrared spectroscopy (NIRS) is currently being widely used as an analytical tool for fast determination of the physical and chemical properties of drugs.⁸ Very often, the analytical control of pharmaceuticals is time-consuming and delays the adoption of corrective measures on their production process. The NIRS technique is being increasingly used to solve this problem with growing efficiency as new, more powerful analytical equipment and software become available. Its usefulness in determining the composition of recipients,¹⁰ raw materials,¹¹ and active pharmaceutical ingredients (APIs) have enabled the development of fast, accurate, and precise analytical methods for the pharmaceutical industry exploiting its flexibility and data processing capabilities. In addition, NIRS has proved useful for determining various parameters including homogeneity,^{12–14} moisture,^{15–17} particle size in pure products and granulates,^{18,19} tablet hardness,²⁰ and polymorphism.^{21–23}

The need for no sample treatment in NIRS allows an analytical response to be obtained within a few seconds with minimal effort on the part of the analyst. This has fostered a wide use in the monitoring of pharmaceuticals^{24–26} and also in various other fields for purposes such as the determination of ethanol²⁷ and the monitoring of fermentation,²⁸ diol synthesis,²⁹ and food manufacturing processes.³⁰

The NIR spectra for a batch are usually gathered in a data array for mathematical processing with classical two-way methods such as principal component analysis (PCA), multiple linear regression (MLR), or partial least squares (PLS). However, the data provided by spectroscopic measurements made during the production of a batch and by several batches can be arranged in a data cube for application of a three-way unfolding method. The data array consists of three dimensions (batches \times time \times spectra). This method is called multiway partial least squares (MPLS), and their associated monitoring statistics have been shown to be successful with industrial data for both the analysis of completed batches.^{31–33} MPLS perform PLS on the three-way matrices arising from batch by unfolding and rearranging them

in two-dimensional arrays as described by Nomikos and MacGregor.³² Therefore, a NIR spectrum can be viewed as the fingerprint of a chemical system at a given point of time. However, this spectral fingerprint is difficult to interpret and requires appropriate chemometric processing to extract analytically useful information.

In this work, we used NIRS as a PAT tool to determine the physical (viscosity and pH) and chemical properties (API and excipient concentrations) of a pharmaceutical gel. Also, we compared batches obtained under normal operational conditions (NOCs) with batches from an experimental design in order to identify the similarities and differences between the two. To this end, we used MPLS in combination with control charts for residuals (Q -statistic) and Hotelling's T^2 (D -statistic).

MATERIAL AND METHODS

Production Batches and Laboratory Samples

The studied material was a colorless, transparent pharmaceutical gel containing a 12.5 mg/g concentration of API (dexketoprofen in acid form). A total of 60 laboratory samples spanning a concentration range of $\pm 20\%$ around the nominal value of API and $\pm 15\%$ for the excipients were used to construct a calibration model, using a D-optimal design with four factors (viz. the API, carbomer, ethanol, and water concentrations). Correlation between pairs of analytes was less than 0.15, except for the major components (ethanol and water).

Experimental Design of Equipment and Processes

The design space used was established from a total of 15 gel batches prepared according to a D-optimal design with five factors (ethanol, water, carbomer, acid neutralized fraction, and reactor temperature). The procedure and tests used are described in detail in Part 1 of this study.

Each gel batch was prepared as follows: The reactor was loaded with an appropriate amount of ethanol and API, and the mixture was stirred to complete dissolution, after which the amount of water required was added. After homogenization, the mixture was supplied with the carbomer and kept under stirring until complete dissolution. Total acidity in the solution was the combination of that of the API (a monocarboxylic acid) and the carbomer (a polycarboxylic polymer). The reactor mixture was finally supplied with a tris solution in different fractions in order to neutralize the API and cause gelling. Each homogenization step was followed by withdrawal of appropriate samples for analysis. A total of 15 samples were withdrawn after 0%, 2%, 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, and 70%

of the total acid was neutralized. Following recording of the temperature in the reactor, each sample was allowed to cool to room temperature (21°C–23°C) prior to recording of its NIR spectrum and measurement of its viscosity and pH.^{34,35}

The equipment used in Part 1 was supplemented with a Portable NIR LabSpec® Pro 5000 spectrophotometer from ASD Inc. (Boulder, Colorado, USA) furnished with a continuous-flow cell of 0.1 mm light path. Spectra were acquired with the aid of the software Indico Pro 5.2, also from ASD Inc. The spectrum for the empty cell in the absence of gel was used as spectral blank. Each NIR spectrum was the average of 32 scans performed at 1 nm intervals over a wavelength range of 1000–2500 nm.

Data Processing

All multivariate models used to determine the physical (viscosity and pH) and chemical parameters (concentrations) were constructed with the PLS1 algorithm (the spectral treatments used included first and second derivative with a moving window of 15, 21, or 29 points), standard normal variate (SNV), and PCA. Models were validated by full cross-validation. PLS models were constructed by using the software The Unscrambler version 9.8 from CAMO (Trondheim, Norway) and SIMCA-P+ version 12.0 from Umetrics (Umeå, Sweden).

Calibration and prediction quality were measured in terms of root mean standard error (RMSE) (Eq. 1):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{pred}} - y_i^{\text{ref}})^2}{n}} \quad (1)$$

where n is the number of samples, y^{ref} is the reference value, and y^{pred} is the NIR value.

Multivariate Statistical Process Control

The concept of batch statistical process control was originally developed by Nomikos and MacGregor.^{31,32}

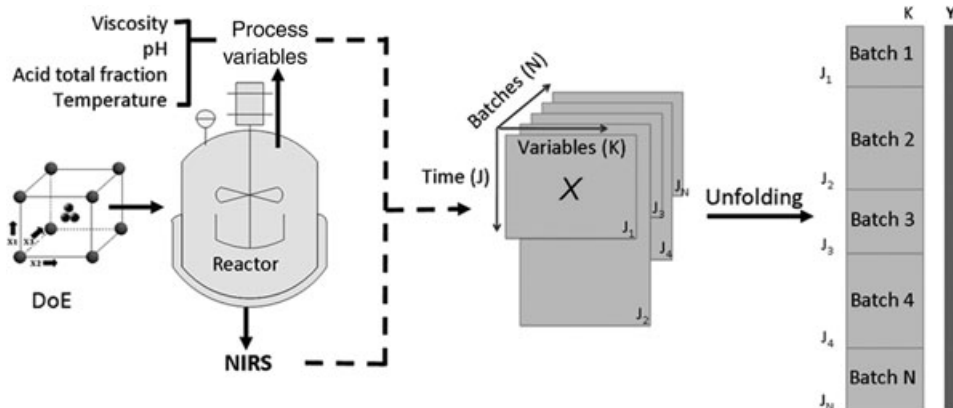


Figure 1. Multivariate unfolding of process data prior to the construction of MSPC models.

Monitoring temporal changes in some properties enables at-line comparison of a batch being processed at a given time with one obtained under NOCs, which is used as reference. The two batches can be compared by plotting their changes with time. The line connecting different points in time for a batch is taken to be the trajectory of the batch, which should fall within specific limits as defined by, for example, Hotteling's T2. The status of a batch depends on a number of variables that must be reduced to a much smaller space in order to better envisage the trajectory of the batch. The body of data for a batch are arranged in a three-way array, a data cube wherein one dimension corresponds to process variables (or wavelengths in relation to spectra), another to the samples withdrawn during the process, and the third to the studied batches.

Nomikos and MacGregor³² proposed an unfolding procedure for the data cube that allows batches being manufactured to NOC batches in order to construct an appropriate model. This approach, however, requires that batches be completely finished for comparison; also, all batches should have identical process duration. The original procedure was modified by Wold et al.³⁶; theirs was subject to no effect of the batch process duration provided the dimension of the variables remained constant throughout. With this procedure, the data cube X is unfolded into a two-way data array (Fig. 1) from which a vector Y can be constructed. In batch process control, Y can be a property of the product or a time value in the sample collection period. PCA or PLS scores and loadings are monitored via control charts (D -statistic and Q -statistic) and assumed to represent the variables of a standard process.^{31–33}

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 depicts the methodology used in this work. Implementing the proposed DoE required producing

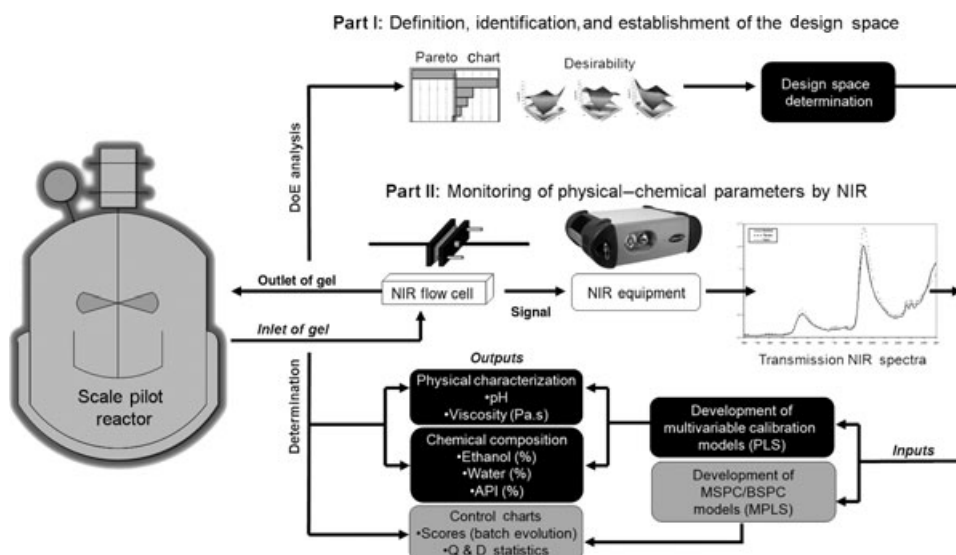


Figure 2. Development of a self-contained QbD and PAT approach for a pharmaceutical gel production process.

gel batches containing variable amounts of reagents in a pilot plant reactor, which also led to variable viscosity and pH values. The production process was monitored by withdrawing samples to record their NIR spectra at preset times. The body of spectra thus obtained was subjected to PCA in order to identify those containing the greatest variability in viscosity and pH, which were used to construct and validate calibration models for these two properties. The models for chemical parameters were constructed and validated from laboratory samples mainly.

Multivariate Analysis

Figure 3 shows the absorbance spectra of samples withdrawn from the reactor after variable lengths of time. As can be clearly seen, the spectra contained the typical bands for water (1300–1600 and 1900–2100 nm) and those for ethanol (2200–2350 nm). Changes in concentration of the components of the gel appear to be correlated between some NIR spectra regions and changes in viscosity and pH.

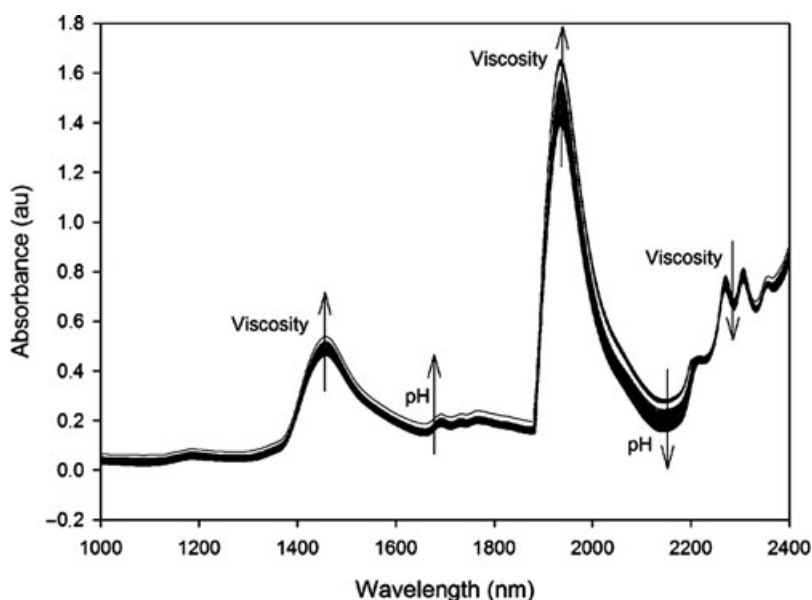


Figure 3. Near infrared absorbance spectra for an individual process.

A PCA of the results revealed spectral differences between batches (Fig. 4) and helped identifying the experiments corresponding to the same population with a view to construct appropriate models. Batches B2 and B4 were excluded owing to their strong spectral differences from the others. The batches were designated B1–B13, the batches B9–B11 are the NOC batches. As can be seen, the samples withdrawn for analysis from the different batches followed an identical trajectory denoted by a start-to-end arrow. Also, the NOC batches lay very close to one another and also to B1 and B12, but very far from others (B6 and B8). This separation between batches confirms that altering the composition of the gel modifies its properties.

As noted earlier, we analyzed laboratory samples in addition to production samples. Three-fourths of the laboratory samples were used to construct PLS1 calibration models and the remainder to assess their predictive ability. The samples to be used for each purpose were selected from the scores plot for a PCA conducted with all samples spanning the whole range of the variable Y and containing as much spectral variability as possible. The calibration set was expanded with production samples in order to incorporate variability in the manufacturing process into the models.

We constructed models to determine the concentrations of the major components of the gel. Figure 5 shows the NIR spectra for a process sample (nominal concentration), a placebo, water, the API, and ethanol. As can be seen, the spectra for the placebo and process sample were nearly identical. The low concentration of API and high absorptivity of the hydroalcoholic matrix (64:32 ethanol/water mixture) masked the contribution of the API; this entailed using the maximum absorption bands for the API (1600–1800 nm) to construct the model in order to avoid the influence of the matrix. The water, ethanol, and API contents were determined by using calibration models based on the PLS1 algorithm.

Table 1 shows the figures of merit for the three models. As can be seen, they used a small number of PLS factors and exhibited a very high predictive ability (prediction errors, as root mean square error of prediction (RMSEP), were all less than 0.7).

We also conducted two calibration models to determine the physical properties of the gel (viscosity and pH). Their figures of merit are shown in Table 2. Although these models required a greater number of factors than those for the chemical parameters, they also exhibited a very high predictive ability, with RMSEP of less than 0.4 for both viscosity and pH.

Multivariate Statistical Process Control

The data for each process were used to construct two multivariate statistical process control (MSPC) models for exploration purposes. One model was based

on the variables recorded during the process (viscosity, pH, neutralized fraction of acid, and reactor temperature), the other was constructed from NIR spectra, also recorded during the process. Both models used NOC (reference) batches only. This allowed us to compare changes in DoE batches with those in NOC batches. For easier interpretation, we used control charts of scores, residuals (Q -statistic, or DModX in SIMCA-P+), and Hotelling's T^2 (also known as D -statistic).^{35,36} The D -chart reflected the deviation of a new batch from the NOC batches in terms of the variance explained by the model, whereas the Q -chart reflected the variance not accounted for by the model. These two types of chart are thus complementary.

For easier interpretation of these control charts, we shall assume a batch L for comparison with the NOC batches. If L has high values for Hotelling's T^2 (D -statistic) and moderate values for the residuals (Q -statistic), then the variability contained in it will to some extent be explained by the NOC batches (i.e., the model will not account for the whole variability in L). However, if L lies far from the center of the model (i.e., it has a high Hotelling's T^2 value), then it will be subject to a high variability. A batch having a high Q -statistic (i.e., large residuals) can be assumed to contain some source of variability not present in the NOC batches. It is therefore highly useful to use both types of control charts simultaneously.

The first MSPC model constructed from process variables allowed the process to be explored with real, known variables. The model required only two PLS factors to explain 99% of the total variance, and its application confirmed that all DoE batches except B12 departed from the NOC batches. By way of example, Figures 6a and 6b show the residuals and scores control charts for batches B1, B3, and B12. Careful examination of the charts together with the contribution graphs reveals that the viscosity was the individual variable most strongly affected by the concentration changes in the gel components; any change in concentration above or below the NOC values reduced the fraction of variance explained by the model and caused the batch concerned to fall outside the limits of the residuals (Q -statistic) control chart, the departure increasing with increasing viscosity.

The second MSPC model was constructed from NIR spectra, using orthogonal signal correction, which proved the most suitable among the different spectral treatments studied. The model exhibited a single significant PLS factor that accounted for 90% of the total variance. As expected, its application to the DoE batches revealed that they all fell outside the bounds of the scores, D -statistic, and Q -statistic control charts. This was so even for B12, which, according to the MSPC model based on process variables, fell within such limits. By way of example, Figure 7 shows the scores control chart for the model as applied to B1;

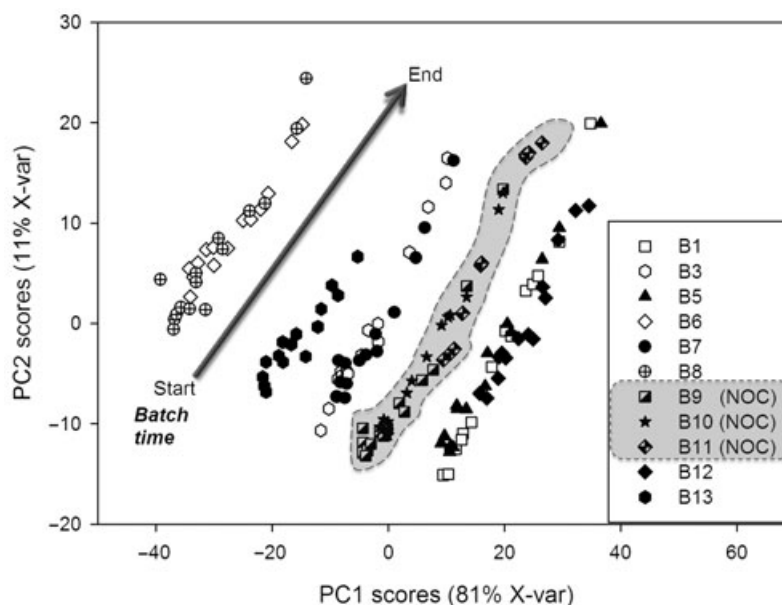


Figure 4. Scatter plots for DoE batches PC1 versus PC2 (B2 and B4 were excluded).

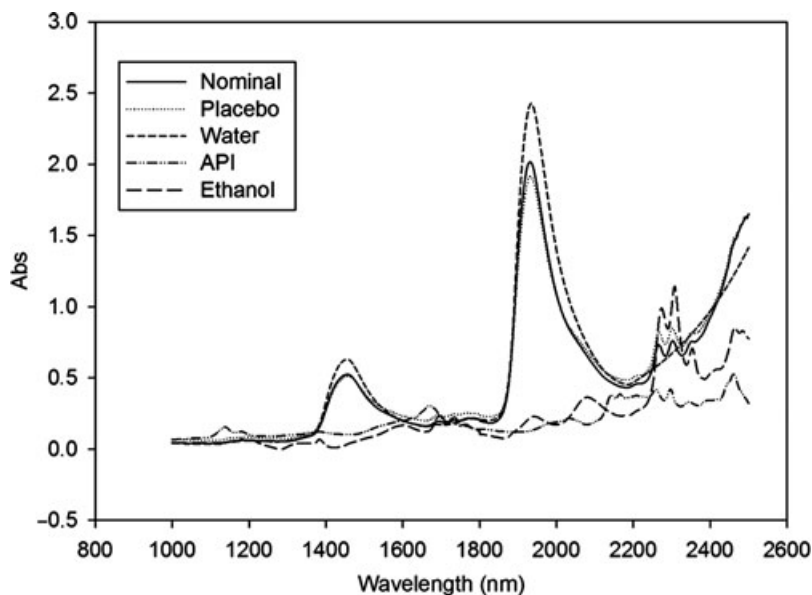


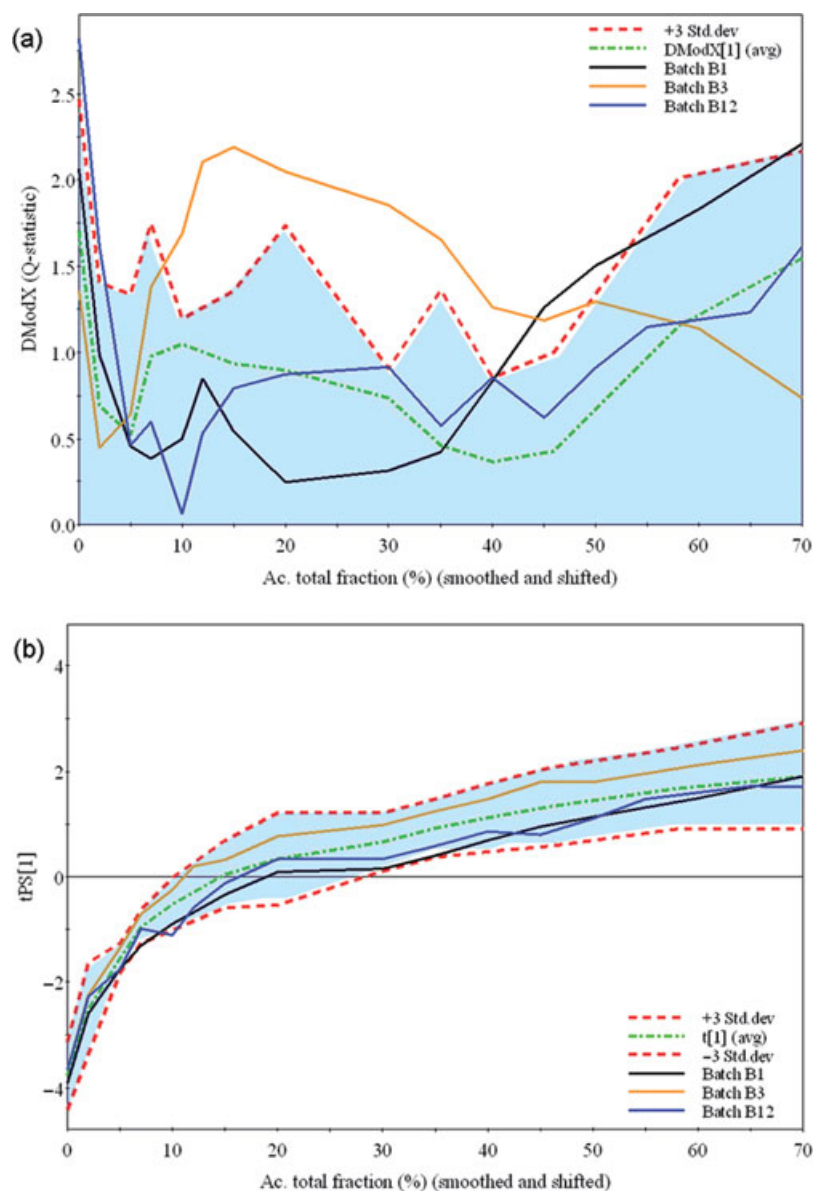
Figure 5. Near infrared spectra for a pharmaceutical gel sample (nominal), a placebo, water, the API, and ethanol.

Table 1. Figures of Merit of the Models for the Determination of Chemical Parameters

	Ethanol	Water	API
Spectral mode	First derivative	First derivative	First derivative
Spectral range (nm)	1832–2100	1300–1642 1801–2100	1600–1800
Number of PLS factors	2	2	3
NOC target concentration (%)	33.60	63.09	1.21
Calibration set			
Number of laboratory samples	9	8	15
Number of production samples	10	3	30
Concentration range (%)	24.7–41.9	55.2–72.6	1.0–1.4
Prediction set			
Number of laboratory samples	14	13	26
Concentration range (%)	28.1–38.4	58.9–69.2	1.1–1.2
RMSEP	0.636	0.649	0.027

Table 2. Figures of Merit of the Models for the Determination of Physical Parameters

	Viscosity	pH
Spectral mode	First derivative 29p + SNV	First derivative 29p + SNV
Spectral range (nm)	1000-1796 1984-2112	1100-1796 1861-2400
Number of PLS factors	5	5
Target value for a normal batch	3.0 (Pa s)	6.22
Calibration set		
Number of production samples	41	42
Calibration range	2.0–5.7 (Pa s)	4.5–6.5
R^2	0.98	0.99
Prediction set		
Number of production samples	34	34
Prediction range	2.2–4.0 (Pa s)	4.6–6.4
RMSEP	0.359	0.394

**Figure 6.** Control charts for (a) scores and (b) the Q -statistic for a MSPC model constructed from process outputs (viscosity, pH, total acid fraction, and temperature).

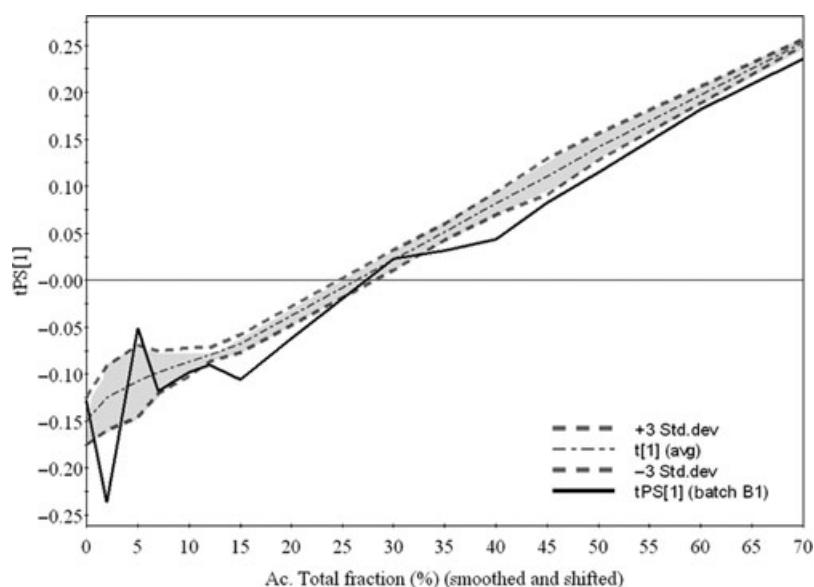


Figure 7. Control charts for the scores of a model constructed from NIR spectra.

as can be seen, the limits were very tight, which is suggestive of reproducibility in the process and of easy detection of outliers (out-of-control batches). However, this comparison allows one to identify any batches having very close trajectories (scores) and residuals despite their differences in concentration, which is important toward process understanding.

We should note that the previous models were constructed from the NOC batches available; hence, the tight acceptance limits in the control charts. However, this information is highly useful toward comprehensive monitoring with NOC batches and also toward constructing a model containing, virtually, the whole variability of the process, even though this requires using a substantial number of NOC batches.

At-line Monitoring of a Process

The above-described models were used to monitor physical and chemical parameters during a gelling process. To this end, NIR spectra for periodically withdrawn samples were recorded as described above. A residual t -test ($\alpha = 0.05$) was used to compare the NIR predictions with the reference values. Tables 3 and 4 list the figures of merit of the residual t -test on the NIR predictions of the chemical and physical parameters, respectively. As can be seen, the NIR predictions were not significantly different from the reference values ($t_{\text{crit}} > t_{\text{obs}}$). Predictions were accurate and errors were small (RMSEP was 0.48 for viscosity and 0.26 for pH), which shows that the NIR method is effective for at-line monitoring of pH and viscosity changes during the production of a pharmaceutical gel.

We also used the MSPC model constructed from NIR spectra to at-line monitor the process via scores, residuals, and so on. The results were very good and

Table 3. Statistics of Residuals of NIR Predictions for a Batch of Pharmaceutical Gel (Chemical Parameters)

Statistics of Residuals	Ethanol (%)	Water (%)	API (%)
Average	-0.17	0.04	-0.01
Standard deviation	0.32	0.31	0.06
$t_{\text{crit}} (\alpha = 0.05)$	2.14	2.14	2.14
$t_{\text{obs}} (\alpha = 0.05)$	2.12	0.51	0.43
Degrees of freedom	14	14	14
RMSEP	0.35	0.30	0.06

Table 4. Statistics of Residuals of NIR Predictions for a Batch of Pharmaceutical Gel (Physical Parameters)

Statistics of Residuals	Viscosity (Pa·s)	pH
Average	-0.12	0.11
Standard deviation	0.46	0.23
$t_{\text{crit}} (\alpha = 0.05)$	2.16	2.14
$t_{\text{obs}} (\alpha = 0.05)$	0.98	1.86
Degrees of freedom	13	14
RMSEP	0.48	0.26

the at-line monitored batch remained within the acceptance limits throughout the process. Therefore, the model can be easily adapted for the at-line monitoring of a gel manufacturing process. Figures 8a and 8b summarize the MSPC scores and residuals (Q -statistic) control charts for the monitored batch. As can be seen, the batch fell within the acceptance limits in both charts.

As shown above, the use of NIRS in combination with a variety of chemometric tools allows the reliable at-line monitoring of an entire pharmaceutical production process with a view of controlling the quality of production batches.

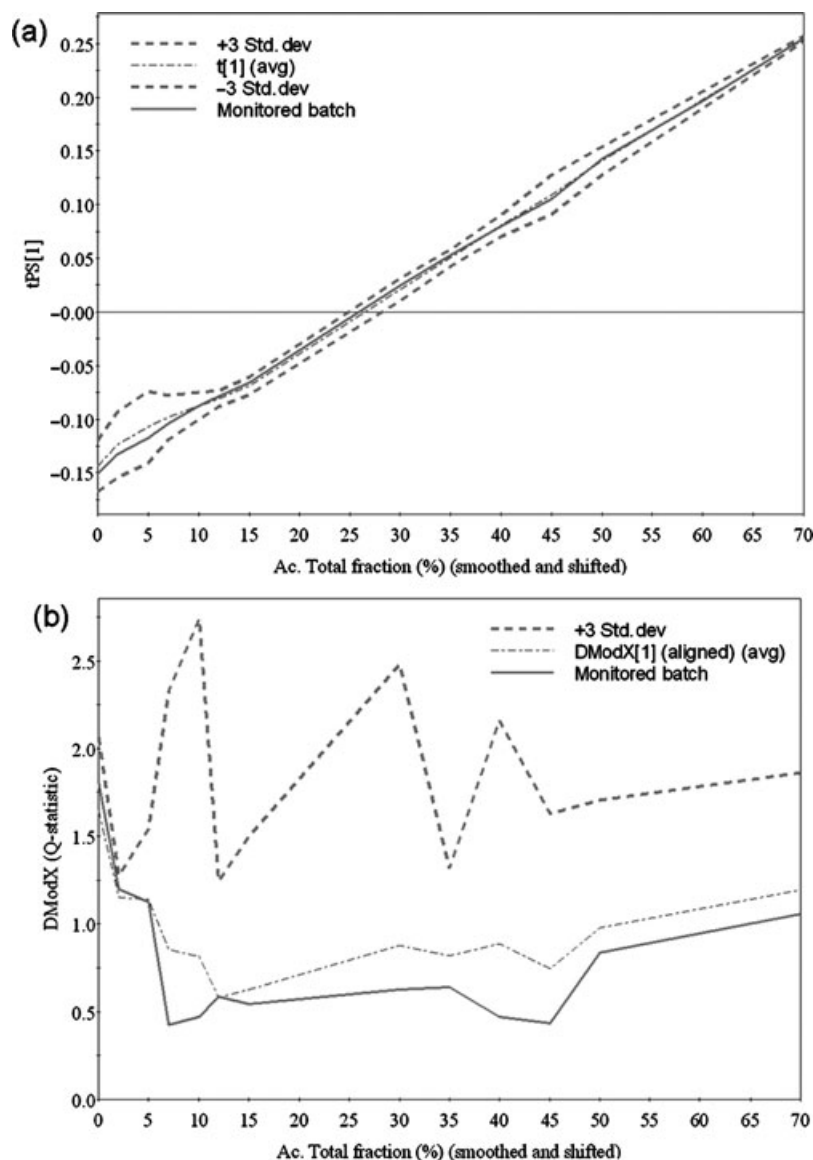


Figure 8. Monitoring of a process from NIR spectra. (a) Scores control chart and (b) Q control chart.

CONCLUSIONS

Using QbD and PAT principles in combination in this work allowed us to detect variability sources in a gel production process and identify the particular variables influencing the robustness of the process. As shown here, NIRS is an excellent analytical choice for the expeditious, convenient at-line monitoring of the production process for semisolid pharmaceutical products and it affords the determination of chemical (API and excipient concentrations) and physical parameters (viscosity and pH). Also, MSPC control charts provide a useful tool for identifying production batches departing from NOC batches. The ensuing errors are within the expected ranges for these pharmaceuticals. Finally, using real process samples in combination with laboratory samples allows one to

expand the variation range for the target parameters and identify the critical variables influencing the process, thereby facilitating interpretation of the results.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this research as part of Project CTQ2009-08312, and to Laboratorios Menarini (Badalona, Spain) for supporting the conduct of this work.

REFERENCES

1. Wu H, Khan MA. 2009. Quality-by-design (QbD): An integrated approach for evaluation of powder blending process kinetics and determination of powder blending end-point. *J Pharm Sci* 98:2784–2798.

2. Huang J, Kaul G, Cai C, Chatlapalli R, Hernandez-Abad P, Ghosh K, Nagi A. 2009. Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development. *Int J Pharm* 382:23–32.
3. Juran JM, Godfrey AB. 1999. Juran's quality handbook. 5th ed. McGraw-Hill, New York.
4. Verma S, Lan Y, Gokhale R, Burgess DJ. 2009. Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *Int J Pharm* 377:185–198.
5. Ordoñez A, Ordoñez R, Zampini I, Isla M. 2009. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal, and antioxidant properties. *Int J Pharm* 378:51–58.
6. Wu H, Tawakkul M, White M, Khan M. 2009. Quality-by-Design (QbD): An integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends. *Int J Pharm* 372:39–48.
7. Guidance for Industry, PAT-A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. Accessed November 1, 2006, at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/6419fn1.pdf>.
8. Blanco M, Alcalá M. 2010. Process analytical technology: Spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries; Bakeev K, Ed. John Wiley & Sons, pp 463–491, UK.
9. ICH. ICH-Topic Q8(R2): Pharmaceutical development. August 2009.
10. Ulmschneider M, Barth G, Trenka E. 2000. Building transferable cluster calibrations for the identification of different solid excipients with near-infrared spectroscopy. *Drugs* 43:71–73.
11. Blanco M, Romero MA. 2001. Near infrared libraries in the pharmaceutical industry: A solution for identity confirmation. *Analyst* 126:2212–2217.
12. Uhl VW, Gray JB. 1967. *Mixing: Theory and practice*. Academic Press, New York.
13. Schirmer RE. 1991. *Modern methods of pharmaceutical analysis*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
14. Drennen JK, Lodder RA. 1993. *Pharmaceutical applications of near infrared spectrometry*. Connecticut: JAI Press.
15. Zhou X, Hines P, Borer MW. 1998. Moisture determination in hygroscopic drug substances by near infrared spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 17:219–225.
16. Jones JA, Last IR, MacDonald BF, Prebble KA. 1993. Development and transferability of near infrared methods for determination of moisture in a freeze-dried injection products. *J Pharm Biomed Anal* 11:1227–1231.
17. Kamat MS, Lodder RA, DeLuca PP. 1989. Near-infrared spectroscopic determination of residual moisture in lyophilized sucrose through intact glass vials. *Pharm Res* 6:961–965.
18. Ciurczak E. 1987. Uses of near-infrared spectroscopy in pharmaceutical analysis. *Appl Spectrosc Rev* 23:147–163.
19. Ilari JL, Martens H, Isaksson T. 1988. Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance. *Appl Spectrosc* 42:722–728.
20. Morisseau KM, Rhodes CT. 1997. Near-infrared spectroscopy as a nondestructive alternative to conventional tablet hardness testing. *Pharm Res* 14:108–111.
21. Luner PE, Majuru S, Seyer JJ, Kemper MS. 2000. Quantifying crystalline form composition in binary powder mixtures using near-infrared reflectance spectroscopy. *Pharm Dev Technol* 5:231–246.
22. Blanco M, Valdes D, Bayod MS, Fernandez-Mari F, Llorente I. 2004. Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry. *Anal Chim Acta* 502:221–227.
23. Ciurczak EW. 2002. Growth of near-infrared spectroscopy in pharmaceutical and medical sciences. *Am Pharm Rev* 5:68–73.
24. Maesschalck RD, Sanchez FC, Massart DL, Doherty P, Hailey P. 1998. On-line monitoring of powder blending with near-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc* 52:725–731.
25. Blanco M, Romero MA. 2002. Near infrared transreflectance spectroscopy: Determination of dexketoprofen in a hydrogel. *J Pharm Biomed Anal* 30:467–472.
26. Kemper M, Magnuson E, Lowry S, McCarthy W, Aksornkoae N, Watts D, Johnson J, Shukla A. 2001. Use of FT-NIR transmission spectroscopy for the quantitative analysis of an active ingredient in a translucent pharmaceutical topical gel formulation. *AAPS J* 3:81–85.
27. Mackison R, Brinkworth SJ, Belchamber RM, Aries RE, Cutler DJ, Deeley C, Mould HM. 1992. A demonstration of truly remote in-line near-infrared process analysis. *Appl Spectrosc* 46:1020–1024.
28. Cavinato AG, Mayes DM, Ge Z, Callis JB. 1990. Non-invasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy. *Anal Chem* 62:1977–1982.
29. Bjørsvik HR. 1996. Reaction monitoring in explorative organic synthesis using fiber-optical NIR spectroscopy and principal component analysis. *Appl Spectrosc* 50:1541–1544.
30. Mouazen AM, De Baerdemaeker J, Ramon H. 2005. Towards development of on-line soil moisture content sensor using a fibre-type NIR spectrophotometer. *Soil Tillage Res* 80:171–183.
31. Nomikos P, MacGregor JF. 1995. Multivariate SPC charts for monitoring batch processes. *Technometrics* 37:41–59.
32. Nomikos P, MacGregor JF. 1995. Multi-way partial least squares in monitoring batch processes. *Chemom Intell Lab Syst* 30:97–108.
33. Kourti T. 2006. Process analytical technology beyond real-time analyzers: The role of multivariate analysis. *Crit Rev Anal Chem* 36:257–278.
34. Islam M, Rodríguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. 2004. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. *Pharm Res* 21:1192–1199.
35. Islam M, Rodríguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. 2004. Fourier transform infrared spectroscopy for the analysis of neutralizer–Carbomer and surfactant–Carbomer interactions in aqueous, hydroalcoholic, and anhydrous gel formulations. *AAPS J* 6:61–67.
36. Wold S, Kettaneh N, Fridén H, Holmberg A. 1998. Modelling and diagnostics of batch processes and analogous kinetic experiments. *Chemom Intell Lab Syst* 44:331–340.

ANEXO III

Real-time determination of critical
quality attributes using near-
infrared spectroscopy: a
contribution for Process Analytical
Technology (PAT)

Juan G. Rosas, Marcel Blanco, Josep M^a.
González and Manel Alcalá

Talanta **97** (2012) 163 – 170.



Real-time determination of critical quality attributes using near-infrared spectroscopy: A contribution for Process Analytical Technology (PAT)

Juan G. Rosas^a, Marcel Blanco^a, Josep M. González^b, Manel Alcalà^{a,*}

^a Grup de Quimiometria Aplicada, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain

^b Laboratoris Menarini, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2012

Received in revised form

29 March 2012

Accepted 4 April 2012

Available online 10 April 2012

Keywords:

Process Analytical Technology

Critical quality attribute

Partial least-squares regression

Near-infrared spectroscopy

ABSTRACT

Process Analytical Technology (PAT) is playing a central role in current regulations on pharmaceutical production processes. Proper understanding of all operations and variables connecting the raw materials to end products is one of the keys to ensuring quality of the products and continuous improvement in their production. Near infrared spectroscopy (NIRS) has been successfully used to develop faster and non-invasive quantitative methods for real-time predicting critical quality attributes (CQA) of pharmaceutical granulates (API content, pH, moisture, flowability, angle of repose and particle size). NIR spectra have been acquired from the bin blender after granulation process in a non-classified area without the need of sample withdrawal. The methodology used for data acquisition, calibration modelling and method application in this context is relatively inexpensive and can be easily implemented by most pharmaceutical laboratories. For this purpose, Partial Least-Squares (PLS) algorithm was used to calculate multivariate calibration models, that provided acceptable Root Mean Square Error of Predictions (RMSEP) values (RMSEP_{API} = 1.0 mg/g; RMSEP_{pH} = 0.1; RMSEP_{Moisture} = 0.1%; RMSEP_{Flowability} = 0.6 g/s; RMSEP_{Angle of repose} = 1.7° and RMSEP_{Particle size} = 2.5%) that allowed the application for routine analyses of production batches. The proposed method affords quality assessment of end products and the determination of important parameters with a view to understanding production processes used by the pharmaceutical industry. As shown here, the NIRS technique is a highly suitable tool for Process Analytical Technologies.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pharmaceutical production processes comprise a number of steps that involve a series of operations requiring validation and adherence to strict Standard Operating Procedures (SOPs). Quality Assurance, which encompasses the decisions leading to the successful completion of each step in a process, relies on off-line testing to assess the quality of a product at the end of each step, as well as that of the end product. This takes a long time that is further increased by the manufacturing cycle time. In addition, because this approach considers neither risk assessment nor risk management, it does not ensure the complete absence of quality

defects in the product. This problem was addressed by Process Analytical Technology (PAT) initiative of the United States Food and Drug Administration (US-FDA) [1] aimed at fostering the development of more technically and scientifically rigorous production processes by the pharmaceutical industry [2].

The PAT approach, which relies on scientific knowledge and risk analysis, affords the design and development of efficient, continuously controlled processes. In this way, it ensures a pre-set level of quality at the end of the manufacturing process. PAT can therefore be regarded as a joint venture of analytical chemical science and pharmaceutical technology [3–5].

Near infrared spectroscopy (NIRS) is one of the most flexible vibrational spectroscopic techniques for the analysis of pharmaceutical products and also one of the most useful tools for the industrial implementation of PAT on account of its affording at-line, in-line and on-line measurements by virtue of its ability to measure a number of physical and chemical properties of samples. Some of the better known uses of NIRS in the production of solid pharmaceutical forms include chemical raw material identification [6], blend uniformity assessment [7–10], granulation monitoring [11], roller compaction monitoring [12], drying end-point determination [13] and coating end-point and uniformity determinations [14].

Abbreviations: SOPs, Standard Operating Procedures; PAT, Process Analytical Technology; US-FDA, United States Food and Drug Administration; NIRS, near infrared spectroscopy; HPLC, high-performance liquid chromatography; ISO, International Organization for Standardization; CQA, critical quality attribute; API, active pharmaceutical ingredient; PLS, Partial Least Squares; PCA, Principal Component Analysis; SNV, Standard Normal Variate; RMSE, Root Mean Square Error; RMSEC/P, Root Mean Square Error of Calibration/Prediction; S_p , process spectrum

* Corresponding author. Tel./fax: +34 93 5814899.

E-mail address: manel.alcala@uab.cat (M. Alcalà).

Using NIRS in PAT projects has a number of advantages including its non-destructive nature and its ability to provide immediate results, which affords real-time analysis. Near infrared spectra are influenced by some physical properties of the samples, but the effects can be suppressed or minimised by using an appropriate spectral pretreatment; also, the results must be calibrated against a reference technique such as HPLC, but a recent method allows the easy construction of NIR calibration models for quantifying the API and excipients in a formulation without the need for a reference method [15].

In this work, we developed a method for the non-invasive determination of the critical quality attributes (CQAs) of a pharmaceutical granulate with a view to reducing its manufacturing time and obtaining a better knowledge of the influence of some variables of the production process. At present, the determination of CQAs for a granulate involves withdrawing a sample from the bin blender in an ISO 8 classified area and submitting it to the laboratory for chemical analysis. In addition to the need for an ISO 8 area and its staffing, this entails taking some health cautions, which delays the sampling process. Also, the conventional methodologies used for this purpose are time-consuming, which additionally delays the obtainment of quality information for timely decision-making (specifically, whether a given production batch should be released for the next step of the process, which is usually packaging).

This PAT methodology was used to determine the target CQAs (API content, pH and moisture content as primary attributes) from NIR spectra acquired in the bin blender after the granulation process in a non-classified area without the need of sample withdrawal. Also, it is intended to evaluate the determination of other physical variables, such as flow-related properties (flowability and angle of repose) and particle size-related parameters (< 125, 125–250 and > 250 μm fractions) that can eventually influence the quality of the end product.

2. Materials and methods

2.1. Pharmaceutical formulation

The formulation used was a solid form commercially available in 2 g bags and containing an amount of active pharmaceutical ingredient (API) of 50 mg per gram of product (5 wt%), sucrose as major excipient (90 wt%), citric acid as minor excipient (1.5 wt%), macrogol 400 (0.4 wt%), maltodextrin (0.8 wt%) and orange flavouring (2.1 wt%). The API (Nimesulide) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with analgesic and antithermal action.

2.2. Calibration samples used for PLS models

A total of eight multivariate calibration models were constructed by using the Partial Least-Squares Algorithm (PLS1) for the following CQAs: (1) API content; (2) pH; (3) moisture content; flow-related

properties (4) flowability and (5) angle of repose; and particle size (6) > 125 μm , (7) 125–250 μm and (8) > 250 μm .

The models used to determine the API and pH were constructed from the spectra of 55 powder mixtures of the formulation ingredients prepared in the laboratory by weighing on an analytical balance and mixed in a Turbula solid blender. The composition for the sample set was established by using a D-optimal design, modifying the concentrations of the five components of the formulation (API, sucrose, citric acid, maltodextrin and orange flavouring) in order to minimise correlation between concentrations. The concentration range used and the matrix of correlations between components in the mixtures are shown in Table 1. As can be seen, correlation was minimal except for the API and sucrose, the high concentrations of which (95% of the mixture in combination) precluded lowering the correlation level. Sample set was split in two subsets, for calibration and validation purposes.

The models for moisture, flow-related properties and particle-size related properties were constructed by using the spectra for samples from 12 different production batches.

For the moisture model, a subset of samples was dried in a laboratory-drying oven and another subset was wetted in a wet chamber by placing it next to a vessel with water in a closed enclosure in order to expand the calibration range with respect to the nominal value. Sufficient amount of sample to determine moisture by the reference method and recording the spectrum was extracted every hour to cover a suitable range of moisture.

The granulate samples used to construct the models for particle size and flow properties were sieved to retain three different size fractions which were mixed in appropriate proportions in order to expand the calibration range for flowability.

2.3. Calibration modelling with the S_p method

The API and pH calibration models were constructed by using the method proposed by Blanco and Peguero [15], except that data were obtained from SNV-processed rather than direct absorbance data. Briefly, the method involves calculating the process spectrum, S_p , which should contain the variability of the production process (Eq. 1). These changes during production process are reflected in the spectra as a spectral offset, scaling, etc. as a result of the granulation step. Consequently S_p spectrum could be different for different granulation behaviour:

$$S_p = S_t - S_{\text{tab.ref}} \quad (1)$$

where S_t is the spectrum for a production sample and $S_{\text{tab.ref}}$ the reference spectrum, corresponding to a powder laboratory mixture containing the API and excipients at their nominal concentrations (see Fig. 1).

2.4. Granulation

Granulation was done in a GLATT WSG300 fluid bed system (FBS) where the raw materials (API and excipient) were introduced

Table 1
Correlation coefficients between concentrations of the powder samples components.

Compounds	Correlation coefficients					Concentrations	
	API	Sucrose	Citric acid	Maltodextrin	Orange flavouring	Range (mg/g)	Nominal approx. (mg/g) ^a
API	1					34–66	50
Sucrose	–0.97	1				890–921	900
Citric acid	0.16	–0.24	1			12–18	15
Maltodextrin	–0.17	0.11	–0.14	1		5–9	7
Orange flavouring	–0.28	0.15	–0.42	–0.03	1	17–28	21

^a The missing 4 mg/g of macrogol to complete the 100% of formulation is added as solution during granulation process.

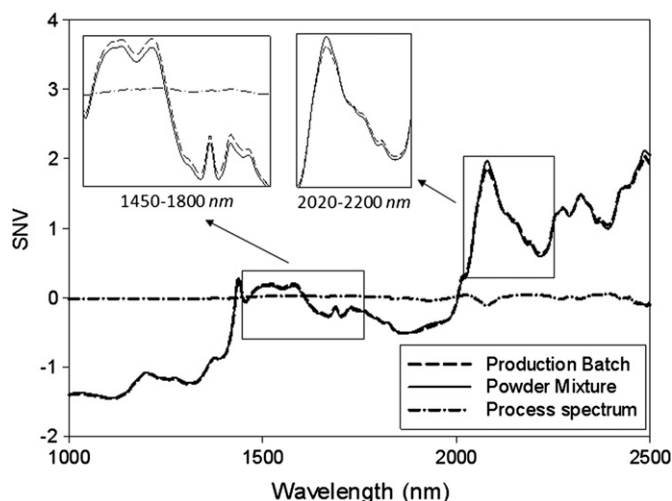


Fig. 1. SNV spectra for a laboratory powder mixture, a granule production sample (both containing the same concentration of each component) and a process spectrum.

by aspiration and an ascending flow or hot air continuously agitated the load in order to ensure uniform blending prior to granulation. After the binder solution (an aqueous solution of macrogol 400, sucrose and maltodextrin) was added and the granulate formed, the hot air flow was continued until the required moisture level was reached. The overall process time was about 255 min. The granulate was transferred to stainless steel bin blenders for mixing with an extra-granular excipient and the flavouring agent which was not added during granulation in order to avoid its loss through drying. Once the mixing process was finished, a sample was withdrawn to determine the API by HPLC and the result was used to ascertain whether the batch concerned was released for subjection to the next steps of the manufacturing process (dosage and packaging) or held in the bin blender for further agitation to complete uniformity. The analytical determination of the API can take several hours, which, in addition to withdrawing samples in a classified zone, considerably delays the manufacturing process.

2.5. Reference methods

All methods used to obtain the reference values were previously validated by Laboratorios Menarini and are routinely used by the control laboratory for the analysis of production batches. The API (Nimesulide) was quantified on an HPLC instrument from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) furnished with a Lichrospher 100 RP-18 column. The mobile phase was a 40:60 (v/v) mixture of 0.03 M acetic acid and methanol, and the spectral wavelength of 300 nm. pH measurements were directly made in 2% (w/v) solutions of the granulate, using a model 691 pH-meter from Metrohm AG (Herisau, Switzerland). Moisture contents were determined by using the loss-on-drying method on a LJ16 Moisture Analyzer Balance from Mettler Toledo Intnal., Inc. (Greifensee, Switzerland), each sample being heated at 90 °C to constant weight for 5 min.

Particle size was determined by sieving various granulate batches through a Prufsieb Jel 200 sieve shaker (Hosokawa, Augsburg, Germany) in order to obtain three particle fractions: > 125, 125–250 and > 250 μm .

Flowability and angle of repose were determined with a Powder Characterisation Instrument GmbH PTG-2 from Pharma Test AG (Munich, Germany).

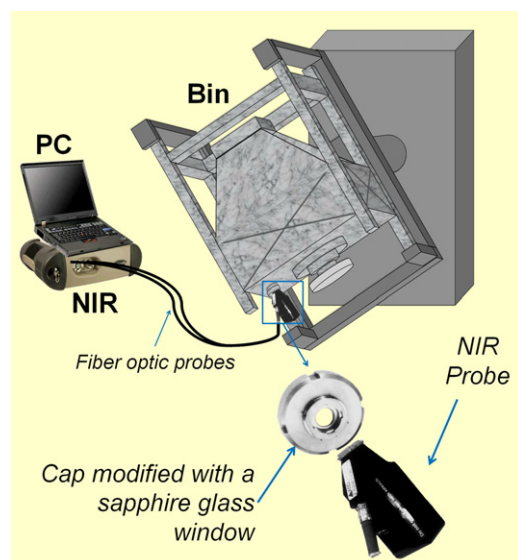


Fig. 2. Measuring schema for non-invasive NIR spectra recording in the bin.

2.6. Near infrared equipment

Near infrared spectra were recorded in the bin blender, using a Portable LabSpec Pro 2500 NIR spectrophotometer from ASD, Inc. (Boulder, CO, USA). Measurements were made in the reflectance mode, using a 3 mm thick sapphire window 2 cm in diameter that was inserted into a bin blender cap previously adapted for insertion of a probe that was connected to the spectrophotometer via a 3 m long optical fibre. The experimental set-up used is depicted in Fig. 2.

The spectra for the laboratory calibration samples were recorded by using an identical probe. An appropriate amount of sample was placed on the bin blender cap in such a way as to completely cover the sapphire window.

All NIR spectra were acquired with the aid of the software Indico Pro 5.2, also from ASD, Inc. Each spectrum was the average of 32 scans spanning the range 1000–2500 nm at 1 nm intervals.

2.7. Spectral processing

The spectral treatments used included Standard Normal Variate (SNV) transformation, first and second Savitzky–Golay derivatives with a moving window of 11–21 points, and combinations of SNV with derivatives and Principal Component Analysis (PCA). Models were constructed by full cross-validation and validated against an external data set. PLS models were developed with the software The Unscrambler v. 9.8, from CAMO (Trondheim, Norway). Unscrambler On-line v. 2.2, also from CAMO, was used to apply the ensuing models to the manufacturing process in order to predict physical and chemical CQAs. The quality of the models was assessed in terms of the Root Mean Square Error (RMSE):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{pred}} - y_i^{\text{ref}})^2}{n}} \quad (2)$$

where n is the number of samples, y^{ref} the reference value and y^{pred} the NIR predicted value.

3. Results and discussion

The sequence of steps during the granulation process studied, which involves six steps (steps 1 and 2 are not described here as they have been examined in another study), is illustrated in Fig. 3.

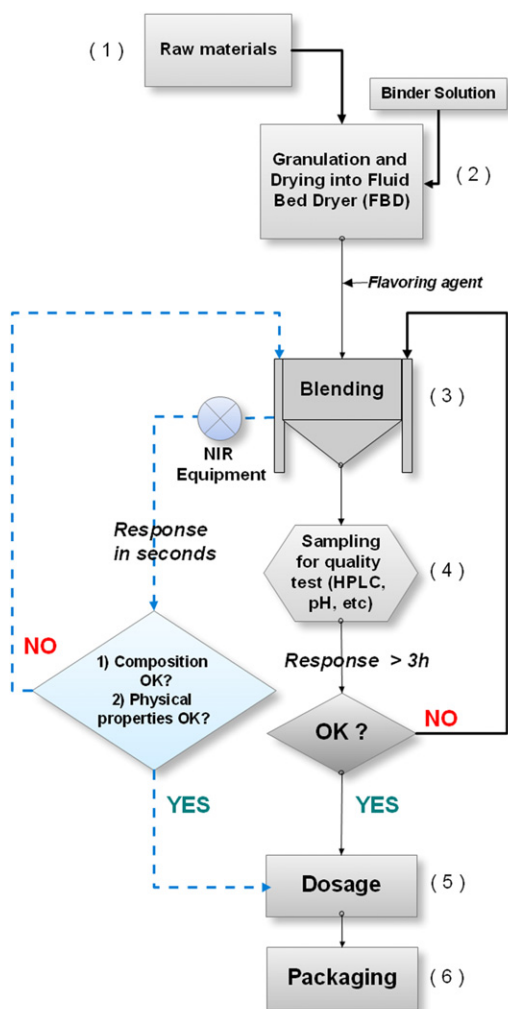


Fig. 3. Steps for current granulation manufacturing process and for the new NIR method implementation in routine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

As can be seen, the scheme shows the conventional (step 4) and proposed strategy (in dotted blue lines) for quality assessment of blending step, the most interesting step for our purposes, which can be substantially expedited by using the proposed strategy to real-time to ensure that the blend is uniform. In a routine process, the average time elapsed between sample collection (step 4) for analysis to delivery of the results is typically 6 h (in a quality control laboratory not exclusively dedicated) and depends on various external factors such as the availability of staff and an ISO 8 classified area for sampling, as well as the time during which batches are stocked unprocessed. Obtaining accurate analytical results in real-time in this step allows one to assure that the product is suitable for subjection to the following last steps of the process (dosage and packaging) or else be corrected as required prior to release (with extra blending time for example). The physical and chemical information provided by PLS models for this step of the process is much wealthier than that obtained with the conventional methodology and takes only a few seconds to acquire.

3.1. Development of the calibration model

The samples to be included in the calibration and validation sets for constructing our multivariate calibration models were selected by using a scatter plot for the first two scores of a PCA

[16] to ensure that the calibration samples would encompass the whole variability in the prediction samples; if the available samples failed to fulfil this condition, then the sample set had to be expanded with selected or properly prepared samples. Determining the API content and pH in the bin blender required constructing PLS models from the spectra for laboratory powder samples, which were combined with the process spectrum (S_p) to incorporate process variability in the calibration and prediction sets. For example, whether the sample set combined with S_p contained the process variability was assessed by PCA of the calibration set for the API and projecting the scores for the external validation samples. As can be seen from Fig. 4a, the first two principal components (PCs) explained 87% of the total variance. PC1 (60%) was associated to processes variability including the spectrum process (S_p), separating the samples into two clusters with similar S_p . PC2 and PC3 (27% and 7% respectively) were associated to changes in the concentration of the API. As can be seen in the example of Fig. 4a, the calibration samples encompassed the prediction samples, showing that the samples are suitable for constructing the PLS model to quantify API. Actually, these NIR methods will be used in the bin blender, consequently it is necessary to ensure that the calibration samples collect variability of production batches. For example, whether the sample set combined with S_p contained the process variability was assessed by PCA of the calibration set for the API and the scores were projected for the production batches. As can be seen from Fig. 4b, the first two principal components explained 87% of the total variance; also, the production samples were included in the set of laboratory samples combined with the process spectrum, which confirmed that the expanded calibration set encompassed the variability in the production samples and was hence appropriate for constructing the models. The narrow concentration range spanned by the production samples ($\pm 5\%$ around the nominal value) is consistent with their clustering in the middle of the graph; by contrast, the laboratory samples spanned a wider concentration range and their scores were more scattered along the PC2 axis.

Fig. 4c shows the first two PCA loadings of the calibration samples. If these loadings are compared with a production batch and API spectra (Fig. 4e) we can clearly see that the first loading shows characteristic bands of production batch spectrum, especially in the range 1400–1600 and 2000–2100 nm (characteristic bands of sucrose, see Fig. 4f). In Fig. 4c it can be observed that the second loading is related to API (Fig. 4e) mainly in the bands around 1500, 1650, 1900, 2100–2300 nm.

Table 2 shows the figures of merit of the PLS models for primary CQAs. The three models required three PLS factors each to explain 99% of the variance with virtually the entire wavelength range—the zone from 2300 to 2500 nm was excluded owing to the high noise in the derivative spectra. As an example, Fig. 4d shows the three loadings of PLS model for API which explained 99.4% of variance. As can be seen, the first two loading (86.8% and 12.1%) are closely related to the API, especially in the bands around 1150, from 1500 to 1700 and 2100–2300 nm (Fig. 4f). The third loading (0.5%) is related principally to sucrose, especially in the bands around 1300–1450 and 1900–2100 nm (Fig. 4f). With respect to the PLS model for pH, Fig. 5a shows the first two loadings explaining 95.5% of the variance. As can be seen, the first loading is closely related to the citric acid (Fig. 5b), especially in the bands 1420, 1650–1750, and 2025–2090 nm. The second loading seems to be related to certain bands of API (Fig. 5b), mainly around 1675, 1834, and 2150–2210 nm. It is important to clarify that calibration samples for pH contained principally variable amounts of citric acid, but as we have seen it is not the only component related to pH, since the API also contributes to pH changes, consequently pH depends on the

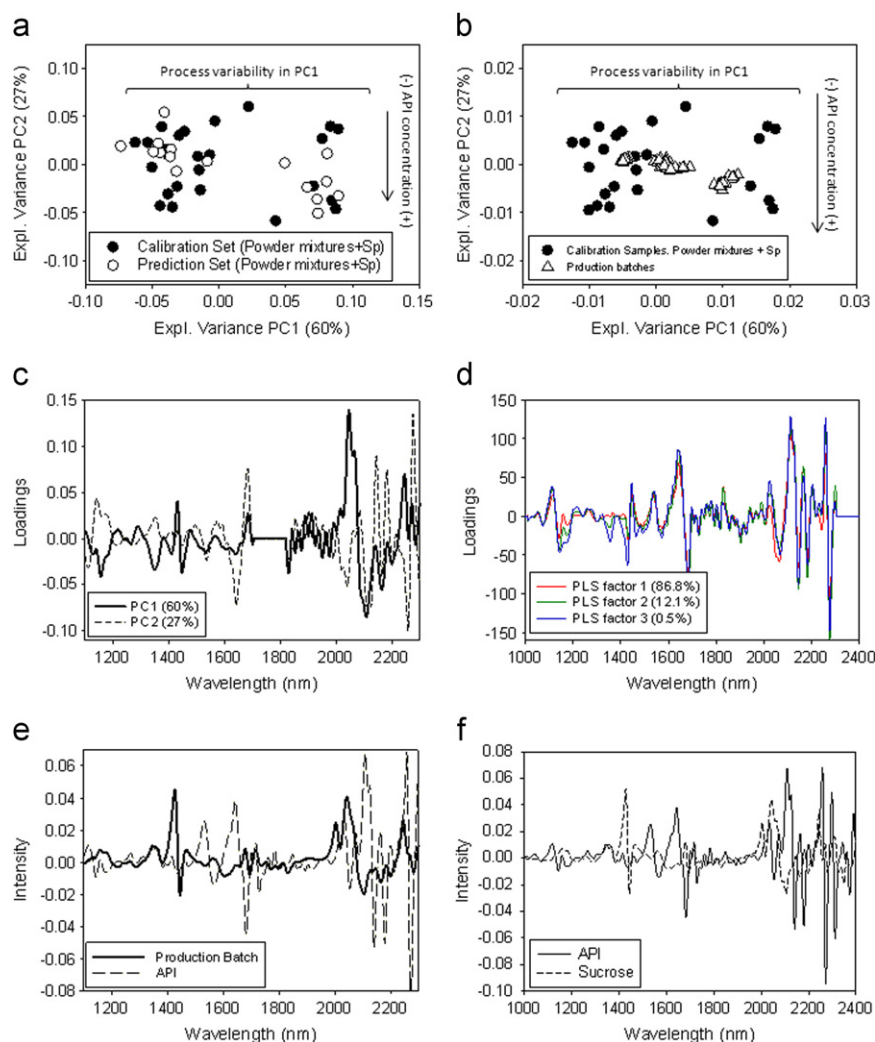


Fig. 4. Graphic details of multivariate analysis of samples set to develop NIR method to quantify API. (a) PCA: projection of validation samples in scatter plot of scores from PCA of calibration samples, (b) PCA: scatter plots of production samples and laboratory calibration samples (powder mixtures + spectrum process), (c) PCA: plot of first two loadings explaining 87% of variance. (d) PLS: three first loadings of PLS model for API, (e) PCA: production batch and API spectra, and (f) PLS: API and sucrose (major excipient) spectra. Spectral mode used in all case was SNV + 1st derivative in 1100–2300 nm range.

Table 2

Figures of merit of the PLS models constructed for primary CQAs.

Set	Characteristics	API (mg/g)	pH	Moisture (%)
Calibration Set	No. of samples	25	39	23
	Spectral pre-treatment	SNV + 1st derivative	SNV + 2nd derivative	1st derivative
	Wavelength range (nm)	1000–2300	1000–2260	1300–1500 1850–2050
	Calibration range ^a	34.1–66.2	2.9–3.3	0.10–1.21
	Nominal values (NOC) ^a	50.0 ± 2.5	3.0 ± 0.5	< 0.5
	Number of PLS factors	3	3	3
	Explained variance (Y) (%)	99.4	99.1	97.8
	Regression Y^{ref} vs. Y^{NIR}			
	Slope ± CI _{α=0.05}	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.07
	Offset ± CI _{α=0.05}	0.31 ± 1.72	0.03 ± 0.10	0.01 ± 0.03
RMSEC ^a	0.68	0.01	0.04	
Prediction set	Prediction range ^a	40.8–56.2	3.03–3.10	0.11–0.70
	No. of samples	19	12	9
	RMSEP ^a	1.0	0.1	0.1

NOC=Normal Operating Conditions.

CI=Confidence interval ($\alpha=0.05$).

RMSEC/P=Root Mean Square Error of Calibration/Prediction.

^a Results are expressed in their respective units.

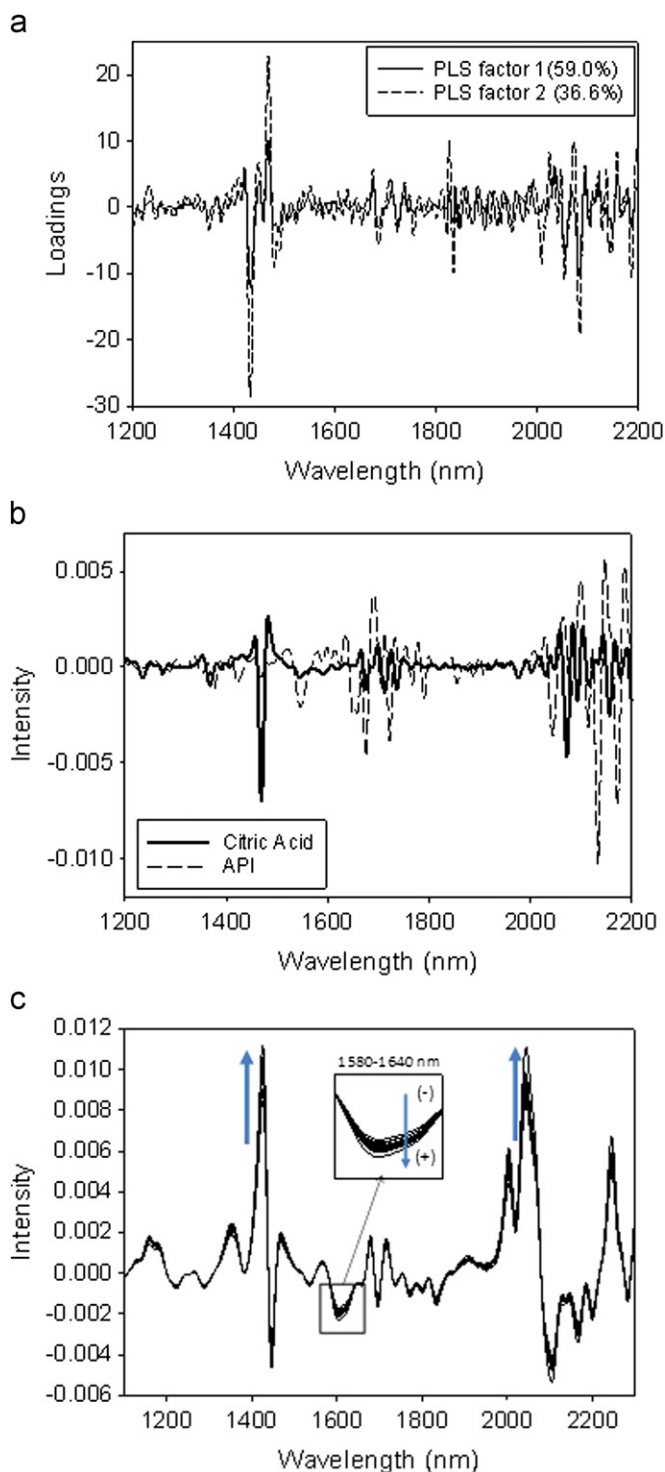


Fig. 5. Details of PLS models for pH and flowability. (a) Two first loadings of PLS model for pH, (b) SNV+2nd derivative spectra of citric acid and (c) 1st derivative spectra of calibration set used to construct PLS flowability model.

proportion of these two substances. The model for moisture spanned the wavelength regions containing the typical bands for water (see Table 2). All models were validated against an external set of prediction samples not used for calibration and all exhibited acceptable prediction errors.

Table 3 shows the figures of merit of the PLS models for secondary CQAs. These models required an increased number to explain 99% of the variance relative to those for primary CQAs. Because the determination of physical parameters by NIRS cannot

rely on a characteristic absorption band, the models spanned the whole wavelength range. Although they required the same number of PLS factors, the models for flowability and angle of repose provided smaller errors than those for particle size. As an example, Fig. 5c shows the spectra of the calibration set used to construct the PLS model for flowability, as can be seen there is a variation along the spectrum, however there are bands related to changes in flowability, especially around 1400, 1580–1640 and 2000 nm (by using Jack-knife criterion to evaluate significance of regression coefficients, we found two important regions at 1380–1613 and 1980–2071 nm). As can be seen, the bands of water are situated between these ranges, as a consequence we can affirm that the moisture content has an effect on the flowability and consequently on the angle of repose. Similar results were found by Otsuka [17] and Sarraguca et al. [18] in studies about physical properties by using NIRS. By the use of Jack-knife criterion, significant ranges for angle of repose PLS loadings were found at 1126–1445 and 1880–2332 nm. On the other hand, PLS loadings for particle size model (plot not shown) were similar to the mean calibration spectrum, because when particle size increases a positive baseline displacement is observed on the spectra.

The samples used to expand the flowability and particle size range were mixtures containing variable proportions of granulate in different particle sizes. These samples were used to determine the correlation coefficient between the two properties. As expected – both parameters are measures of the same property – flowability and the angle of repose were highly correlated ($R = -0.96$); also, both were highly correlated with the proportion of fine particles ($< 125 \mu\text{m}$, $R = -0.93$) (see Table 4).

The proposed NIR method to quantify API was validated for use in the routine analysis by using the model obtained. Validation was based on the guidelines of the International Conference on Harmonisation (ICH) [19] and included selectivity, linearity, accuracy and robustness.

The selectivity of an NIR method is established by the use of spectral libraries, which allow the accurate identification of the pharmaceutical preparation as a combination of API and excipients. The identification criterion used was the correlation coefficient (CorrCoef), with a threshold of 0.98. Spectral pre-treatment used was second-derivative mode over the wavelength range of 1100–2200 nm. All production batches were positively identified ($\text{CorrCoef} > 0.98$) and every pure component in the formulation was accurately discriminated at an identification level above the threshold ($\text{CorrCoef} < 0.98$). Table 5 shows the identification values.

The application of proposed method was found to meet all the requirements in the validation guideline, which confirms its suitability for use as a routine analytical method in the pharmaceutical industry. Table 5 shows the most salient results for the validation procedure of the application of NIR method for API in the pharmaceutical process. The application in routine for the rest of the NIR methods (pH, moisture, flowability, angle of repose and particle sizes) is in the process of validation. This procedure took some time because it is necessary to sieve the samples from different batches and then analyse the fractions using the reference. However, the robustness values of all NIR methods were evaluated in several production batches such as described below.

3.2. Validation of robustness for proposed methods. Non-invasive determination of CQAs in the bin blender

The robustness for above-described PLS models were validated by using them to determine the CQAs for fifty industrial batches and assess their robustness in routine analyses. To this end, a total of six NIR spectra per batch were recorded as described in Section 2.6 and averaged. The results thus obtained were compared with

Table 3
Figures of merit of the PLS models constructed for secondary CQAs.

Set	Characteristics	Flow properties		Particle size parameters		
		Flowability (g/s)	Angle of repose (deg.)	< 125 μm (%)	125–250 μm (%)	> 250 μm (%)
Calibration set	No. of samples	17	15	10	9	9
	Spectral pre-treatment	1st Derivative	SNV+1st derivative	1st Derivative	SNV	SNV
	Wavelength range (nm)	1100–2330	1000–2400	1000–2500	1000–2400	1000–2400
	Calibration range ^a	4.4–9.3	30.3–36.3	16.6–25.0	35.5–43.5	37.1–48.0
	Number of PLS factors	5	6	5	5	6
	Explained variance (Y) (%)	97.9	99.6	99.9	99.4	99.3
	Regression Y^{ref} vs. Y^{NIR}					
	Slope \pm CI _{$\alpha=0.05$}	0.98 \pm 0.08	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.02	0.99 \pm 0.07	0.99 \pm 0.07
	Offset \pm CI _{$\alpha=0.05$}	0.15 \pm 0.56	0.14 \pm 1.28	0.01 \pm 0.31	0.22 \pm 2.60	0.26 \pm 2.99
	RMSEC ^a	0.18	0.11	0.04	0.18	0.24
Prediction set	No. of samples	23	29	4	6	5
	Prediction range ^a	5.9–7.4	30.8–35.1	18.4–19.7	37.9–42.0	40.9–46.0
	RMSEP ^a	0.6	1.7	2.5	2.4	2.5

CI=Confidence interval ($\alpha=0.05$).

RMSEC/P=Root Mean Square Error of Calibration/Prediction.

^a Results are expressed in their respective units.**Table 4**
Correlation coefficients of the physical parameters.

	< 125 μm	125–250 μm	> 250 μm	Flowability (g/s)	Angle of repose (deg.)
< 125 μm	1				
125–250 μm	–0.50	1			
> 250 μm	–0.50	–0.50	1		
Flowability (g/s)	–0.93	0.56	0.37	1	
Angle of repose (deg.)	0.95	–0.59	–0.36	–0.96	1

Table 5
Validation parameters for the API quantitation in pharmaceutical process by using the proposed NIR method.

	Compound	Coefficient correlation
Selectivity	Production batch	0.998
	Powder sucrose	0.978
	Crystal sucrose	0.955
	Maltodextrin	0.239
	Orange aroma	0.200
	Citric acid	0.064
	Nimesulide	–0.061
Threshold 0.98 (positive identification: id results > 0.98)		
	Parameter	Result
Linearity	n	9
	Concentration range (mg/g)	36.3–60.7
	Intercept	2.23 \pm 2.32
	Slope	0.96 \pm 0.05
	R	0.991
Accuracy	n	9
	Average difference (mg/g)	0.55
	S.D.	1.42
	t_{exp}	1.17
	t_{crit}	1.17
Repeatability	Replicates	2.31
	Mean NIR (mg/g)	
	CV (%)	6
Robustness	n	50
	t_{exp}	1.50
	t_{crit}	2.01

the reference values provided by the routine analytical method applied to each batch, using a paired t -test at the 95% confidence level. As can be seen from Table 6, there were no statistical

Table 6
Non-invasive NIR method robustness for critical quality attributes (CQAs).

	Parameter	REF _{Mean}	NIR _{Mean}	RES _{Mean}	RMSEP	t_{obs}
Primary CQAs	API (mg/g)	49.83	50.44	0.61	1.34	1.50
	pH	3.09	3.08	–0.01	0.03	0.60
	Moisture (%)	0.21	0.24	0.03	0.05	1.70
Secondary CQAs	Flowability (g/s)	6.78	6.82	0.04	0.57	0.31
	Angle of repose (deg.)	33.36	33.04	–0.32	0.94	0.99
	< 125 μm (%)	19.18	19.85	0.67	1.46	1.70
	125–250 μm (%)	38.51	38.39	–0.12	1.22	0.27
	> 250 μm (%)	42.32	41.84	–0.48	1.39	1.00

$t_{crit}=2.01$ ($\alpha=0.05$ and 49 degrees of freedom). t_{obs} lesser than t_{crit} indicates two means are not statistically different.

REF_{Mean} refers to mean of the reference values and NIR_{Mean} refers to mean of the predicted values by NIR model for 50 production batches.

RES_{Mean} refers to mean of the residuals values and RMSEP refers to the root mean square error of prediction.

differences between the mean NIR predicted values and the reference values ($t_{obs} < t_{crit}$). This confirms that the models provided accurate results from non-invasive measurements made in the bin blender.

These results warrant using PLS models in routine analyses with a view to assessing their long-term robustness by application to an increased number of batches. The most salient feature of this new NIR methodology is that it affords the quantitation of a greater number of both physical and chemical properties in a product from a single NIR spectrum, thereby enabling routine determinations which were formerly done on an individual, anecdotal basis.

4. Conclusions

The proposed experimental design, which requires no alteration of the operational procedure, allows the non-invasive and real-time determination of critical quality attributes (CQAs) for pharmaceutical granulates. Our methodology provides a deeper knowledge of the product as it allows the whole physico-chemical information it contains to be extracted in real time (a few seconds) and with no added effort. The information thus obtained can be used to expedite decisions, which formerly required hours, even in the absence of a comprehensive knowledge of the applicable quality specifications. The proposed approach facilitates quantitative assessment of granulation and blending uniformity. Also, the eight PLS models used allow the most salient properties of the granulate to be determined in real time with measurement in a non-classified area. The operational simplicity of method makes it suitable to be executed by non-specialists (i.e., an operator of production). Consequently, NIR spectroscopy is a useful tool for Process Analytical Technology (PAT).

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this work as part of Project CTQ2009-08312 and to Laboratorios Menarini (Badalona, Spain) for additional support.

References

- [1] United States Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, FDA, <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>>, 2004.
- [2] S. Doherty, C. Kettler, in: K.A. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Lackwell Publishing, United Kingdom, 2005, pp. 329–358.
- [3] M. Blanco, M. Alcalá, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353–359.
- [4] A. Heinz, M. Savolainen, T. Rades, C. Strachan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 32 (2007) 182–192.
- [5] Y. Sulub, R. LoBrutto, R. Vivilecchia, B.Wa Wabuyele, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 143–150.
- [6] M. Blanco, M. Romero, *Analyst* 126 (2001) 2212–2217.
- [7] A. El-Hagrasy, H. Morris, F. D'Amico, R. Lodder, J. Drennen, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298–1307.
- [8] S. Sekulic, H. Ward, D. Brannegan, E. Stanley, C. Evans, S. Scivolino, P. Hailey, P. Aldridge, *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.
- [9] H. Wu, M. Tawakkul, M. White, M. Khan., *Int. J. Pharm.* 372 (2009) 39–48.
- [10] H. Wu, M. Khan, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2784–2798.
- [11] A. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A. Juppo, J. Yliruusi, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2232–2243.
- [12] A. Gupta, G. Peck, R. Miller, K. Morris, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1047–1053.
- [13] G. Reich, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 1109–1143.
- [14] J. Pérez-Ramos, W. Findlay, G. Peck, K. Morris, *AAPS PharmSciTech* 6 (2005) 127–136.
- [15] M. Blanco, A. Peguero, *TrAC—Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1127–1136.
- [16] M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 1236–1245.
- [17] M. Otsuka, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 82 (2006) 109–114.
- [18] M. Sarraguca, A. Cruz, S. Soares, Helena R. Amaral, P. Costa, J. Lopes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 484–492.
- [19] ICH Guidelines: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>, 1996.

ANEXO IV

Assessment of chemometric
methods for non-invasive solid
blending monitoring by using
wireless NIR spectroscopy

Juan G. Rosas, Marcel Blanco, Fernando
Santamaria and Manel Alcalá

Journal of Near-Infrared Spectroscopy (Enviado)

1 **Assessment of chemometric methods for the non-invasive**
2 **monitoring of solid blending processes using wireless NIR**
3 **spectroscopy**

4
5 Juan G. Rosas,¹ Marcel Blanco,¹ Fernando Santamaría² and Manel Alcalá^{1*}

6 ¹ Grupo de Quimiometría Aplicada, Departament de Química, Unitat de Química Analítica,
7 Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

8 ² Esteve, c/ Sant Martí s/n, 08197 Martorelles, Barcelona, Spain

9 * corresponding author: manel.alcala@uab.cat

10 **ABSTRACT**

11 The US Food and Drug Administration's Process Analytical Technology (PAT) initiative has
12 encouraged the pharmaceutical industry to strengthen research with a view to developing new
13 analytical technologies for improving blending processes. Near infrared spectroscopy (NIRS),
14 which is sensitive to both physical and chemical attributes of substances, has proved a powerful
15 non-invasive analytical technique for this purpose. In this paper, we propose a criterion to
16 assess blending uniformity and accurately detect the end-point of a blending process. The
17 criterion was established by using Partial Least-Squares Regression (PLS) and calibration-free
18 methods including Moving Block Standard Deviation (MBSD) of spectra, Principal Component
19 Scores Distance Analysis (PC-SDA) and the mixing index (M). The mixing index was found to
20 provide accurate, robust results with a view to assessing blending uniformity, as was PLS for
21 detecting blending end-points. In fact, the M index method is a highly suitable tool for PAT

22 which allows the accurate, precise real-time monitoring of blending processes with minimal
23 intervention of the analyst.

24

25 **Keywords:** NIR spectroscopy, PLS, uniformity, blending, mixing index, blending end-point,
26 MBSD, PC-SDA, PAT.

27 1. INTRODUCTION

28 The blending process is an extensively studied unit operation by virtue of its great significance
29 to the manufacturing of solid pharmaceuticals; in fact, proper blending ensures that the end
30 product will have a uniform content in the active pharmaceutical ingredient (API). Blending
31 uniformity is usually assessed by withdrawing samples at different points in the blender for
32 analysis with validated analytical methods. Many of these methods are destructive and time-
33 consuming, and use solvents; also, they can introduce contamination in the product at the time
34 samples are withdrawn for analysis.

35 A number of mixing indices have been reported over the last fifty years. Most apply to
36 binary mixtures only and rely on statistical analysis (usually the standard deviation or variance
37 in composition between samples from the mixture).^{1,2} The *M* index allows progress in a
38 blending process to be assessed in terms of simple, widely studied criteria.

39 Near infrared spectroscopy (NIRS) is a powerful non-invasive analytical technique by
40 virtue of its sensitivity to physical and chemical attributes of the sample, and of its easy
41 interfacing to the process.³ This technique has been used by the pharmaceutical industry to
42 examine and monitor blending processes since the 1990s. Some authors have assessed blending
43 uniformity from the NIR spectra for samples withdrawn during the process.^{4,5} This procedure is
44 destructive and samples cannot be returned to the blender for obvious sanitary reasons. Other
45 authors stop the blending process to record spectra *in situ*;⁴⁻⁷ this involves inserting a NIR
46 probe into the product, which sometimes requires altering the geometry of the blender. The
47 issuance of PAT guidelines for industrial implementation^{8,9} has boosted the use of technologies
48 affording the real-time extraction of information from pharmaceutical processes. Table 1 lists
49 selected studies on the monitoring of pharmaceutical blending processes via NIR spectra

50 recorded with invasive¹⁰⁻¹² or non-invasive methods.^{13,14} Some instruments use contact probes
51 furnished with optical fibres of variable length. However, their use in routine applications is
52 subject to some constraints such as the need to alter blenders in order to facilitate insertion of
53 the probe and to stop the process to record spectra, the lack of space to install NIR equipment
54 and computers in the vicinity of industrial reactors and increased spectral noise resulting from
55 the long optical fibres required. Wireless NIR technologies based on microelectromechanical
56 systems (MEMS) have recently enabled the use of conventional NIR equipment in industrial
57 processes. Wireless systems are powered by long-life battery, which enables application to
58 dynamic processes; also, they have a small footprint and are lightweight, so they can be easily
59 attached to blenders to record NIR spectra in a non-invasive manner and without stopping the
60 blender. These systems, however, have been the subject of little study.¹⁵⁻¹⁹

61 Table 1 lists the chemometric methods used to assess blending uniformity with both
62 conventional and wireless NIR equipment. As can be seen, data were processed with qualitative
63 (calibration-free) or quantitative (calibration) methods, or both. The calibration-free methods
64 calculate the variance between continuous spectra recorded throughout a blending process. The
65 blending process is usually monitored via statistics such as the standard deviation, variance or
66 Hotelling's T^2 .^{5-7,10,12,13,15,17,18} The greatest advantages of these methods are that they require no
67 calibration set and that they use easily calculated statistics. However, the information they
68 provide is not directly related to the analyte concentration. In fact, the calibration methods
69 entail constructing a calibration model to predict API and/or excipient concentrations, which is
70 a difficult task. Partial Least-Squares (PLS) regression is no doubt the most widely used
71 quantitative method for this purpose,^{11-14, 16, 19} but not the only choice.^{5,13,18,20} Its greatest
72 disadvantage is the need for a calibration set consisting of laboratory samples and also for a

73 reference method—in addition to recalibration to incorporate variability in the process in some
74 cases. The spectral data delivered by wireless NIR equipment are most often processed with
75 methods based on the Moving Block Standard Deviation (MBSD),^{15,17} Hotelling's T^2 ,^{15,16} PLS
76 regression^{16,19} or univariate regression.¹⁸ However, only those based on Hotelling's T^2 allow the
77 blending end-point (BEP) to be determined in terms of accurate statistics. The others determine
78 BEP empirically by identifying the point where the monitored variable becomes constant near a
79 reference value (*e.g.* 0 for MBSD and 100% API potency for PLS regression).

80 The primary aim of this work was to develop a simple, scientific criterion for the real-
81 time, non-invasive determination of the end-point of a blending process (BEP). To this end, we
82 used PLS, MBSD and PC-SDA procedures employed in previous work and compared the
83 results with those provided by a new parameter: the mixing index (M). This parameter was
84 previously used to assess spatial homogeneity in hyperspectral images,²¹ but never in
85 pharmaceutical blending processes or determining BEP.

86

87 **2. MATERIAL AND METHODS**

88 **2.1. Materials**

89 The formulation studied was a ternary mixture consisting mainly of two pellets A and B which
90 jointly accounted for 99.7 %w/w of the product, the remaining 0.3% corresponding to the
91 antitacking excipient. This research is under a non-disclosure agreement which prevents us
92 from stating the names of the API and its excipients. Both pellets are gastroresistant and differ
93 in release profile after the acid stage; thus A is fast-release form and B a slow-release one. They
94 comprise an inert core, a layer containing the API, one or more intervening layers and an outer
95 enteric coating layer. The mean particle size, d_{50} , of both pellets is 1.1–1.2 mm, and that of the

96 antitacking excipient, which is used to facilitate blending and avoid aggregation of the pellets,
97 about 10 μm .

98

99 **2.2. Preparation of laboratory calibration samples**

100 A total of 11 laboratory samples were prepared by accurately weighing preset amounts of both
101 types of pellets spanning a range of proportions from 0 to 100 %w/w that were blended by
102 stirring in a plastic container. The concentration interval between samples was about 10 units.
103 The reference values for these samples were obtained by weighing of each pellet type. The total
104 weight of each sample was about 5g. The whole sample amount was transferred to a quartz cell
105 to record their static NIR spectra.

106

107 **2.3. Industrial blending processes and near infrared equipment**

108 A PM400 blender from L.B. Bohle (Ennigerloh, Germany) with a 150 l volume bin was used to
109 prepare an amount of 90 kg of blend in each batch. A total of 6 blends with varying pellet A to
110 pellet B ratio were thus obtained at a blending speed of 6 rpm. The bin lid was modified with a
111 flange that was welded to fit a sapphire window for connection to the NIR equipment (Figure
112 1a).

113 Spectra were acquired by using an Antaris Target Series Blend Analyser from Thermo
114 Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The spectrometer is a microelectromechanical system
115 (MEMS)-based NIR analyser spanning a narrow spectral range ($7400\text{--}5550\text{ cm}^{-1}$) and equipped
116 with a semiconductor-based NIR tunable laser source, a high-resolution (4 cm^{-1}) Fabry–Perot
117 tunable filter for wavelength selection and a single-element InGaAs photodiode detector. The
118 greatest assets of this equipment are that it is wireless (*i.e.* it needs no wires for interfacing to a
119 computer), it does not use fibre optics (the detector is built-in) and is powered by a long-life

120 battery that enables recording of spectra throughout a dynamic blending process. In addition,
121 the equipment uses an MEMS-based accelerometer board to determine the blender position and
122 hence start data acquisition. Data are acquired when the material in the blender is against the
123 window at the bottom part of the blender rotating mechanism. Each spectrum is referenced to an
124 internal standard to maximize wavelength and absorbance reproducibility. A trigger angle of –
125 150 to 210° proved optimal for all real-time acquisition of blending data. The spot size used, 40
126 mm, corresponded to *ca.* 600 mg of sample mass. The set-up for non-invasive acquisition of
127 reflectance spectra from the blender is depicted in Figure 1a.

128 The sequence of addition to the blender was A pellets, followed by B pellets and the
129 antitacking excipient. The samples contained three different concentrations of A and two
130 batches of each concentration were prepared (a total of six) (Table 2).

131

132 **2.4. Analysis of samples**

133 Samples withdrawn at variables intervals during the blending process were used to expand the
134 calibration set and construct a validation set (Table 2). A total of 10 aliquots were withdrawn at
135 different points inside the blender, each being analysed separately for its content in A pellets.
136 Because only these pellets contain magnesium, their proportion in each sample was directly
137 related to their Mg content, which was determined by complexometric titration with EDTA at
138 pH 10.

139

140 **2.5. Acquisition of NIR spectra and processing of data**

141 All spectra were acquired by using the software RESULTTM from Thermo Fisher Scientific
142 (Waltham, MA, USA). The software allows spectra to be recorded in two modes: static and
143 dynamic. Static spectra were recorded by turning the NIR equipment upside down and placing

144 each sample in a quartz cell for measurement, the cell in turn being placed on the equipment
145 window and covered with a black lid to protect it from external light (Figure 1b). This recording
146 procedure was used with both the laboratory samples and those withdrawn from the blender
147 (process samples). Each sample was measured in quadruplicate, with shaking of the cell
148 between recordings.

149 Dynamic spectra were obtained with the blender in motion (Figure 1a). The NIR
150 equipment recorded four scans with the equipment upside down and the sample on the sapphire
151 window of the bin lid. Approximately 2 seconds were needed for spectra acquisition and
152 integration. The average of the four measurements was assigned to each rotation. A total of six
153 NIR spectra per minute of blending were obtained at the selected rotation speed. The spectral
154 data thus obtained were transferred by the spectrometer to a laptop computer via a wireless
155 interface.

156

157 **2.6. Spectral treatment and construction of a multivariate PLS model**

158 Spectral data were processed with the chemometric software Unscrambler v. 9.8 from Camo
159 Process AS (Oslo, Norway). The spectral treatments used included the second Norris derivative
160 with a 9-point moving window, the standard normal variate (SNV) and a combination of both.

161 For easier visual inspection, the spectra were subjected to principal component analysis
162 (PCA). The multivariate model was constructed by using the partial least squares (PLS1)
163 algorithm. The full cross-validation method was used and the PRESS (predicted residual sum of
164 squares) criterion allowed the most suitable number of PLS factors to be selected. Quality and
165 predictive ability were checked in terms of the root mean square error (RMSE). The quality of
166 the predictions of the NIR method in relation to the reference method was assessed via the
167 relative standard error of prediction (RSEP).

168

169 **2.7. Calibration-free methods**

170 The Moving Block of Standard Deviation (MBSD) method is the most widely used to assess
171 blending uniformity.^{6,7,10,12,13,15,18} This method involves gradually moving a window of n
172 consecutive spectra throughout the blending process. The method calculates the mean standard
173 deviation (MeanSD) between the spectra in the window. The temporal variation of MeanSD
174 provides a measure of blending uniformity during the process. In this work, we used custom m-
175 files developed in MATLAB 7.1 (The Matworks, Beltsville, MD, USA) to calculate MeanSD.

176 The PC Scores Distance Analysis (PC-SDA) method¹⁷ involves constructing a PCA
177 model from spectral data and calculating their Hotelling's T^2 value at the 95% level. Our PCA
178 model was constructed from the spectra exhibiting the smallest standard deviation in the
179 Euclidean distance between scores. A comprehensive description of the method can be found
180 elsewhere.¹⁷ The model was constructed with the aid of the software SIMCA-P+ v. 11.5 from
181 Umetrics (Umea, Sweden) and Euclidean distances by using custom MATLAB m-files.

182 Unlike MBSD and PC-SDA calculations, the mixing index, M , was obtained by using a
183 “fixed” window that was moved across the body of spectra (the first three spectra were
184 followed by the fourth and sixth, and so on). The variance between consecutive spectra was
185 calculated by using eqs (1) and (2) as implemented in MATLAB:

186

$$187 \quad \text{Var}\eta = \frac{\sum_{j=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_i)^2}{n - 1} \quad (1)$$

188

$$189 \quad \text{Var} = \frac{\sum_{i=1}^m \text{Var}\eta}{m} \quad (2)$$

190 where A_{ij} is the absorbance at wavelength i in spectrum j and \bar{A}_i the mean absorbance for the n
191 spectra recorded at the same wavelength. Equation (1) provides a variance vector Var_i from
192 which the mean variance, Var , is calculated. Miles *et al.*^{1,22} proposed the following mixing
193 index to assess uniformity in seed mixtures:

$$194 \quad M = \left(1 - \frac{\sigma^2}{\sigma_0^2}\right) \quad (3)$$

195 where M is the degree of mixedness; and σ^2 and σ_0^2 are the variance of several withdrawn
196 samples and that prior to mixing, respectively, which can be determined experimentally.

197 Equation (3) was rewritten as follows for use with NIR spectral data:

$$198 \quad M = \left(1 - \frac{Var}{Var_0}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

199 where M denotes the percent mixing index, Var the mean variance of a “fixed” moving window
200 of n consecutive spectra recorded at m different wavelengths and Var_0 the mean variance of a
201 window of n spectra at the start of the process.
202

203

204 3. RESULTS AND DISCUSSION

205 Figure 2 shows the NIR spectra for the three mixture components as such and after processing
206 with the SNV method (Figure 2a) or the second derivative + SNV method (Figure 2b). As can
207 be seen, the spectra for the major components, A and B, were virtually identical. In fact, the
208 sole marked difference between the absorbance spectra was the presence of the characteristic
209 band for the A pellets at 7123 cm^{-1} (see arrow in Figure 2a). Differences, however, were more
210 apparent in the second-derivative spectra (Figure 2b).

211

212 **3.1. PLS calibration method**

213 An initial PLS calibration model was constructed from the 11 laboratory samples only that was
214 expanded with process spectra in order to shrink the concentration range. However, the model
215 failed to accurately predict the dynamic spectra obtained during the blending process. This was
216 a result of slight differences between the dynamic and static spectra, a phenomenon previously
217 observed in this type of NIR spectrometer.^{16,19} The difference between the dynamic and static
218 spectra is quite apparent in Figure 3, which shows the scatter plot for the first two factors of a
219 PCA of the data. As can be seen, the calibration samples fell mainly along the PC1 axis (88%
220 explained variance), which was associated to the variation of the concentration of A pellets
221 (%w/w); also, the calibration samples encompassed the validation samples. On the other hand,
222 the dynamic spectra departed from the calibration spectra, which suggest that the two were
223 slightly different.

224 The calibration set was expanded with dynamic spectra in order to obtain a model capable
225 of accurately predicting concentrations during the blending process. Table 3 shows the figures
226 of merit of the final PLS model, which was constructed with 4 PLS factors and exhibited small
227 prediction errors—quite acceptable for the narrow spectral range and high spectral similarity of
228 the major components of the pharmaceutical.

229 Because the blender was in continuous motion, the sample reaching the spot of the NIR
230 equipment was continuously renewed. Each spectrum was thus assumed to represent a different
231 aliquot; as a result, the amount of sample analysed might exceed the total mass examined in a
232 typical thief sampling analysis. For easier viewing of concentration changes, the amount of A
233 pellets was plotted as a relative proportion in Figures 4a and 4b; this allowed the point where

234 the concentrations predicted by the NIR model met the target value to be easily identified. As
235 can be seen, the two blending processes examined evolved differently. A statistical analysis of
236 the NIR predictions for the last minute of blending in each process revealed acceptable errors
237 (RSEP = 2.9%) and RSD values less than 5% in all instances.

238

239 **3.2. Comparison of methods**

240 Figure 4 shows the blending profiles as a function of time for the blending of two sample
241 batches. The figure compares the results obtained with the MBSD and PC-SDA methods, *M*
242 index and PLS model at the blending end-point (BEP). Because all methods were applied to the
243 same spectral set, the resulting end-points should be very similar.

244 The limits used in each graph were $\pm 5\%$ around the nominal value of A pellets with PLS,
245 MeanSD for the last few minutes of blending with MBSD, Hotelling's T^2_{crit} with PC-SDA and
246 95% uniformity with *M*. As can be seen, identifying BEP in batch 4 (Figures 4a, 4c, 4e and 4g)
247 was very simple relative to batch 5 (Figures 4b, 4d, 4f and 4h) because the latter exhibited
248 substantial spectral variations. In fact, a comparison of the spectra obtained at this moment of
249 the process revealed a marked increase in the band for the antitacking excipient, which suggests
250 that the previous variations may have resulted from local agglomeration of this component on
251 the measuring window or agglomerates of it in the blend.

252 The BEP values obtained with the different methods (Table 4) were compared in terms of
253 average and standard deviation (SD). The method with the lowest SD was PLS. The qualitative
254 methods exhibited very similar SD values, which were lowest with the mixing index method.
255 Overall, the BEP values obtained with the *M* method were slightly high relative to the other
256 methods. Interestingly, the main source of variation was variability between sample batches;

257 thus, the greatest difference between methods was that in batches 1, 2 and 6 (11, 11 and 13
258 revolutions, respectively).

259 A one-way ANOVA of the results revealed the presence of significant differences ($p =$
260 0.016) between the BEPs obtained with the four chemometric methods. Also, Tukey's Honestly
261 Significant difference (HSD) test revealed that the MBSD method exhibited significant
262 differences from that based on M . The results showed that the BEP was reached prematurely
263 and confirmed the conclusions of previous work that the spectral variations due to the API are
264 very small. However, the method of choice in each case depends on the particular problem. In
265 fact, there were variations between sample batches and this resulted in the greatest source of
266 variability in BEP being that in the process—a likely result of its being stopped to withdraw
267 samples in some cases and the blending dynamics altered as a result. The PLS method was that
268 providing the most reliable predictions for our formulation; this, however, was countered by the
269 need to construct a calibration model and hence to use calibration samples and, necessarily, a
270 reference method.

271 The MBSD method is straightforward and easily implemented, but provides inaccurate
272 predictions owing to its poor sensitivity for identifying the blending end-point as a result of the
273 strong effects of spectral variation and noise.^{12,25}

274 The PC-SDA method provided results on a par with those of the PLS method; like
275 MBSD, however, it is subject to the deleterious effects of spectral variations and noise (Figure
276 4f). By contrast, the PC-SDA method requires no reference and its threshold is statistically
277 calculated and hence reproducible. However, calculating the threshold entails constructing a
278 PCA model via a series of steps. Also, the model must be established from carefully selected
279 samples if a satisfactory limit of acceptance is to be obtained.

280 Interpreting the variation of the mixing index, M , with the number of revolutions (Figures
281 4g and 4h) allows the course of the blending process to be monitored. Parameter Var in eq. (2)
282 was calculated by using a “fixed” moving window of 3 non-superimposable consecutive
283 spectra. For example, the 240 spectra recorded for a sample batch allowed $240/3 = 80$ Var
284 values throughout the blending process to be obtained. We chose not to use the moving window
285 typically employed by other methods because smoothing was excessive and led to
286 underestimated BEPs –and also, to avoid the interference of abnormal spectra recorded at
287 consecutive points in the process. As can be seen from Figure 4g, the values at the start were
288 near-zero; this indicates that blending is heterogeneous and gradually becomes homogeneous
289 until full uniformity is reached. The blending end-point (BEP) was identified immediately after
290 10 consecutive values exceeding the threshold (95%) were obtained. Unlike the MBSD and PC-
291 SDA results, those based on the mixing index were unaffected by spectral variations (see Figure
292 4h). Therefore, M is robust against changes not directly associated to the blending process. In
293 addition, it is independent of the concentration of each component in the mixture, so it can be
294 applied to any type of solid blend. The BEP values obtained with M are comparable to those
295 provided by the PLS and PC-SDA methods. This makes the mixing index method a simple,
296 expeditious, accurate tool for routine measurements.

297

298 **4. CONCLUSIONS**

299 The success of this work lay on the use of a wireless NIR spectrometer and a mixture of pellets
300 the spectral and particle similarity of which, together with the narrow spectral range of NIRS,
301 virtually preclude the use of chemometric methods to identify blending end-points.

302 The PLS method is no doubt the most accurate for determining BEPs. It suffices to obtain
303 predictions $\pm 5\%$ around the nominal API content. However, constructing, validating and

304 implementing a PLS model is not always easy, which makes this method sometimes unsuitable
305 for industrial blending processes.

306 The mixing index, M , and the PC-SDA method are well suited to the target pellet
307 formulation. The former is especially useful for determining BEPs on account of its computa-
308 tional simplicity, the need –unlike PC-SDA– for no monitoring of the whole process, the ability
309 to obtain results in real time, the independence on the analyte concentration and the ability to
310 directly set the acceptance threshold at 95%. All these advantages facilitate the incorporation of
311 the mixing index into the software governing wireless NIR equipment with a view to assessing
312 uniformity in solid blends.

313 Finally, the MBSD method provided inaccurate BEP values, so it is not recommended for
314 establishing the BEP of the target formulation.

315 If no quantitative information is required, the mixing index method is the most suitable
316 for the in-line monitoring of blending processes by virtue of its computational expeditiousness,
317 easy routine implementation and plotting, and little sensitivity to slight spectral changes.

318

319 **ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and
320 Technology for funding this research as a part of Project CTQ2009-08312 and to the
321 Pharmaceutical Innovation Department of Laboratorios Dr Esteve (Barcelona, Spain) for
322 technical support.

323

324 **REFERENCES**

- 325 [1] L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, “Solids Mixing”, *Ind. Eng. Chem.* **62**, 53–66 (1970).
- 326 [2] N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow, *Mixing in the Process Industries*, 2nd. ed.,
327 Butterworth–Heinemann, London, UK (1997).
- 328 [3] M. Blanco, R. Gozalez, E. Bertran, “Monitoring powder blending in pharmaceutical
329 processes by use of near infrared spectroscopy”, *Talanta.* **56**, 203–212 (2002).
- 330 [4] A. El-Hagrasy, M. Delgado-Lopez, J.K. Drennen, “A Process Analytical Technology
331 approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending: Part II:
332 Qualitative near-infrared models for prediction of blend homogeneity”, *J. Pharm. Sci.* **95**, 407–
333 421 (2005).
- 334 [5] E.T. Skibsted, H.F. Boelens, J.A. Westerhuis, D.T. Witte, A.K. Smilde, “A Simple
335 assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near-infrared
336 reflectance probe and control charts”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 26–35 (2006).
- 337 [6] P.A. Hailey, P. Doherty, P. Tapsell, T. Oliver, P.K. Aldridge, “Automated system for the
338 on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part I. System
339 development and control”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 551-559 (1996).
- 340 [7] S.S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty, P.A. Hailey, “Automated system for the on-line
341 monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II. Qualitative
342 approaches to blend evaluation”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1285–1309 (1998).
- 343 [8] US-FDA, *Guidance for Industry, Powder Blends and Finished Dosage Units — Stratified*
344 *In-Process Dosage Unit Sampling and Assessment*, Rockville, MD, USA (2003).
- 345 [9] US-FDA, *Guidance: PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development*,
346 Rockville, MD, USA (2004).

- 347 [10] S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A.
348 Hailey, P.K. Aldridge, “On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared
349 spectroscopy”, *Anal. Chem.* **68**, 509–513 (1996).
- 350 [11] O. Berntsson, L.G. Danielsson, B. Lagerholm, S. Folestad, “Quantitative in-line
351 monitoring of powder blending by near infrared reflection spectroscopy”, *Powder Technol.* **123**,
352) 185–193 (2002).
- 353 [12] H. Zhang, Z. Jiang, J. Pi, H. Xu, R. Du, “On-Line monitoring of pharmaceutical production
354 processes using hidden Markov model”, *J. Pharm. Sci.* **98**, 1487–1498 (2008).
- 355 [13] Z. Shi, R. Cogdill, S. Short, C. Anderson, “Process characterization of powder blending by
356 near-infrared spectroscopy: Blend end-points and beyond”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 738–
357 745 (2008).
- 358 [14] C.V Liew, A.D. Karande, P.W. Heng, “In-line quantification of drug and excipients in
359 cohesive powder blends by near infrared spectroscopy”, *Int. J. Pharm.* **386**, 138–148 (2010).
- 360 [15] P.P. LaPointe-Garant, J.S. Simard, N. Abatzoglou, “Real-time NIR Monitoring of a
361 Pharmaceutical Blending Process through Multivariate Analysis-derived Models” in: 1st
362 WSEAS International Conference on Multivariate Analysis and its Application in Science and
363 Engineering (MAASE’08), Turkey, pp. 109–118 (2008).
- 364 [16] Y. Sulub, B. Wabuyele, P. Gargiulo, J. Pazdan, J. Cheney, J. Berry, A. Gupta, R. Shah, H.
365 Wu, M. Khan, “Real-time on-line blend uniformity monitoring using near-infrared reflectance
366 spectrometry: A noninvasive off-line calibration approach”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 48–54
367 (2009).
- 368 [17] T. Puchert, C.V. Holzhauser, J.C. Menezes, D. Lochmann, G. Reich, “A new PAT/QbD
369 approach for the determination of blend homogeneity: combination of on-line NIRS analysis

370 with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA)", *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 173–182 (2011).

371 [18] W. Momose, K. Imai, S. Yokota, E. Yonemochi, K. Terada, "Process analytical technology
372 applied for end-point detection of pharmaceutical blending by combining two calibration-free
373 methods: Simultaneously monitoring specific near-infrared peak intensity and moving block
374 standard deviation", *Powder Technol.* **210**, 122–131 (2011).

375 [19] Y. Sulub, M. Konigsberger, J. Cheney, "Blend uniformity end-point determination using
376 near-infrared spectroscopy and multivariate calibration", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**, 429–434
377 (2011).

378 [20] L. Bellamy, A. Nordon, D. Littlejohn, "Real-time monitoring of powder mixing in a
379 convective blender using non-invasive reflectance NIR spectrometry", *Analyst.* **133**, 429–434
380 (2008).

381 [21] J. G. Rosas, M. Blanco, "A criterion for assessing homogeneity distribution in
382 hyperspectral images. Part 2: Application of homogeneity indices to solid pharmaceutical
383 dosage forms" , *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70**, 691–699 (2012).

384 [22] S.R. Miles, "Heterogeneity in seed lots", *Proc. Inst. Seed Test. Assoc.* **27**, 407–412 (1962).

385 [23] J. Berman, D.E. Elinski, C.R. Gonzales, J.D. Hofer, P.J. Jimenez, J.A. Planchard, R.J.
386 Tlachac, P.F. Vogel, "Blend uniformity analysis: validation and in-process testing. Technical
387 Report No. 25. PDA (Parenteral Drug association)". *PDA J Pharm Sci Technol.* **51**, 1 (1997).

388 [24] M. Sullivan, "The use of NIR as a PAT tool for measuring blend uniformity". Supplement
389 to Spectroscopy. **1**, 22–30 (2006).

390 [25] M. Blanco, R. Cueva, J. Cruz. "Critical evaluation of methods for end-point determination
391 in pharmaceutical blending processes". *Anal. Methods.* **4**, 2694–2703 (2012).

392

FIGURES CAPTIONS

Figure 1. Experimental setup for: a) dynamic and b) static NIR spectra acquisition.

Figure 2. NIR spectra of three raw materials in (a) SNV, and (b) 2nd derivative + SNV mode

Figure 3. PCA scatter plot of calibration set and projecting validation set and dynamic batch. Spectral pre-treatment used 2nd derivative (Norris 9 point) + SNV.

Figure 4. Estimation of blending end-point for, PLS (a, b), MBSD (c, d), PC-SDA (e, f) and M index (g, h). All trend plots are against number of revolutions.

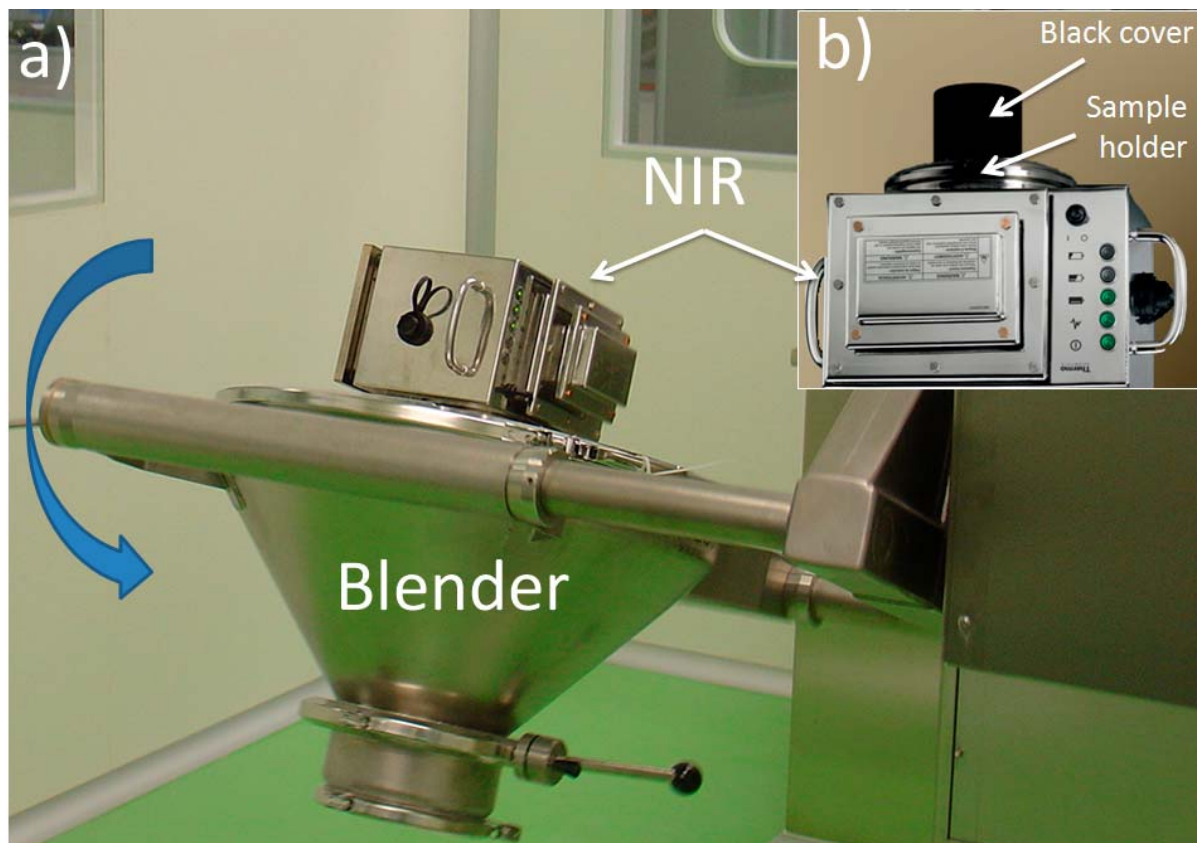


Figure 1. Experimental setup for: a) dynamic and b) static NIR spectra acquisition.

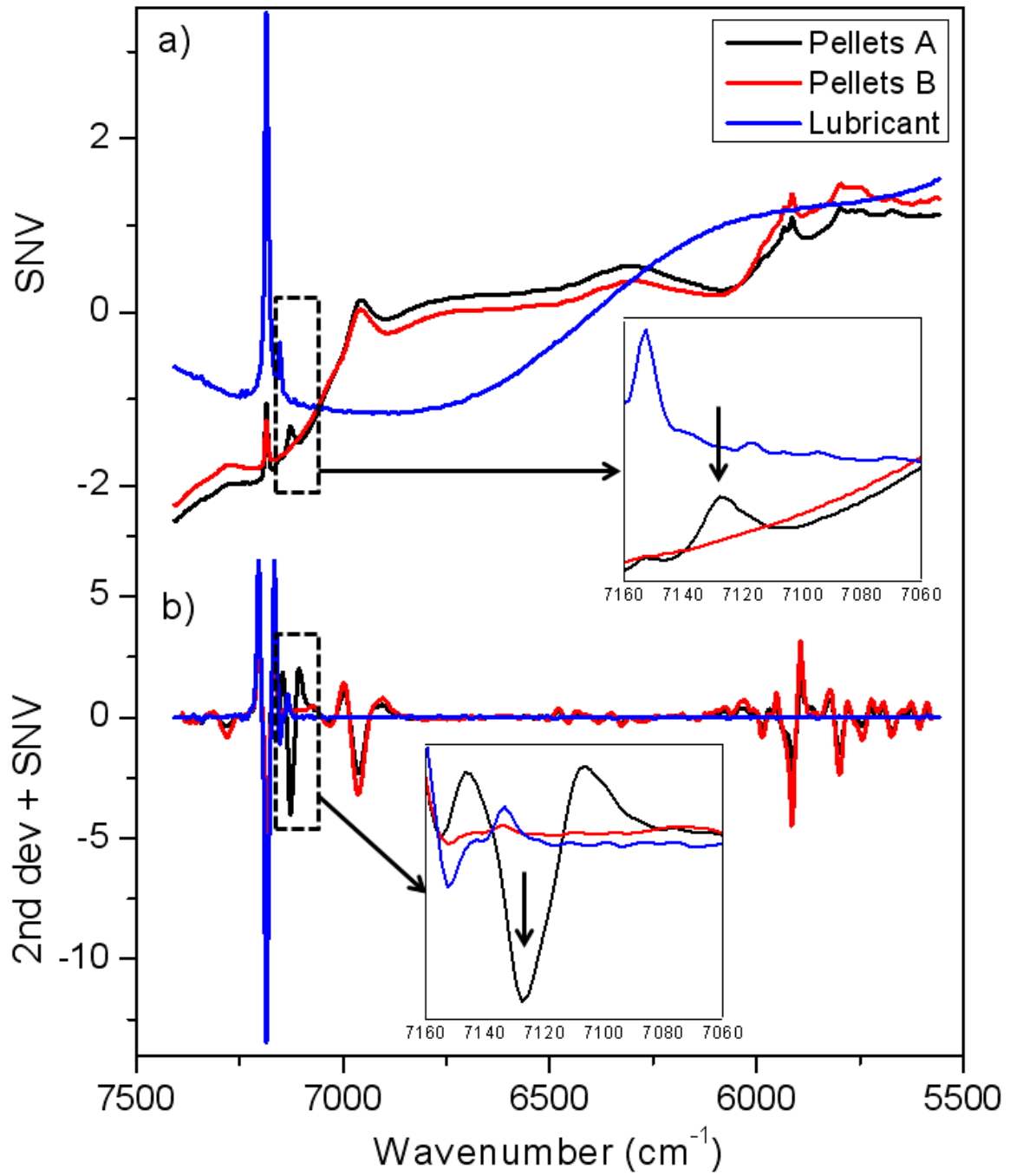


Figure 2. NIR spectra of three raw materials in (a) SNV, and (b) 2nd derivative + SNV mode

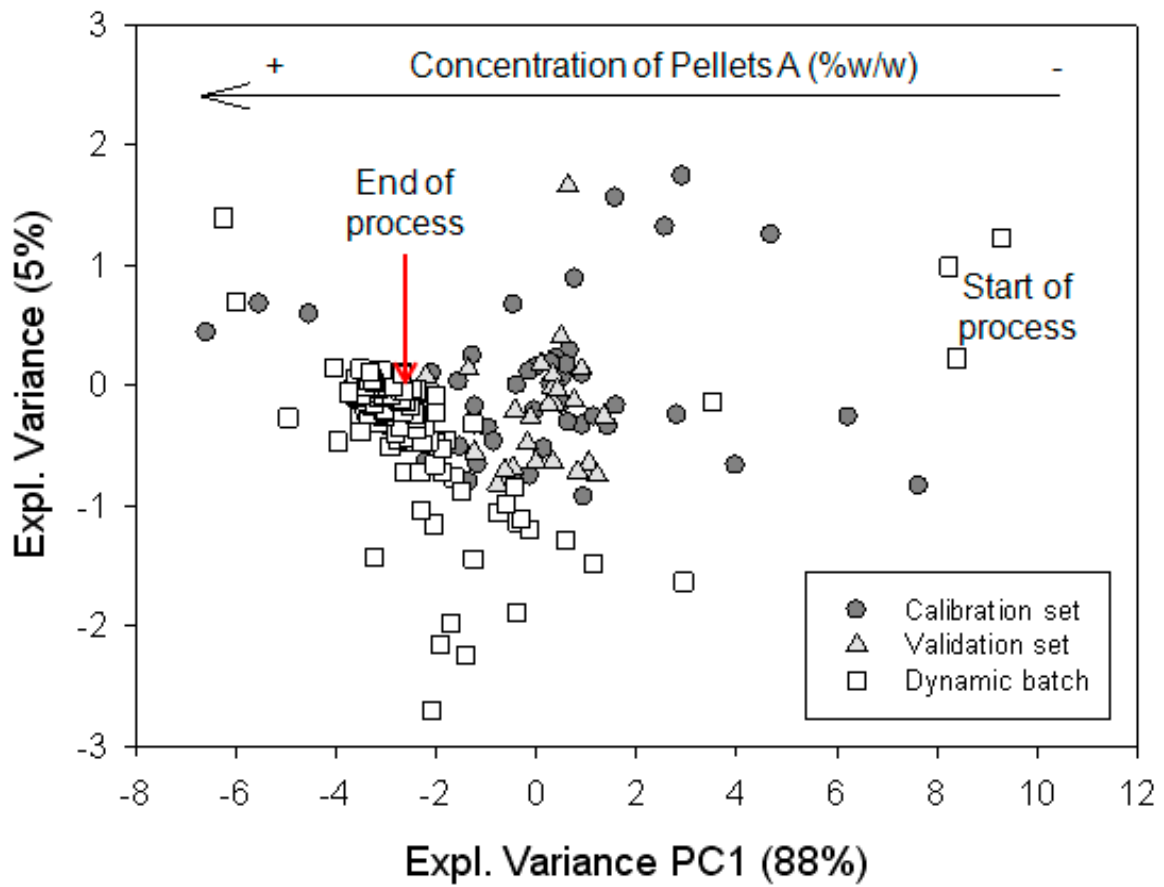


Figure 3. PCA scatter plot of calibration set and projecting validation set and dynamic batch. Spectral pre-treatment used 2nd derivative (Norris 9 point) + SNV.

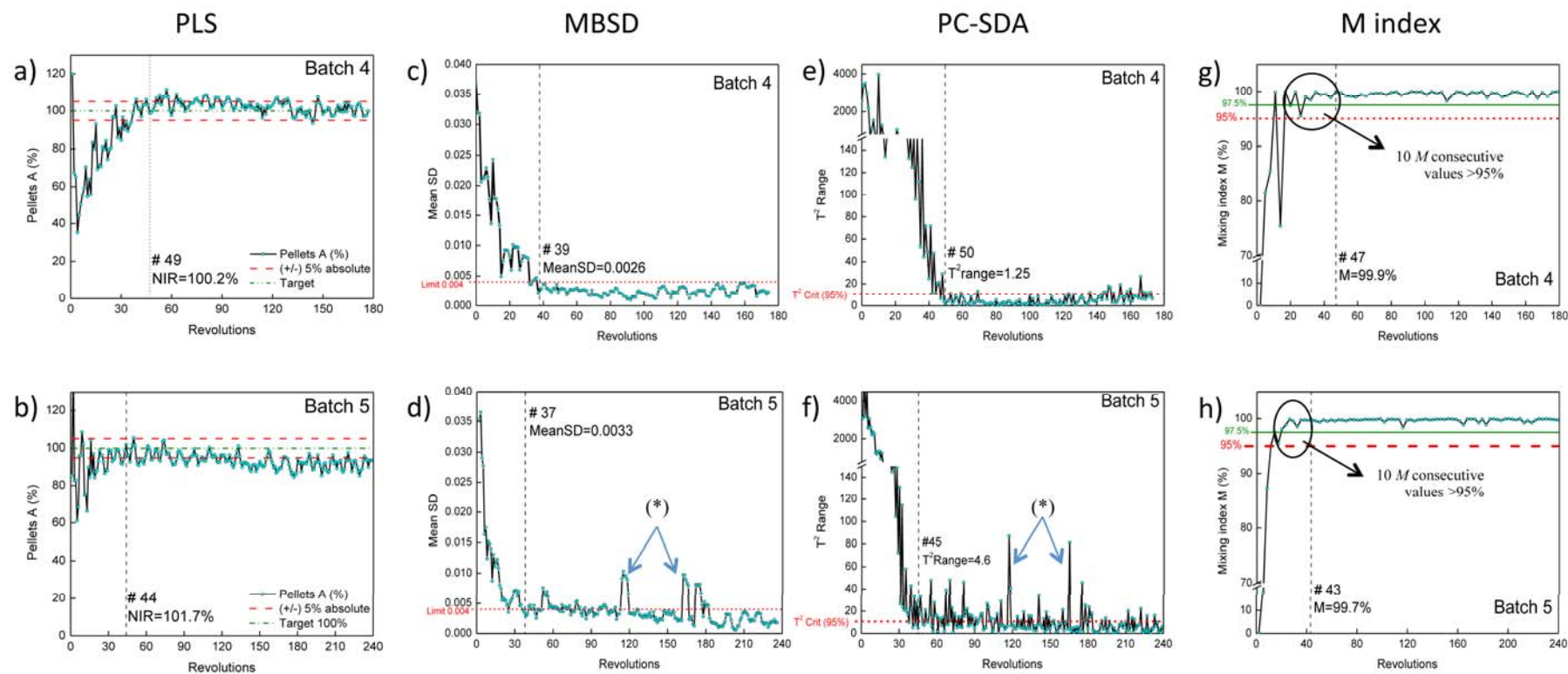


Figure 4. Estimation of blending end-point for, PLS (a, b), MBSD (c, d), PC-SDA (e, f) and M index (g, h). All trend plots are against number of revolutions. (*) antitacking excipient stuck on the window or agglomerates in the blend.

LIST OF TABLES

Table 1. Historical applications of NIR spectroscopy for industrial blending monitoring

Table 2. Experimental description of blend batches

Table 3. Figures of merit of PLS1 model for determining pellets A content

Table 4. Comparison of BEPs expressed in number of revolution for each method

Table 1. Historical applications of NIR spectroscopy for industrial blending monitoring

Blender	Invasive	Method ^a	Algorithm ^b	Parameter monitored	End-point determination criteria Blend homogeneity is achieved when:	References
1) NIR Conventional Set-up (with fibre optic cables)						
V-blender and bin blender	Yes	2	MBSD	PooledSD	Values are constant and expected to approach zero.	6
V-blender	Yes	2	MBSD	MeanSD	Values are constant and expected to approach zero	10
Flobin blender	Yes	2	a) MBSD b) Dissimilarity c) PCA	PooledSD Dissimilarity mean PC scores	Values are constant and expected to approach zero Values are constant and expected to approach zero Scores became constant	7
Nauta mixer	Yes	1	PLS	API content	Mean and SD of API content are constant Histogram plots of predicted content in three intervals	11
V-blender	Yes	2	a) SIMCA	a) F-statistic	(SIMCA) a non-significant F ratio indicates that sample belong to the training set	4
Bin blender	Yes	1 and 2	b) PC-MBEST a) PLS b) HMM c) MBSD	b) Correlation coefficient a) API content b) Log(P) c) MeanSD	Values are constant and close to 1 a) Values become constant b) Values become constant c) Values are constant and expected to approach zero	12
Bin blender	No	1 and 2	a) NIPLS	a.1) API content a.2) RMSNV a.3) Student's t-test value	a.1) RSD of predictions was smaller than 5% a.2) Values lower RMSNV=0.05 a.3) Student's t-test (tow-tailed) was performed between every 12 RMSNV with CI at 95%	13
Pilot IBC blender	No	1	b) MBSD PLS	b) MeanSD API content	b) The first zero-crossing point of the first derivative of the smoothed mean SD trend was regarded as the end point values were in the range of 100±5% of the target values and the corresponding %RSD values below 5%	14
2) NIR Wireless Set-up						
V-blender	No	2	a) MBSD b) PCA	a) MeanSD b) Hotelling's T2	a) Constant values close to zero b) T2 values within limits of T2 range at 95%	15
IBC bin blender	No	1	PLS	API content	Values become constant close 100%	16
Bohle bin blender	No	2	PC-SDA	Hotelling's T2	T2 values within limits of T2 range at 95%	17
Bohle bin blender	No	1 and 2	a) Univariate regression b) MBSD	a) API content b) MeanSD	a) Constant API values b) Constant values close to zero	18

^a Calibration method (1) and calibration-free method (2)

^b Moving Block Standard Deviation (MBSD), Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares (PLS), Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA), PC-MBEST (principal component modified bootstrap error-adjusted), Net signal analyte (NAS), Hidden Markov model (HMM), Non-linear iterative PLS (NIPLS), Root mean square from nominal value (RMSNV), Principal Ccomponent Scores Distance Analysis (PC-SDA)

Table 2. Experimental description of blend batches

Batch	Formulation			Processes description	
	Pellets A (%w/w)	Pellets B (%w/w)	Lubricant (%w/w)	Total blending time (min)	Total revolutions
1	38.70	61.00	0.3	20	120
2	38.70	61.00	0.3	30	180
3	53.50	46.20	0.3	30	180
4	53.50	46.20	0.3	30	180
5	46.50	53.20	0.3	40	240
6	46.50	53.20	0.3	30	180

Table 3. Figures of merit of PLS1 model for determining pellets A content

Set	Parameters	PLS full range
Calibration	Number of samples	52
	Spectral pre-treatment	2 nd derivative + SNV
	Spectral range (cm ⁻¹)	7400 – 5550
	Calibration range (%w/w)	0 – 100
	PLS factors	4
	Explained Variance (%)	98.7
	RSEC (%)	3.6
	RMSEC (% w/w)	1.8
Validation (external set)	Number of samples	26
	Residuals t-test	
	Average (%w/w)	-0.8
	SD (%w/w)	2.6
	t _{crit} (95%)	2.1
	t _{cal} (95%)	1.6
	RSEP (%)	6.2
	RMSEP (% w/w)	2.7

Table 4. Comparison of BEPs expressed in number of revolution for each method

Batch	PLS	MBSD	PC-SDA	M index	Average	SD
1	45	36	34	59	44	11
2	44	59	64	68	59	11
3	54	39	40	56	47	9
4	49	39	50	56	49	7
5	44	37	45	43	42	4
6	43	32	48	64	47	13
Average	47	40	47	58		
SD	4	10	10	9		

ANEXO V

NIR spectroscopy for the in-line
monitoring of a multicomponent
formulation during the entire
freeze-drying process

Juan G. Rosas, Hans de Waard, Chris Vervaet,
Jean Paul Remon, Wouter L.J. Hinrichs,
Henderik W. Frijlink, Marcel Blanco, Thomas
De Beer

En preparación

1 **NIR spectroscopy for the in-line monitoring of a multicomponent** 2 **formulation during the entire freeze-drying process**

3 Juan G. Rosas¹, Hans de Waard², Chris Vervaet³, Jean Paul Remon³, Wouter L.J. Hinrichs²,
4 Henderik W. Frijlink², Marcel Blanco¹, Thomas De Beer^{4*}

5 ¹Grupo de Quimiometría Aplicada, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Universitat
6 Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

7 ²Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Groningen, Antonius Deusinglaan
8 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands.

9 ³Laboratory of Pharmaceutical Technology, Ghent University, Harelbekestraat 72, 9000 Ghent, Belgium.

10 ⁴Laboratory of Pharmaceutical Process Analytical Technology, Department of Pharmaceutical Analysis, Ghent
11 University, Harelbekestraat 72, 9000 Ghent, Belgium.

12 *Corresponding author: Tel.: +32 9 2648097; fax: +32 9 2228236

13 E-mail address: Thomas.DeBeer@UGent.be (T. De Beer)

14

15 **ABSTRACT:** Freeze drying is traditionally employed to convert solutions of (heat-) labile
16 materials (pharmaceuticals) into solids having sufficient stability for distribution and storage.
17 The process is complex, time consuming and thus expensive, hence creating a need for
18 understanding the material behaviour in the process environment and for process optimisation.
19 Near-Infrared spectroscopy (NIRS) offers the opportunity to monitor physicochemical
20 changes of the formulation during freeze-drying. The aim of this work was to examine
21 whether NIRS allows in-line monitoring of all components during the entire freeze-drying
22 process of a multi-component formulation (fenofibrate, mannitol, tertiary-butyl alcohol, and
23 water). To extract useful information of all components in the formulation from the large
24 multivariate data-sets obtained during in-line spectroscopic monitoring, several spectral pre-
25 processing techniques and spectral data analysis techniques (selected wavenumbers,
26 correlation coefficient and principal component analysis, PCA) have been evaluated and
27 compared. To find out whether these chemometric techniques are also able to

1 differentiate between changes in the process settings influencing the freeze-drying
2 process of the formulation, four different freeze-drying processes were performed.
3 Results demonstrated that in-line measurements and process understanding in an icy
4 environment were possible by using NIRS. All applied data-analysis techniques allowed
5 the identification of the solvent crystallization during the freezing stage, while the
6 solutes crystallized after the temperature was increased, but before first drying started.
7 The experiments demonstrated that both freezing rate and shelf temperature have an
8 impact on the final residual water content in the end products.

9

10 **Key words:** NIRS, in-line monitoring, freeze-drying, principal component analysis.

1 1. Introduction

2 Freeze-drying is a widely used but complex, time consuming and hence for industries
3 expensive pharmaceutical multi-step production process, during which the starting material
4 (mostly solution) undergoes several transformations leading to dry cake end product [1–3] .
5 To increase freeze-drying understanding and to develop freeze-drying process monitoring
6 and control strategies, several univariate and multivariate process analytical technology
7 (PAT) tools have been used (**Table 1**). However, most of these classically used technologies
8 [4–14] might disturb the process and the product behaviour during freeze-drying and do not
9 allow monitoring all critical process aspects. Furthermore, the cited techniques cannot
10 characterize the product itself during freeze-drying [15]. In contrast, the suitability of in-line
11 vibrational spectroscopic techniques [15–22], such as Near-Infrared (NIR) and Raman have
12 been recently shown to be able to provide product information during the entire freeze-drying
13 process. These spectroscopic techniques are fast, non-destructive and non-invasive, and do
14 not require sample preparations. The first applications of vibrational spectroscopy during
15 freeze-drying process were based on in-situ and invasive FT-IR [21] and NIR spectroscopy
16 [22]. Afterwards, non-invasive monitoring approaches based on Raman [12, 15, 16, 17, 19]
17 and NIR spectroscopy [12, 16, 17, 19] have been used. One of the advantages of Raman
18 spectroscopy over NIR spectroscopy is that Raman spectra generally contain sharp bands by
19 which the individual components of the measured product can be easily distinguished in the
20 spectra, making it relatively easy to obtain information on t each component during
21 processing. However, water and ice are weak Raman scatterers making Raman spectroscopy
22 less suitable for gaining information on water and ice changes during processing . As water
23 and ice produce strong signals in NIR spectra (often overwhelming the signals of the freeze-
24 dried formulation), Raman and NIR spectroscopy can be considered as useful complementary
25 tools for freeze-drying monitoring.

1 The aim of this work is to examine whether NIR spectroscopy allows in-line monitoring of
2 the behaviour of all components during the entire freeze-drying process of a multi-component
3 system (fenofibrate, tertiary-butyl alcohol, mannitol in water), even during the freezing-phase
4 where ice is expected to overwhelm the signals from the other components in the spectra. To
5 extract useful information of all components in the formulation from the large multivariate
6 data-sets obtained during in-line NIRS spectroscopic monitoring, several spectral pre-
7 processing techniques and spectral data analysis techniques (selected wavenumbers,
8 correlation coefficient and principal component analysis, PCA) have been examined and
9 compared. Four different freeze-drying processes were performed to find out whether
10 these chemometric techniques are also able to differentiate between changes in the
11 process settings influencing the freeze-drying process of the formulation, .

12

13 **2. MATERIALS AND METHODS**

14 *2.1. Materials*

15 Fenofibrate and tertiary-butyl alcohol (TBA) were obtained from Sigma-Aldrich Chemie
16 (B.V. Zwijndrecht, The Netherlands). Mannitol was purchased from VWR international
17 (Fontenay sous Bois, France).

18

19 *2.2. Process Description*

20 Freeze-drying experiments were performed using an Amsco FINN-AQUA GT4 freeze dryer
21 (GEA, Köln, Germany). Fenofibrate was dissolved in TBA (25 mg/ml) and the matrix
22 material, mannitol, in water (31 mg/ml). Both solutions were then heated to approximately
23 60°C and 2.4 ml of the aqueous solution was mixed with 1.6 ml of the TBA solution.

1 Immediately after mixing, the vials were frozen by either shelf-ramped freezing or by placing
2 them on pre-cooled shelf of -50 °C (**Table 2**). This temperature was kept constant for two
3 hours after which the shelf temperature was increased to either -25 °C or -15 °C in 30
4 minutes. This temperature was maintained for another 7 h. Sublimation of the solvents then
5 was initiated by decreasing the pressure to 0.8–1.0 mbar in 20 min and the samples were
6 dried for 30 h. Finally, the shelf temperature was gradually raised to room temperature. To
7 have an idea about product temperature changes in crystallization, in run 3 a temperature
8 probe was introduced into other vial.

9

10 2.3. *In-line NIR Spectroscopy*

11 Diffuse reflectance NIR spectra were continuously and noninvasively collected during
12 freeze-drying using a Fourier transform (FT) NIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific,
13 Nicolet Antaris II near-IR analyzer) equipped with an InGaAS detector, a quartz halogen
14 lamp, and a fiber-optic noncontact probe. Spectra, from 10000–4500 cm^{-1} , with a resolution
15 of 8 cm^{-1} and averaged over 32 scans, were acquired every process minute. The non-invasive
16 character of the measurements guarantees that neither the process nor the product is
17 influenced by contact of the NIR probe. The fiber optic cable connecting the NIR probe to the
18 NIR spectrometer was lead through a port in the side wall of the freeze dryer chamber. The
19 NIR probe was positioned next to the vial hence monitoring the side wall at the bottom of the
20 the vial. The spot size was about 28 mm^2 [20]. Hence, the effective sample size measured by
21 the NIR probe only consisted of a small part of the cake volume.

22

23

1 2.4. Data Analysis

2 Spectral data was analyzed using in home-made m-files in Matlab 7.1 (The Mathworks,
3 Natick, MA). The spectral pre-treatments evaluated were Standard Normal Variate correction
4 (SNV) for removing the multiplicative interference of scatter and particle size and the first
5 Savitzky-Golay derivative to reduce the baseline shifts and to improve the spectral band
6 resolution.

7 For extracting relevant information from NIR process spectra, several chemometric methods
8 were evaluated. The first method evaluated the wavenumbers profiles during processing. The
9 average of some wavenumbers (M_{ws}) for each component was used instead to unique
10 wavenumber.

11
$$M_{ws} = \frac{A_1 + A_2 + \dots + A_n}{n} \quad (\text{Eq. 1})$$

12
13 Where, A_1, A_2, \dots, A_n are selected wavenumbers for each component and n is the number of
14 wavenumbers selected. Thus, the M_{ws} values are monitored during the freeze-drying process.

15 A second applied data-analysis method is the correlation coefficient (*CorrCoef*) method. The
16 *CorrCoef* provides a measure of similarity between spectral data: pure spectra (API and
17 excipients) versus the continuously collected in-process spectra. In fact, one of the most
18 interesting uses of correlation coefficients is two-dimensional correlation spectroscopy [23],
19 which allows the small spectral changes induced by an experimental perturbation to be
20 magnified. The *CorrCoef* is calculated using the following equation:

21
22
$$\text{CorrCoef} = \frac{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda} y_{\lambda}}{\sqrt{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda}^2 \sum_{\lambda} y_{\lambda}^2}} \quad (\text{Eq. 2})$$

1 where, for each wavelength, $x_{mn\lambda}$ is the spectrum and y_λ the pure spectral profile for one
2 analyte. The spectra of two similar compounds will have a near unity *CorrCoef*, while more
3 dissimilar the spectra will have a lower *CorrCoef* [24].

4 The third evaluated data-analysis method was principal component analysis (PCA). This
5 method is a variable reduction method and has proven to be a highly efficient method for
6 extracting physicochemical information from large and complex multivariate datasets
7 collected during freeze-drying [12, 17]. PCA is a multivariate data analysis technique [26],
8 widely used for spectroscopic process monitoring [12, 17]. PCA produces an orthogonal
9 bilinear data matrix decomposition, where principal components (PCs) are obtained in a
10 sequential way to explain maximum variance:

11

$$12 \quad X = TP^T + E = t_1p_1^T + t_2p_2^T + \dots + t_np_n^T + E \quad (\text{Eq. 3})$$

13

14 Where, T is the score matrix, P the loading matrix, E the model residual matrix, n the number
15 of principal components (PCs). Each PC consists of two vectors, the score vector t and the
16 loading vector p . The score vector contains a score value for each spectrum, and this value
17 informs how the spectrum is related to the other spectra in that particular component.

18

19 2.5. X-ray Powder Diffraction

20 X-ray powder diffraction (XRPD) was used to determine the crystallinity and polymorphic
21 forms of both solutes in the freeze-dried formulation. Therefore a $\text{CuK}\alpha$ radiation with a
22 wavelength of 1.5405 Å from a Bruker D2 Phaser (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped
23 with a lynxeye detector was used. The sample powders were placed on a zero-background

1 silicon holder and scanned from 5–70° 2θ with a step size of 0.02° and a time per step of 1.0
2 s.

3

4 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

5 First of all, as an example, the process variable settings (shelf temperature and chamber
6 pressure) for experiment 3 are visualized to clarify the product temperature changes,
7 measured using a temperature sensor inserted in a vial, during freeze-drying (Figure 1). As
8 seen, during the freezing step, the product temperature decreased to -36° C, after that product
9 temperature increases following the shelf temperature rise, maintaining constant at -20° C.
10 Afterwards, vacuum was applied and product temperature rapidly decreased to -25° C,
11 indicating that sublimation reached the area around the temperature probe into the vial. At
12 610 minutes product temperature starts to increase becoming constant (approximately at 1300
13 minutes) and equivalent to shelf temperature, although with a shift of 20 °C, indicating the
14 end of first drying stage. Second drying was observed because temperatures increased to
15 22°C.

16

17 *3.1. Pure component NIR spectra vs process spectra*

18 The formulation contains a large proportion of water, which has no signal in NIR spectra
19 measured in the reflectance mode. However, when water is converted into ice during freezing
20 step, strong and broad ice bands in the NIR spectra are clearly visible which can overwhelm
21 the signals from other compounds (Figure 2). Therefore, identification of specific spectral
22 regions for each component, non-overlapping with the ice bands might facilitate the data
23 analysis. Therefore, reflectance spectra were acquired from the used fenofibrate and mannitol

1 powders. Reflectance spectra of solvents were recorded in their frozen state, because both
2 solvents have no signal in NIR spectra in liquid state (Figure 2a). As seen from the chemical
3 structures (Figure 2b), fenofibrate is the only aromatic compound. Characteristic absorption
4 bands of the aromatic groups can be observed in the NIR spectrum of fenofibrate in the
5 regions of 9126 – 8659 and 6121 – 5724 cm^{-1} . Frozen TBA has a characteristic pick at
6 8500 cm^{-1} from $-\text{CH}_3$ and at 7351 – 6965 cm^{-1} related to the $-\text{OH}$ functional group, especially
7 at 6703 cm^{-1} . Note that the NIR region from 9126 to 8659 cm^{-1} encompasses fenofibrate and
8 TBA spectral information, but no ice signals. In the mannitol spectrum one can identify
9 spectral regions, such as 6970 – 5994 and 4900 – 4509 cm^{-1} , associated to functional groups
10 of $-\text{OH}-\text{CH}$ and $-\text{CH}$, respectively. For ice, the two main bands can be observed in the ranges
11 of 7108 – 6302 cm^{-1} and 5384 – 4744 cm^{-1} . Note that this range encompasses mannitol and
12 water spectral information.

13 As an example of the wavenumber evolution during freeze-drying, spectra acquired every
14 20th minute during experiment 1 are shown in figure 2b. As can be seen, arrows positioned at
15 selected wavenumbers show the spectral changes throughout the freeze-drying steps, such as
16 cooling, especially in range 7000 – 6500 cm^{-1} [marked with an arrow and a star (*)], and
17 solvent sublimation in the regions 9126 – 8659, 7108 – 6300, and 5384 – 4744 cm^{-1} .

18

19 3.2. *Identification of mannitol polymorphs in freeze-dried end products*

20 During lyophilization, mannitol can crystallize into 4 different crystalline forms: as
21 anhydrous α , β , or δ mannitol or as mannitol hemi-hydrate [16, 17]. The polymorphic form of
22 pharmaceuticals can alter some essential properties (physicochemical, bioavailability,
23 processability) of the end product [17]. Thus, the mannitol crystalline polymorph was
24 identified for the dry end-products of the 4 experiments in the range 7500–5500 cm^{-1} (**Figure**

1 3) by using the *CorrCoef* method. The application of *CorrCoef* to NIR spectroscopy for
2 polymorph identification has been described in the literature [27]. This is an easy method
3 consisting of the comparison of a reference spectrum of the pure polymorphic form and the
4 “sample” spectrum. The NIR spectra of anhydrous α , β , and δ -mannitol polymorph are shown
5 in **Figures 3a** and **3c**. Note that the δ -polymorph can be visually distinguished from the other
6 two polymorphs at 6649 cm^{-1} , whereas β -polymorph can be differentiated from α -polymorph
7 at 7000 cm^{-1} . The differences become more obvious by evaluating 1st Savitzky-Golay
8 derivatives of the spectra (Figure 3c?). Qualitative information on the mannitol polymorphs
9 in the freeze-dried end products can hence be extracted by comparing the pure mannitol
10 polymorph spectra with the freeze-dried end-products of experiments 1–4 (**Figures 3b** and
11 **3d**, respectively). This comparison was in first instance done using the *CorrCoef* method. The
12 results of this *CorrCoef* (**Table 3**) **analysis** show the highest correlation for the freeze-dried
13 end products with δ -mannitol ($\text{CorrCoef} > 0.95$). These results were confirmed by XRPD for
14 each end product (**Figure 3e**). The characteristic diffractions for anhydrous δ -polymorph are
15 widely reported in literature at $9.7^\circ 2\theta$ and $24.7^\circ 2\theta$ [28–30]. Mannitol hemi-hydrate shows a
16 characteristic diffraction signal at $18^\circ 2\theta$ [28, 30] After these results, it is possible that in
17 processes 2 and 4 there is a mixture of δ - and hemihydrate polymorphs. Unfortunately, NIR
18 spectrum of mannitol hemihydrate was not available for this study and comparison was not
19 possible.

20

21 **3.3. Analysis of in-line collected NIR spectra during freeze-drying via different data-** 22 **analysis approaches**

23 The in-line collected NIR spectra during the four different freeze-drying processes (table 2)
24 were analyzed via different data-analysis approaches. The exploration of these data-analysis

1 methods intends to evaluate their strengths and weaknesses for analyzing in-line collected
2 data during freeze-drying processes.

3 Since NIR signals are difficult to be assigned to a component in a formulation - because of
4 broad overlapping signals and complicated combinations of vibrational modes -, one
5 wavenumber evaluation of in-line collected NIR spectra is often unsatisfactory. However, as
6 demonstrated above (Figure 2), some specific bands for each component in the freeze-dried
7 formulation could be observed. Therefore, the mean of specific wavenumbers (M_{ws}) method
8 (see...) was used to monitor spectral changes of each component during the freeze-drying
9 processes. This approach includes the information of the selected wavenumbers, although the
10 average of these wavenumbers are monitored (Eq. 1). The selected wavenumbers for
11 fenofibrate were 8910, 6028, 5940 and 5809 cm^{-1} . In the case of mannitol 6541, 6237, 5897
12 and 4678 cm^{-1} were used. For the solvents, the selected wavenumbers were 8427, 7247 and
13 6977 cm^{-1} for TBA and for 6707 and 5099 cm^{-1} for water (ice).

14 The M_{ws} profiles for water and TBA combined with the measured product temperature, for
15 example in run 3 (Figure 4a), show that the M_{ws} values increase as result of exothermic
16 crystallization of solvents. Kasraian and DeLuca [31] reported a phase diagram for a mixture
17 of TBA and water at several concentrations of TBA. In our formulation there is
18 approximately 40% v/v TBA, and when the product temperature decreased to -9 °C (12
19 minutes), an increase in both mean TBA intensity and product temperature was observed,
20 indicating the crystallization of the eutectic mixture of TBA–water crystallizes. After that,
21 TBA hydrate crystallized at approximately -11°C (20min). The endpoints of crystallization
22 for TBA and water were observed at -12°C (24 min.) and -15°C (40 min.), respectively. On
23 the other hand, the M_{ws} profiles for the solutes, in combination also the shelf and product
24 temperature (Figure 4b) show that the product temperature increases shortly after when the
25 shelf temperature is increased. Note that shelf temperature increases (120 min) and M_{ws} starts

1 to decrease approximately at 210 min, indicating that the crystallization of solutes occurred.
2 The time when solute crystallization seems to finish was approximately at 450 min, at this
3 time the shelf and product temperatures are constant. An overview of M_{ws} profiles during
4 entire process (Figure 4c) shows that profiles are consistent with expected results for solvents
5 and solutes. The observed crystallization times (Table 4) will be compared with the two
6 others chemometric methods.

7 As a second data-analysis approach, the *CorrCoef* statistic was used to monitor product
8 changes during freeze-drying. More wavenumber (i.e., the entire spectra) are included for this
9 data-analysis method compared to M_{ws} approach. Thus, this approach can be considered as a
10 multivariate method. A plot of *CorrCoef* profiles against first 100 minutes for run 3 (Figure
11 5a) shows that the exothermic crystallization of TBA was observed between 12 and 30
12 minutes, in fact the crystallization can be observed by a sudden decrease of *CorrCoef* values.
13 During the entire process, one can observe that after sublimation started, *CorrCoef* values of
14 TBA increased and decreased dramatically. A similar observation was described for selected
15 TBA intensities of Raman spectroscopy [19]. As another example, the fenofibrate *CorrCoef*
16 profile (**Figure 5b**) displays the moment at crystallization started, for example when product
17 temperature increased, immediately after increase shelf temperature from -50 to -25°C.
18 Results of crystallization time for mannitol and water were also obtained (**Table 4**). In
19 conclusion, results were similar to those obtained with M_{ws} and allowed to identify the
20 crystallization time of each component.

21 The multivariate exploratory method most reported in literature is undoubtedly PCA. PCA
22 was in first instance performed on all spectra collected during each experiment using the
23 spectral range 9126–8659 cm^{-1} , providing information mainly from Fenofibrate and TBA.
24 First Savitzky-Golay derivative with 41 points of moving windows was employed as spectral
25 pre-treatment. The loading for PC1 explaining 96% of variance was associated to fenofibrate

1 and the loading of PC2, which explain 3% of variance was related to TBA (plots not shown).
2 Thus, plotting the two first scores, t_1 and t_2 , against process time (**Figures 6a** and **6b**) showed
3 that in the beginning of freezing step, TBA scores were higher; which decreases, whereas
4 fenofibrate scores increase. Another significant change on the score profiles were seen
5 between 11 – 43 minutes for TBA and 213–441 minutes for fenofibrate, these changes are
6 related to product temperature rise, and consequently with their crystallization.

7 A second PCA model was developed utilizing the spectral ranges 7108 – 6300 and 5384 –
8 4744 cm^{-1} , related bands to mannitol and water, respectively. The spectral pre-treatment
9 employed was SNV. The loading for PC1, which explain 67% of variance was associated to
10 mannitol, while loading for PC2 explaining 32% of variance was related to ice (plots not
11 shown). The trend plot of scores against time and combined with product temperature
12 showed, in a general overview, that throughout the process t_1 increases (**Figure 6c**), whereas
13 t_2 decreases (**Figure 6d**). The scores corresponding to the beginning of process, when the
14 formulation is still in the liquid state, were lower for solutes and higher in the first drying
15 stage. During freezing step, scores values were higher for solvents, after that in the first
16 drying they decrease. Important changes on profiles were observed between 247 – 432
17 minutes for mannitol and 12 – 34 minutes for water. The sudden change on scores values is
18 associated with product temperature change, indicating that both solvents and solutes
19 crystallization started.

20 As can be observed in table 4, the three assessed chemometric methods lead to similar
21 conclusions. In general, the ranges of product crystallization times for each compound were
22 similar to results obtained in a previous study, where Raman spectroscopy was used [19]. As
23 known, NIR and Raman spectroscopy are both molecular vibrational spectroscopic
24 techniques studying vibrational transitions in molecules, and both measurements can be
25 acquired in a very fast (seconds) and non-destructive way. Referring to the different selection

1 rules for Raman and NIR activity (change in polarizability and change in dipole moment,
2 respectively), both vibrational techniques can be complementary [3]. Both Raman and NIR
3 spectra contain qualitative and quantitative information on the chemical composition and the
4 physical properties of measured sample and applied for process monitoring result in a huge
5 amount of spectral data. Thus, chemometrics is required to extract useful process information
6 from the complex data-sets leading to process understanding.

7 According our results, all chemometric methods evaluated in this study demonstrated that
8 solvents and solutes crystallize at different time points in the freeze-drying process. During
9 freezing step only the solvents crystallized while the solutes became more concentrated.
10 Moreover, all data-analysis methods showed that the solutes did not crystallize during the
11 freezing steps. In addition and regarding freezing rate, we observed when cooling occurs
12 rapidly (runs 3 and 4), a rigid glass is formed, which does not allow neither solvents nor
13 solutes crystallize. Furthermore, shelf-ramped freezing at 1°C/min was enough to avoid
14 solutes crystallization during freezing step. After 2h at -50°C shelf temperature was increased
15 to -15 o -25°C, at this solutes crystallized, all methods evidenced that solutes crystallization
16 finished far before first drying step starts. Concerning the first drying step, all chemometric
17 methods shown that solvents are sublimated faster when shelf temperature was lower (i.e. -
18 25°C), indifferently of freezing rate employed. Nevertheless, the residual moisture rise in the
19 end-product can be observed whether second drying time is not adjusted, for example in run
20 2 and 4.

21 Taken together, NIR spectroscopy and chemometric techniques gave relevant information
22 about freeze-drying process of a complex mixture with a strong icy milieu. For the moment,
23 the main disadvantage of spectroscopic techniques for implementation in industrial freeze-
24 drying processes is that only 1 vial can be monitored. However, smaller portable NIR
25 spectrometers are appearing as result of miniaturization of sensors (MEMS technologies) [32].

1 In addition, there are already on the market NIR wireless spectrometers (based also in MEMS
2 technologies). The combination of these two technologies, could resolve the problem of in-
3 process implementation of NIR probes in a near future.

4

5 **4. Conclusions**

6 The suitability of NIRS was successfully evaluated for the in-line and non-invasively
7 monitoring of a multi-component system freeze-drying process. Even during freezing step
8 where ice is expected to overwhelm the signal from the other components in the spectra.

9 NIR spectra and Chemometric methods provided relevant information about formulation
10 changes during freeze-drying processes by mean of in-line measurements.

11 The *CorrCoef* statistic allowed to identify the formed δ -mannitol solid state was correctly
12 identified. Nevertheless, NIR spectra gave relevant evidence that in the end product there was
13 also the hemihydrate polymorph, unfortunately, NIR spectrum of mannitol hemihydrate was
14 not available for this study and comparison was not possible.

15 Comparison of results in terms of crystallization time for the three chemometric methods,
16 mean of selected wavenumbers (M_{ws}), correlation coefficient (*CorrCoef*) and principal
17 component analysis (PCA) were equivalent. Crystallization times were identified due to
18 changes in the profiles for each monitored parameter.

19 NIR measurements showed that the solvent crystallize in the freezing step and the solutes in
20 the crystallization step. In addition, the experiments demonstrated that process variables
21 studied, freezing rate and shelf temperature, have an impact on the final residual water
22 content. Finally, these subtle changes in process variables were reflected in all chemometric
23 methods evaluated.

1

2 **ACKNOWLEDGEMENTS**

3 Juan G. Rosas is grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this
4 work through Project CTQ2009-08312. Juan G. Rosas is also grateful to Laboratory of
5 Pharmaceutical Technology of Ghent University for their help and support, as well as
6 Laurent Hansen for his support to carry out the freeze-drying processes.

7

1 References

- 2 [1] United States Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry PAT-A Framework for
3 Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, 2004,
4 [2] D.C. Hinz, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1036–1042.
5 [3] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 32–
6 47.
7 [4] T. Jennings, *J. Parenter. Sci. Technol.* 34 (1980) 62–69.
8 [5] M. Roy, M. Pikal, *J. Parenter. Sci. Technol.* 43 (1989) 60–66.
9 [6] P. Cameron, *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*, Interpharm Press Inc., New York, 1997.
10 [7] N. Milton, M. J. Pikal, M. L. Roy, S. L. Nail, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 51 (1997) 7–16.
11 [8] G. Oetjen, P. Haseley, K. Klutsch, M. Leineweber, Method for controlling a freeze drying process, (2000),
12 United States, Patent number 6163979
13 [9] C. Roth, G. Winter, G. Lee, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1345–1355.
14 [10] M. Druy, *Spectroscopy* 1 (2006) 1–4.
15 [11] S. Schneid, H. Gieseler, *AAPS PharmSciTech* 9 (2008) 729–239.
16 [12] T.R.M. De Beer, M. Wiggenhorn, R. Veillon, C. Debacq, Y. Mayeresse, B. Moreau, A. Burggraeve, T.
17 Quinten, W. Friess, G. Winter, C. Vervaet, J. P. Remon, W.R.G. Baeyens, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7639–7649.
18 [13] S. Velardi, H. Hammouri, *Chem. Eng. Res. Des.* 87 (2009) 1409–1419.
19 [14] E. Dragoi, S. Curteanu, D. Fissore, *Chem. Eng. Sci.* 72 (2012) 195–204.
20 [15] S. Romero-Torres, H. Wikström, E. Grant, L. Taylor, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 61 (2007) 131–145.
21 [16] T. R. M. De Beer, M. Allesø, F. Goethals, A. Coppens, Y. Vander Heyden, H. Lopez De Diego, J.
22 Rantanen, F. Verpoort, C. Vervaet, J.P. Remon, W.R.G. Baeyens, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7992–8003.
23 [17] T.R.M. De Beer, P. Vercruyssen, A. Burggraeve, T. Quinten, J. Ouyang, X. Zhang, C. Vervaet, J.P. Remon,
24 W.R. Baeyens, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3430–3446.
25 [18] H. de Waard, W.L.J. Hinrichs, H.W. Frijlink, *J. Controlled Release.* 128 (2008) 179–183.
26 [19] H. de Waard, T. De Beer, W.L. J. Hinrichs, C. Vervaet, J-P. Remon, H.W. Frijlink, *The AAPS Journal*
27 (2010) DOI: 10.1208/s12248-010-9215-z.
28 [20] S. Pieters, T. De Beer, J. C. Kasper, D. Boulpaep, O. Waszkiewicz, M. Goodarzi, C. Tistaert, W. Friess, J.P.
29 Remon, C. Vervaet, Y. Van der Heyden, *Anal. Chem.* 84 (2012) 947–955.
30 [21] R. Remmele, C. Stushnoff, J. Carpenter, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1548–1555.
31 [22] M. Brülls, S. Folestad, A. Sparen, A. Rasmuson, *Pharm. Res.* 20 (2003) 494–499.
32 [23] Y. Peng, P. Wu, *Polymer* 45(2004) 5295-5299.
33 [24] A.G. Asuero, A. Sayago, A.G. Gonzalez, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36(2006) 41 – 59.
34 [25] M. Blanco, J. Cruz, M. Bautista, *Anal. Bioanal. Chem.* 392(2008) 1367–1372.
35 [26] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. 1997. Handbook
36 of chemometrics and qualimetrics: Part A. Amsterdam: Elsevier.
37 [27] M. Blanco, M. Alcalá, J. M. González, E. Torras, *Anal. Chim. Acta* 567 (2006) 262–268
38 [28] H. Grohgan, D. Gildemyn, E. Skibsted, J.M. Flink, J. Rantanen, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 2871-2875.
39 [29] L. Yu, N. Milton, E. G. Groleau, D. S. Mishra, R. E. Vansickle, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 196-198.
40 [30] Y. Xie, W. Cao, S. Krishnan, H. Lin, N. Cauchon, *Pharm. Res.* 25 (2008) 2292-2301.
41 [31] K. Kasraian, P.P. DeLuca, *Pharm. Res.* 12 (1995) 484–490.
42 [32] www.jdsu.com/ProductLiterature/micronir1700-spectrometer-ds-co-ae.pdf
43

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Process settings (shelf temperature and chamber pressure) during an entire freeze-drying process (experiment 3), combined with the product temperature measured using a temperature probe inserted in a freeze-dried sample.

Figure 2. NIR spectra obtained during a) entire freeze-drying process (run 1), and b) for pure components. NIR Spectra are in SNV + Savitzky–Golay smoothing mode. The full spectral range was 9500– 4500 cm⁻¹.

Figure 3. Physicochemical characterization of mannitol polymorph in end-products. a) and c) NIR spectra of α - β -, and δ -mannitol polymorphs in SNV and 1st derivative mode, respectively. b) and d) NIR spectra of end-products for each experiment in SNV and 1st derivative mode, respectively, and e) XRPD of end-products (*) and (+) characteristic diffractions for δ - and hemihydrate mannitol, respectively.

Figure 4. (a) M_{ws} profiles for water and TBA for the first 140 minutes, combined with product temperature against process time. (b) M_{ws} profiles for fenofibrate and mannitol for the first 500 minutes, combined with shelf and product temperatures against process time. (c) M_{ws} profiles for each component of formulation against process time.

Figure 5. Trend plot of Correlation coefficients against process time (Run 3) for first 100 minutes for TBA and b) first 500 minutes for fenofibrate. Pre-treatment used was SNV on full spectral range.

Figure 6. Trend plot two first scores and product temperature. In the first PCA was used the range 9126 – 8659 cm⁻¹ and 1st derivative in full spectral range as pretreatment. a) score 1, t1 (96%) associated to Fenofibrate and b) score 2, t2 (2%) was associated to TBA. Second PCA in the range 7108 – 6300 & 5384 – 4744 cm⁻¹, and SNV in full range as pretreatment. c) score 1, t1 (67%) was associated to mannitol and d) score 2, t2 (32%) was associated to water.

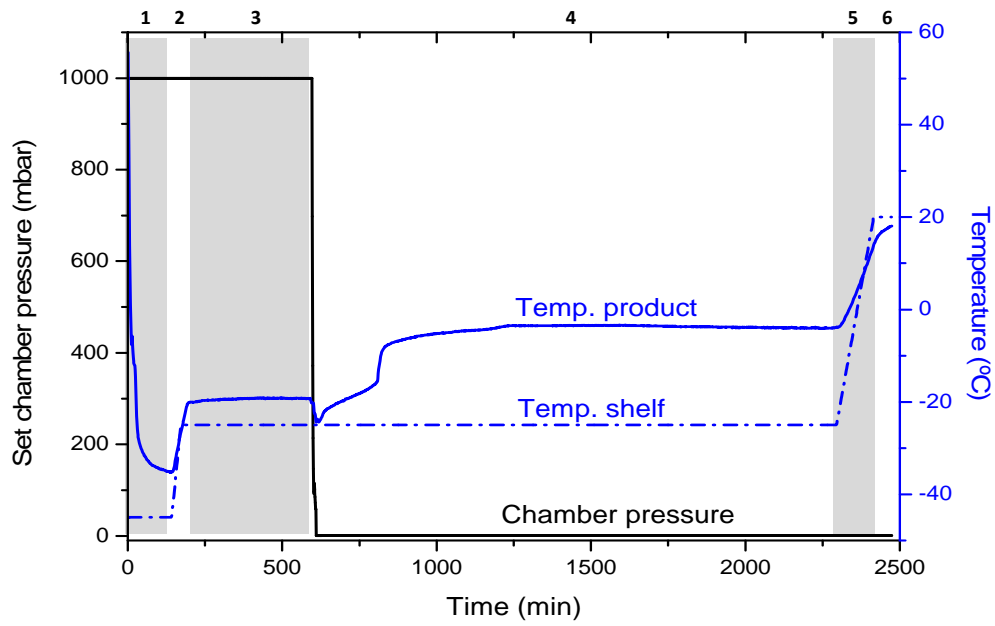


Figure 1. Process settings (shelf temperature and chamber pressure) during an entire freeze-drying process (experiment 3), combined with the product temperature measured using a temperature probe inserted in a freeze-dried sample.

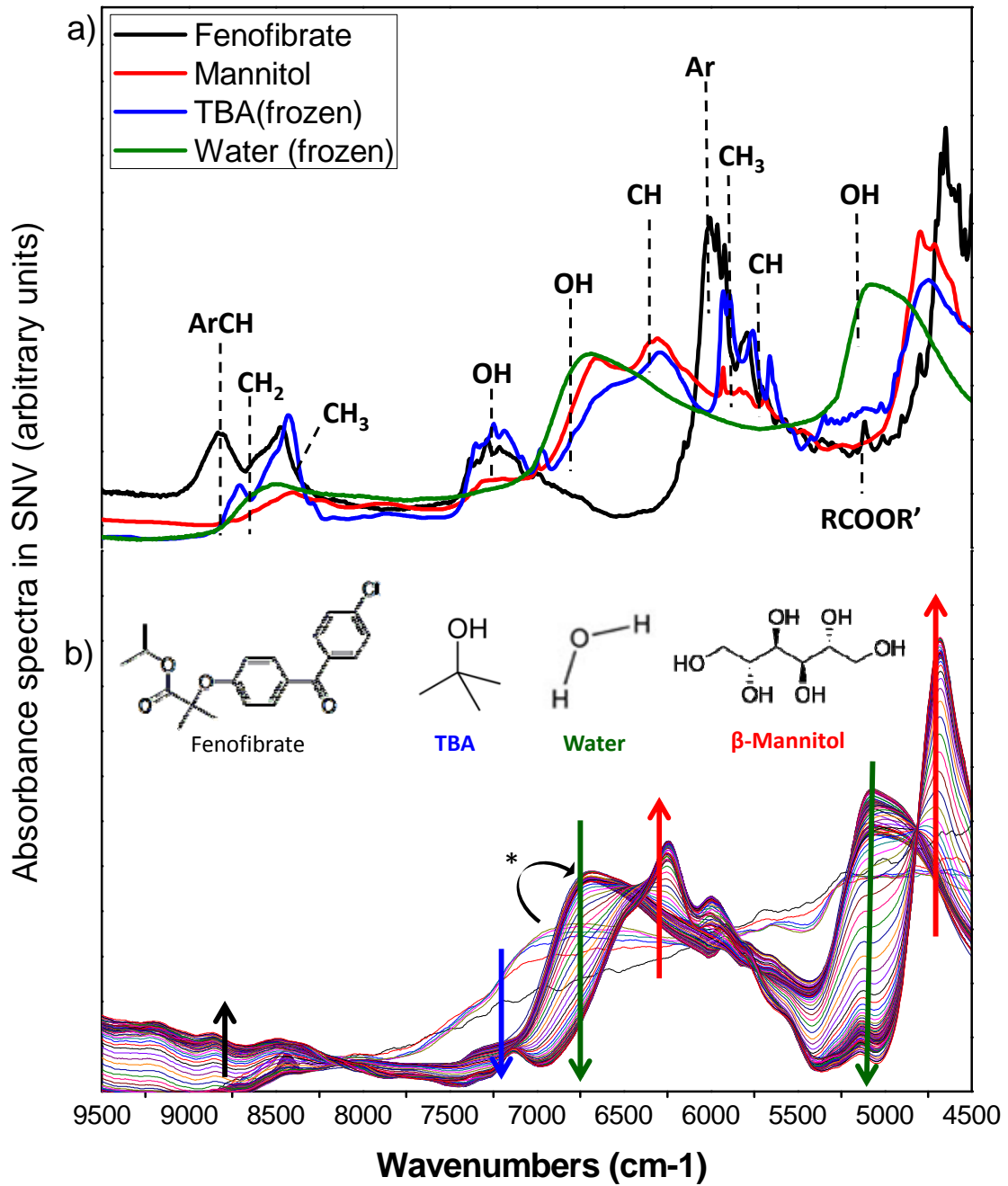


Figure 2. NIR spectra obtained during a) entire freeze-drying process (run 1), and b) for pure components. NIR Spectra are in SNV + Savitzky–Golay smoothing mode. The full spectral range was 9500– 4500 cm⁻¹.

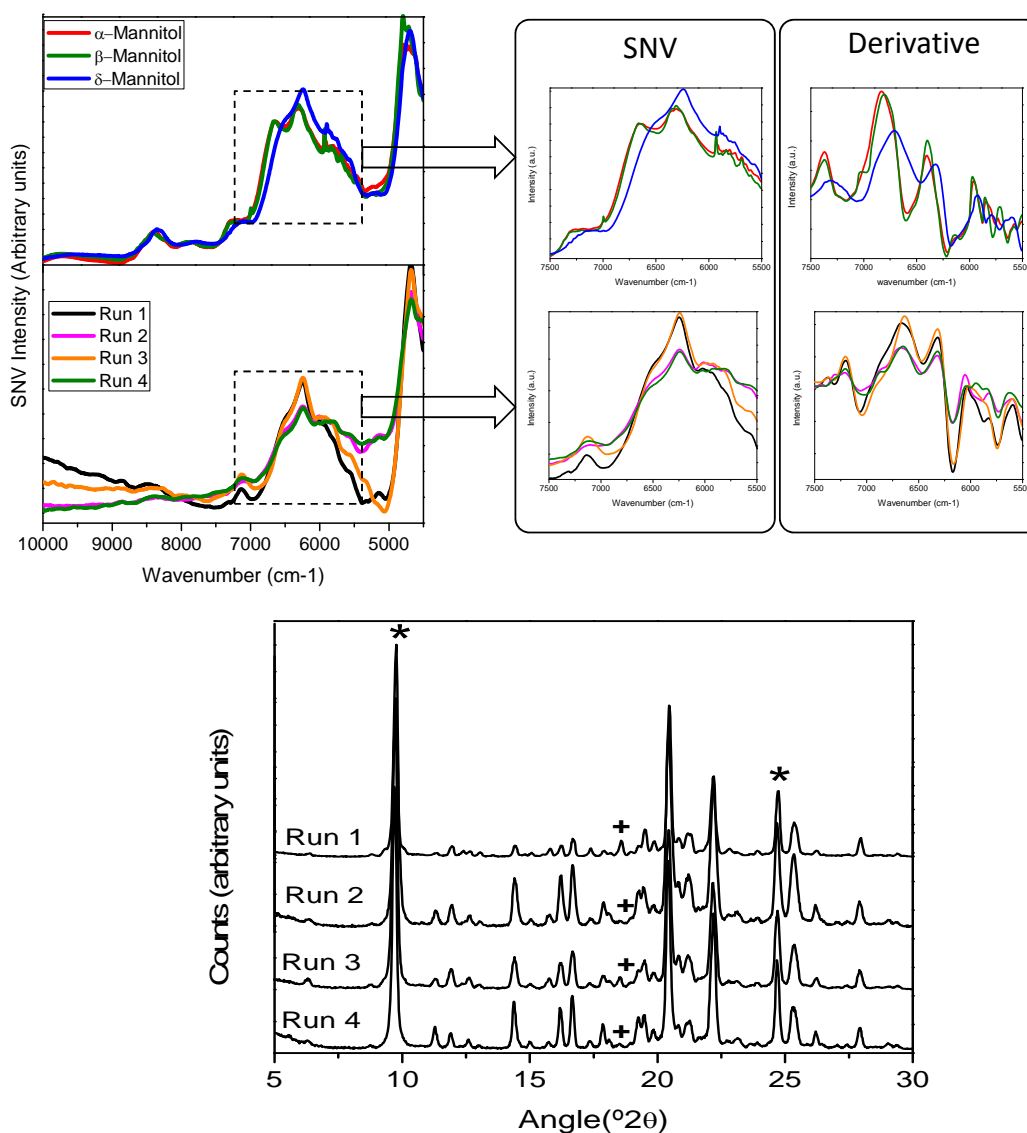


Figure 3. Physicochemical characterization of mannitol polymorph in end-products. a) and c) NIR spectra of α -, β -, and δ -mannitol polymorphs in SNV and 1st derivative mode, respectively. b) and d) NIR spectra of end-products for each experiment in SNV and 1st derivative mode, respectively, and e) XRPD of end-products (*) and (+) characteristic diffractions for δ - and hemihydrate mannitol, respectively.

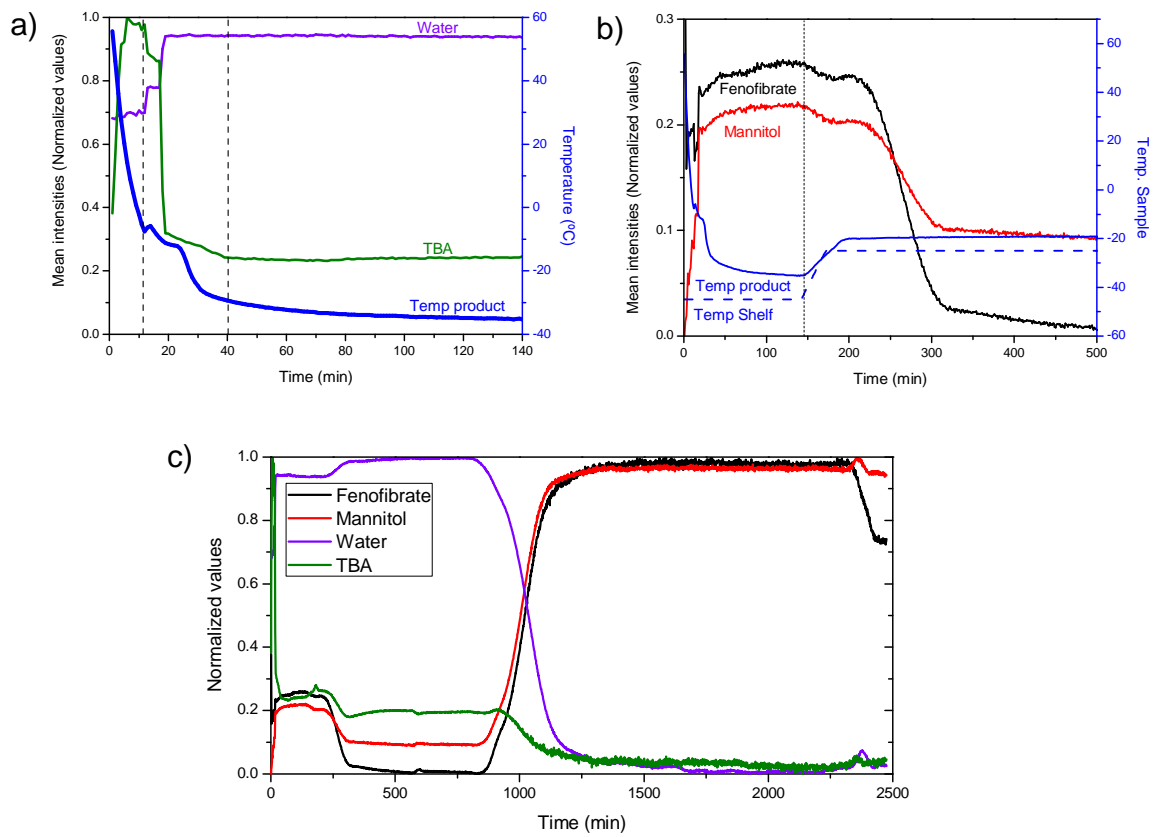


Figure 4. (a) M_{ws} profiles for water and TBA for the first 140 minutes, combined with product temperature against process time. (b) M_{ws} profiles for fenofibrate and mannitol for the first 500 minutes, combined with shelf and product temperatures against process time. (c) M_{ws} profiles for each component of formulation against process time.

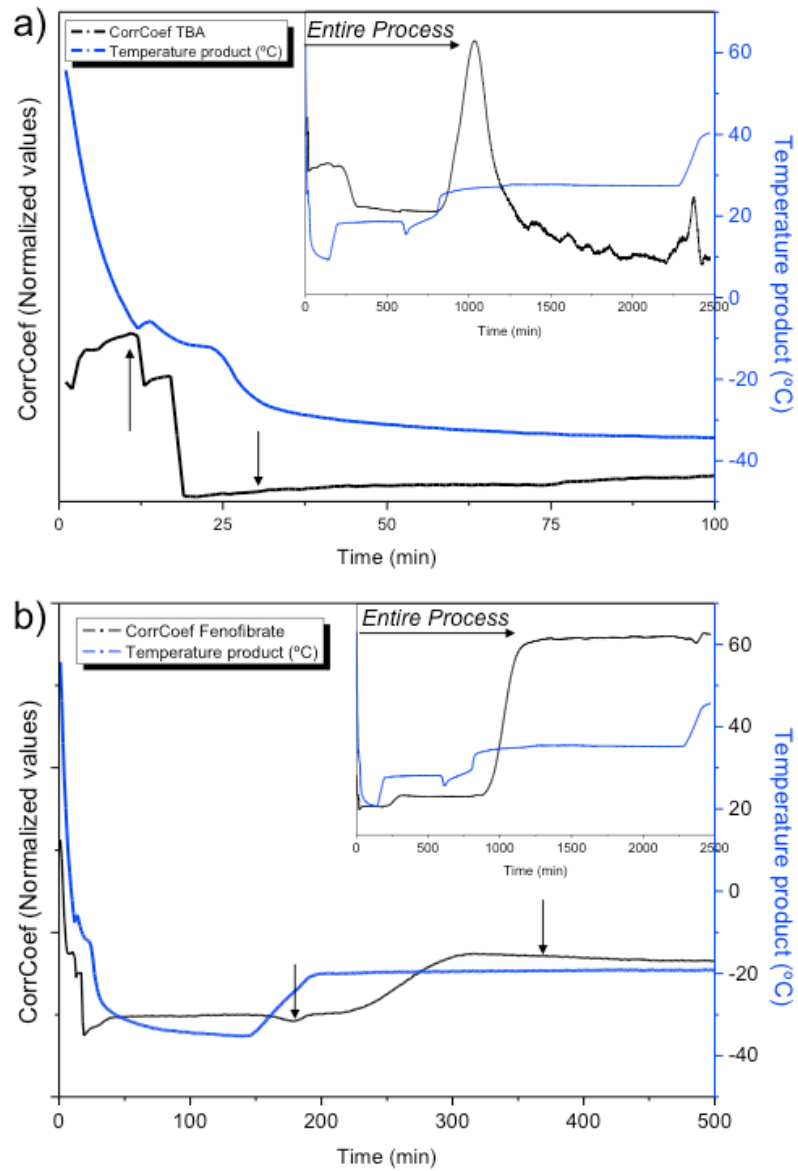


Figure 5. Trend plot of Correlation coefficients against process time (Run 3) for first 100 minutes for TBA and b) first 500 minutes for fenofibrate. Pre-treatment used was SNV on full spectral range.

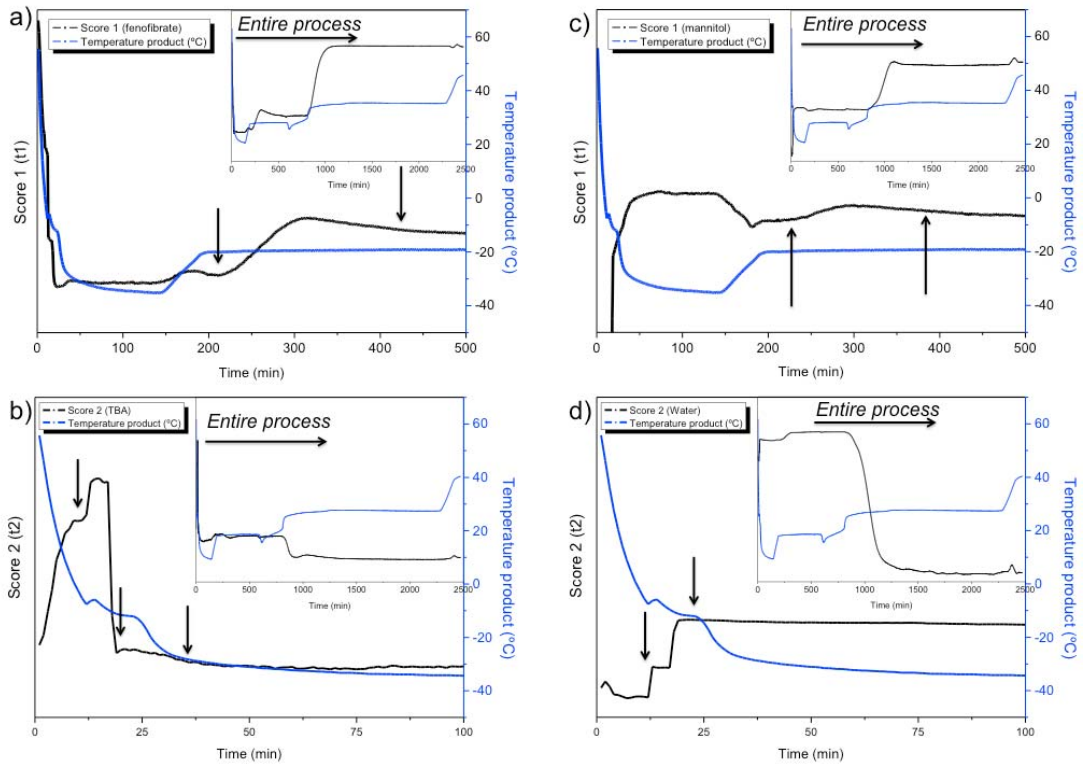


Figure 6. Trend plot two first scores and product temperature. In the first PCA was used the range 9126 – 8659 cm^{-1} and 1st derivative in full spectral range as pretreatment. a) score 1, t1 (96%) associated to Fenofibrate and b) score 2, t2 (2%) was associated to TBA. Second PCA in the range 7108 – 6300 & 5384 – 4744 cm^{-1} , and SNV in full range as pretreatment. c) score 1, t1 (67%) was associated to mannitol and d) score 2, t2 (32%) was associated to water.

Table 1. Process analytical technologies utilized for freeze-drying monitoring

<i>a) Classical technologies</i>				
Technology	Measurement	Invasive	Year	Reference
Mass spectrometry or Residual Gas Analysis (RGA)	Residual Gas	Non	1980	4
Dewpoint Sensor	Moisture content	Yes	1989	5
Resistance Thermal Detectors	Product temperature	Yes	1997	6
Pressure measurement systems (Pirani gauges, capacitance manometers, and thermocouple gauges)	Chamber pressure	Non	1997	6
Manometric Temperature Measurement (MTM)	Product temperature	Non	1997	7
Thermodynamic Lyophilization Control (TLC)	Ice temperature	Non	2000	8
Weighing Systems (Microbalance)	Loss of weight of sample	Non	2001	9
Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy (TDLAS)	Absorption of radiation	Non	2006	10
Thermocouples	Product temperature	Yes	2008	11
Temperature Remote Interrogation System (TEMPRIS)	Product temperature	Yes	2009	12
Plasma emission spectroscopy (Cold plasma ionization device)	Chamber moisture content	Non	2009	12
Dynamic Parameters Estimation (DPE) Model	Product temperature	Non	2009	13
Soft-sensor (Kalman filters)	Product temperature	Yes	2009	13
Neuro-evolutive technique	Temperature and the residual ice content	Non	2012	14
<i>b) Vibrational spectroscopic (only in-line & non-invasive)</i>				
Objectives		Chemometric Method*	Year	Reference
Raman	To evaluate the feasibility of Raman spectroscopy for monitor crystallization and freeze-drying	PCA	2007	15
Raman	To evaluate the suitability of the technique for the in-line and real-time monitoring of freeze-drying processes	PCA MCR	2007	16
Raman & NIR	To use Raman and NIR spectroscopy simultaneously for the in-line and real-time monitoring of a freeze-drying process.	PCA MCR	2009	17
Raman & NIR	To demonstrate the importance of using complementary process analysers (PAT tools) for the process monitoring, analysis, and understanding of freeze drying	PCA MCR	2009	12
Raman	To elucidate the mechanisms of controlled crystallization during freeze-drying.	PCA	2010	19
NIR	To assess whether NIRS may provide relevant information on protein stability and on the influence of lyoprotectants during freeze-drying	AWA	2012	20

*Principal component analysis (PCA); multivariate curve resolution (MCR); apparent water absorbance (AWA)

Table 2. Freeze-drying processes conditions

Description process variables				
Run		Variable 1		Variable 2
		Freezing rate during step 1		Shelf temperature (°C) during step 3
1		Slow (from 20 to -50 at 1°C/min)		-25
2		Slow (from 20 to -50 at 1°C/min)		-15
3		Fast (vial on pre-cooled shelf (-50°C))		-25
4		Fast (vial on pre-cooled shelf (-50°C))		-15
Process conditions				
Step	Process Phase	Length of step (h)	Shelf temperature in freeze drier (°C)	Pressure in freeze drier (mbar)
1	Freezing		Variable 1	1000
		2	-50	1000
2	Ramping to T _c	0.5	Variable 2	1000
3	Crystallization	7	Variable 2	1000
4	Primary Drying	30	Variable 2	0.8-1.0
5	Secondary Drying			
	Ramping to T _{end}	2	20	0.8-1.0
7	Program end	1	20	0.8-1.0
8	Emptying	-	20	1000

T_c=Crystallization temperature

Variable 1 = Freezing rate

Variable 2 = Temperature of the freeze-dryer shelf

Table 3. *CorrCoef* analysis results for mannitol polymorph identification in the freeze-dried end-products.

Run	Correlation coefficients*		
	α -Mannitol	β -Mannitol	δ -Mannitol
1	0.89	0.90	0.96
2	0.90	0.90	0.98
3	0.87	0.87	0.97
4	0.88	0.87	0.96

* Spectral range utilized 7500-5500 cm^{-1} and in SNV mode.

Table 4. Comparison of observed crystallization times by using the three chemometric methods

Method	Component	Run 1		Run 2		Run 3		Run 4	
		Start	End	Start	End	Start	End	Start	End
M _{ws}	Fenofibrate	246	445	264	320	219	421	191	300
	Mannitol	248	450	263	425	225	422	202	302
	TBA	54	70	49	84	12	24	11	32
	Water	59	81	61	84	17	39	13	33
CorrCoef	Fenofibrate	250	449	243	308	213	457	196	259
	Mannitol	247	446	246	425	227	432	200	291
	TBA	59	70	49	87	12	20	12	31
	Water	58	75	61	90	17	23	13	31
PCA	Fenofibrate	228	487	252	328	213	441	199	265
	Mannitol	245	460	245	462	247	432	170	312
	TBA	50	78	48	72	11	43	15	23
	Water	53	84	54	84	12	34	13	34
Range of values	Fenofibrate	228-250	445-487	243-264	308-328	213-219	421-457	191-199	259-300
	Mannitol	245-248	446-474	245-263	425-462	225-247	422-432	170-202	291-312
	TBA	50-59	70-78	48-49	72-87	11-12	20-43	11-15	23-32
	Water	53-59	75-84	54-61	84-90	12-17	23-39	13	31-34

ANEXO VI

A criterion for assessing
homogeneity distribution in
hyperspectral images. Part 1:
Homogeneity index bases and
blending processes

Juan G. Rosas, Marcel Blanco

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

70 (2012) 680 – 690.



A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 1: Homogeneity index bases and blending processes

Juan G. Rosas, Marcelo Blanco*

Applied Chemometrics Group, Departamento de Química, Edificio Cn, Facultad de Ciencias, Universitat Autònoma de Barcelona, 01893 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2012

Received in revised form 12 June 2012

Accepted 20 June 2012

Available online 3 July 2012

Keywords:

Homogeneity

Process analytical technologies (PAT)

Image analysis techniques

Mixing indices

Macropixel analysis

Percent homogeneity

ABSTRACT

The Process Analytical Technologies (PAT) initiative of the US Food and Drug Administration (US FDA) has established a framework for the development of imaging techniques to determine the real-time distribution of mixture components during the production of solid dosage forms. This study, which is the first in a series of two parts, uses existing mixing indices and a new criterion called the “percentage of homogeneity” ($H\%$) to assess image homogeneity. Image analysis techniques use feature extraction procedures to extract information from images subjected to treatments including colour segmentation and binarization. The surface distribution of components was determined by macropixel analysis, which splits an image into non-overlapping blocks of a preset size and calculates several statistical parameters for the resulting divisional structure. Such parameters were used to compute mixing indices. In this work, we explored the potential of image processing in combination with mixing indices and $H\%$ for assessing blending end-point and component distribution on images. As a simplified test, an arrangement of binary and ternary systems of coloured particles was mixed collecting at-line multispectral (MSI) and non-invasive RGB pictures at preset intervals.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mixing is a critical step in the production of solid and semi-solid pharmaceutical formulations. Mixture homogeneity is essential with a view to obtaining products of a high quality and uniform content. All mixing processes should ideally provide a “perfect mixture”, where all components are uniformly distributed in the mass. In practice, this is usually very difficult, especially with powder mixtures, which can contain widely different components; the type of mixer used can also affect the uniformity of the product.

The most common definition of a perfectly random mixture is one in which the probability of finding a particle of a constituent of the mixture is the same for all points in the mixture [1]. Homogeneity in solid mixtures is usually assessed in terms of mixing indices, which are measures of the degree of mixing. Such indices should be independent of the mixing process and readily determined [1]. A number of indices have been reported over the past fifty years, most of which are for binary mixtures (i.e. mixtures of two components) and rely on statistical analysis (mainly on the standard deviation, variance or relative standard deviation of the composition between samples of the same mixture) [1,2].

The pharmaceutical industry typically assesses content uniformity by high performance liquid chromatography (HPLC) [3]. A blend mixture is deemed uniform if its active pharmaceutical ingredient (API) content is within 85–115% of the theoretical value [3] and the relative standard deviation (RSD) between contents in several, simultaneously collected samples meets the specifications (i.e. $RSD < 10\%$) [4]. A number of qualitative and quantitative methods are currently available for the spectroscopic assessment of homogeneity in solid mixtures to monitor mixing processes [5].

The use of imaging techniques in analytical processes is currently expanding at a rapid pace. Some recent technologies have enabled the acquisition of images clearly surpassing greyscale and RGB pictures. Although multispectral imaging (MSI) systems using up to 20 wavelength bands have been used since the 1960s, hyperspectral imaging systems (HSI), which use up to 200 bands, have aroused increasing interest in the industrial sector in recent times. The three common and more reported configurations in HSI devices are: (i) point mapping or point scan (whisker-broom configuration) [6,7], (ii) line mapping or line scan (push-broom configuration) [8], and (iii) global imaging or plane scan (staring imager configuration) [9,10]. The HSI techniques more recognised are Fourier transform infrared (FT-IR), near infrared (NIR) and Raman [8,11–16]. Their applications in determining the concentration of API and excipients have been widely studied, especially with NIR imaging [6,7,10,17]. This technique has been tested and implemented in the monitoring of industrial mixing processes [5,14,15,17–20]. Since the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.
E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

blending process is a dynamic operation, the global imaging setup is more applicable (because it is possible to obtain images in real time) [9].

Despite the expansion of imaging techniques, no clear-cut criterion for mixing homogeneity has to date been established, even though the widely tested classical criteria can provide information about the status of a mixing process in a fast and efficient manner. To the authors' knowledge, no such indices have been used in combination with imaging techniques to assess mixing homogeneity or to identify the end-point of the mixing processes. This study is the first of a two-part study describing the application of mixing indices for assessing the homogeneity of distribution in hyperspectral images. Part one examines the feasibility to use several mixing indices – and a new parameter which we called “percentage homogeneity” ($H\%$) to determine the mixing end-point in blending processes. Part 2 will examine the application of mixing indices and $H\%$ in pharmaceutical solid forms. To this end, in the first part we used both at-line and non-invasive monitoring systems. A custom-built mixing robot was used to ensure repeatability in the mixing process. The robot mixed the components and acquired images at preset intervals throughout the mixing process. The studied mixtures were either binary (two components) or ternary (three components), and were used to identify the most suitable algorithms for assessing homogeneity rather than to solve a specific industrial problem.

2. Image analysis

For this study, three types of images were used: Intensity, RGB and labelled images (binary and ternary images). An intensity image is a data matrix whose values have been scaled to represent intensities. Pixel values of intensity images (e.g. greyscale) used in this part one study were scaled in the range of 0–1. A greyscale image is composed exclusively of shades of grey, varying from black at the weakest intensity to white at the strongest. An RGB colour image is an $M \times N \times 3$ array of colour pixels, where each colour pixel is a triplet corresponding to the red, green and blue components. An RGB image may be viewed as an array of three greyscale images (red, green, and blue colours). Greyscale images can be obtained from RGB images by eliminating the hue and saturation information while retaining only the luminosity layer (e.g. using *rgb2gray* function in Matlab).

A labelled image is an image obtained by labelling every pixel in the image with its clusters obtained from the result of segmentation using, for instance K -means algorithm. The K -means parameters used were: (i) K clusters number (2 and 3 for binary and ternary mixtures, respectively), (ii) squared Euclidean distances, (iii) the method used to choose the initial cluster centroid positions was by selecting randomly K observations from data, and finally (iv) the clustering was repeated 5 times (each with a new set of initial centroids).

A binary image is a logical array of 0s and 1s. From another point of view, a binary image can be defined as a labelled image consisting of two clusters. For reasons of practicality, we will use the name ‘binary images’ for labelled images from mixtures of two components (0 and 1 labels) and ternary images for labelled images from mixtures of three components (1, 2 and 3 labels).

3. Homogeneity and image analysis approach

Defining “perfect homogeneity” in the pharmaceutical realm is no easy task as it depends on factors such as image dimension, API and excipient particle size, and physical properties influencing the distribution of mixture components (viscosity, density, static electricity).

Fig. 1 shows the procedure followed for images processing: (i) RGB images were filtered by adjustment of image intensity values to improve its quality and remove noise (e.g. using *imadjust* function in Matlab), (ii) The K -means algorithm is applied on RGB images to classify the components of mixtures based on pixel values for each colour, (iii) segmented images are obtained (see next section), (iv) binary or ternary labelling images are obtained and finally (v) images are split into macropixels (the statistics of which were used to calculate homogeneity indices).

3.1. Colour-based segmentation by K -means clustering

To use the information for each pixel of a colour image, a transformation from RGB colour space to $L^*a^*b^*$ colour space is necessary. The $L^*a^*b^*$ colour space enables the quantification of the visual differences between colours. The $L^*a^*b^*$ space consists of a luminosity layer ‘ L^* ’, chromaticity-layer ‘ a^* ’ indicating where colour falls along the red-green axis, and chromaticity-layer ‘ b^* ’ indicating where the colour falls along the blue-yellow axis. All of the colour information is in the ‘ a^* ’ and ‘ b^* ’ layers. The difference between two colours can be measured using the Euclidean distance metric.

To classify the colours in ‘ a^*b^* ’ space K -means clustering can be used. Clustering is a way to separate groups of components. K -means clustering treats each component as having a location in space assigning each pixel x_{mn} of the image to the k th cluster, whichever centre is nearest, by minimizing the sum of the squared distances of each pixel to its corresponding centre (Eq. (1)):

$$J = \sum_{K=1}^K \sum_{mn=1}^{MN} \left\| x_{mn}^{(k)} - m_k \right\|^2 \quad (1)$$

where $x_{mn}^{(k)}$ is the nm th pixel and m_k is the centre of cluster k . Application of the algorithm involves the following steps:

- (1) Choosing the number of clusters, k ;
- (2) Generating k clusters and determining the cluster centres;
- (3) Assigning each pixel to the nearest cluster centre;
- (4) Calculating J and recalculating new cluster centres; and
- (5) Repeating 3 and 4 until a convergence criterion is fulfilled.

The main advantage of this k -means algorithm is its simplicity, which avoids the processing of large data sets. On the other hand, the main drawback is a risk of converging to a local minimum and consequently forcing each pixel to belong exclusively to one cluster. Since the colour information exists in the ‘ a^*b^* ’ space, the components are pixels with ‘ a^* ’ and ‘ b^* ’ values and every pixel in the image can be labelled with its cluster using the results from K -means for every component in the image. Finally, using pixel labels, we can separate components by colour, which will result in one segmented image for each colour.

3.2. Macropixel analysis

Macropixel analysis was introduced as a measure of image heterogeneity based on pixel clusters (Fig. 2) [21]. This technique splits an image into N non-overlapping square pixels from which quantitative information can be extracted via within- and between-macropixel statistics (e.g. mean, standard deviation and variance). Obviously, the lowest is the standard deviation of the macropixel means, the most representative sampling will be.

Each macropixel can be viewed as a sample from a larger population (the whole image), thus the distribution of components on the image surface can be assessed by comparing macropixels. Obviously, if the macropixels of an image are all very similar,

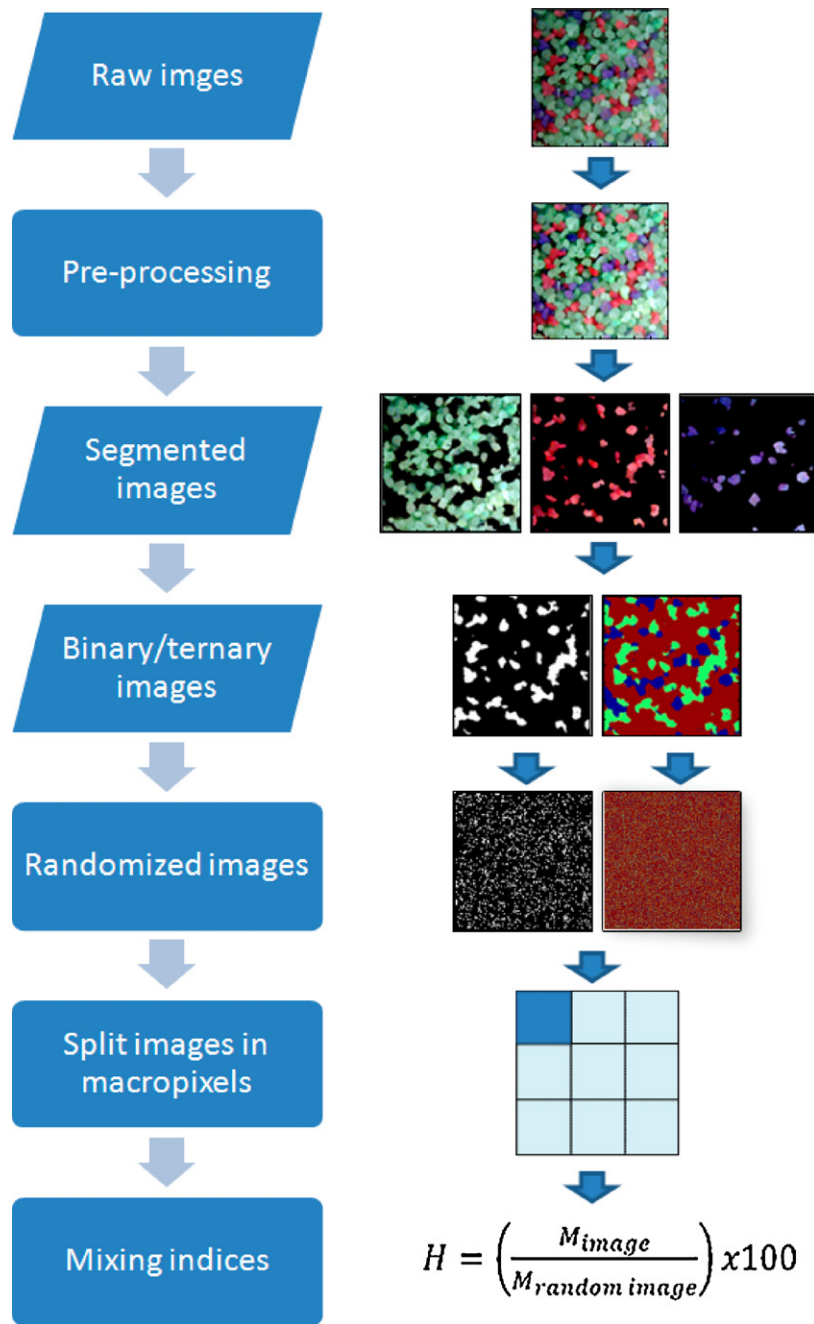


Fig. 1. Steps to determine homogeneity on images.

Table 1
Equations for performing macropixel analysis to assess homogeneity.

Statistic	Within macropixels	Between macropixels
Mean	$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$	$\bar{M}_{Sd} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Sd_i \quad (5)$
Standard deviation	$Sd = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2} \quad (3)$	$\sigma_m = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\bar{X}_i - Mt)^2} \quad (6)$
Variance	$Var = Sd^2 \quad (4)$	$Var_m = \sigma_m^2 \quad (7)$
Where,	\bar{X} = mean of pixels intensity n = number of pixels, x_i = pixel value, Sd = standard deviation of pixels intensity, Var = variance of pixels intensity	\bar{M}_{Sd} = average of standard deviations of macropixels in the image, Sd_i = standard deviation of each macropixel N = overall number of macropixels in the image, σ_m = standard deviation of macropixel means, \bar{X}_i = mean of each macropixel, Mt = average of macropixel means Var_m = variance of macropixel means

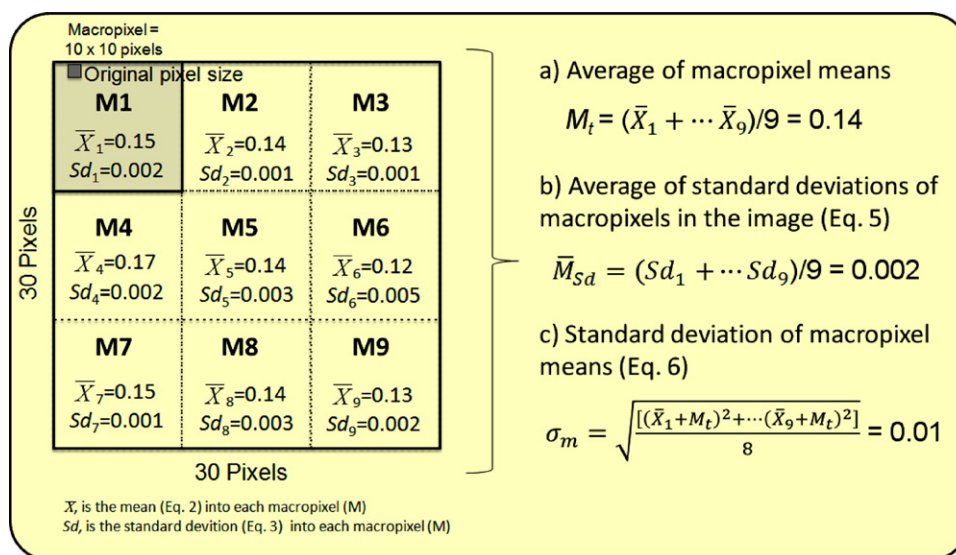


Fig. 2. Macropixel analysis used to extract statistical parameters from an image.

the image would have a homogeneous distribution. This can be checked by comparing the mean (\bar{X}) and standard deviation (Sd) of the image macropixels, and using the standard deviation (σ_m) and variance (Var_m) of the macropixel means. For facilitate comprehension of the analytical process, Table 1 and Fig. 2 summarize the equations used in macropixel analysis to determine mixing indices.

3.3. Degree of mixedness

3.3.1. Binary mixtures

The classical notions of homogeneity in mixtures can be extrapolated to image analysis in terms of macropixels. Instead of statistical information about the whole image, the procedure uses statistics for each macropixel and compares them to approximate homogeneity in the whole image.

Traditionally, the theoretical variance of a binary mixture in the segregated state, i.e. non-homogeneous (σ_o^2) and the totally random or homogeneous state (σ_r^2) are given by Eqs. (8) and (9.1), respectively (Table 2) [1]. These equations can be directly adapted to image analysis. Obviously, σ_r^2 will approach zero as macropixel size (M_s) increases or equals image size.

The first reported mixing index, segregation intensity (S), was introduced by Dankwertz [22] in 1952, as a measure of uniformity in solid mixtures. The original index and its image-adapted version are defined in Eqs. (10.1) and (10.2), respectively (Table 2). A S value of 1 corresponds to a totally segregated state and one of 0 to a totally random state. In 1954, Lacey introduced the mixing index (M) to assess mixture homogeneity [23]. This index has been widely discussed and used [1]. The original index (M) and its image-adapted version (M_L) are defined in Eqs. (11.1) and (11.2), respectively (Table 2). For a real-life image, M_L ranges from 0 (totally segregated) to 1 (totally random). Another useful and more discriminating index was proposed by Poole et al. [24], which in practice tends to unity in totally random images. Its original (M) and image-adapted versions of the index (M_p) are defined in Eqs. (12.1) and (12.2), respectively (Table 2).

3.3.2. Multicomponent mixtures

Although the above-described indices have been widely used on binary systems, most real-life mixtures contain more than two components. In response to this problem, Gayle et al. [25] used the chi-square statistic to calculate mixing indices for multicomponent

mixtures with good results. The distribution of components of a mixture on the image surface can be similarly calculated, albeit with provision for the content of each mixture component in each macropixel:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E} \quad (13)$$

where, χ^2 is the chi-squared statistic, O the observed frequency and E the expected frequency.

For multicomponent mixtures, Gayle et al. [25] adapted the equation for the segregation index (S) by using χ^2 values. Using this χ^2 approach we also adapted the Lacey index (M_x). The original (S) and image-adapted (S_x) equations of the segregation index and image-adapted Lacey index (M_x) are defined in Eqs. (14.1)–(14.3), respectively (Table 2). Note the upper and lower limits of chi-square (χ_o^2 and χ_r^2 respectively). Gayle et al. [25] demonstrated that for a mixing process of three components, before the mixing process starts, the χ_o^2 value is maximum and equals to the number of degrees of freedom multiplied by the number of particles counted on each sample (in image processing can be used concentrations values). It was also observed that during mixing process chi-square value decreased (asymptotically), considering χ_r^2 value (for random mixture) equal to the number of degrees of freedom. Note that, one or both limits will change if the number of components, number of samples or number of particles counted per sample change.

A different alternative to calculate σ_r^2 in multicomponent mixtures was proposed by Stange [26] in 1963, however, its estimation is complicated and for this reason was avoided in this study. Another approach proposed by Walker and Rollins [27] uses multivariate analysis of variance (MANOVA) to calculate segregation indices for multicomponent mixtures and found it to be highly sensitive to changes in the variance source – and hence highly prone to interpretation errors, so it was also avoided here.

In practice, a multicomponent system can be viewed as a mixture of the most important component (i.e. the API) and all others (the excipients), and thus be dealt with as a binary mixture [28], which can simplify calculations by using equations for binary mixtures.

3.3.3. Percent homogeneity (H%)

By definition, a mixture is deemed homogeneous when its components are distributed in a totally random manner [29]. The

Table 2
Originals and adapted equations to determine mixing indices.

Parameter	Original equations	Reference	Adapted to image analysis
Theoretical variance at completely segregated	$\sigma_o^2 = p(1-p)$ (8)	[1]	
Theoretical variance at randomly mixed	$\sigma_r^2 = \frac{p(1-p)}{n}$ (9.1)	[1]	$\sigma_r^2 = \frac{p(1-p)}{n}$ (9.2)
Segregation index	$S = \frac{\sigma^2 - \sigma_r^2}{\sigma_o^2 - \sigma_r^2}$ (10.1)	[17]	$S = \frac{\sigma_m^2 - \sigma_r^2}{\sigma_o^2 - \sigma_r^2}$ (10.2)
Lacey index	$M = \frac{\sigma_o^2 - \sigma_r^2}{\sigma_o^2 - \sigma_r^2}$ (11.1)	[18]	$M_L = \frac{\sigma_o^2 - \sigma_m^2}{\sigma_o^2 - \sigma_r^2}$ (11.2)
Poole index	$M = \frac{\sigma}{\sigma_r}$ (12.1)	[19]	$M_P = \frac{\bar{M}_{Sd}}{\bar{M}_{Sd-rdn}}$ (12.2)
Segregation index using chi-square	$S = \frac{\chi_o^2 - \chi_r^2}{\chi_s^2 - \chi_r^2}$ (14.1)	[20]	$S_\chi = \frac{\chi_o^2 - \chi_r^2}{\chi_o^2 - \chi_r^2}$ (14.2)
			$M_\chi = \frac{\chi_o^2 - \chi^2}{\chi_o^2 - \chi_r^2}$ (14.3)

Where,
 p and $(1-p)$ are the proportions of components (mass fractions) determined from samples
 n = number of particles in each sample
 σ_o = standard deviation of mixture before mixing
 σ_r = standard deviation of complete random mixture
 σ = observed standard deviation
 S = segregation index for chi-square
 χ_o^2 = observed chi-square for any mixture
 χ_r^2 = expected chi-square for random mixture
 χ_s^2 = expected chi square for segregation mixture

n = number of pixels in each macropixel
 σ_o = standard deviation of mixture before image
 σ_r = standard deviation of complete random image
 σ_m = standard deviation of macropixel means (see Eq. (6))
 \bar{M}_{Sd} = average of standard deviations of macropixels for real image
 \bar{M}_{Sd-rdn} = average of standard deviations of macropixels for randomized image (see eq.5)
 S_χ and M_χ = segregation and Lacey indices for chi-square
 χ_o^2 = observed chi-square for any mixture
 χ_r^2 = expected chi-square for random mixture
 χ_s^2 = expected chi square for segregation mixture

absence of homogeneity references for image processing led us to develop a parameter allowing the homogeneity indices for an image to be compared with a random version obtained from the same pixels. Because the random image exhibits a totally random distribution, it can be used as a reference. An example of random image generation is shown in Section 5.2.

The ratio of the mixing index (M_{image}) for an image and its randomized version ($M_{random.image}$) is called the “homogeneity ratio”. The percentage homogeneity, $H\%$, is the result of multiplying the homogeneity ratio by 100 (Eq. (15)). Since Poole index (M_P) is the ratio of \bar{M}_{Sd} of real and randomized images and in order to compare results with Lacey index (M_L), M_P was directly multiplying by 100 (Eq. (16)).

$$H\%_{Lacey} = \left(\frac{M_{L.image}}{M_{L.random.image}} \right) \times 100 \quad (15)$$

$$H\%_{Poole} = (M_P) \times 100 \quad (16)$$

Table 3
Description and conditions for mixing processes.

Run N	Particle size ^a	Mixture matrix	Key component content (%)	Image acquisition	Number of images acquired ^b	Nature of image
1	Small	Binary	30	At-line	40	Multispectral
2	Small	Binary	40	At-line	40	Multispectral
3	Medium	Binary	10	At-line	40	Multispectral
4	Medium	Binary	20	At-line	40	Multispectral
5	Medium	Binary	40	At-line	40	Multispectral
6	Large	Ternary	20	Non-invasive	100	RGB
7	Large	Ternary	45	Non-invasive	100	RGB
8	Large	Ternary	20	Non-invasive	100	RGB
9	Large	Ternary	20	Non-invasive	100	RGB
10	Large	Ternary	50	Non-invasive	100	RGB

All runs were carried out at 180 RPM.

^a Small = 26; medium = 180 and large = 1000 pixels of surface area by particle.

^b Images acquired during entire mixing process.

In practice, M_{image} and $M_{random.image}$ are smaller than 1, actually $M_{random.image}$ is close to unity, but is not always 1. Obviously, the closest $H\%$ is to 100, the more near-random the component distribution of a mixture, and the more homogeneous the mixture, will be.

We adopted an $H\%$ threshold of 95% as the criterion for deeming a mixture homogeneous.

4. Experimental

4.1. Samples

We used coloured sand (SiO_2) with three different particle sizes (see Table 3). The mean diameter for small, medium and large particles were 380, 600 and 2000 μm , respectively, and their size in pixel area units 26, 180 and 1000 pixels, respectively [30]. Binary and ternary mixtures of known composition were prepared on the basis of the percentage weight of each component.

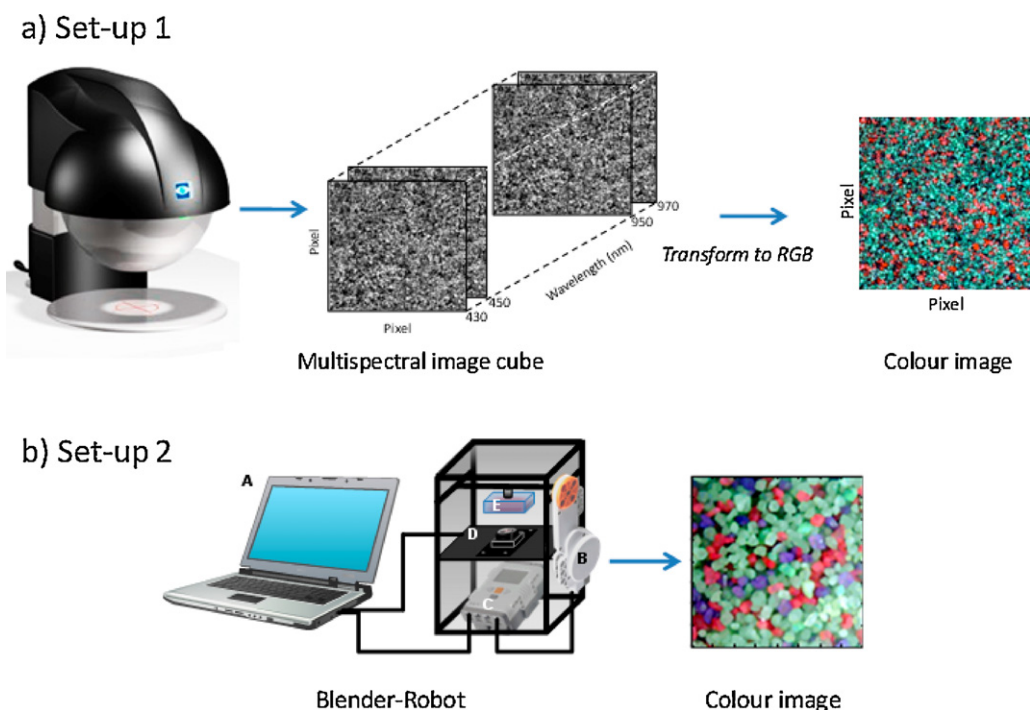


Fig. 3. Diagram of two setups used for recording images from mixing processes (a) Set-up 1, with multispectral camera and (b) Set-up 2, with miniature blender robot built for experiments. (A) PC computer with MATLAB v 7.9 (The MatWorks, Massachusetts, USA), (B) Interactive Servo Motor and (C) NXT Intelligent Brick (Mindstorms NXT 2.0, Lego group, Denmark), (D) Webcam (Logitech International S.A., USA) and (E) blender for sample.

4.2. Equipment

We used a miniature blender robot controlled in the MATLAB environment (MATLAB v. 7.9, The Matworks, Massachusetts, USA) to examine and understand the mixing process with imaging techniques, as well as to ensure repeatability in the mixing. The robot was constructed with Mindstorms NXT 2.0 from Lego Group (Billund, Denmark).

The experimental set-up used for at-line (Set-up 1) and non-invasively (Set-up 2) recording of images during mixing processes is shown schematically in Fig. 3.

In Set-up 1 (Fig. 3a), MSI were acquired by using a VideometerLab camera from Videometer A/S (Hørsholm, Denmark). The equipment, which includes a camera, light emitting diodes (LEDs) and an integrating sphere, produces completely diffuse light that avoids shadows and specular reflections. The system acquires multispectral images by means of fast strobe illumination from the LEDs at up to 18 different wavelengths (from 430 to 970 nm with variable spectral resolution) and with a spatial resolution of $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ per pixel. The camera resolution was 1280×960 pixels.

In Set-up 2 (Fig. 3b), digital images were obtained with a conventional digital webcam from Logitech International (Apples, Switzerland) that was positioned vertically at a distance of 5 cm from the sample (see Fig. 2). The camera resolution was 480×640 pixels and the spatial resolution was $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ each pixel.

Due to the size of multi-spectral and RGB images being different; the original images were cropped to 400×400 pixels for calculations.

4.3. Mixing processes and image acquisition

To carry out the mixing processes, a rectangular transparent blender with a total capacity of 20 g was used. To facilitate the movement of the particles, the blender was loaded 75% its capacity, i.e. with 15 g of sample. A total of 10 runs were performed to

simulate binary and ternary mixing processes by using a blender at 180 rpm. Three different particle sizes were used in the mixtures.

In Set-up 1, the structure of the blender-robot did not allow for the non-invasive acquisition of images with VideometerLab camera, consequently we decided to withdraw the sample manually. Considering that withdrawing and reintroducing the sample (into the blender) produced an additional mixing effect; only 40 images were recorded at-line and after 3 rotations during the mixing process.

In Set-up 2, digital images of ternary mixtures were recorded automatically and non-invasively. An RGB image was recorded after 3 rotations of the blender. For each non-invasively blending process 100 RGB images were recorded. The set-up and conditions for mixing processes are described in Table 3.

5. Results and discussion

5.1. Image pre-processing and estimation of concentrations

The difference in resolution of the two cameras and sample size in each recorded image led us to crop the original images to an identical size of 400×400 pixels. In MSI images, intensity image at specific-selected wavelength (WI) can be used, for example in Fig. 4 is shown that red sand (key component) was correctly differentiated at 700 nm (WI_{700}). In same figure are also shown, spectra of pure components and three binary mixtures (mean spectra of entire image) at different concentrations of the key component. Images were filtered and normalized (intensity range 0–1).

RGB images (Fig. 4b) were obtained from MSI images by combining the wavelengths corresponding to the primary colours red ($\lambda_r = 630 \text{ nm}$), green ($\lambda_g = 505 \text{ nm}$) and blue ($\lambda_b = 470 \text{ nm}$). K-Means algorithm was applied to RGB images to cluster the pixels (one cluster per component in mixtures); finally we obtained segmented images for each component (as shown Fig. 1). The ratio between the number of pixels in each cluster and total number of pixels in the entire image allowed us to estimate the concentrations of

Table 4
Estimate of concentrations (%) after different period of the mixing process by image segmentation.

Run <i>N</i>	Expected concentration K–E1–E2	Mixing process stages								
		Beginning (L1)			Middle (L2)			End (L3)		
		K	E1	E2	K	E1	E2	K	E1	E2
1	30–70	89.5	10.5	–	29.7	70.3	–	28.5	71.5	–
2	40–60	90.2	9.8	–	35.8	64.2	–	37.3	62.7	–
3	10–90	33.4	66.6	–	12.2	87.8	–	12.4	87.6	–
4	20–80	32.7	67.3	–	15.7	84.3	–	20.9	79.1	–
5	40–60	23.1	76.9	–	46.1	53.9	–	36.4	63.6	–
6	20–75–05	58.4	4.1	37.4	22.3	73.2	4.5	21.8	73.4	4.8
7	45–40–15	41.5	13.6	45.0	43.9	39.5	16.6	45.8	37.7	16.5
8	20–65–15	60.6	21.8	17.6	22.8	62.5	14.6	23.7	58.4	17.6
9	20–70–10	29.1	8.9	61.8	22.6	62.6	14.5	17.4	71.5	11.0
10	50–40–10	48.1	39.5	12.0	50.9	34.2	14.7	50.8	33.9	15.1

K: key component; E1 and E2: excipients.

each component. The estimation of these concentrations is shown in Table 4. As can be seen in the results, the concentrations are very close to the theoretical values (especially at the end of the process), these values will be used later in the chi-square approach to calculate mixing indices in multicomponent mixtures (Section 5.4). The RGB images were binarized and ternarized, using the results of K-means analysis.

5.2. Macropixel size selection

Prior to splitting an image into macropixels, the optimal macropixel size for accurately discriminating between homogeneous and non-homogeneous images had to be established. To this end, we split the images in non-overlapping square macropixels ($n \times n$). The variances and mixing indices for three images were calculated and plotted as a function of macropixel size. Fig. 5 shows the criterion used to select the macropixel size (M_s) for three mixing processes involving different particle sizes (runs 1, 4 and 9) and application of the Lacey index (M_L) and variances (σ^2) between macropixels. Each graph comprised three binary images obtained at the beginning, I_1 (non-homogeneous sample), at the middle (I_2), and at the end of the process, I_3 (near-homogeneous sample). The end of the mixing process was determined immediately after 40 and 100 images for at-line and non-invasively setups, respectively. Unity values of M_L correspond to perfectly random mixtures and close to zero values correspond to non-homogeneous mixtures. As

can be seen from Fig. 5a, c and e, M_L values for I_1 were significantly different from I_2 and I_3 (near-unity values), showing that the degree of homogeneity increases with respect to process progression; this indicates that the M_L index accurately discriminates between process stages (i.e. degree of homogeneity). The variance (Fig. 5b, b, and f) should be close to zero as much as possible. As can be seen variance for I_1 decreases, while the macropixel size increases during mixing processes. The optimal-identified macropixel size depends on particle size; thus, the smallest particles required using 50×50 macropixels, those of intermediate size 80×80 macropixels and the largest particles 200×200 macropixels. We obtained similar results with M_p and S indices (graphs not shown). Larger macropixels failed to discriminate between homogeneous and heterogeneous samples in terms of M_L index or the variance.

5.3. Mixing indices for two component mixtures (binary mixtures)

The mixing indices for all experiments were calculated from binary images. Each calculation was performed by using the optimal macropixel size for each particle size. Ternary mixtures (runs 6–10) were transformed into “pseudo-binary images”, where the key component pixel values were equal to 1 and assuming the rest as excipients (pixel values 0). In order to estimate the mixing indices (M_L , M_p and S), randomized images (Irdn) were obtained by triplicate – to get a robust estimation of SD – from real images (I) by using the following matlab code:

```

» a = reshape(I,400*400,1); % Image I is unfolded
» b = randsample(a,400*400); % pixels of I are randomly arranged
» Irdn = reshape(b,400,400); % randomized image is generated

```

The only index that compares the standard deviations of the image with those of its randomized image is Poole index (see respective equations in Table 2). One of our aims has been to express the relative homogeneity of an image regarding its randomized image. We called this index “percentage of homogeneity” ($H\%$), which may provide a quantitative criterion about how homogeneous an image is homogeneous (in comparison with the randomized image). The results of mixing indices and $H\%$ at the beginning, middle and at the end of processes are shown in Table 5. As seen, M_L and M_p values increase during the process while the segregation index decreases.

$H\%$ was used to express the homogeneity of the images, this value can be calculated for binary images and intensity images at specific wavelength ($WI_{700\text{nm}}$) where the key component absorbs and allows for the differentiation of the two components of the mixture. As can be seen in Fig. 6a, using the $H\%_{\text{lacey}}$, the homogeneity was reached before in the case of $WI_{700\text{nm}}$ images than

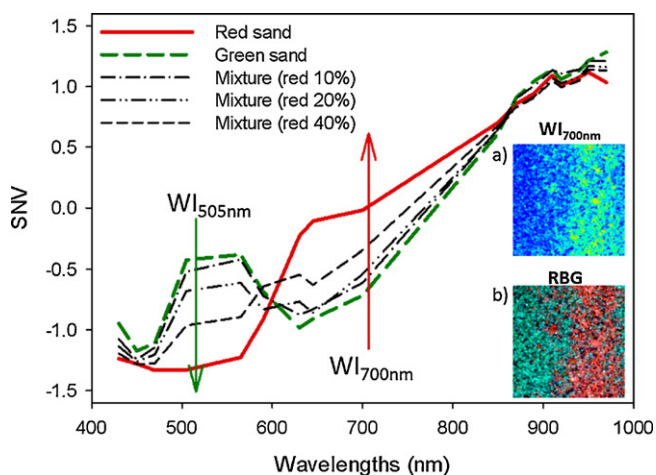


Fig. 4. Mean spectra of binary mixtures (runs 3, 4 and 5) and pure spectra of red (key component) and green component. (a) Specific-selected wavelength image for key component (WI_{700}) and (b) RGB image (both images are after 6 revolutions for mixture at 40% of key component). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

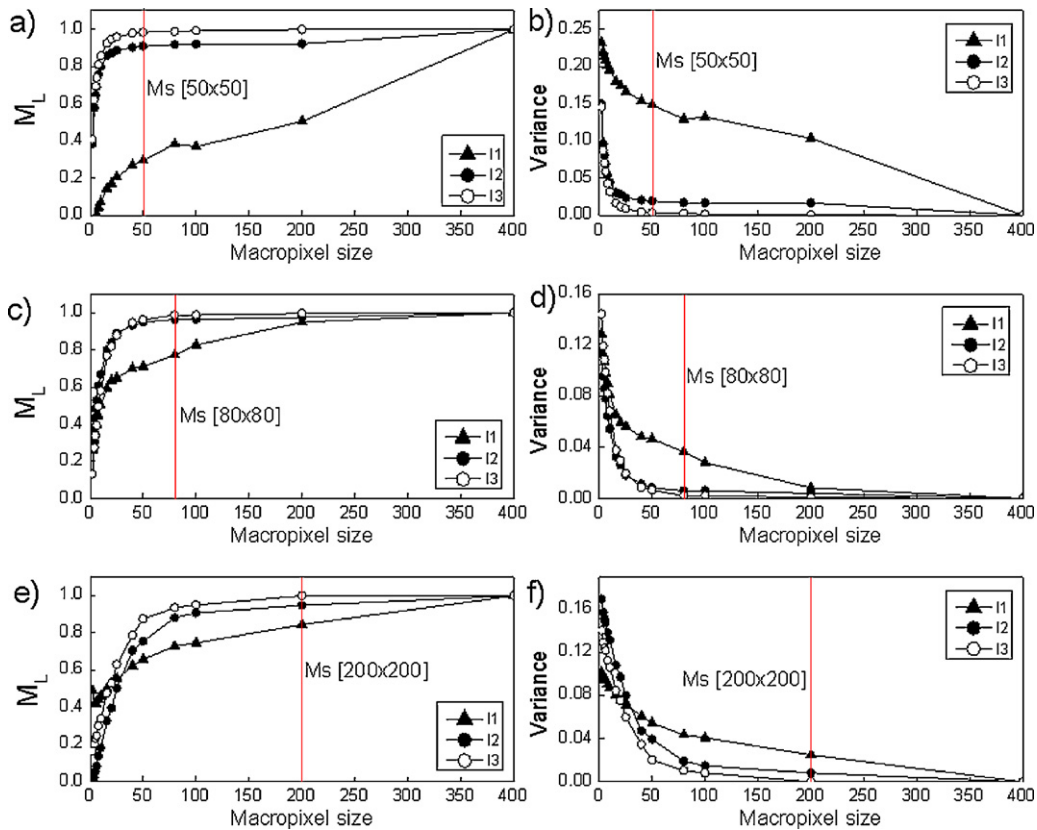


Fig. 5. Criterion for the selection of optimal macropixel size (Ms) in mixing processes involving different particle sizes. (a) Lacey index (M_L) and (b) variance (σ^2), respectively vs. Ms for Run 1 (small particle size), (c) M_L and (d) σ^2 , respectively vs. Ms for Run 4 (medium particle size), and finally (e) M_L and σ^2 , respectively vs. Ms for Run 9 (large particle size). I1 = start, I2 = middle and I3 = end of mixing process.

the binary one. On the other hand, for $H\%_{poo\ell e}$, both images behave a similar manner. Therefore, $H\%_{Lacey}$ appears to be unsuitable for intensity images, whereas $H\%_{poo\ell e}$ is suitable for both binary and intensity images. An identical conclusion was reached for $H\%_{Lacey}$ and $H\%_{poo\ell e}$ with medium-sized particles (Fig. 6b). Furthermore for small particles, $H\%_{Lacey}$ is only useful with binary images, whereas $H\%_{poo\ell e}$ can be used with both types of images, whatever the particle size.

The effect of the particle size on the $H\%_{poo\ell e}$ and $H\%_{Lacey}$ was evaluated using similar key component concentration (40–45%). As

can be seen from Fig. 7a, $H\%_{Lacey}$ was close to 100% after 45 rotations for small and medium particle sizes, but for larger homogeneity is achieved after 63 rotations. On the other hand, $H\%_{poo\ell e}$ was identical for the three particle sizes after 45 rotations.

The effect of the key component content on mixing indices was evaluated by observation of mixing processes at three concentrations (10, 20 and 40%), and using a medium particle size. In all case we used a macropixels size of 80×80 pixels. Fig. 7b shows as $H\%_{Lacey}$ and $H\%_{poo\ell e}$ become constant after 30 rotations for 40% key component (white circle) while with 20% key component (black

Table 5
Homogeneity indices for overall experiments during mixing process using binary images.

Stage	Indices	Run number									
		Small particles		Medium particles			Large particles				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Beginning	Lacey (M_L)	0.29	0.59	0.83	0.93	0.64	0.54	0.66	0.48	0.85	0.06
	$H\%_{Lacey}$	29.4	58.9	83.0	93.2	63.7	54.4	65.6	47.9	84.5	5.6
	Poole (M_p)	0.54	0.68	0.96	0.97	0.75	0.42	0.60	0.85	0.65	0.38
	$H\%_{poo\ell e}$	54.1	68.2	96.1	97.4	74.8	42.3	60.2	85.0	65.0	37.7
	Segregation (S)	0.71	0.41	0.17	0.07	0.36	1.54	0.34	0.52	0.15	1.06
Middle	Lacey (M_L)	0.91	0.97	0.99	0.96	0.98	0.99	0.99	0.98	0.95	0.97
	$H\%_{Lacey}$	90.8	96.6	98.5	96.3	97.8	98.8	99.1	98.0	94.8	97.3
	Poole (M_p)	0.94	0.98	0.99	0.96	0.99	0.99	1.00	0.99	0.97	0.99
	$H\%_{poo\ell e}$	94.4	98.1	98.7	95.8	98.9	99.1	99.6	99.1	97.4	99.0
	Segregation (S)	0.09	0.03	0.01	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.05	0.03
End	Lacey (M_L)	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	1.00	0.97	1.00	0.99
	$H\%_{Lacey}$	97.7	97.7	98.6	98.6	98.2	99.2	99.6	96.6	99.9	98.6
	Poole (M_p)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00	0.98	1.00	0.99
	$H\%_{poo\ell e}$	98.5	98.7	98.7	98.9	99.0	99.4	99.8	98.4	99.9	99.5
	Segregation (S)	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.03	0.00	0.01
Key component (%)		30	40	10	20	40	20	40	20	20	50

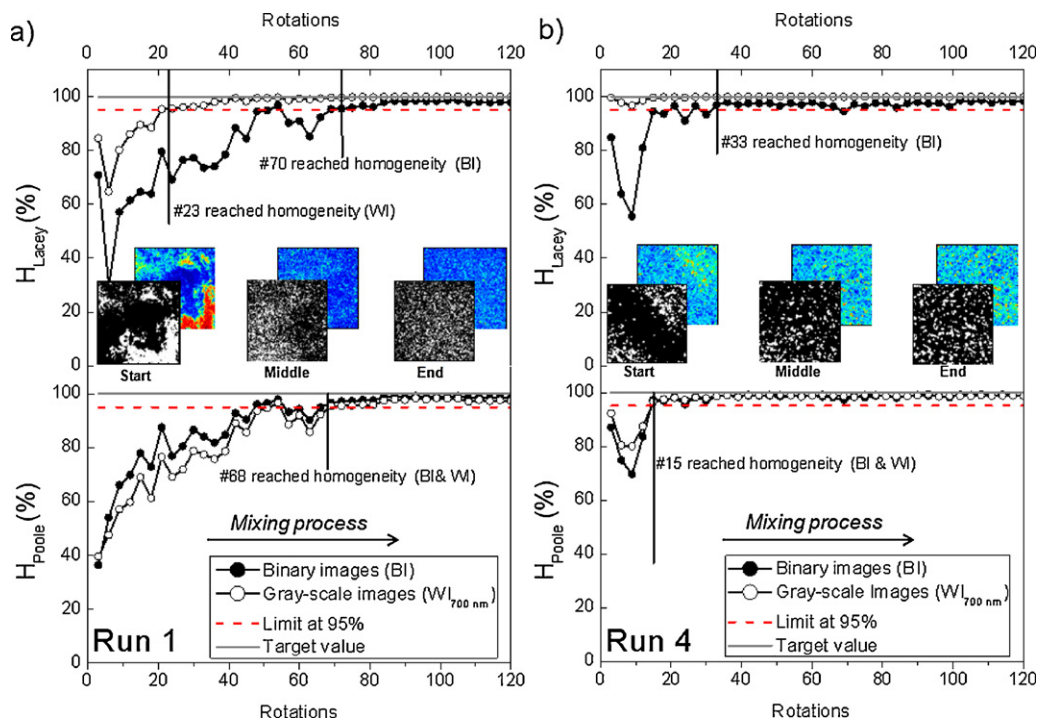


Fig. 6. Percentage of homogeneity ($H\%_{Lacey}$ and $H\%_{Pooler}$) using binary and grey-scale images: (a) mixing process with small particle size (Run 1) and (b) mixing process with medium particle size (Run 4).

circle) it becomes constant later, after 70 rotations; changes are may be due to variability in the process or natural deviation in the $H\%_{Pooler}$. Therefore, the key component concentration has no significant effect on $H\%_{Lacey}$ or $H\%_{Pooler}$ for mixtures with similar particle size.

5.4. Mixing indices for multicomponent mixtures (ternary mixtures)

The previously described indices have been widely used with binary mixtures; however, calculating theoretical variances for

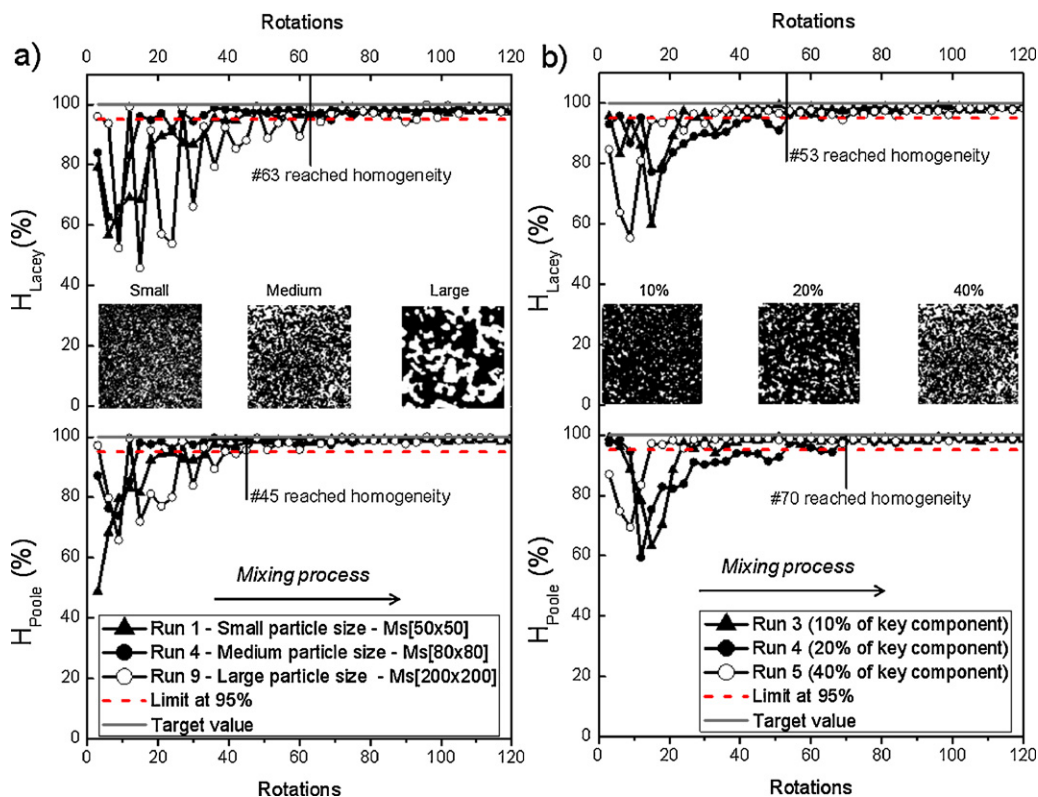


Fig. 7. Comparison of $H\%$ values in mixing processes according to: (a) particle size in runs with similar key component concentration and (b) same particle size and different key component concentrations.

Table 6
Example of computation of Chi-Square using 100th image for Run 9.

Macropixel [200 × 200]	Concentration ^a			χ^2
	K (%)	E1 (%)	E2 (%)	
M1	18	71	11	0.38
M2	20	66	15	2.47
M3	18	70	11	0.34
M4	17	73	10	0.69
			Total	3.88

^a Expected concentration for this process; K = 20, E1 = 70 and E2 = 10%.

ternary or higher-order (multicomponent) mixtures is much more complicated [26]. Gayle et al. [25] used the chi-square method to calculate the segregation index for ternary mixtures. We applied this criterion to our ternary images (labeled images) and compared the estimated concentrations (see Section 5.1) of each component in each macropixel with their theoretical counterparts. The total concentration for each macropixel was fixed at 100, consequently when the concentration of two components is determined the third can be determined by difference. Thus each macropixel contributes 2 degrees of freedom, where a total for 4 macropixels of [200 × 200] would be 2×4 , i.e. $\chi_r^2 = 8$. The chi-square value at the beginning of the mixing process (zero revolutions) is therefore 100×8 ($\chi_0^2 = 800$). Table 6 shows the chi-square calculations for the last image in run 9.

Miyamoto [28] suggested to analyse ternary mixtures as if they were binary (i.e. mixtures of the key component and the rest of the excipients), in order to facilitate calculation of mixing indices. Table 7 shows the results of the mixing indices application for ternary images, note that during mixing processes M_χ and $H\%_{Lacey}$ tend to unity and 100%, respectively; reaching values above the threshold of 0.95 and 95% from the middle of the process. Additionally, S_χ achieves a level close to zero as the mixing process progresses. We noted that chi-square value for an entire image and its corresponding randomized one is the same, because it is the result of the sum of chi-squares for each component in each macropixel; for this reason, we were not able to use the Poole index with chi-square.

One-factor analysis of variance (ANOVA) demonstrated a statistically significant difference between the $H\%_{Lacey}$ values from pseudo-binary and ternary images (runs 6–10). Fig. 8 shows $H\%_{Lacey}$ values for run 8, as seen the main difference between the $H\%_{Lacey}$ values is at the beginning of the mixing process, where there are more variations for pseudo-binary than for ternary images. Note that $H\%_{Lacey}$ values for ternary images exceed the threshold of 95% in the approximately 60th rotation, while for pseudo-binary images exceed at 120th rotation. Interestingly, it seems that the most appropriate criterion for multicomponent mixtures is using the chi-square approach (because the concentrations of each component was used); however it is necessary to have a reference value,

Table 7
Mixing indices calculated from chi-square values for ternaries mixtures using ternary images.

Stage	Indices	Run number				
		6	7	8	9	10
Beginning	Lacey (M_χ)	0.21	0.34	0.20	0.83	0.28
	$H\%_{Lacey}$	36.5	42.7	43.8	92.0	32.1
	Segregation (S_χ)	1.21	0.66	0.80	0.17	0.72
Middle	Lacey (M_χ)	0.94	0.98	0.99	0.97	0.99
	$H\%_{Lacey}$	98.5	97.5	98.2	97.3	98.6
	Segregation (S_χ)	0.06	0.02	0.01	0.03	0.01
End	Lacey (M_χ)	0.99	0.98	0.98	1.01	0.99
	$H\%_{Lacey}$	98.6	97.3	98.3	99.8	99.4
	Segregation (S_χ)	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01

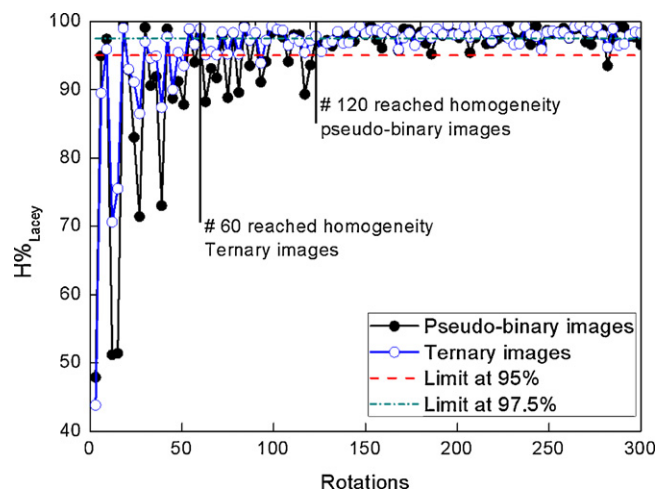


Fig. 8. Comparison of $H\%_{Lacey}$ values for run 8 by using binary and ternary images.

for example, in our case we used the estimated concentrations by segmentation colour, but unfortunately in practice this may not always be possible.

In conclusion, mixing image-adapted indices can be used in binary images as qualitative criterion to evaluate the homogeneity of the images. It is recommended to observe in parallel, for example, the Poole or $H\%_{Poole}$ index at specific-selected wavelength images (WI_λ); with these two values it is possible to obtain a good approximation for the homogeneity in the image.

6. Conclusions

In this work, we established the maximum optimal macropixel size for image analysis of mixtures, M_s , from the variation of the Lacey index (M_L) and the variance with M_s . We found particles with a surface of about 26, 180 and 1000 pixels to require a macropixel size of 50×50 , 80×80 and 200×200 , respectively. The proposed homogeneity index, $H\%$, was successfully used to monitor mixing processes. $H\%_{Lacey}$ was found to be unsuitable for greyscale images (intensity images), but $H\%_{Poole}$ proved to be appropriate for both intensity and binary images. Furthermore, $H\%_{Lacey}$ was unaffected by the key component concentration maintaining constant particles size. The best results for ternary (multicomponent) mixtures were obtained with the chi-square statistic. The $H\%$ index provides an objective criterion for assessing image homogeneity irrespective of key component content and particle size by direct comparison of a real image with its random counterpart.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this work through Project CTQ2009-08312. Juan G. Rosas is also grateful to the Quality & Technology Group of the University of Copenhagen, Denmark, for their help and support, as well as to Dr. José Manuel Amigo for experimental advice and Dr. Frans W.J. van der Berg for his help in constructing the blender robot. Finally, the authors like to thank Dr. Sergio Armenta for the contribution to the revision of the manuscript.

References

- [1] L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, Solids mixing, *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970) 53–66.
- [2] N. Harnby, M.F. Edwards, A.W. Nienow, *Mixing in the Process Industries*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, London, 1997.
- [3] United States Pharmacopeia (USP-RF), <905> Uniformity of Dosage Units, 2009.
- [4] U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units,

- U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Rockville, 2003.
- [5] E.W. Ciurczak, J.K. Drennen, *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
- [6] L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 262–278.
- [7] H. Shinzawa, K. Awa, T. Okumura, S. Morita, M. Otsuka, Y. Ozaki, H. Sato, Raman imaging analysis of pharmaceutical tablets by two-dimensional (2D) correlation spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 51 (2009) 125–131.
- [8] C. Ravn, E. Skibstedb, R. Bro, Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms—comparing common calibration approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58 (2008) 554–561.
- [9] S. Sasic, W. Yu, L. Zhang, Monitoring of API particle size during solid dosage form manufacturing process by chemical imaging and particle sizing, *Anal. Methods* 3 (2011) 568–574.
- [10] S. Sasic, Chemical imaging of pharmaceutical granules by Raman global illumination and near-infrared mapping platforms, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 73–79.
- [11] J. Cruz, M. Blanco, Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets, *Talanta* 80 (2009) 473–478.
- [12] J.M. Amigo, Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 93–109.
- [13] J.M. Amigo, C. Ravn, Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76–82.
- [14] A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen III, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298–1307.
- [15] W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, D. Winstead, Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging, *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 369–373.
- [16] J. Johansson, S. Pettersson, L.S. Taylor, Infrared imaging of laser-induced heating during Raman spectroscopy of pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1223–1231.
- [17] H. Ma, C.A. Anderson, Characterization of pharmaceutical powder blends by NIR chemical imaging, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3305–3320.
- [18] S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannegan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, P.K. Aldridge, On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.
- [19] R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, A.S. Hussain, Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity, *AAPS PharmSciTech* 3 (2002) 1–15.
- [20] T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, S. Ochiai, Evaluation of homogeneity of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(L-lactic acid) studied by near infrared chemical imaging (NIRCI), *Anal. Sci.* 23 (2007) 871–876.
- [21] M.L. Hamad, C.D. Ellison, M.A. Khan, R.C. Lyon, Drug product characterization by Macropixel Analysis of chemical images, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3390–3401.
- [22] P.V. Dankwertz, The definition and measurement of some characteristics of mixing, *Appl. Sci. Res.* 3 (1952) 279–281.
- [23] P.M.C. Lacey, Developments on the theory of particle mixing, *J. Appl. Chem.* 4 (1954) 257–268.
- [24] K.R. Poole, R.F. Taylor, G.P. Wall, Mixing powders to fine-scale homogeneity: studies of batch mixing, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 42 (1964) 305–315.
- [25] J. Gayle, O. Lacey, J. Gary, Mixing of solids. Chi square as a criterion, *Eng. Chem.* 50 (1958) 1279–1282.
- [26] K. Stange, Mixing quality in a random mixture of three or more components, *Chem. Eng. Technol.* 35 (1963) 580–582.
- [27] J.J. Walker, D.K. Rollins, Detecting powder mixture segregation for multicomponent. Mixtures, *Chem. Eng. Sci.* 53 (1997) 651–655.
- [28] K. Miyamoto, Mixing, in: K. Gotoh, H. Masuda, K. Higashitani (Eds.), *Powder Technology Handbook*, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 609–625.
- [29] F.J. Muzzio, A. Alexander, C. Goodridge, E. Shen, T. Shinbrot, in: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta (Eds.), *Handbook of Industrial Mixing*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2004, pp. 887–940.
- [30] T. Bozdog, C. Karpuz, Development of a particle size distribution analysis system by digital image processing, *Int. J. Surf. Min. Reclam. Environ.* 11 (1997) 59–67.

ANEXO VII

A criterion for assessing
homogeneity distribution in
hyperspectral images. Part 2:
Application of homogeneity indices
to solid pharmaceutical dosage
forms

Juan G. Rosas, Marcel Blanco

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

70 (2012) 691 – 699.



A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 2: Application of homogeneity indices to solid pharmaceutical dosage forms

Juan G. Rosas, Marcelo Blanco*

Applied Chemometrics Group, Departamento de Química, Edificio Cn, Facultad de Ciencias, Universitat Autònoma de Barcelona, 01893 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2012
Received in revised form 12 June 2012
Accepted 20 June 2012
Available online 14 July 2012

Keywords:

Near infrared chemical imaging
Homogeneity
Process analytical technology
Image analysis techniques
Macropixel analysis
Homogeneity index

ABSTRACT

This article is the second of a series of two articles detailing the application of mixing index to assess homogeneity distribution in oral pharmaceutical solid dosage forms by image analysis. Chemical imaging (CI) is an emerging technique integrating conventional imaging and spectroscopic techniques with a view to obtaining spatial and spectral information from a sample. Near infrared chemical imaging (NIR-CI) has proved an excellent analytical tool for extracting high-quality information from sample surfaces. The primary objective of this second part was to demonstrate that the approach developed in the first part could be successfully applied to near infrared hyperspectral images of oral pharmaceutical solid dosage forms such as coated, uncoated and effervescent tablets, as well as to powder blends. To this end, we assessed a new criterion for establishing mixing homogeneity by using four different methods based on a three-dimensional ($M \times N \times \lambda$) data array of hyperspectral images (spectral standard deviations and correlation coefficients) or a two-dimensional ($M \times N$) data array (concentration maps and binary images). The four methods were used applying macropixel analysis to the Poole (M_p) and homogeneity ($H\%_{\text{Poole}}$) indices. Both indices proved useful for assessing the degree of homogeneity of pharmaceutical samples. The results testify that the proposed approach can be effectively used in the pharmaceutical industry, in the finished products (e.g., tablets) and in mixing unit operations for example, as a process analytical technology tool for the blending monitoring (see part 1).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The manufacturing process of pharmaceutical solids dosage forms (e.g., tablets) encompasses several intermediate steps, called unit operations (i.e., mixing, granulation, drying, compression, coating, and packaging). Process analytical technology (PAT) initiative [1] encourages the determination of the critical quality attributes (CQAs) in each unit operation to assure the quality of finished products which is highly dependent on the correct development of each unit operation. One of these CQAs is the homogeneity, being defined as the uniform distribution of the active pharmaceutical ingredient (API) between withdrawn samples [2]. In part 1, we have presented and discussed a new approach for the assessment of the homogeneity during mixing processes by using image analysis.

Chemical imaging (CI) is an emerging technique that uses a combination of conventional imaging and spectroscopic techniques to extract spatial and spectral (physicochemical) information from samples. Whereas the term spectral imaging can be applied to virtually all spectroscopic techniques (e.g. IR, Raman, fluorescence,

UV, MS), chemical imaging refers to vibrational spectroscopy (IR, NIR, Raman) in particular. The chemical selectivity of vibrational spectroscopy and the visualisation power of imaging techniques can be combined to obtain a more comprehensive description of the concentrations and distributions of ingredients in solid, semi-solid, and powder samples. In CI the term “homogeneity” is used when the concentration of the API is almost the same in every pixel (i.e., the concentration distribution itself is narrow) [3]. The most common tool to evaluate this homogeneity is the histograms of the concentration maps. Nevertheless, the histogram cannot give information about spatial distribution, since the histograms for a real image and its randomised image are exactly the same [3]. This problem has been tackled by several research groups [4–16], without responses of how assess the spatial distribution in images. An interesting attempt to evaluate the spatial distribution in Raman-mapping was proposed by Vajna et al. [4]. The statistical parameter used in his work was the relative standard deviation (RSD) between Raman scores of each point on a map, however this method is not appropriate if large chunks of ingredients within an image are formed. In these two articles (part 1 and 2), we focus in the spatial distribution in images and we intent offer a solution to the problem.

Near infrared chemical imaging (NIR-CI) is an especially useful technique for extracting quality information from sample surfaces. NIR-CI has been extensively used in pharmaceutical research

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.
E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

for purposes such as assessing quality [17,18], coating thickness [19–21], composition [3,8,22,23], and blend homogeneity [16,19,20,24], as well as for remote identification [25], high-throughput analysis [15], extraction of process-related effects [17,18,26] and counterfeit drug identification [27,28]. An important number of methodologies have been developed to process NIR-CI data (see Table 1). These methods have all proved powerful tools for extracting qualitative and quantitative information from samples. However, sample homogeneity remains an ill-defined concept since these methods fail to provide objective enough information to establish the actual homogeneity of the surface of an image.

The correlation coefficient (corrcoef) provides a well-known criterion for assessing similarity between spectra [14]. Correlation coefficients between the spectrum for the pure API and others obtained from individual pixels of a sample image are used to construct a correlation map showing the distribution of each analyte in the sample. The correlation coefficient is calculated from the following equation:

$$\text{corrcoef} = \frac{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda} y_{\lambda}}{\sqrt{\sum_{\lambda} x_{mn\lambda}^2 \sum_{\lambda} y_{\lambda}^2}} \quad (1)$$

where, for each wavelength, $x_{mn\lambda}$ is the spectrum for the mn -th pixel and y_{λ} the pure spectral profile for one analyte. Similarity is greatest for two identical spectra, i.e. with $\text{corrcoef} = 1$ [14,29,52]. Correlation coefficients are essentially qualitative parameters that may be of use towards obtaining an accurate qualitative picture of the distribution of each analyte in an image.

In the first part of this work, we explored the use of homogeneity indices – Lacey (M_L), Poole (M_P) and segregation (S) – and their usefulness for imaging analysis via macropixel analysis for assessing homogeneity during blending processes. Macropixel analysis [12] splits an image into N non-overlapping square of pixels to obtain quantitative information from between- and within-macropixel statistics; for example mean, standard deviation and variance (see Fig. 2 in part 1). We initially used the M_P index on account of its computational flexibility, unlike M_L and S . It requires no reference values such as initial concentrations to calculate theoretical variances (see Tables 1 and 2 in part 1); rather, it uses the macropixel standard deviation of the original image and for a totally random image obtained by rearranging the pixels (or spectra) in the original image. The M_P index [53,54] is an effective alternative to the Lacey index, which is described in detail in part 1 [55]. The image-adapted version of its equation is

$$M_P = \frac{\overline{M}_{sd}}{\overline{M}_{sd_rdn}} \quad (2)$$

where, \overline{M}_{sd} is the average of standard deviations (S_d) between the macropixels of the image and \overline{M}_{sd_rdn} the standard deviation of

Table 1
Bibliographic methods for hyperspectral images analysis in pharmaceuticals.

Approach	Reference
Partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA)	[9–11,24,30,39,42,43]
Principal component analysis (PCA)	[10,17–20,26,30,37–39]
Single wavelength	[14,17–19,24,29–31]
Clustering analysis	[32–36]
Augmented MCR-ALS for homogeneous samples	[3,8,22,23,44]
Classical least squares (CLS)	[29,13,41]
Partial least-squares (PLS)	[21,14,29]
Similarity using correlation coefficients	[14,38]
Direct classical least squares (DCLS)	[4,29]
Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS)	[45,46]
Peak-height ratio	[14,17]
Simplex identification of split augmented Lagrangian (SISAL)	[6,7]
Self-modeling mixture analysis (SIMPLISMA or SMMA)	[33,40]
Sample-sample 2D correlation spectroscopy	[48,49]
Positive matrix factorization (PMF)	[6,47]
Fixed size image window-evolving factor analysis (FSIW-EFA)	[50,51]
Local rank analysis	[51]
Symmetry parameter image analysis (SPIA)	[5]

a totally random image (for more details about these equations, please see Tables 1 and 2 from part 1). This random image can be simulated by computer with the same number and intensity range of pixels than original image (see part 1).

We also assessed the percent homogeneity in the Poole index, $H\%_{\text{Poole}}$ [53,54] which was defined as the ratio of M_P for an image of unknown homogeneity to its totally random – and hence homogeneous – counterpart times 100:

$$H\%_{\text{Poole}} = (M_P) \times 100 \quad (3)$$

Obviously, the closer $H\%_{\text{Poole}}$ is to 100%, the more random will be the component distribution of the image—and hence that of the sample.

The aim of this article was to confirm that the approach developed in the first could be applied to the NIR-CI of pharmaceutical solid dosage forms, whether as powders or as finished products (coated, uncoated and effervescent tablets) by using macropixel analysis in combination with M_P and $H\%_{\text{Poole}}$. To this end, we used two-dimensional ($M \times N$) data arrays (binary images, concentration maps) or three-dimensional arrays ($M \times N \times \lambda$). In addition, we aimed to establish an accurate criterion for assessing image homogeneity based solely on spatial and spectral information provided by the image itself.

Table 2
Description of the solid pharmaceutical forms used in this study.

Form	Commercial name	API	API nominal content (%)	Form analysed	API calculated content (%)	Reference
Tablet 1	Bayer 500	ASA	82	Tablet	81.6	
Tablet 2	AAS 500	ASA	58	Tablet	54.9	
Tablet 3	Dolmen	ASA – ascorbic acid	15 ^b	Effervescent tablet	16.4	[23]
Tablet 4	Aspirina C	ASA – ascorbic acid	12 ^b	Effervescent tablet	12.9	
Tablet 5	Tablet 5 ^a	API ^a	35	Uncoated tablet	34.5	[21]
Tablet 6	Tablet 6 ^a	API ^a	25	Coated tablet	22.7	
Powder blend	Finasteride	Finasteride	3.6	Powder	3.7	[44]

^a The name of the tablet and API cannot be disclosed since the formulation is at the development stage.

^b Concentrations for ASA

2. Experimental

2.1. Samples

The sample set studied included six tablets and a powder blend. Four tablets (no. 1–4) were commercial tablets of aspirin purchased at local pharmacies and contained acetylsalicylic acid (ASA) as active pharmaceutical ingredient (API) (Images used in Cruz and Blanco [23]). The nominal ASA content of the tablets was calculated by dividing the nominal content into the weight of each tablet. Table 2 summarises the characteristics of each tablet. Tablet 1 contained microcrystalline cellulose (MCC), and tablet 2 mannitol, as major excipient. Tablets 3 and 4 were effervescent and contained ascorbic acid as co-active component and other, well-known excipients (citric acid, sodium carbonate and anhydrous sodium bicarbonate). Tablet 5 was of the uncoated type (Image used in Palou et al. [21]); its API content cannot be disclosed since the formulation is at the development stage (for further details, please see [21]). The nominal composition of the uncoated tablet was 35% API and 65% excipients (see Table 2). Tablet 6 was a coated tablet of a formulation also at the development stage containing 25% API. The last sample was a pharmaceutical powder blend, whose image was acquired from a sample drawn at the end of a blending process and assumed to be homogeneously blended (Image used in Blanco and Cueva-Mestanza [44]). The API was Finasteride with a concentration of 3.6%, being lactose the major (please see [44] for further details).

The nominal API content of the studied formulations spanned a wide range: 3–82%.

2.2. Instrumentation

Hyperspectral images of the surface for tablets 1–4 and the powder blend were obtained by diffuse reflectance mode using an NIRCI spectrometer [Think Spectrally Roda-25 (Think Spectrally, Valencia, Spain)] with a HgCdTe detector covering the spectral range from 1000 to 2400 nm with a spectral resolution of 7 nm and a spatial resolution of $100 \times 100 \mu\text{m}$ per pixel. Each image took about 2 min to acquire. Four halogen lamps were focused at a 45° angle on the sample to obtain as noise-free images as possible.

Prior to recording images, the instrument was calibrated with six standards (FOSS AP-0200 NIR) spanning the reflectance range from 99% to 0.2%.

The hyperspectral images for tablets 5 and 6 were acquired by using a SyNIRgyTM Chemical Imaging System hyperspectral camera from Malvern Instruments (Malvern, UK). The camera was equipped with an InSb detector with a focal plane array of 320×256 pixels and controlled via the software Pyxis[®], also from Malvern. Samples were placed on the plate and illuminated with halogen lamps arranged at appropriate angles around the plate, the lens distance being adjusted according to object size. The images thus obtained had a spectral resolution of 10 nm and a spatial resolution of $40 \times 40 \mu\text{m}$. Acquiring all reflectance images throughout the wavelength range took about 3 min. Prior to acquiring the image for the sample (*S*), the camera was used to record one for the background (*B*, a reference ceramic plate of 99% reflectance) and another for a dark reference (*D*, a mirror). The image for the sample, *S*, was converted into reflectance data, *R*, by using the equation $R = (S - D)/(B - D)$. This calculation was done at every pixel in each image. The data thus obtained were then converted into absorbance units.

2.3. Software

Homogeneity indices were computed by using custom-developed m-files in Matlab 7.1 (The Mathworks, Massachusetts).

Spectral treatments were applied by using PLS-Toolbox 6.0 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA, USA). Hyperspectral images were analysed with MCR-ALS [45] and ISys 5.0 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.4. Data processing

Prior to application of any spectral treatment or algorithm to extract the required information, the ($M \times N \times \lambda$) datacube (where *M* and *N* represent spatial dimensions and λ denotes spectral information) was unfolded into a two-dimensional matrix since most available treatments and algorithms have been developed for two-dimensional data. Two different spectral treatments were used, namely: standard normal variate (SNV) and Savitzky–Golay smoothing with an 11-points window and fitting to a second-order polynomial. These treatments were followed by application of the above-mentioned chemometric algorithms to the data matrix. Having a spectrum for each pixel in each image allowed us to use MCR-ALS and PLS models previously constructed by Cruz and Blanco [23] and Palou et al. [21] respectively, to calculate API concentrations. Interested readers can find detailed information about the construction of models, quantitation of the API and algorithms used in these two references. The predicted concentrations thus obtained were used to construct concentration maps where each pixel represented an API concentration corresponding to the spectrum for the pixel.

3. Results and discussion

As stated in the first part of this series, success in the use of mixing indices depends on the particular image type used for analysis. The index least markedly influenced by factors such as API concentration or particle size was that of Poole, M_P , which was thus adopted for further investigation in this second part.

The lack of methods allowing one to establish when the API distribution in an image is heterogeneous led us to perform several tests based on macropixel analysis [12] with M_{Poole} and $H\%_{\text{Poole}}$. As shown below, the procedure used to calculate M_P was adapted to various surface types including binary images, concentration maps and correlation maps. However, it was applied not only to two-dimensional data arrays ($M \times N$), but also to the three-dimensional datacube of hyperspectral images ($M \times N \times \lambda$).

3.1. Binary images

Binary images were obtained by applying the following image treatments:

- Hyperspectral images ($M \times N \times \lambda$) were unfolded to two-dimensional data arrays ($M \times N$, λ) and subjected to Savitzky–Golay smoothing with an 11-points moving window and fitting to a second-order polynomial, followed by SNV treatment.
- The pretreated unfolded images ($M \times N$, λ) were converted into three-dimensional images ($M \times N \times \lambda$) and some single-wavelength or single-channel images ($M \times N$) were selected (viz. that of maximum absorption of the API and/or major excipients).
- The previous images were used to obtain RGB colour images (see Fig. 1). The RGB images for tablets 3 and 4 were obtained from the absorbance of ASA and ascorbic acid. That for the powder blend, however, could not be constructed in this way owing to its low content in API (3.6%) and the absence of a well-defined characteristic peak for it, which was concealed by those for the highly concentrated excipients.

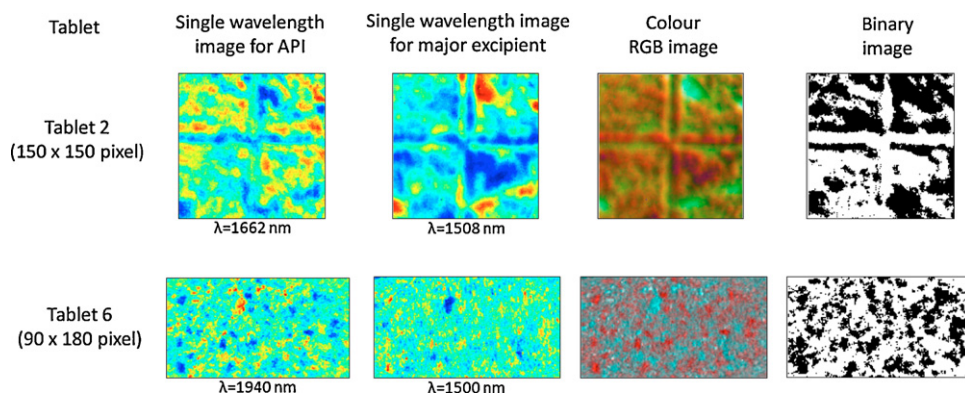


Fig. 1. Obtaining binary images from RGB images (obtained by concatenation of single wavelength images of API and major excipients). Single wavelength images are shown in false colour intensities. In binary images, the API and major excipients are in white and black, respectively.

(d) The RGB images were split into two clusters (one for the API and the other for the excipients) with the K-means algorithm (for more details about the use of this algorithm, please see Sections 3.1 and 5.2 in part 1) that were converted into two binary images where all pixels corresponding to the API and excipients were assigned a unity and zero value, respectively—the API and excipients are shown in white and black, respectively, in Fig. 1. The resulting images were used to calculate M_P and $H\%_{\text{Poole}}$.

3.2. Selection of macropixel size

Once the binary images were obtained, the next step was to choose a suitable macropixel size for analysis. Macropixels should be of a size providing useful information about heterogeneity of the image surface (i.e. small enough to avoid total homogeneity but large enough to avoid total heterogeneity). In the first part of this work, we found a plot of M_P against macropixel size with a threshold of 0.95 to be highly suitable for establishing the best macropixel size for our purpose; thus, a macropixel size resulting in an M_P value exceeding the threshold would be indicative of a homogeneous distribution and hence provide no useful information about heterogeneity. Therefore, a macropixel size close to the threshold value should be suitable for our image analyses.

In order to find an optimum range of macropixel sizes to evaluate homogeneity in images, Fig. 2 shows the M_P values of binary

image for tablet 4 and its randomized image as a function of macropixel size. The criterion applied should collect the lower and upper limits, allowing to establish the homogeneity between macropixels. The lower limit is the macropixel size for a random image below which the image will be always heterogeneous (i.e. $M_P < 0.95$), in our case it was $[5 \times 5]$. Moreover, the upper limit is the macropixel size above which the image will appear always homogeneous (i.e. $M_P > 0.95$), in our case it was $[50 \times 50]$. The optimal macropixel size will be within these two limits and its choice depends of the user exigency to assess homogeneity in the image. For this study we evaluated two macropixel sizes within the optimal range, $[30 \times 30]$ and $[50 \times 50]$. An identical procedure was used with other aspirin tablets (results not shown). For tablets 5 and 6, the maximum acceptable macropixel size was $[45 \times 45]$, whilst the minimum one was also $[5 \times 5]$ —the images were 90×180 pixels in all. Finally, the macropixel size used for the powder blend was $[50 \times 50]$ —the whole image was 150×150 pixels. As can be seen, we chose to use the macropixel sizes allowing the images to be split in an exact manner without overlapping macropixels. Definitely, the image size limits the number of non-overlapping macropixels and it is recommended to choose images with sizes that allow their division into the largest number of macropixels.

Cruz and Blanco [23] used MCR-ALS to estimate the ASA concentrations of tablets 1–4. We used their concentration maps to confirm that our chosen macropixel sizes were appropriate. In order to assess the API content distribution, we split the concentration maps into $[30 \times 30]$ and $[50 \times 50]$ macropixels for tablets 1–4 and the powder blend, and into $[30 \times 30]$ and $[45 \times 45]$ macropixels for tablets 5 and 6. The body of macropixels was used to calculate the average concentrations and three times their standard deviations. Fig. 3 shows concentration maps divided according to macropixel size. Moreover, the histograms of the API concentration of tablets are also shown (this histogram is not a feature from macropixel analysis). The same procedure used for tablets 1–4 is illustrated in Fig. 4 for tablets 5 and 6. As can be seen, each macropixel was numbered in such a way that it would facilitate identification of the zone where the API concentration surpassed the acceptance threshold (outlier). Table 3 shows the acceptance ranges for all images. The choice of macropixel size depends on various factors including the absence of outliers and/or relative standard deviations (RSD) exceeding 5% (the FDA recommends using RSD to assess homogeneity in powder mixtures [2]). If both conditions are met, then the macropixel size used is correct. The sole macropixel falling outside the acceptance range was no. 2 for tablet 3 ($M_2 [30 \times 30]$) in Fig. 3c). As can be seen from Table 3, all RSD values obtained with $[50 \times 50]$ macropixels – that for tablet 2 excepted – were less than 5%. Also, tablet 2 exhibited a fairly wide acceptance range relative to the others, which suggests a

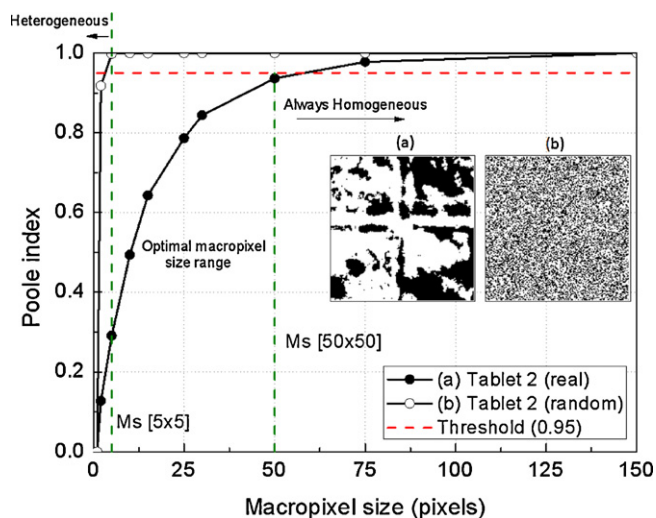


Fig. 2. Criterion for choosing the optimal macropixel size in binary images. Poole index (M_{Poole}) against macropixel size.

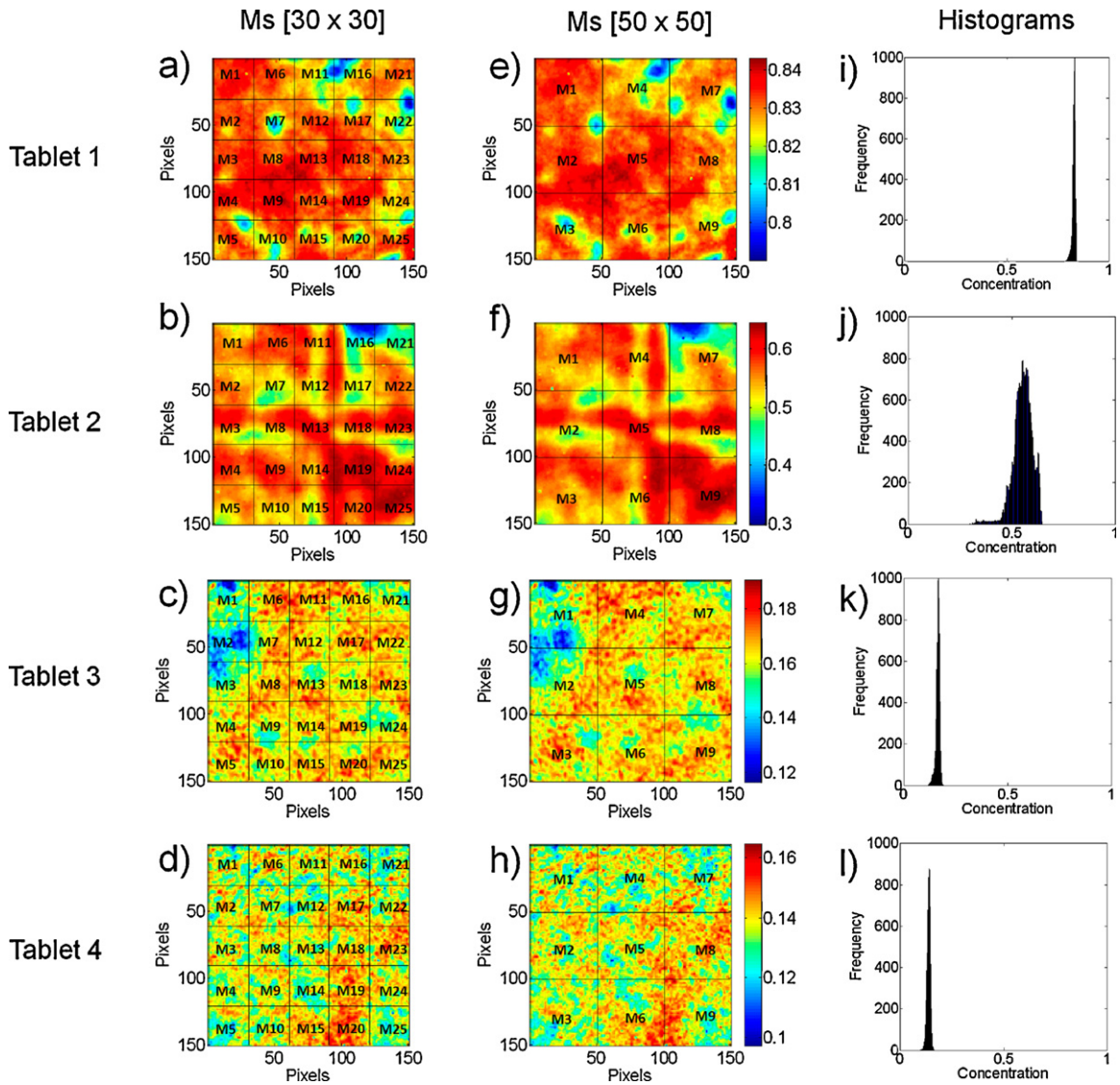


Fig. 3. Macropixel size (Ms) based on concentrations maps of ASA in commercial tablets of aspirin. (a–b) Tablet 1–4 with Ms [30 × 30], (e–h) Tablet 1–4 with Ms [50 × 50] and (i–l) are the histograms of contractions for each tablet.

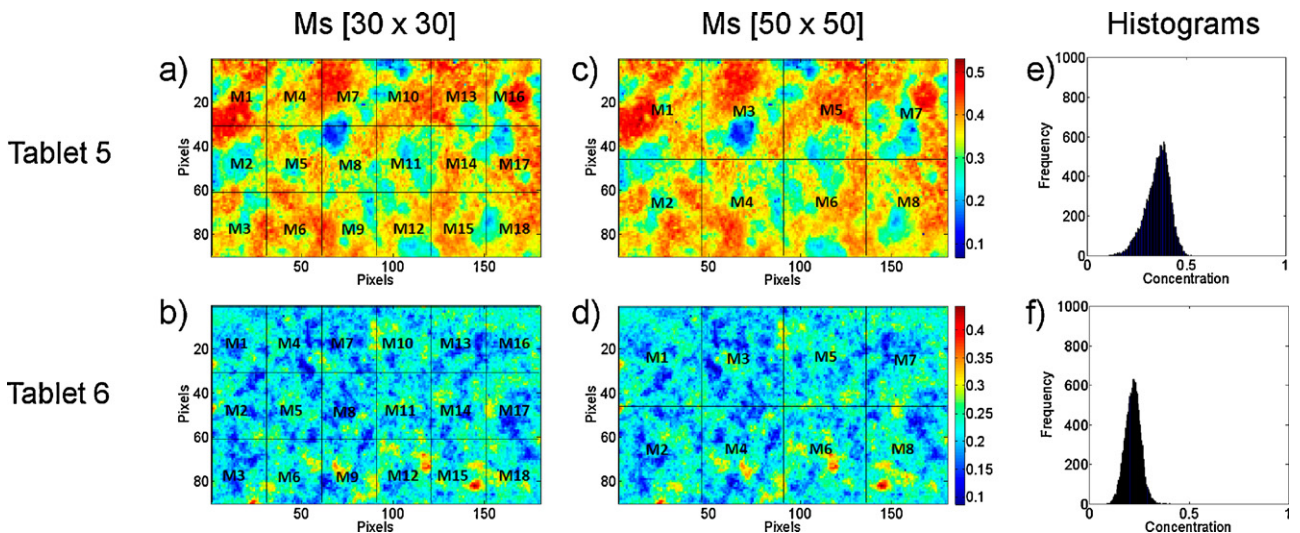


Fig. 4. Macropixel size (Ms) based on concentrations maps. (a) Tablet 5 (uncoated tablet) and (b) tablet 6 (coated tablet) with Ms [30 × 30], (c) Tablet 5 and (d) Tablet 6 with Ms [50 × 50]. Also are shown the histograms of contractions for each tablet.

Table 3
Statistics for API concentration in macropixels as a criterion to choose the maximum macropixel size.

Sample	Macropixel size	Number of macropixels	Mean $\pm 3 \times$ SD	RSD (%)
Tablet 1	30 \times 30	25	82.94 \pm 1.3	0.53
	50 \times 50	9	82.94 \pm 1.1	0.44
Tablet 2	30 \times 30	25	55.37 \pm 10.1	6.09
	50 \times 50	9	55.37 \pm 8.7	5.25
Tablet 3	30 \times 30	25	16.25 \pm 1.8	3.65
	50 \times 50	9	16.25 \pm 1.3	2.71
Tablet 4	30 \times 30	25	13.74 \pm 1.1	2.64
	50 \times 50	9	13.74 \pm 0.7	1.71
Tablet 5	30 \times 30	18	35.29 \pm 6.7	6.32
	45 \times 45	8	35.29 \pm 3.0	2.87
Tablet 6	30 \times 30	18	21.78 \pm 3.0	4.64
	45 \times 45	8	21.78 \pm 2.5	3.80
Powder blend	30 \times 30	25	3.61 \pm 0.5	4.31
	50 \times 50	9	3.61 \pm 0.4	4.05

SD = standard deviation; RSD = relative standard deviation.

potential lack of homogeneity and may account for its scarcely uniform histogram in Fig. 3b. Based on these results, we chose to adopt a macropixel size of [50 \times 50] for tablets 1–4 and the powder blend, and one of [45 \times 45] for tablets 5 and 6. These sizes are consistent with those selected from the MP-macropixel size graph of Fig. 2. Therefore, all results given below are referred to these macropixel sizes.

3.3. Method 1. Calculation of M_P and $H\%_{\text{Pool}}$ from spectral standard deviations

We also assessed homogeneity in the ($M \times N \times \lambda$) images in terms of the standard deviation of spectra for each macropixel. The procedure, illustrated in Fig. 5, was as follows:

- The hyperspectral images were subjected to Savitzky–Golay smoothing with an 11-points moving window and fitting to a second-order polynomial, followed by SNV treatment.
- A randomized ($M \times N \times \lambda$) image was obtained by re-arranging the original hyperspectral image in a random manner. The randomisation of original image was made three times in order to get a robust estimation of statistics.
- The original and randomized images were split into m macropixels (same size than shown in Figs. 3 and 4) and the standard deviation between spectra in each unfolded macropixel was calculated by using Eqs. (4) and (5).

$$SD_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_i)^2}{n-1}} \quad (4)$$

$$\text{Mean SD} = \frac{\sum_{j=1}^h SD_j}{h} \quad (5)$$

where, A_{ij} is the absorbance at wavelength i in spectrum j and \bar{A}_i is the mean absorbance for the n spectra at the same wavelength within a macropixel. This equation provides a vector consisting of the standard deviation (SD_i) obtained per each macropixel. Then, the macropixel mean standard deviation (Mean SD_i) for

such as vector, SD, is calculated (for h wavelengths). Next, calculations are repeated for all macropixels on the whole image. (d) The global mean standard deviation (GMSD) of the original and randomized image for m macropixels was calculated

$$\text{GMSD} = \frac{\sum_{j=1}^m \text{Mean } SD_j}{m} \quad (6)$$

(e) Finally, M_P was calculated by dividing the previously obtained mean standard deviation for each image and multiplied by 100 to obtain $H\%_{\text{Pool}}$.

Table 4 gives the M_{Pool} and $H\%_{\text{Pool}}$ values obtained at the two macropixel sizes used. As can be seen, [30 \times 30] macropixels gave lower homogeneity values than [45 \times 45] macropixels for tablets 1–4 (74–84% versus 83–93%). The difference is consistent with those observed in the concentration maps and confirms that the homogeneity index increases with increasing macropixel size. Both macropixel sizes gave homogeneity values exceeding 89% for tablets 5 and 6; also, both samples were highly homogeneous (especially, tablet 6). On the other hand, [30 \times 30] and [50 \times 50] macropixels gave quite similar values (81% and 86%, respectively) for the powder blend; this indicates that the blend was nearly identically homogeneous with both macropixel sizes.

3.4. Method 2. Calculation of M_P and $H\%_{\text{Pool}}$ from correlation coefficient

The use of the correlation coefficient between NIR spectra for mixtures and pure components, corrcoef , is described in detail elsewhere [1,2]. In this work, we developed a procedure that uses corrcoef to calculate M_P and $H\%_{\text{Pool}}$. The procedure, summarized in Fig. 6, involved the following steps:

- The hyperspectral image and the pure spectrum for the API were subjected to Savitzky–Golay smoothing with an 11-points moving window and fitting to a second-order polynomial, followed by SNV treatment.
- A randomized ($M \times N \times \lambda$) image was obtained by randomly re-arranging the spectra in the original hyperspectral image.
- The corrcoef value for the API in each spectrum for the original NIR image and its randomized version was calculated.
- A correlation coefficient map was constructed.
- The map was split into [30 \times 30] and [50 \times 50] macropixels for the Images 150 \times 150 pixels in size and into [30 \times 30] and [45 \times 45] macropixels for those 90 \times 180 pixels in size.
- Finally, the M_P and $H\%_{\text{Pool}}$ values for each image were calculated.

As can be seen from Table 4, the results for “method 2” were very similar to those obtained by using the standard deviations for spectra (method 1); by exception, those for tablets 3 and 4 were rather dissimilar (e.g. $H\%_{\text{Pool}}$ was lower with method 2). $H\%_{\text{Pool}}$ ranged from 72 to 90% with [30 \times 30] macropixels, and from 84 to 94% with [50 \times 50] macropixels. By contrast, tablets 5 and 6 had invariably higher $H\%_{\text{Pool}}$ values with method 1 irrespective of macropixel size. Finally, the powder blend had very similar values with both methods.

3.5. Method 3. Calculation of M_P and $H\%_{\text{Pool}}$ from concentration maps

As in Section 3.2, concentration maps were split into non-overlapping macropixels and used to calculate M_P and $H\%_{\text{Pool}}$

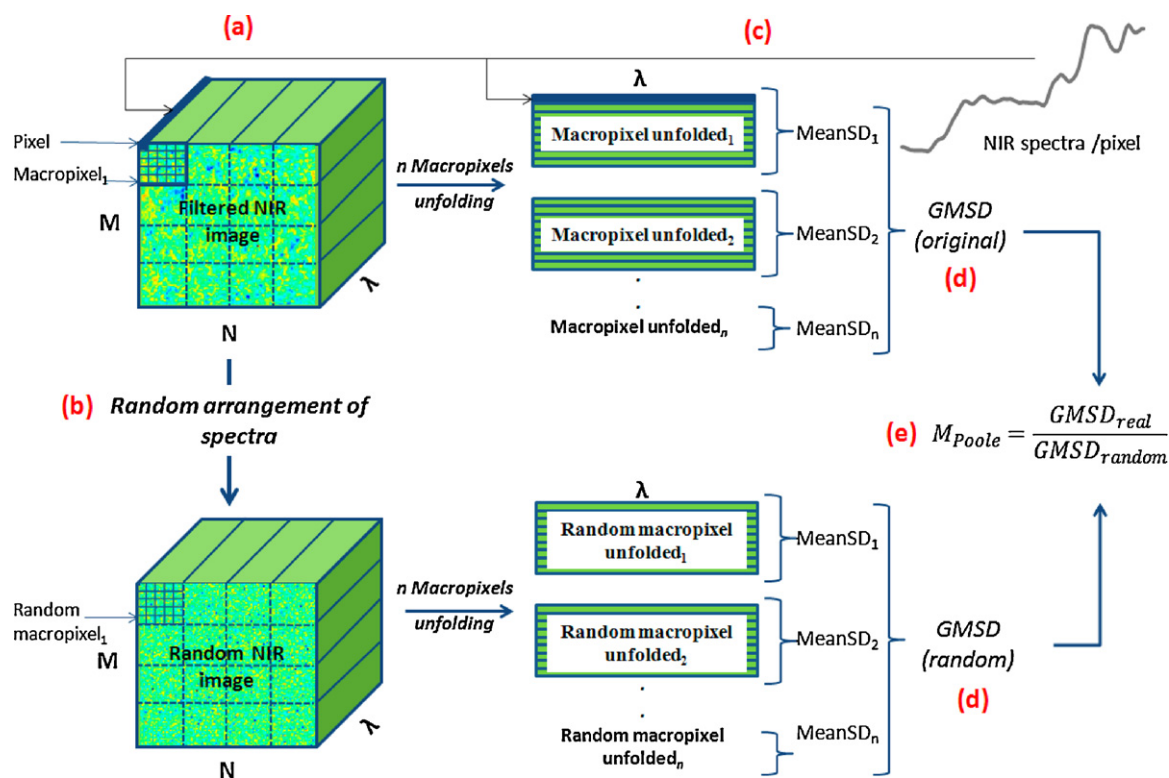


Fig. 5. Estimation of M_{Poole} based on standard deviation of spectra into each macropixel and between macropixels for a hyperspectral image. Steps (a–d) are described in Section 3.3.

Table 4

Summary of results for Poole index (M_{Poole}) and percentage of homogeneity ($H\%_{\text{Poole}}$) by using different approaches.

Sample	Macropixel size	Macropixel number	Method 1. Spectral standard deviation		Method 2. Correlation coefficient with API		Method 3. Concentration maps		Method 4. Binary images	
			M_{Poole}	$H\%_{\text{Poole}}$	M_{Poole}	$H\%_{\text{Poole}}$	M_{Poole}	$H\%_{\text{Poole}}$	M_{Poole}	$H\%_{\text{Poole}}$
Tablet 1	30 × 30	25	0.74	74.1	0.72	72.0	0.71	71.7	0.80	80.2
	50 × 50	9	0.83	83.3	0.85	84.8	0.83	83.6	0.92	91.7
Tablet 2	30 × 30	25	0.75	74.8	0.73	72.9	0.64	64.6	0.88	87.8
	50 × 50	9	0.87	86.5	0.87	86.8	0.74	75.0	0.97	96.8
Tablet 3	30 × 30	25	0.75	75.4	0.91	90.8	0.74	73.9	0.91	90.6
	50 × 50	9	0.85	84.7	0.94	94.5	0.85	84.5	0.93	93.3
Tablet 4	30 × 30	25	0.87	87.3	0.78	78.1	0.89	89.3	0.80	80.5
	50 × 50	9	0.93	93.0	0.85	85.2	0.91	90.2	0.96	95.8
Tablet 5	30 × 30	18	0.89	89.1	0.96	95.9	0.92	91.6	0.93	92.8
	45 × 45	8	0.94	94.4	0.97	97.0	0.98	97.6	0.99	99.3
Tablet 6	30 × 30	18	0.97	97.1	0.98	98.1	0.96	96.4	0.99	99.2
	45 × 45	8	0.98	98.3	0.99	99.1	0.98	97.6	0.99	99.8
Powder blend	30 × 30	25	0.81	81.3	0.83	83.5	0.75	75.2		
	50 × 50	9	0.86	85.9	0.88	88.1	0.80	80.4		

from the standard deviations of the concentrations. The results are shown under “method 3” in Table 4. The $H\%_{\text{Poole}}$ values for the powder blend, and tablets 2 and 3, thus obtained were lower than those provided by methods 1 and 2 irrespective of macropixel size; on the other hand, those for tablets 5–6 were very similar to those obtained with such methods.

3.6. Method 4. Calculation of M_{P} and $H\%_{\text{Poole}}$ from binary images

The two indices were also calculated from the binary images for the tablets; as noted in Section 3.1, however, that for the powder blend could not be obtained owing to its very low concentration and low absorption. The results are shown under “method 4” in

Table 4. As can be seen, M_{P} and $H\%_{\text{Poole}}$ increased with increasing macropixel size. Also, both indices were slightly higher than those obtained with the other three methods, which suggests that binarizing images has some effect on them.

Table 5

Homogeneity degree classification based on grade point average (GPA).

$H\%_{\text{Poole}}$ value	Grade equivalence	Homogeneity degree classification
90–100	A	Excellent homogeneity
80–89	B	Very good homogeneity
70–79	C	Good homogeneity
60–69	D	Low homogeneity
0–59	E	Non-homogeneity

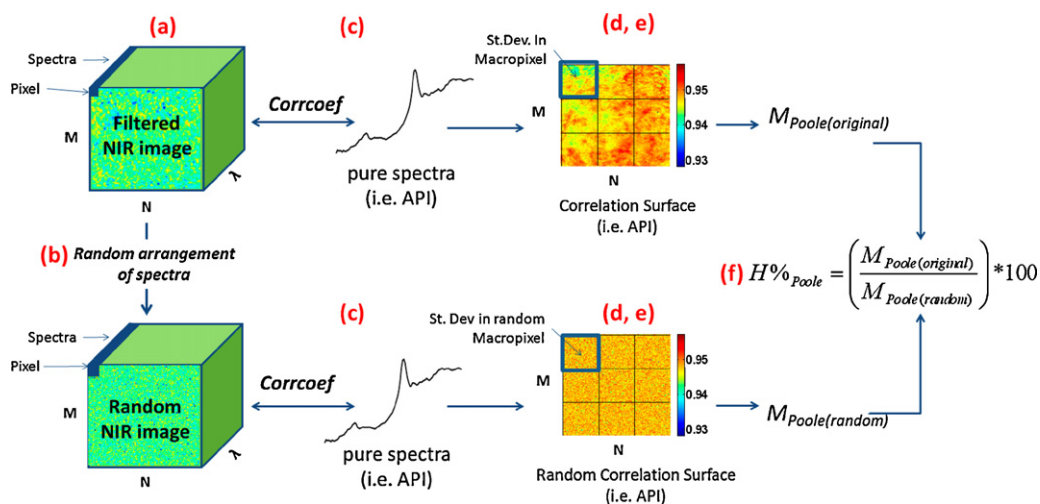


Fig. 6. Estimation of M_{Poole} and $H\%_{Poole}$ based on coefficients of correlation surfaces. Steps (a–d) are described in Section 3.4.

Table 6
Homogeneity degree based on $H\%_{Poole}$ for each sample by using different approaches.

Sample	Macropixel size	Macropixel number	Method 1. Spectral standard deviation	Method 2. Correlation coefficient with API	Method 3. Concentration maps	Method 4. Binary images
Tablet 1	50 × 50	9	Very good	Very good	Excellent	Excellent
Tablet 2	50 × 50	9	Very good	Very good	Good	Excellent
Tablet 3	50 × 50	9	Very good	Excellent	Very good	Excellent
Tablet 4	50 × 50	9	Excellent	Very good	Excellent	Excellent
Tablet 5	45 × 45	8	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent
Tablet 6	45 × 45	8	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent
Powder blend	50 × 50	9	Very good	Very good	Very good	

3.7. Degree of homogeneity

We thought it advisable to use some scale to qualify image homogeneity. The absence of such a scale led us to try the grade point average (GPA) as reference [56]. Table 5 summarizes the criterion used to assess the degree of homogeneity of an image in terms of $H\%_{Poole}$. The results thus obtained with the selected macropixel size are shown in Table 6. As can be seen, the four methods differed somewhat, but, as revealed by an ANOVA, the differences were not statistically significant ($p = 0.18$). The greatest differences were those in tablet 2, the histogram for which, as previously seen in Fig. 3b, exhibited a non-normal distribution in the API concentration; also, as seen from Table 3, this tablet exhibited higher standard deviations than the others. This indicates that method 3 is highly sensitive to API oscillations on the image surface.

Tablets 3–6 and the powder blend were virtually identically homogeneous, especially, tablets 5 and 6 which exhibited an excellent homogeneity with all four methods.

Note that, unlike method 3, the other three required no model to quantify the API; this can be expected to facilitate their use to establish an objective qualification criterion for the degree of homogeneity of an image. Methods 1–3 are useful for extracting spectral information contained in each pixel, whereas method 4 is to be preferred for extraction information from image surfaces. These criteria can also be applied to the excipients if they are to be assessed for homogeneity simultaneously with the API.

4. Conclusions

A criterion based on a plot of M_P versus macropixel size proved highly useful towards selecting the optimum macropixel size for image analyses. The M_P and $H\%_{Poole}$ values calculated from the standard deviation of the spectra for each macropixel (method 1)

and the correlation coefficient with the API for each spectrum in a macropixel (method 2) provided quite acceptable results that were very similar to those obtained from API concentrations (method 3). The greatest advantages of these methods are that they can be applied to any three-dimensional ($M \times N \times \lambda$) hyperspectral image and provide comprehensive information for the whole image without the need to calculate concentrations.

Method 4, which is based on the surface analysis of a binary image obtained from single-channel images for the API and major excipients, provided very encouraging results. However, when the API is present at a low concentration and fails to exhibit a characteristic NIR peak not concealed by those for the excipients, it is virtually impossible to construct a binary image and homogeneity calculations have to rely on another method.

Differences between methods were not statistically significant. Therefore, all four are comparable and their choice should be dictated by the particular type of information to be obtained (spatial or spectral).

Using homogeneity indices to assess hyperspectral images provides highly useful qualitative information with a view to assessing homogeneity in the API distribution from a sample image.

M_P and $H\%_{Poole}$ provide two useful tools for assessing homogeneity in pharmaceutical samples via NIR chemical imaging. Therefore, they are highly suitable for use in the framework of process analytical technology (PAT) by the pharmaceutical industry in finished products (e.g., tablets) and in mixing unit operations (e.g., intermediate blending step).

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Technology for funding this research in the framework of Project CTQ2009-08312. Juan G. Rosas is also grateful to

Jordi Cruz, Anna Palou and Ruben Cueva for kindly supplying the hyperspectral images. Finally, the authors like to thank Dr. Sergio Armenta for the contribution to the revision of the manuscript.

References

- [1] U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry PAT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, Rockville, 2004.
- [2] U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units—Stratified In-Process Dosage Units Sampling and Assessment, Rockville, 2003.
- [3] J.M. Amigo, Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 93–109.
- [4] B. Vajna, I. Farkas, A. Szabó, Z. Zsigmond, G. Marosi, Raman microscopic evaluation of technology dependent structural differences in tablets containing imipramine model drug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 30–38.
- [5] T. Puchert, D. Lochmann, J.C. Menezes, G. Reich, A multivariate approach for the statistical evaluation of near-infrared chemical images using symmetry parameter image analysis (SPIA), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 117–124.
- [6] B. Vajna, G. Patyi, Z. Nagy, A. Farkas, G. Marosi, Comparison of chemometric methods in the analysis of pharmaceuticals with hyperspectral Raman imaging, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 1977–1986.
- [7] M.B. Lopes, J.-C. Wolff, J.M. Biucas-Dias, M.A.T. Figueiredo, Near-infrared hyperspectral unmixing based on a minimum volume criterion for fast and accurate chemometric characterization of counterfeit tablets, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1462–1469.
- [8] J.M. Amigo, C. Ravn, Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76–82.
- [9] W. Li, A. Woldu, R. Kelly, J. McCool, R. Bruce, H. Rasmussen, J. Cunningham, D. Winstead, Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging, *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 369–373.
- [10] H. Ma, C.A. Anderson, Characterization of pharmaceutical powder blends by NIR chemical imaging, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3305–3320.
- [11] T. Furukawa, H. Sato, H. Shinzawa, I. Noda, S. Ochiai, Evaluation of homogeneity of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(L-lactic acid) studied by near infrared chemical imaging (NIRCI), *Anal. Sci.* 23 (2007) 871–876.
- [12] M.L. Hamad, C.D. Ellison, M.A. Khan, R.C. Lyon, Drug product characterization by macropixel analysis of chemical images, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3390–3401.
- [13] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: a feasibility study, *Talanta* 73 (2007) 733–741.
- [14] N. Jovanovic, A. Gerich, A. Bouchard, W. Jiskoot, Near-infrared imaging for studying homogeneity of protein–sugar mixtures, *Pharm. Res.* 23 (2006) 2002–2013.
- [15] E. Lee, W.X. Huang, P. Chen, E.N. Lewis, R.V. Vivilecchia, Highthroughput analysis of pharmaceutical tablet content uniformity by near-infrared chemical imaging, *Spectroscopy* 21 (2006) 24–32.
- [16] S.S. Sekulic, H.W. Ward, D.R. Brannagan, E.D. Stanley, C.L. Evans, S.T. Sciavolino, P.A. Hailey, P.K. Aldridge, On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.
- [17] Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, Infrared hyperspectral imaging for qualitative analysis of pharmaceutical solid forms, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 79–87.
- [18] Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, Characterizing process effects on pharmaceutical solid forms using near-infrared spectroscopy and infrared imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005) 100–110.
- [19] E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, L.H. Kidder, Near-infrared chemical imaging as a process analytical tool, in: K.A. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing Ltd., 2005, pp. 187–225.
- [20] E.N. Lewis, L.H. Kidder, E. Lee, NIR chemical imaging as a process analytical tool, *Innov. Pharm. Technol.* (2005) 107–111.
- [21] A. Palou, J. Cruz, M. Blanco, J. Tomas, J. De los Rios, M. Alcalá, Determination of drug, excipients and coating distribution in pharmaceutical tablets using NIR-Cl, *J. Pharm. Anal.* 2 (2012) 90–97.
- [22] A. de Juan, R. Tauler, Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163–176.
- [23] J. Cruz, M. Blanco, Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets, *Talanta* 80 (2009) 473–478.
- [24] R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, A.S. Hussain, Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity, *AAPS PharmSciTech* 3 (2002) 1–15.
- [25] S.J. Hamilton, A.E. Lowell, R.A. Lodder, Hyperspectral techniques in analysis of oral dosage forms, *J. Biomed. Opt.* 7 (2002) 561–570.
- [26] F. Clarke, Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy, *Vib. Spectrosc.* 34 (2004) 25–35.
- [27] O. Roionova, L. Houmiller, A. Pomerantsev, P. Geladi, J. Burger, V. Dorofeyev, A. Arzamastsev, NIR spectrometry for counterfeit drug detection: a feasibility study, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 151–158.
- [28] J. Dubois, J.C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrei, E. Lewis, NIR chemical imaging for counterfeit pharmaceutical products analysis, *Spectroscopy* 22 (2007) 40–50.
- [29] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, C. Collet, Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 828–837.
- [30] S. Sasic, An in-depth analysis of Raman and near-infrared chemical images of common pharmaceutical tablets, *Appl. Spectrosc.* 61 (2007) 239–250.
- [31] A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen III, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298–1307.
- [32] L. Makein, L.H. Kidder, E.N. Lewis, M. Valleri, Non-destructive evaluation of manufacturing process changes using near infrared chemical imaging, *NIR News* 19 (2008) 11–15.
- [33] L. Zhang, M.J. Henson, S.S. Sekulic, Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 262–278.
- [34] J.C. Noordam, W.H.A.M. van den Broek, P. Geladi, L.M.C. Buydens, A new procedure for the modelling and representation of classes in multivariate images, *Chemometr. Intell. Lab. Syst. 75* (2005) 115–126.
- [35] B. Walczak, *Wavelets in Chemistry*, Elsevier, New York, 2000.
- [36] S. Theodoridis, K. Koutroumbas, *Pattern Recognition*, Academic Press, New York, 1999.
- [37] L.R. Hilden, C.J. Pommier, S.I. Badawy, E.M. Friedman, NIR chemical imaging to guide/support BMS-561389 tablet formulation development, *Int. J. Pharm.* 253 (2008) 283–290.
- [38] J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. Maspocho, J. Coello, M. Blanco, Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis, *TRAC, Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 696–713.
- [39] J. Burger, P. Geladi, Spectral pre-treatments of hyperspectral near infrared images: analysis of diffuse reflectance scattering, *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007) 29–37.
- [40] B. Vajna, A. Farkas, H. Pataki, Z. Zsigmond, T. Igricz, G. Marosi, Testing the performance of pure spectrum resolution from Raman hyperspectral images of differently manufactured pharmaceutical tablets, *Anal. Chim. Acta* 712 (2012) 45–55.
- [41] K.L.A. Chan, N. Elkhider, S.G. Kazarian, Spectroscopic imaging of compacted pharmaceutical tablets, *Chem. Eng. Res. Des.* 83 (2005) 1303–1310.
- [42] B.J. Westenberger, C.D. Ellison, A.S. Fussner, S. Jenney, R.E. Kolinski, T.G. Lipe, R.C. Lyon, T.W. Moore, L.K. Revelle, A.P. Smith, J.A. Spencer, K.D. Story, D.Y. Toler, A.M. Wokovich, L.F. Buhse, Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques, *Int. J. Pharm.* 306 (2005) 56–70.
- [43] F.W. Koehler, E. Lee, L.H. Kidder, E.N. Lewis, Near-infrared spectroscopy: the practical imaging solution, *Spectrosc. Eur.* 14 (2002) 12–19.
- [44] M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, Jordi Cruz, Critical evaluation of methods for end point determination in mixture blending of pharmaceuticals. (2012), <http://dx.doi.org/10.1039/C2AY25379H>.
- [45] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, A user friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101–110.
- [46] R. Tauler, Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133–146.
- [47] L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne, Multivariate curve resolution methods in imaging spectroscopy: influence of extraction methods and instrumental perturbations, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 2057–2067.
- [48] H. Shinzawa, K. Awa, T. Okumura, S. Morita, M. Otsuka, Y. Ozaki, H. Sato, Raman imaging analysis of pharmaceutical tablets by two-dimensional (2D) correlation spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 51 (2009) 125–131.
- [49] S. Sasic, D.A. Clark, J.C. Mitchell, M.J. Snowden, Analyzing Raman maps of pharmaceutical products by sample-sample two-dimensional correlation, *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 630–638.
- [50] A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, Use of local rank-based spatial information for resolution of spectroscopic images, *J. Chemometrics* 22 (2008) 291–298.
- [51] A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, Local rank analysis for exploratory spectroscopic image analysis. Fixed size image window-evolving factor analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005) 64–74.
- [52] Z. Wu, O. Taao, W. Chenga, L. Yu, X. Shi, Y. Qiao, Visualizing excipient composition and homogeneity of compound liquorice tablets by near-infrared chemical imaging, *Spectrochim. Acta Part A* 86 (2012) 631–636.
- [53] K.R. Poole, R.F. Taylor, G.P. Wall, Mixing powders to fine-scale homogeneity: studies of batch mixing, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 42 (1964) 305–315.
- [54] L.T. Fan, S.J. Chen, C.A. Watson, Solids mixing, *Ind. Eng. Chem.* 62 (1970) 53–66.
- [55] J.G. Rosas, M. Blanco, A criterion for assessing homogeneity distribution in hyperspectral images. Part 1: Homogeneity index bases and blending processes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.036>.
- [56] D. Bouyssou, *Evaluation and Decision Models: A Critical Perspective*, Kluwer Academic Publishers, USA, 2000.

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Applied Chemometric Group