



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Análisis de control de preparados farmacéuticos mediante
técnicas analíticas de espectroscopía vibracional**

Diego Alonso Gómez Salazar

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Directores: Santiago Maspoch Andrés y Jordi Coello Bonilla

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

2017

CAPÍTULO 7

EL MUESTREO DE UN MATERIAL HETEROGÉNEO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA PRECISIÓN DEL ANÁLISIS DE MEZCLAS BINARIAS

7.1 *Introducción*

En la obtención de resultados imprecisos y/o inexactos de la concentración de un analito en una mezcla sólida uniforme, dos causantes que rápidamente vienen a la mente son un posible fallo del método analítico, o un mezclado incompleto del material. Ambas asignaciones implican el desempeño de equipos y/o personas. Otra fuente de error más sutil, referida como el error de muestreo, con frecuencia se pasa por alto. Este error depende de la concentración del analito, sus características físicoquímicas (tamaño de partícula, forma, densidad, tendencias de interacción), el tamaño de la muestra que se dispone de la mezcla y la precisión del método analítico ¹.

De la misma forma que se puede decir que el paso de muestreo en ocasiones es obviado dentro de la evaluación de la calidad de los resultados obtenidos, en general a nivel científico el muestreo es algo que se reconoce como una fuente importante de incertidumbre en un resultado analítico, pero descuidado en la práctica. Los motivos pueden ser, entre otros, la dificultad en la evaluación experimental del error de muestreo, y la falta de teorías de muestreo claramente aplicables ².

Por intuición se sabe que muestras extremadamente pequeñas puede que no sean representativas de una mezcla a granel. No obstante, una muestra de varios gramos, que probablemente contiene millones de partículas, puede que tampoco sea representativa de la mezcla mayor ¹.

Existe un número considerable de trabajos en los que se han investigado los errores y requisitos del muestreo, en todos ellos se estudia la relación entre el error de muestreo y

el número de partículas en la muestra, el peso de la muestra, o el número de muestras a tomar ^{3,4}. Por ejemplo, las ecuaciones de muestreo de Gy ^{5,6} e Ingamells y Switzer ⁷ tratan el error de muestreo como una función de la masa de muestra.

Las mezclas con partículas de dos componentes juegan un papel importante en la aplicación de la Teoría de Muestreo al análisis químico, por ser un primer paso hacia una teoría general de muestreo para poblaciones más complicadas ⁸. Este tipo de mezclas fue el material analizado en el presente trabajo usando espectroscopía Raman. Se prepararon distintas mezclas binarias, donde hay un componente en la mezcla en menor cantidad (llamado A) y otro que es mayoritario (llamado B). El desarrollo matemático que se muestra a continuación está basado en un estudio de Fricke y colaboradores ¹, en el cual presentaron una fórmula para el cálculo del peso mínimo de muestra para la determinación de un analito en una mezcla sólida, en función de los tamaños de partícula de los componentes de una mezcla binaria.

El error global total, expresado como la varianza S_0^2 para la cantidad de A en la mezcla mayor está dado por

$$S_0^2 = S_a^2 + S_s^2 + S_m^2 \quad (7.1)$$

S_a^2 es la desviación estándar del método analítico, S_s^2 es la desviación estándar del muestreo (es decir, el error de muestreo), y S_m^2 es la desviación estándar del mezclado. De acuerdo a un trabajo previo de Kratochvil y Taylor ³ se presume que las varianzas son aditivas, y en todo este análisis se asume que los errores de manipulación son despreciables.

Cuando la mezcla es uniforme, S_m^2 es despreciable y la ecuación (7.1) se reduce a

$$S_0^2 = S_a^2 + S_s^2 \quad (7.2)$$

S_0^2 se calculó experimentalmente en nuestro trabajo a partir de un conjunto de espectros registrados por mapeo en el material, y de cada uno se mide la intensidad de alguna banda relacionada con A. Según Fricke y colaboradores S_a^2 se obtiene de la validación del método para el analito. En nuestro caso se determinó midiendo también la intensidad de una banda relacionada con A, pero a partir de un conjunto de espectros adquiridos en modo repetitividad.

Habiendo detallado en qué consiste la sumatoria de varianzas para la determinación del error total del análisis, ahora se explicará con más detalle lo que se pretende demostrar en este estudio. Básicamente el objetivo fue evaluar una estrategia de mediciones por mapeo usando espectroscopía Raman, para el análisis de comprimidos constituidos por una mezcla binaria de componentes totalmente caracterizados. Un primer reto viene dado por el diámetro de láser tan pequeño que incorpora el FT-Raman utilizado (500 μm), mientras que los materiales bajo estudio son tabletas de diámetro 13.4 mm *. El número de espectros adquiridos y la posición de registro de cada uno en la tableta es de libre elección, y es instrumentalmente factible por la platina de muestras que incorpora el instrumento, la cual es controlada con precisión desde el ordenador. Se consideró que 10 posiciones de mapeo era un número suficiente de puntos de medición, equidistantes los unos de los otros. Las mezclas tienen una composición que va del 1 al 10 % en peso, donde lo que se mezcló fue un compuesto que simulara a un API, con otro que representa un excipiente típico.

No obstante, el objetivo de este trabajo no es cuantificar el contenido del API en estas tabletas, sino hacer una evaluación de la estrategia de mapeo en sí que se ha propuesto para el análisis de unos hipotéticos comprimidos farmacéuticos, los cuales tienen un contenido de API que empieza a rozar la baja dosificación. Se prepararon dos tipos de comprimidos, con los mismos porcentajes en peso, pero donde el API añadido está en un tamaño de partícula distinto en cada uno. Aquí se abre a consideración una cuestión que a simple vista no puede resolverse intuitivamente: en muchos casos se habla de que las técnicas espectroscópicas permiten hacer análisis en la escala de porcentajes, pero es posible que el resultado sea distinto en función del tamaño de partícula en el cual se encuentre lo que se quiere cuantificar. El estudio del parámetro tamaño de partícula sobre un conjunto de mediciones realizadas por mapeo es lo que se ha investigado en este estudio.

Volviendo a la ecuación (7.2), lo que se va a investigar es si S_s^2 es un contribuidor despreciable de S_0^2 . S_s^2 está representado por las 10 mediciones por mapeo que se realizaron. Entonces con el fin de determinar si esta cantidad de puntos de medición es adecuada en un eventual análisis de estas tabletas (irradiando cada posición con un láser

* Se hicieron además mediciones con el microscopio Raman usando el objetivo 10X. Se reportan los resultados de estas mediciones con fines comparativos, porque no se espera que un microscopio brinde resultados adecuados para un análisis de contenido total de API en comprimidos farmacéuticos, a no ser que se considere el mapeo de toda la superficie de la tableta.

de 500 μm), se prueba la siguiente hipótesis nula: $H_0: S_0^2 = S_a^2$. Una hipótesis alternativa establece que $H_1: S_0^2 > S_a^2$.

Para probar la hipótesis nula, se calcula una relación de varianzas F_{exp}

$$F_{exp} = S_0^2 / S_a^2 \quad (7.3)$$

El valor obtenido de la ecuación (7.3) se compara con el valor que se encuentra en las tablas estadísticas. Este se va a representar como $F_{0.95}$ dado que se ha seleccionado un nivel de confianza del 95 % para probar la hipótesis nula. Cuando la hipótesis nula es cierta, se espera que el F_{exp} calculado por la ecuación (7.3) exceda el $F_{0.95}$ sólo un 5 % de las veces. De esta manera S_0^2 puede aproximarse mediante S_a^2 y S_s^2 es despreciable ¹.

Dada la gran cantidad de ventajas que tiene el análisis de formas sólidas de dosificación usando espectroscopía Raman (registro de espectros sin preparación de la muestra, el nivel de humedad de los materiales es poco relevante, cada componente individual da un conjunto único de bandas, los espectros contienen mucha información que luego puede procesarse automáticamente mediante ordenador), se podría pensar que el análisis cuantitativo es factible y sumamente sencillo, siendo la única cosa que debe considerarse con cierta precaución, la posibilidad de que el diámetro de irradiación sea muy pequeño respecto al objeto que se está midiendo. No obstante, en la práctica la precisión de un análisis cuantitativo es muy sensible tanto a la configuración del instrumento como a los errores de muestreo ⁹. Se detallaron una serie de ventajas de la espectroscopía Raman al inicio de este párrafo, pero de igual manera es curioso mencionar la comparación que hacen Fraser y Gordon en su revisión sobre los problemas y las soluciones al submuestreo en la espectroscopía Raman ¹⁰: tan problemático es el fenómeno de la fluorescencia hacia posibles resultados erróneos usando esta técnica, como el submuestreo.

En este trabajo se hace énfasis en el tema del muestreo, pero además se incluye una discusión sobre la sensibilidad absoluta de los dos instrumentos usados (y el efecto de variar los parámetros de adquisición en cada instrumento), dado que el tema de la sensibilidad es particularmente importante en situaciones donde se requiere analizar un número elevado de muestras, y entonces el tiempo total de adquisición de datos por muestra viene determinado por el tiempo necesario para acumular señales con una relación señal/ruido adecuada ⁹.

7.2 *Materiales y métodos*

7.2.1 **Preparación de las mezclas binarias en polvo, y obtención de las tabletas**

Los materiales de partida para la preparación de las mezclas binarias fueron:

- *Microesferas de Poli(estireno-co-divinilbenceno)* (Aldrich, abreviado PS), de 8 μm como tamaño de partícula nominal (el valor exacto del lote usado es 8.43 μm , donde la especificación indica valores entre 8 y 9 μm). Este compuesto fue utilizado como un supuesto API.

- *Ftalato ácido de potasio* (Fluka, abreviado KHP), el cual luego de un secado inicial a 105 °C y moltura a mano, se tamizó en seco usando un tamizador mecánico de laboratorio modelo RP.15 (CISA, Barcelona). La fracción usada contiene partículas entre 20 y 25 μm . Este compuesto también representa a otro API.

- *Celulosa microcristalina* (Aldrich, abreviado MCC), de 20 μm como tamaño de partícula nominal. La especificación establece un valor de d50 entre 18 y 22 μm , y el valor en el lote usado es 19 μm . Este compuesto representa a los supuestos excipientes de los comprimidos preparados posteriormente, aunque en la práctica la MCC es un excipiente farmacéutico. Se trata de uno de los rellenos-aglutinantes más usados en la compactación directa dado que se puede usar como aglutinante seco ¹¹.

Las mezclas fueron homogeneizadas en un agitador mecánico T2C (WAB, Basilea), y se registraron espectros de las mezclas como polvos sueltos y luego de la compactación en tabletas firmes. Para la obtención de las tabletas se usó una prensa hidráulica Perkin Elmer 15.001 (Waltham, MA): se pesaron aproximadamente 300 mg de cada mezcla, y luego de aplicar una presión de 140 MPa, se obtuvieron discos con un diámetro de 13.4 mm y grosores comprendidos entre 1.8 y 2.1 mm.

Las mezclas se prepararon con una composición en peso de 1-3-5-7-10 % de PS o KHP. Las mezclas de KHP/MCC se prepararon dos veces, y en cada ocasión el grupo de mezclas se registró con distintos parámetros como se explicará más adelante. En el caso del segundo grupo de mezclas de KHP/MCC se prepararon 3 mezclas más, de concentración 12-15-20 %.

7.2.2 Tabletas preparadas con un solo compuesto

En adición al estudio sobre la estrategia de mapeo para tabletas preparadas con una mezcla de dos compuestos, se hicieron mediciones para determinar el espesor con el cual las intensidades Raman dejan de crecer para los 3 compuestos mencionados en el apartado anterior, pesando distintas cantidades del polvo y compactando a 140 MPa. Los rangos de espesores probados fueron de 0.6 a 4.4 mm para el PS, 0.5 a 3 mm para el MCCla y 0.5 a 2.8 mm para el KHP. Para otros cálculos que se muestran en este trabajo, el dato más relevante es la profundidad a la cual las intensidades Raman dejan de crecer para el MCC, dado que es el componente mayoritario de los comprimidos formados a partir de las mezclas binarias.

Más tabletas se prepararon que contenían solo PS o MCC, pero variando la presión de compactación. Se usó la misma prensa hidráulica mencionada anteriormente, y se aplicaron los siguientes valores de presión: 74, 222, 444, 666 y 888 MPa.

7.2.3 Adquisición de los espectros de las mezclas binarias

Todas las mezclas se registraron con los equipos MultiRAM y RamanScope III, los cuales fueron descritos en el Capítulo anterior (en este trabajo se seguirán distinguiendo como macro-Raman y microscopio Raman respectivamente), usando un objetivo 10X para la obtención de los espectros Raman en el microscopio[†]. Las condiciones de registro se detallan en la Tabla 7.1. Para la medición de mezclas en polvo se puso una capa de aproximadamente 2 mm, un valor cercano al espesor de las tabletas. En todos los casos los espectros se registraron entre 3600 y 50 cm^{-1} . Se aplicaron potencias de láser considerablemente altas, cerca del máximo de potencia que se puede emitir con el láser instalado (1 W), pero en mediciones preliminares se confirmó que no había daño aparente en los materiales al final del registro. Con el fin de que las tabletas no se desplazaran durante las mediciones por mapeo en el equipo MultiRAM, cada una se fijó a un disco de aluminio que estaba incrustado en la platina de muestras. La configuración de los parámetros de medición, la realización de las medidas y la extracción de los espectros se hizo usando el programa OPUS de Bruker (versión 7.2).

[†] El RamanScope III incorpora además un segundo objetivo 40X. Este también se usó pero sólo para tomar imágenes de las superficies de los materiales.

Tabla 7.1 Parámetros experimentales para la adquisición de los espectros con los equipos macro-Raman y microscopio Raman

Primer grupo de mezclas (Mezclas de KHP/MCC y PS/MCC)	Macro-Raman	Resolución: 4 cm ⁻¹ 32 barridos Potencias de láser: 400-600-800 mW
	Microscopio Raman	Resolución: 8 cm ⁻¹ 32 barridos Potencias de láser: 500-700-900 mW
	Modo de registro de los espectros de cada mezcla: Concentraciones 1-5-10 % en peso: Mapeo, 10 posiciones Repetitividad: 10 espectros sucesivos, registrados en 3 posiciones de la tableta (es decir, 3 grupos de 10 espectros) Concentraciones 3-7 % en peso: Solo se midieron por mapeo, 10 posiciones	
Segundo grupo de mezclas (Solo mezclas KHP/MCC)	Macro-Raman	Resolución: 16 cm ⁻¹ 128 barridos Potencias de láser: 500-900 mW
	Microscopio Raman	Resolución: 16 cm ⁻¹ 256 barridos Potencia de láser: 900 mW
	Modo de registro de los espectros de cada mezcla: Todas las concentraciones 1-3-5-7-10 % en peso*: Mapeo, 10 posiciones Repetitividad: 10 espectros sucesivos, registrados en una posición de la tableta *Adicionalmente se prepararon mezclas de concentración 12-15-20 %, pero estas únicamente se midieron en el microscopio.	

7.2.4 Adquisición de los espectros para las tabletas que contienen un solo compuesto

Las tabletas preparadas con distintos grosores se registraron todas a 4 cm⁻¹ y 32 barridos. En el caso de las tabletas de KHP y MCC se registraron a dos potencias (500 y 900 mW), mientras que las de PS se registraron sólo a 500 mW. Se midieron dos posiciones de estas tabletas, y se registraron 3 espectros uno tras otro en cada una.

Respecto a las tabletas de MCC y PS compactadas a distinta presión, estas se registraron a 800 mW, 4 cm⁻¹ y 32 barridos, y se midieron 3 posiciones de la superficie de estas tabletas, registrando un espectro en cada una.

7.2.5 Pretratamientos espectrales

En todas las comparativas de los resultados obtenidos con los espectros antes y después de pretratar, para lo segundo se aplicaron dos correcciones de línea base (abreviadas BLC) con el fin de corregir el offset espectral y la pendiente de los espectros, y una normalización a vector unidad (abreviado UNorm). Los hallazgos experimentales relacionados con las intensidades Raman se discuten para la banda a 1600 cm^{-1} (estiramiento CC_t debido al anillo aromático en la estructura del PS y KHP). Los espectros fueron pretratados usando el programa Unscrambler (versión 10.3).

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Experimentos sobre tabletas que contienen un único compuesto

7.3.1.1 Evolución de las intensidades Raman en función del espesor de la tableta

La Figura 7.1 muestra la evolución de las intensidades Raman en función del grosor de la tableta de PS y MCC, materiales con un tamaño de partícula de $8\ \mu\text{m}$ y $20\ \mu\text{m}$ respectivamente ($20\ \mu\text{m}$ también es el tamaño del KHP utilizado, pero con el fin de no duplicar figuras los datos del KHP se mostraron en la Figura 6.5). Adicionalmente en las Figuras 7.1a y b se muestra un espectro de PS y MCC respectivamente, ambos adquiridos con los mismos parámetros instrumentales. Como se puede apreciar, el espectro Raman de la MCC resulta en intensidades mucho más bajas que las del PS (y la misma observación se puede encontrar al comparar el espectro del KHP y la MCC, el primero se encuentra en la Figura 6.8). Esto representa una ventaja para el análisis realizado en nuestros hipotéticos comprimidos farmacéuticos, pero también en el análisis formal de cualquier medicamento (para la determinación del contenido de API por ejemplo). Como se ha explicado en capítulos anteriores, la intensidad de la dispersión Raman está relacionada con la polarizabilidad de las moléculas bajo irradiación, y esto generalmente es mucho mayor para los sistemas π que para las estructuras con enlaces σ . Dado que la mayoría de los APIs tienen enlaces π y la mayoría de los excipientes son moléculas saturadas (con enlaces σ), los espectros Raman son más sensibles a las moléculas del API¹⁰.

Al observar las gráficas de evolución de las intensidades en función del grosor de la tableta, el valor para el cual éstas dejan de crecer es de 1, 1.3 y 2 mm para la MCC, KHP y

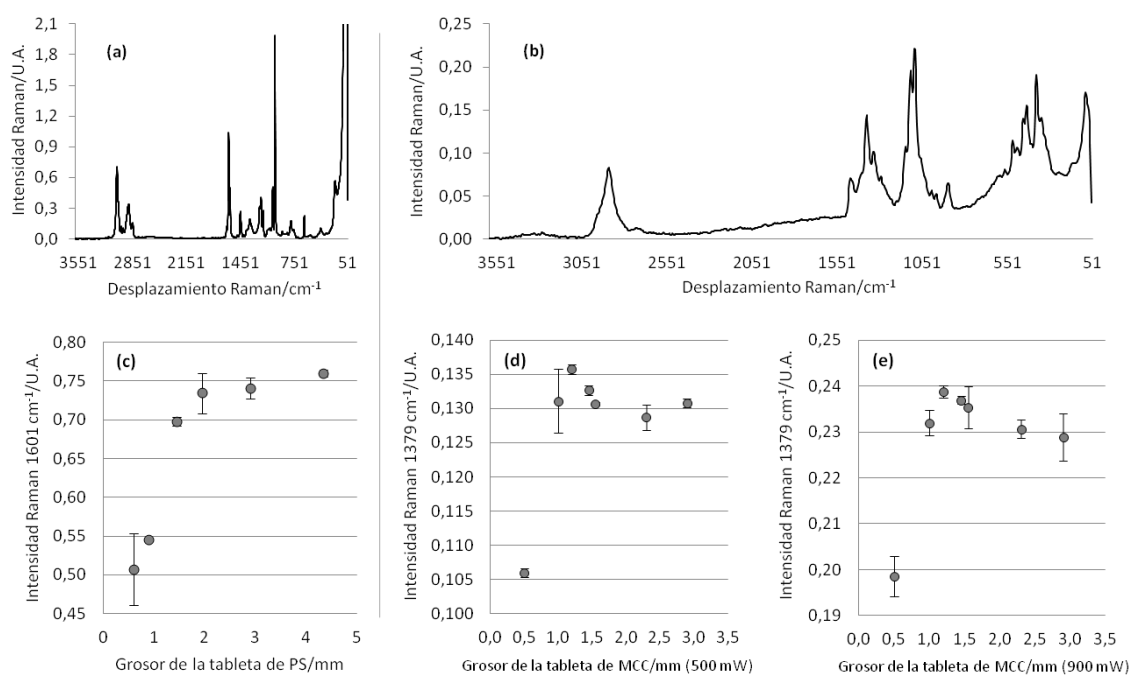


Figura 7.1 (a) y (b): Ejemplo de un espectro Raman registrado en una tableta de PS y MCC respectivamente, ambos obtenidos con los mismos parámetros de adquisición. (c), (d) y (e): Promedio y desviación estándar ($n=6$) de la intensidad Raman a 1601 cm^{-1} para distintos espesores de una tableta de PS (c), y para la intensidad a 1379 cm^{-1} en función del grosor de la tableta de MCC. Se muestran los resultados a una potencia de irradiación de 500 mW (d) y 900 mW (e).

PS respectivamente. Dos de estos materiales tienen el mismo tamaño de partícula (MCC y KHP), y hay una diferencia en la magnitud medida del 30 %. Si bien se es consciente que podrían haber maneras más sofisticadas de hacer esta determinación (los grosores de los comprimidos se midieron con un pie de rey, se podrían haber preparado más gradientes de espesor), el que se haya obtenido un valor inferior para el MCC tiene sentido considerando las propiedades de este material.

La MCC de $20\text{ }\mu\text{m}$ se vende como Avicel PH 105 ¹², y se trata del Avicel de menor tamaño de partícula, así como el más compresible de la familia ¹³. Está reportado que durante la compactación, la MCC se deforma plásticamente y por tanto se maximiza el área de unión interpartícula; y es precisamente esta plasticidad la principal razón de sus excepcionales propiedades aglutinantes ¹⁴. Algo muy importante a destacar es que durante un proceso de deformación plástica no hay cambio en el volumen de las partículas ¹⁵. Durante la formación de comprimidos que contienen MCC, la proximidad de los grupos que contienen hidrógeno entre moléculas de celulosa adyacentes permite la formación de números

puentes de hidrógeno, y esta es la principal causa de la fuerza y cohesividad de las tabletas obtenidas ¹⁴.

Es más, la compactabilidad de la MCC es tan alta que Sun ¹⁶ encontró que es posible tener comprimidos con cero porosidad (densidad de la tableta = densidad absoluta de la MCC), cuando se compacta un material conteniendo un 7.36 % de humedad, a cualquier presión por encima de 100 MPa. En este caso, la posibilidad de alcanzar cero porosidad a baja presión se debe a los efectos plastificantes del agua. Respecto al material usado, en el certificado de análisis de la MCC utilizada se especifica que la pérdida durante el secado debe ser menor o igual al 5 %. El valor encontrado en el lote usado es del 2.8 %, y durante la manipulación del producto éste se mantuvo en una desecadora con el fin de no modificar la humedad del reactivo. Como se dijo en la sección experimental, las mezclas en polvo se compactaron a 140 MPa. Finalmente otro aspecto que incrementa la densidad de empaquetamiento tiene que ver con la dispersión de los tamaños de partícula: una mayor dispersión en los tamaños lleva a comprimidos más densos ¹¹. Esto es importante para todos los tipos de partícula usados, pero en el caso de la MCC, el certificado de análisis del material indica un d10 de 7 μm y un d90 de 42 μm .

Luego de toda la descripción anterior sobre la compactación de la MCC, ¿por qué es tan relevante el empaquetamiento tan alto que se puede alcanzar con este material?. El nivel de empaquetamiento en cada comprimido preparado tiene un impacto sobre dos de los componentes mencionados en el Capítulo 2, que tienen que ver con la interacción de la radiación con ellos: el coeficiente de dispersión elástica (r), y el coeficiente de absorción (α). Agyare Yeboah y colaboradores ¹⁷ encontraron que r disminuye al aplicar una presión de compactación mayor; y por otro lado Oelkrug y colaboradores ¹⁸ midieron α para dos muestras de sílice con tamaño de partícula 5 y 40 μm . La compactación era mayor para la muestra de 40 μm y esto se tradujo en un coeficiente de absorción mayor para este material. Por tanto, la combinación de un mayor α y un menor r en las tabletas de MCC, podría ser la causa de un menor valor de profundidad con el cual las intensidades Raman en modo retrodispersión dejan de crecer, en comparación al KHP.

Respecto al PS, con este material se encontró una profundidad mucho mayor con la cual las intensidades llegaban a un máximo. Esto podría deberse a un peor empaquetamiento en las tabletas de PS. En la Figura 7.2 se representa la altura de la columna obtenida en función de la cantidad de polvo medida en la balanza, y como se puede apreciar para el PS siempre se obtuvieron tabletas más gruesas. Las partículas de PS forman un arreglo menos

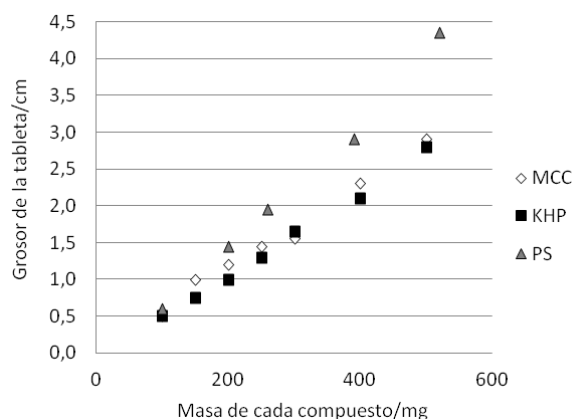


Figura 7.2 Evolución del grosor de la tableta de MCC, KHP o PS según la masa de cada compuesto que se compactó a 140 MPa.

denso, y por este motivo la radiación Raman retrodispersada que se detecta es capaz de aumentar conforme la columna de material se incrementa hasta llegar a los 2 mm.

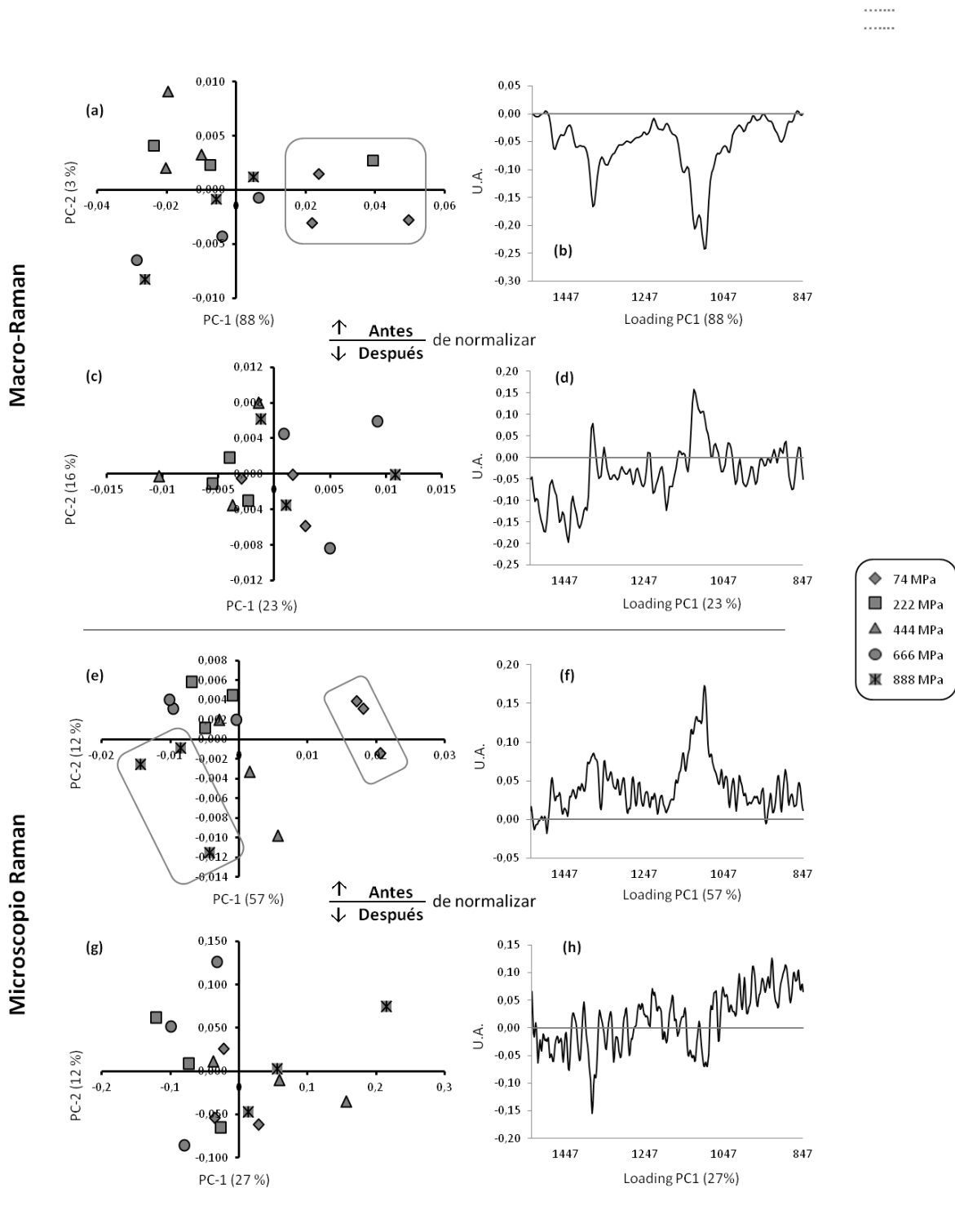
Finalmente queda describir cómo sería el empaquetamiento cuando se preparan las mezclas binarias de KHP/MCC y PS/MCC. En la mayoría de mediciones, las tabletas preparadas contienen como máximo un 10 % en peso de otro

tipo de partícula distinto de la MCC. Thoorens y colaboradores ¹¹ mencionan en su revisión sobre el uso de la MCC en la industria farmacéutica, que el *mechanical interlocking* de partículas de MCC de forma irregular y alargadas, ha sido sugerido para aumentar la capacidad de hacer tabletas de MCC. Es posible que este sea el modo por el cual se compactan las partículas amorfas de KHP y las microesferas de PS, en la matriz de MCC.

7.3.1.2 Efecto de la presión de compactación de polvos de PS y MCC en los espectros Raman

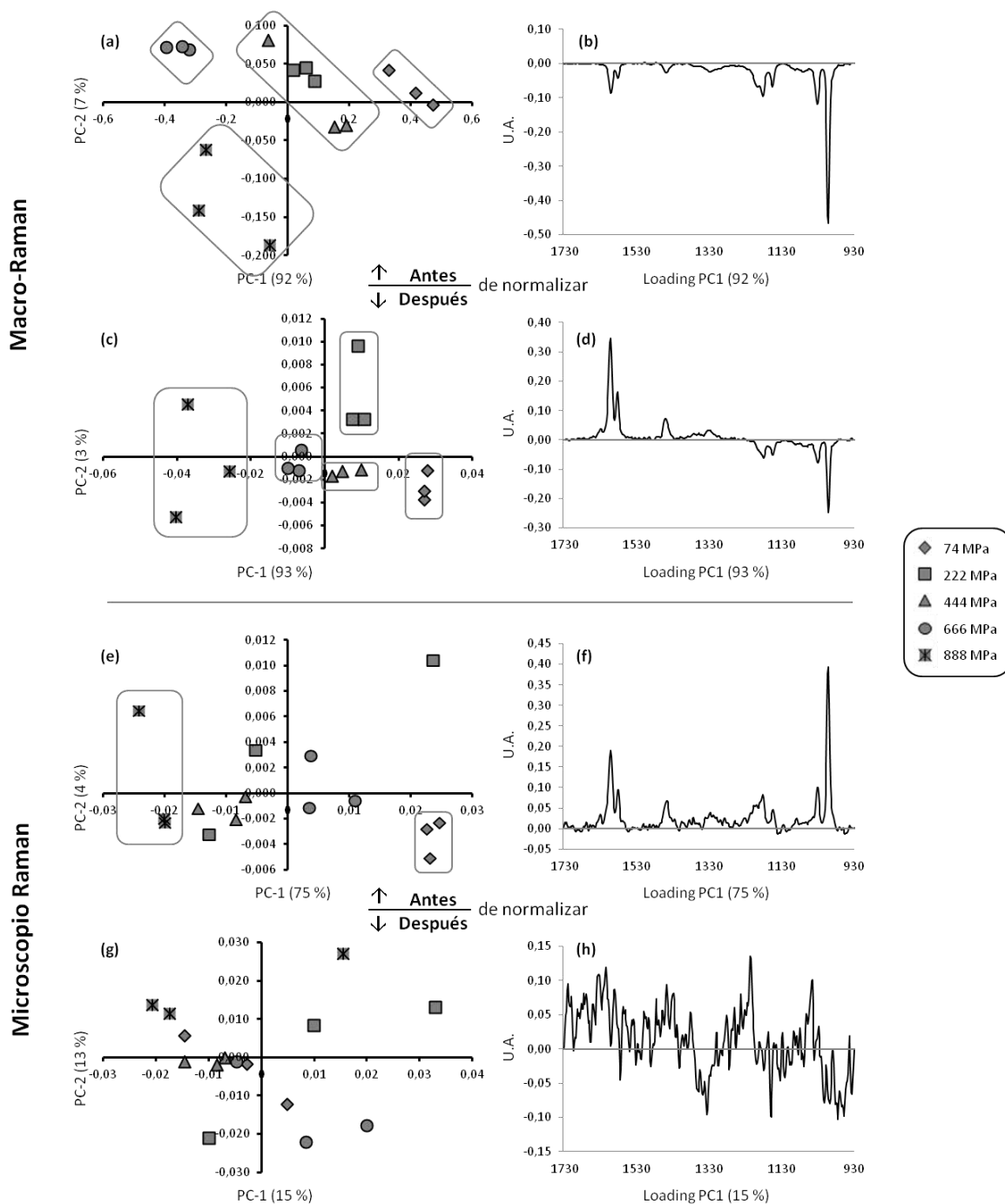
El efecto de la presión de compactación de los polvos se ha estudiado en trabajos previos para datos adquiridos por espectroscopía NIR ¹⁹ y Raman ²⁰. Dada la sutileza de los cambios que se pueden presentar, al tratarse de comparaciones donde todos los materiales tienen la misma composición, mismo tamaño de partícula y en todos los casos lo que se están midiendo son tabletas firmes, en estos se han usado herramientas quimiométricas para las comparaciones necesarias, en adición a la representación de la intensidad Raman versus la presión de compactación. En las Figuras 7.3 y 7.4 se muestran los resultados obtenidos (gráfico de scores PC2 vs PC1 y loadings del PC1) al hacer un PCA con los espectros registrados sobre las tabletas de MCC y PS, antes y después de normalizar, y al pie de cada figura se presentan los resultados de la medición de la intensidad de una banda espectral para cada presión.

Respecto al MCC parece que la tableta compactada a menor presión se diferencia de las otras presiones en ambos instrumentos, pero luego al normalizar ya no es posible



MCC: Medición de la intensidad a 1379 cm ⁻¹						
Macro-Raman				Microscopio Raman		
Presión (MPa)	Antes norm	Desp norm		Presión (MPa)	Antes norm	Desp norm
74	0.116	0.150		74	0.0072	0.0965
222	0.120	0.150		222	0.0054	0.1014
444	0.123	0.151		444	0.0047	0.0805
666	0.123	0.151		666	0.0052	0.1033
888	0.123	0.151		888	0.0040	0.0839

Figura 7.3 Gráficas de PCA de las tabletas de MCC compactadas a distinta presión, con los espectros registrados en el macro-Raman (a-d) y en el microscopio Raman (e-h). Se muestran los resultados antes y después de normalizar. Al pie de la figura se muestran los resultados del análisis univariante para la banda a 1379 cm⁻¹



PS: Medición de la intensidad a 1601 cm ⁻¹						
Macro-Raman			Microscopio Raman			
Presión (MPa)	Antes norm	Desp norm	Presión (MPa)	Antes norm	Desp norm	Desp norm
74	1.044	0.210	74	0.0522	0.1740	
222	1.078	0.203	222	0.0476	0.1708	
444	1.065	0.202	444	0.0461	0.1725	
666	1.129	0.198	666	0.0485	0.1715	
888	1.038	0.188	888	0.0434	0.1697	

Figura 7.4 Gráficas de PCA de las tabletas de PS compactadas a distinta presión, con los espectros registrados en el macro-Raman (a-d) y en el microscopio Raman (e-h). Se muestran los resultados antes y después de normalizar. Al pie de la figura se muestran los resultados del análisis univariante para la banda a 1601 cm⁻¹

distinguir los espectros según la presión aplicada (Figuras 7.3a, c, e, g). Por otro lado un ANOVA usando las intensidades a 1379 cm^{-1} , muestra que no hay diferencias significativas ni antes ni después de normalizar. Este resultado concuerda con lo reportado por Arruabarrena y colaboradores en sus mediciones de tabletas farmacéuticas pulverizadas y recompactadas a distinta presión usando un FT-Raman. En el Anexo 7.1 se muestran imágenes registradas con el objetivo 10 X de la superficie de estas tabletas, donde se observa cómo varía la disposición de las partículas de MCC, las cuales parece que tienen una apariencia alargada.

A diferencia de lo encontrado para las tabletas de MCC, en el caso de las microesferas de PS es llamativo el hecho de que hay clusters según la presión de compactación, antes y después de normalizar. Las esferas tienen un tamaño de partícula de $8\text{ }\mu\text{m}$, y en una revisión sobre el apelmazamiento de polvos a granel, Zafar y colaboradores ²¹ cuando hablan sobre la deformación plástica como uno de los tipos de interacción entre partículas, citan como ejemplo las esferas de poliestireno. De estas indican que cuanto más pequeñas son, es más probable que se deformen plásticamente en función de la presión aplicada.

Dado que la normalización parece confirmar aún más las diferencias entre los espectros en función de la presión aplicada, en la Figura 7.5 se superponen los espectros adquiridos sin pretratar, sólo con las correcciones de línea base aplicadas, y luego de la normalización. Lo primero que llama la atención es que si se mide la intensidad de la banda a 1601 cm^{-1} no se observa ninguna tendencia dependiente de la presión, como sí se veía para la MCC (comparar pies de las Figuras 7.3 y 7.4). Pero luego, al moverse a valores más bajos de desplazamiento Raman (empezando en 1329 cm^{-1}) se observa una mayor dispersión en los espectros, donde las intensidades son más altas para la presión de compactación

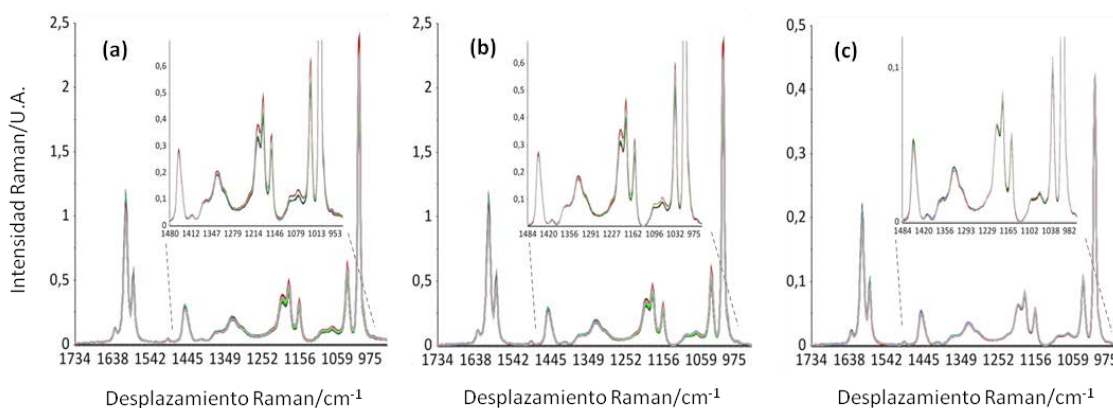


Figura 7.5 Espectros registrados sobre tabletas de microesferas de PS compactadas a distinta presión. Se representan los espectros (a) crudos, (b) luego de las correcciones de línea base y (c) luego de las correcciones de línea base y normalización.

mayor. El RSD % de los 15 valores medidos es del 4 % para la banda a 1329 cm^{-1} , y luego para los máximos de 1182 , 1032 y 1001 cm^{-1} se incrementa hasta el 6 %. En realidad esto queda en evidencia al comparar la intensidad de las dos bandas más altas en los espectros de la Figura 7.5, con el loading del PC1 (Figura 7.4b). Luego de normalizar lo que sucede con las intensidades queda claramente reflejado en el loading correspondiente del PC1 (Figura 7.4d): para las bandas a menor desplazamiento Raman las intensidades son más altas para la mayor presión de compactación, mientras que para las restantes (incluida la debida a la vibración al anillo aromático), ocurre lo contrario. Al aplicar un ANOVA a las intensidades de 1603 , 1183 y 1002 cm^{-1} registradas aplicando distintas presiones de compactación, en todos los casos el $F_{\text{experimental}}$ es superior al $F_{\text{crítico}}$ (3.48). Para la intensidad de 1603 cm^{-1} tiene un valor de 6.77 en el caso de los espectros antes de normalizar, luego para el resto de intensidades, antes y después de normalizar, los $F_{\text{experimental}}$ se incrementan a valores entre 33 y 103. Finalmente en las mediciones con el objetivo 10X, en los extremos del gráfico de scores obtenido luego de sólo aplicar las correcciones de línea base a los espectros quedan las presiones más baja y más alta (Figura 7.4e), y en todo el espectro las intensidades son más altas para la tableta compactada a menor presión. Luego al normalizar los espectros las diferencias desaparecen.

Las explicaciones que se pueden dar a lo observado con las microesferas de PS están relacionadas con lo altamente particular que es este material. Rimai y colaboradores ²² reportaron la deformación por fluencia lenta (*creep behavior* en inglés) de las partículas de PS como resultado de la adhesión al formar una tableta firme. Con cada presión superior que se aplica se va forzando a que estas progresivamente se desplacen y consigan un empaquetamiento más compacto. Estas diferencias son detectadas con un haz de $500\text{ }\mu\text{m}$, pero no en el microscopio Raman, donde la menor cantidad de partículas irradiadas parece que no es lo suficiente para mostrar lo que ocurre a nivel macro. El poliestireno como material se usa en muchísimas aplicaciones, pero hablando propiamente de las esferas de poliestireno entrelazadas con divinilbenceno, se trata de un ejemplo de los materiales que actualmente se producen con un tamaño de partícula muy definido con fines de investigación; por ejemplo hay un trabajo sobre el efecto del tamaño de partícula en los espectros infrarrojos por reflectancia difusa de esferas de poliestireno ²³. De los comprimidos de esferas de PS también se registraron imágenes con el microscopio óptico. Para este caso las imágenes donde se observan más cambios dependiendo de la presión de compactación son las registradas con el objetivo 40 X, las cuales se muestran en el Anexo 7.2. Al hacer el ajuste fino para esta magnificación en cada tableta, en la imagen obtenida

cada vez se van viendo las esferas de mayor tamaño, según la presión que se aplicó para su compactación.

7.3.2 Mediciones sobre las mezclas KHP/MCC, y PS/MCC

7.3.2.1 Evolución de la altura de pico al aumentar la concentración de KHP o PS cuando se irradia con distintas potencias de láser, y el efecto de la normalización de los espectros

La Figura 7.6 muestra espectros adquiridos con el macro-Raman al irradiar una tableta que contiene 5 % p/p de KHP en MCC (a) y 5 % p/p de PS en MCC (c). Estos espectros fueron adquiridos a 800 mW, 4 cm⁻¹ de resolución y 32 barridos. Al lado en (b) y (d), se muestra un espectro de KHP y PS puro respectivamente, adquiridos también a 800 mW y 32 barridos, pero a 1 cm⁻¹ de resolución. En este trabajo el énfasis se ha puesto en la banda a 1601 cm⁻¹ (la cual es común en ambas mezclas), y como se puede apreciar no hay una alteración en el ancho de banda natural al disminuir la resolución de 1 a 4 cm⁻¹. Únicamente los FT-Raman permiten seleccionar una resolución para el registro de los espectros. En este sentido Steven Bell en su capítulo sobre el análisis cuantitativo de

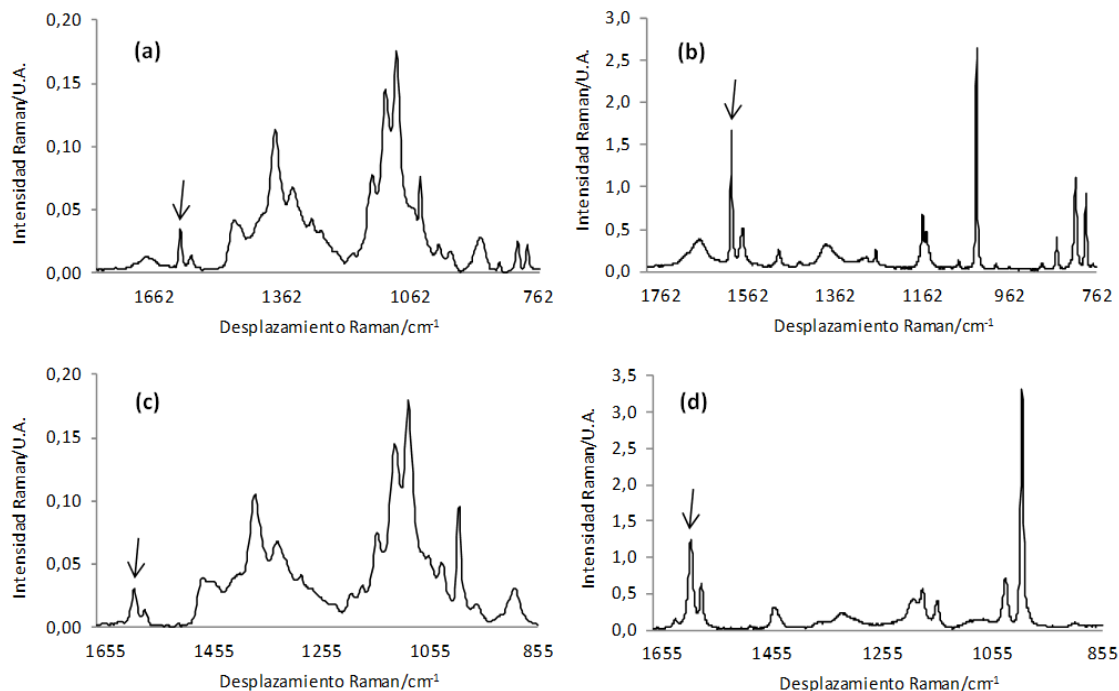


Figura 7.6 Espectros registrados con el macro-Raman, todos a 800 mW de potencia de láser y haciendo 32 barridos. (a) y (c): espectro de una tableta que contiene un 5 % p/p de KHP y PS, respectivamente. Para estos se seleccionó una resolución de 4 cm⁻¹. (b) y (d): espectros de una tableta que contiene únicamente KHP o PS, respectivamente. Estos fueron obtenidos con una resolución de 1 cm⁻¹.

formulaciones sólidas mediante espectroscopía Raman, menciona que en general en los trabajos publicados no se expone explícitamente el porqué de la elección de cierta resolución, pero que no obstante en los productos farmacéuticos sólidos el ancho natural de las bandas Raman es comúnmente $> 4 \text{ cm}^{-1}$ y en ocasiones $> 8 \text{ cm}^{-1}$. Seguidamente expone que el parámetro clave de calidad de los espectros está en si es posible extraer información analítica cuantitativa de ellos, y que esto no está directamente relacionado con el ancho de las bandas. Szostak y Mazurak demostraron esto en un análisis del contenido de ácido acetilsalicílico en tabletas con los espectros registrados a 16 y 2 cm^{-1} , al respecto encontraron que la diferencia en la precisión de las mediciones era muy pequeña (RSEP = 1.52 % a 16 cm^{-1} , 0.99 % a 2 cm^{-1}), haciendo siempre 128 barridos. En nuestro caso con 32 barridos posiblemente sí que se agradece el haber usado una menor resolución, debido a la disminución en el ruido de la línea base en los espectros. Evidentemente también se disminuye el tiempo de adquisición de los espectros al pasar de 1 a 4 cm^{-1} .

En las Figuras 7.7 y 7.8 se muestran los resultados para la medición de tabletas de PS o KHP con el equipo MultiRAM (correspondientes al primer grupo de mezclas según la Tabla 7.1), antes y después de normalizar en modo mapeo (Figura 7.7) y repetitividad (Figura 7.8). Lo más destacable es que las intensidades de banda son mayores cuanto mayor es la potencia del láser, en total concordancia con las ecuaciones (2.1) y (3.1), pero luego al normalizar las intensidades de pico prácticamente se igualan. En el caso de las mediciones de repetitividad se tienen 3 símbolos para cada potencia y nivel de concentración, generado cada uno del promedio de 10 espectros, y como se observa existe cierta dispersión entre los 3 símbolos aún luego de normalizar. Esto se debe a que, a pesar de que hay más datos involucrados (30 espectros), estos se obtuvieron de únicamente 3 posiciones en la tableta, por lo que ya se empieza a notar el inconveniente de tomar una tableta y pretender hacer cualquier tipo de análisis a partir de la irradiación de una única posición en la superficie, al menos usando un diámetro de irradiación de 500 μm .

7.3.2.2 Efecto de la potencia del láser sobre la relación Señal/Ruido de los espectros

En el apartado anterior se vio que las intensidades en los espectros registrados con el mismo material, usando distintas potencias de láser, se hacen prácticamente iguales luego de la normalización. No obstante como se dijo en el Capítulo 2, la capacidad de extraer información analítica de técnicas como la espectroscopía Raman está comúnmente

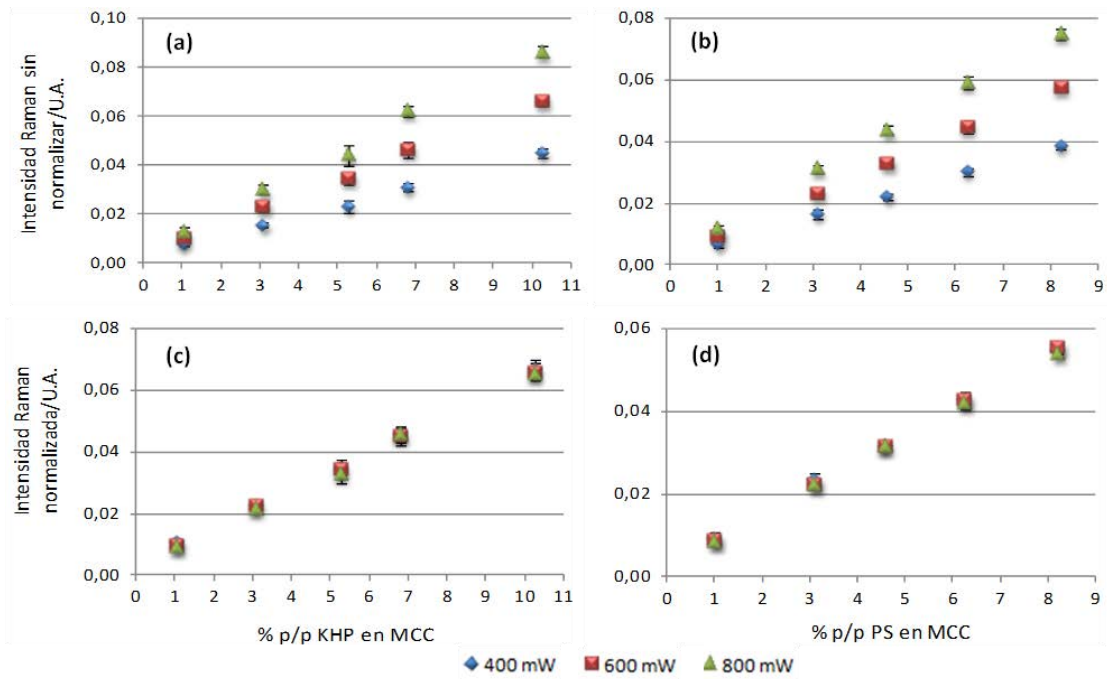


Figura 7.7 Efecto de la normalización en las intensidades de pico registradas variando la potencia del láser sobre tabletas de KHP (a y c) y PS (b y d). Mediciones hechas por mapeo en el macro-Raman.

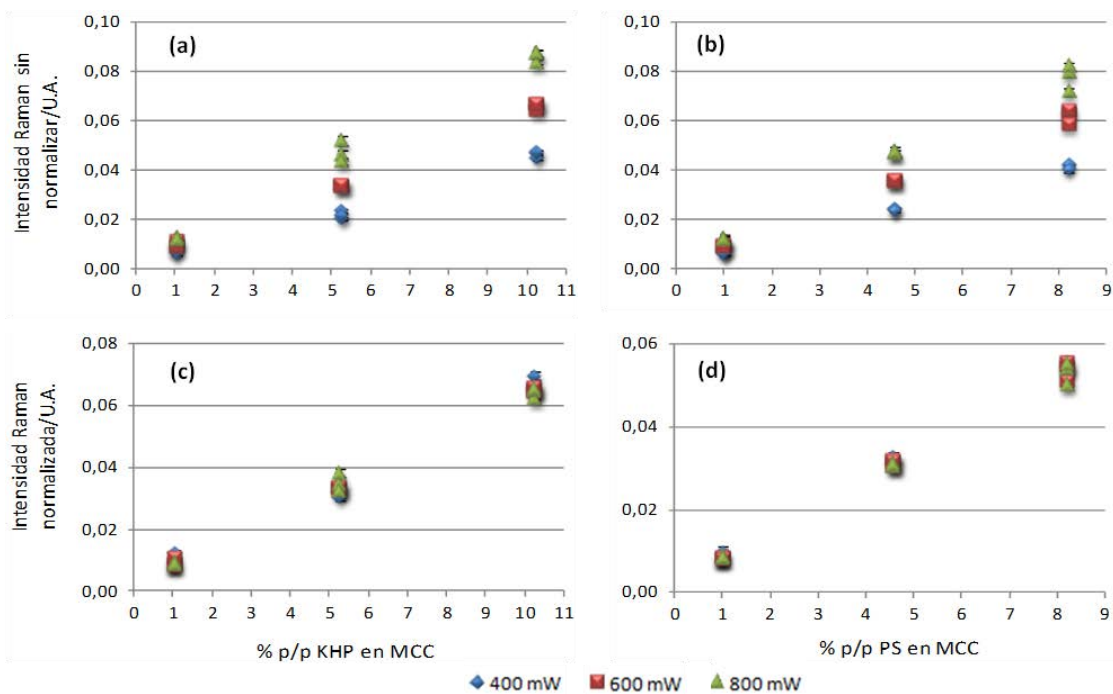


Figura 7.8 Efecto de la normalización en las intensidades de pico registradas variando la potencia del láser sobre tabletas de KHP (a y c) y PS (b y d). Se muestran los resultados para tres mediciones de repetitividad, usando el macro-Raman.

limitada por la *SNR* para cierto conjunto de parámetros de medición. En la Tabla 7.2 se muestran los valores de *SNR* obtenidos para una tableta que contiene un 10 % p/p de PS o KHP, luego de irradiar a 3 potencias de láser, antes y después de normalizar (al igual que en el capítulo anterior, *SNR* únicamente se puede estimar a partir de datos generados en modo repetitividad). Es evidente que la aplicación de una mayor densidad de potencia incrementa la cantidad de fotones Raman generados, la señal aumenta, y aunque el ruido en un FT-Raman también tiene un componente que depende de la señal y del background (ecuaciones 3.18-3.20), lo cierto es que en estos instrumentos la *SNR* está limitada por el ruido oscuro (el ruido del detector). Por tanto *SNR* aumenta al irradiar con una mayor potencia, y la normalización no cambia su valor. En los datos de la Tabla 7.2 parece que con la mezcla de KHP hay cierto aumento en la *SNR* luego de normalizar, no obstante luego de una inspección visual de los espectros antes y después de normalizar no parece que haya alguno anómalo que justifique los datos obtenidos.

Tabla 7.2 Relación Señal/Ruido para la banda a 1601 cm^{-1} en las mediciones de una tableta que contiene 10 % p/p de PS o KHP en MCC, antes y después de normalizar (espectros registrados en el macro-Raman). Los 3 datos que se incluyen separados por guiones corresponden a cada una de las medidas de repetitividad.

Material	Pretratamiento espectral		Potencia de láser			Promedio de los 3 replicados de repetitividad		
			400 mW	600 mW	800 mW	400	600	800
PS	sólo BLC	Relación SNR	45-45-45	53-29-42	48-43-67	45	41	53
	BLC + UNorm		43-42-50	67-30-53	43-48-83	45	50	58
KHP	sólo BLC		42-40-56	43-43-53	77-63-71	46	47	70
	BLC + UNorm		53-53-53	77-56-67	143-167-111	53	66	140

7.3.2.3 Dispersión de las mediciones de mapeo sobre polvos sueltos y tabletas firmes, y el efecto de la normalización de los espectros

En este trabajo se registraron espectros por mapeo y de repetitividad en todas las mezclas preparadas, antes y después de compactar en la prensa hidráulica. La Figura 7.9 muestra la dispersión de las mediciones por mapeo, calculada como la desviación estándar de las 10 intensidades de banda/promedio de las intensidades * 100 (RSD %), antes (Figuras 7.9a y c) y después de normalizar (Figuras 7.9b y d). En todas las gráficas hay dos aspectos muy relevantes: por un lado, los símbolos sin rellenar (correspondientes a espectros

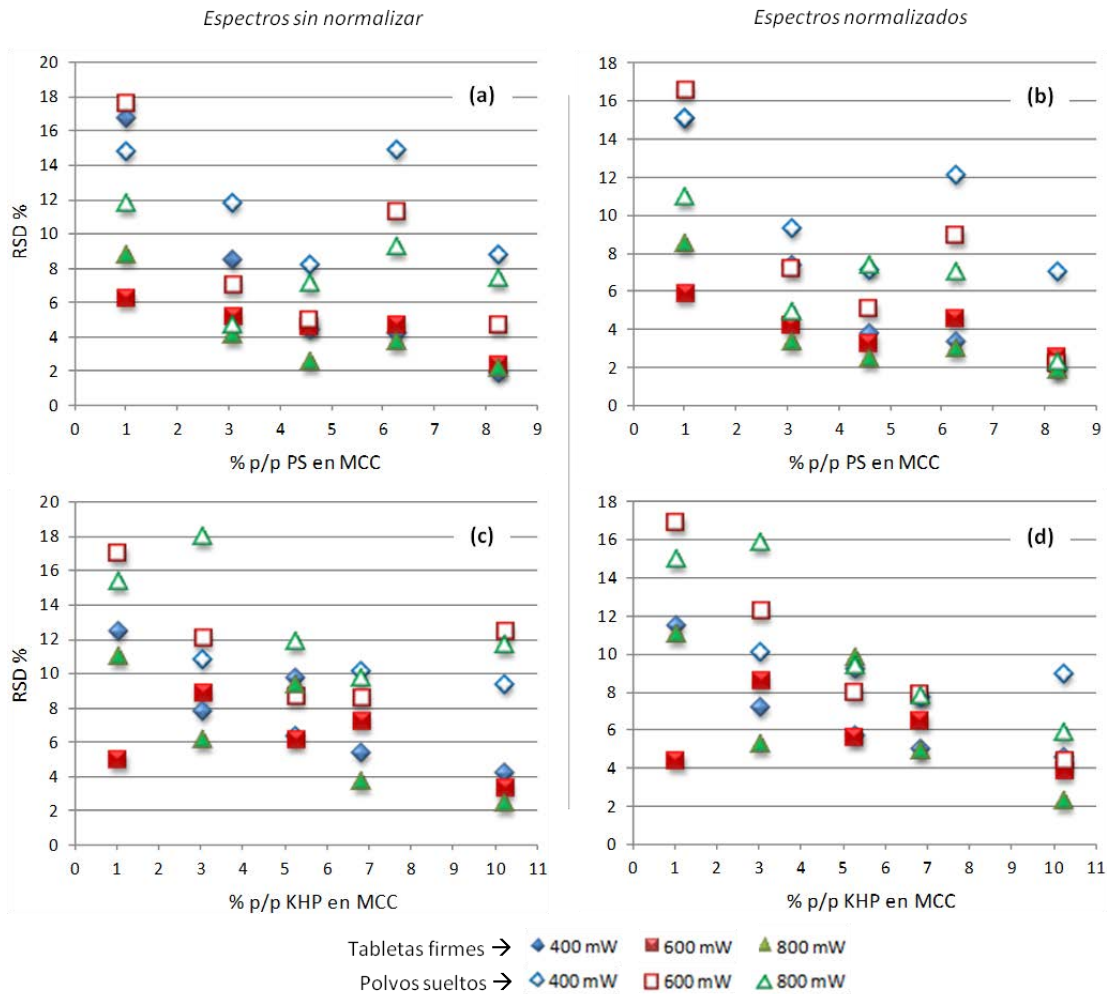


Figura 7.9 Dispersión de los valores de mapeo, calculada como RSD % para las mezclas de PS/MCC y KHP/MCC, medidas como polvos sueltos y como tabletas para tres potencias del láser. Se muestran los valores antes y después de normalizar los espectros. Mediciones hechas con el macro-Raman.

obtenidos sobre las mezclas como polvos sueltos) por lo general aparecen por encima de los símbolos rellenos (valores obtenidos de las tabletas compactadas). Y por otro lado, si se comparan los gráficos de la izquierda con los de la derecha hay muy pocos cambios en los valores representados.

El que los RSD % sean más altos para las mezclas sin compactar que para las tabletas no se debe a la desviación estándar de las 10 mediciones, sino a la intensidad promedio registrada en cada caso. Esto nuevamente se justifica en una menor cantidad de material irradiado cuando el material está suelto, en comparación a una tableta donde la densidad aparente es considerablemente mayor. Lo siguiente que se hizo fue aplicar una normalización a los espectros: al igual que en el estudio anterior, estamos poniendo la

quimiometría al servicio de la evaluación de la estrategia de mapeo que se ha propuesto en este trabajo. De las mediciones hechas sobre un material de composición homogénea, ahora sabemos que la normalización corrige las diferencias debidas a la distinta dispersión física que puede haber en cada posición de registro de espectro sobre una tableta (esto se mostró gráficamente en la Figura 6.6). Está claro que en las mezclas binarias la dispersión física también puede ser distinta en cada posición del objeto donde se obtiene un espectro por mapeo, pero ahora al calcular los RSD % de los conjuntos de datos normalizados, los números prácticamente no han cambiado respecto a los espectros sin normalizar. ¿Qué ocurre entonces?. La respuesta está en la naturaleza del material sobre el cual se hicieron los cálculos del capítulo anterior, y los que se están presentando ahora. En este punto hay que recordar lo que se dijo en el trabajo con el material de composición homogénea: la quimiometría no elimina errores de muestreo. La dispersión de las mediciones hechas por mapeo lo que refleja en este caso es una distinta proporción de partículas de PS ó KHP, respecto a las de MCC, de las cuales se está obteniendo el espectro Raman al irradiar con un láser de 500 μm de diámetro. El espectro completo que se adquiere muestra una relación de bandas proporcional a la concentración de los componentes de la mezcla (en este caso sólo hay dos), pero dado que hay una zona del espectro en la cual la intensidad de la banda observada es proporcional a la del analito, una mayor o menor intensidad de ésta responde a una mayor o menor cantidad de partículas de PS o KHP en cada punto de mapeo (cada punto medido usando un diámetro de irradiación no modificable).

La quimiometría bien aplicada no modifica la información contenida en los datos de partida, y en este caso cualquier tipo de normalización, o la aplicación de SNV, produciría gráficas antes y después de pretratar los espectros muy similares. No obstante las técnicas espectroscópicas cada vez son más aplicadas en estudios de muestras de mayor complejidad, como por ejemplo un análisis *in vivo*. Con este tipo de espectros lo habitual es normalizar respecto a una banda para estandarizar la intensidad de la señal. Dicho en otras palabras, en estos casos se usa un estándar interno espectral. En este sentido Renwick Beattie y colaboradores ²⁴ reportaron que cuando se estudia la estructura molecular de lípidos de ésteres de ácidos grasos por espectroscopía Raman, dependiendo de cómo se haga la normalización se puede extraer información de los espectros para hacer una cuantificación molar o molal.

7.3.2.4 Evaluación de la estrategia propuesta de mediciones por mapeo sobre mezclas binarias de baja concentración en peso. ¿es el error de muestreo un contribuidor despreciable al error global total?

Como se expuso en la introducción de este trabajo, para la evaluación del procedimiento de registro de espectros propuesto (10 posiciones de mapeo, irradiando con un haz de 500 μm de diámetro), buscando determinar si el error de muestreo (S_s^2) contribuye muy poco al error global total (S_0^2), se probó la hipótesis nula $H_0: S_0^2 = S_a^2$, y como hipótesis alternativa $H_1: S_0^2 > S_a^2$. La hipótesis nula se prueba mediante el valor F_{exp} , donde $F_{exp} = S_0^2/S_a^2$, el cual se compara con el $F_{0,95}$ obtenido de las tablas para cierto número de grados de libertad en el numerador y denominador. Los resultados para todas las mediciones hechas con el macro-Raman se muestran en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3 Valores F_{exp} calculados con la ecuación (7.3) a partir las intensidades a 1601 cm^{-1} , medidas usando el macro-Raman sobre las mezclas con y sin compactar de PS y KHP (primer grupo de mezclas según la Tabla 7.1). Se muestran los resultados antes y después de aplicar una normalización a vector unidad. $F_{0,95} = 2.25$.

Potencia láser	% p/p	Mezclas compactadas				Mezclas sin compactar			
		PS		KHP		PS		KHP	
		Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm
400 mW	1 %	1.21	1.10	1.08	1.00	0.51	0.86	*	*
	5 %	1.98	1.67	4.84	6.14	0.93	0.90	2.19	1.19
	10 %	0.62	0.76	3.36	6.10	8.81	4.05	8.02	6.82
600 mW	1 %	0.32	0.33	0.05	0.04	0.68	0.87	0.84	1.01
	5 %	1.61	1.16	2.22	2.97	0.78	0.86	2.30	1.26
	10 %	0.69	1.29	2.47	6.60	3.95	0.73	22.78	3.42
800 mW	1 %	0.77	0.84	1.00	1.16	0.56	0.68	1.24	1.23
	5 %	0.94	1.37	6.02	11.78	3.10	4.76	4.62	1.53
	10 %	1.17	1.04	2.92	9.04	13.10	1.60	29.81	11.09

* A esta concentración, para esta mezcla y potencia de láser, no fue posible distinguir visualmente la banda a 1601 cm^{-1}

Considerando primero las mezclas compactadas, lo que se observa es que los F_{exp} son superiores al $F_{0.95}$ en las intensidades registradas con las tabletas de KHP, a excepción de la concentración de 1 % p/p. En las tabletas que contienen PS, los F_{exp} siempre son menores que el $F_{0.95}$, y en todos los casos la conclusión que se obtiene es la misma usando los espectros con o sin normalizar. El resultado general de la comparación es que la estrategia de mediciones por mapeo resulta en un error de muestreo muy bajo para las mezclas de PS, pero que algo falla para las de KHP. Sin embargo en la mezcla de KHP al 1 % p/p aparentemente no hay error de muestreo, y éste sólo se manifiesta cuando la proporción de KHP se incrementa, lo cual no tiene ningún sentido. Aquí entonces hay que detenerse y repasar las intensidades medidas con estos espectros. Evidentemente con un 1 % p/p el pico a 1601 cm^{-1} es un muy pequeño, distinguible a simple vista, pero las intensidades que se están tomando de los espectros registrados en modo mapeo están en el límite del error analítico del instrumento, de manera que no es posible probar las hipótesis nula y alternativa mencionadas anteriormente. La normalización no cambia las conclusiones de la prueba F porque del trabajo anterior se sabe que este pretratamiento espectral no varía la dispersión de un conjunto de intensidades registradas en modo repetitividad (dato del denominador en la ecuación 7.3), mientras que la dispersión de los datos de mapeo lo que refleja es la calidad de datos adquiridos bajo este modo de adquisición en cada tipo de mezcla (KHP/MCC o PS/MCC) cuando la irradiación se hace con un láser de $500\text{ }\mu\text{m}$.

Se hicieron mediciones también sobre las mezclas sin compactar, más que todo para comparar los resultados respecto a lo obtenido en la medición de un objeto de dimensiones fijas (una tableta por ejemplo), ya que ninguna forma de dosificación sólida que se venda en polvo tiene una masa de 300 mg. Con el fin de aplicar la prueba F a los datos de mapeo y repetitividad adquiridos sobre las mezclas en polvo, lo primero que se hizo fue verificar si en los espectros se distinguía la banda de interés, y esto no ocurría en la mezcla de KHP al 1 % p/p cuando se irradió a 400 mW. La menor señal adquirida con las mezclas en polvo hace que el predominio del error analítico en los valores medidos por mapeo llegue hasta las mediciones hechas sobre la mezcla con 5 % de KHP a todas las potencias. Únicamente teniendo un 10 % en peso de KHP se observa la contribución del error de muestreo al error global total que se describió anteriormente para las tabletas de este compuesto. Respecto a las mezclas de PS, la explicación de lo que ocurre con las mezclas de este compuesto en polvo es un poco más compleja. Para empezar hay que decir que al comparar la dispersión de los tres valores de RSD % en los materiales en polvo y como tabletas, registrados en cada posición donde se hicieron las medidas en modo

repetitividad, estos tres valores están más dispersos entre sí en las muestras en polvo que en las tabletas. Para las pruebas F se hizo una combinación de los 3 valores de varianza de repetitividad con el fin de poner el dato del denominador de la ecuación (7.3), pero el hecho de que haya una dispersión mayor en el valor de repetitividad según qué posición se seleccione visualmente cuando se irradian las mezclas en polvo, podría ser una causa de que en los datos de la derecha de la Tabla 7.3 aparentemente hayan diferencias en las conclusiones obtenidas antes y después de normalizar. En la platina de muestras del FT-Raman se puso una capa de 2 mm de polvo de cada mezcla, el cual fue suavemente aplanado con una espátula. Dado que el PS se añadió como microesferas, éstas fácilmente pueden desplazarse por la matriz compuesta en su mayoría por MCC, alterándose la homogeneidad de mezcla que tal vez había inicialmente luego de mezclar los polvos en el agitador mecánico, y entonces parece que el error de muestreo sí que contribuye significativamente al error global total de la estrategia de medición por mapeo para las mezclas de PS en polvo, no así cuando la mezcla se ha compactado firmemente. Para las mezclas en polvo se encontró que el error analítico predomina hasta las intensidades registradas en la mezcla de 5 % p/p irradiando con una potencia de 600 mW, ya para la de 800 mW sí que se observa la diferencia significativa en la dispersión de las mediciones hechas por mapeo y de repetitividad.

7.3.2.5 Evaluación de la estrategia de mapeo usando un diámetro de irradiación de 50 μm

La Tabla 7.4 muestra los resultados de las pruebas F para las mediciones con el microscopio Raman usando el objetivo 10X. Los datos que se muestran no sorprenden luego de la explicación sobre el "doble análisis" que debe hacerse cuando el cálculo del F_{exp} da un valor inferior que el $F_{0.95}$. Para el registro de estos espectros únicamente se redujo la resolución a 8 cm^{-1} , respecto a los parámetros seleccionados para la adquisición con el macro-Raman. Los barridos se mantuvieron en 32. Por tanto, el menor diámetro de irradiación, la menor profundidad en el material de la cual se están obteniendo los fotones para el registro de los espectros, y unos parámetros de adquisición no tan optimizados para este instrumento específico (en el cual además, a diferencia del macro-Raman, no se tiene un espejo parabólico que ingrese al instrumento la mayor cantidad de fotones posibles), hace que el error analítico predomine en todas las mediciones con excepción de la tableta de 10 % p/p de PS en MCC. En este caso el error de muestreo contribuye significativamente al error global total como cabría esperar. La normalización de los espectros no cambia las conclusiones del análisis.

Tabla 7.4 Valores F_{exp} calculados con la ecuación (7.3) a partir las intensidades a 1601 cm^{-1} , medidas usando el microscopio Raman (objetivo 10X) sobre las mezclas con y sin compactar de PS y KHP (primer grupo de mezclas según la Tabla 7.1). Se muestran los resultados antes y después de aplicar una normalización a vector unidad. $F_{0,95} = 2.25$

Potencia (mW)	% p/p	Mezclas compactadas				Mezclas sin compactar			
		PS		KHP		PS		KHP	
		Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm
500	5 %	*	*	*	*	*	*	*	*
	10 %	1.22	1.25	1.29	1.66	0.57	0.71	*	*
700	5 %	*	*	*	*	*	*	*	*
	10 %	1.71	2.03	1.20	1.23	1.12	2.86	1.95	1.60
900	5 %	2.17	2.61	1.15	1.11	*	*	*	*
	10 %	6.14	5.07	1.29	1.82	0.28	0.49	1.97	1.23

* A esta concentración, para esta mezcla y potencia de láser, no fue posible distinguir visualmente la banda a 1601 cm^{-1} . Las mezclas de 1 % p/p también se midieron en el microscopio pero con ninguna de las potencias se pudo distinguir la banda de interés.

7.3.2.6 Mejora de los parámetros de adquisición de los espectros. Ejemplo para las mezclas de KHP/MCC

Los parámetros bajo los cuales se registraron los espectros con los que se hicieron todos los cálculos mostrados hasta ahora (que corresponden a lo indicado para el primer grupo de mezclas según la Tabla 7.1), se podría decir que son bastante típicos con el fin de obtener una relación calidad de espectro/tiempo de registro aceptable, en especial con el macro-Raman: 4 cm^{-1} y 32 barridos resultan en un tiempo por espectro de 60 s. En el caso del microscopio Raman con el fin de disminuir el ruido de la línea base la decisión que se tomó en su momento fue reducir la resolución a 8 cm^{-1} y mantener los mismos 32 barridos. Con estas condiciones el tiempo se redujo a 35 s por espectro, pero lo cierto es que al momento de estas primeras mediciones no se hizo una adecuada optimización para el registro de estos espectros, considerando todas las diferencias instrumentales y de muestreo que resultan cuando se usa el macro-Raman, o el microscopio con el objetivo 10X.

Se decidió entonces repetir las mediciones para las mezclas de KHP con un nuevo conjunto de parámetros, teniendo como objetivo mejorar la relación señal/ruido de los espectros en

los dos instrumentos. No obstante, la estrategia seguida no fue exactamente la misma para cada instrumento: en el macro-Raman se buscó mantener el mismo tiempo de registro de cada espectro luego de la optimización de los parámetros, mientras que con el microscopio Raman inevitablemente tenía que incrementar el tiempo de adquisición. Los cambios se resumen en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5 Comparativa de los parámetros de adquisición de espectros entre el primer y segundo grupo de mezclas de KHP/MCC

Macro-Raman							
Antes (primer grupo de mezclas)				Después (segundo grupo de mezclas)			
Resolución (cm ⁻¹)	Barridos	Potencia (mW)	Tiempo de registro (s)	Resolución (cm ⁻¹)	Barridos	Potencia (mW)	Tiempo de registro (s)
4	32	400 800	60	16	128	500 900	80

Microscopio Raman							
Antes (primer grupo de mezclas)				Después (segundo grupo de mezclas)			
Resolución (cm ⁻¹)	Barridos	Potencia (mW)	Tiempo de registro (s)	Resolución (cm ⁻¹)	Barridos	Potencia (mW)	Tiempo de registro (s)
8	32	500 900	35	16	256	900	160

En la Figura 7.10 se muestran espectros registrados en modo repetitividad sobre tabletas que contienen 1 % p/p (Figuras 7.10a y b) y 5 % p/p (Figuras 7.10c y d) de KHP, registrados a la menor potencia en que se midieron espectros en cada grupo de mezclas (400 o 500 mW). En las dos mezclas es evidente la disminución en la *SNR* cuando los espectros se registran a una mayor resolución y menos barridos (para un tiempo de registro prácticamente constante). Esta comparación de mantener un mismo tiempo de adquisición, y hacer los cambios correspondientes en la combinación 'resolución + número de barridos' fue incluida por Richard McCreery en el capítulo sobre espectrómetros Raman no dispersivos de su libro, y justifica la disminución de la *SNR* en que para un tiempo determinado, con una mayor resolución cada elemento de resolución está recolectando menos fotones ²⁵.

No obstante, el cambio de 4 a 16 cm⁻¹ fue considerablemente "brusco", y eso lo resienten los espectros adquiridos. A diferencia de los espectros de las mezclas de PS, para las mezclas de KHP hay una banda más a la izquierda de la banda de 1601 cm⁻¹, la cual se debe

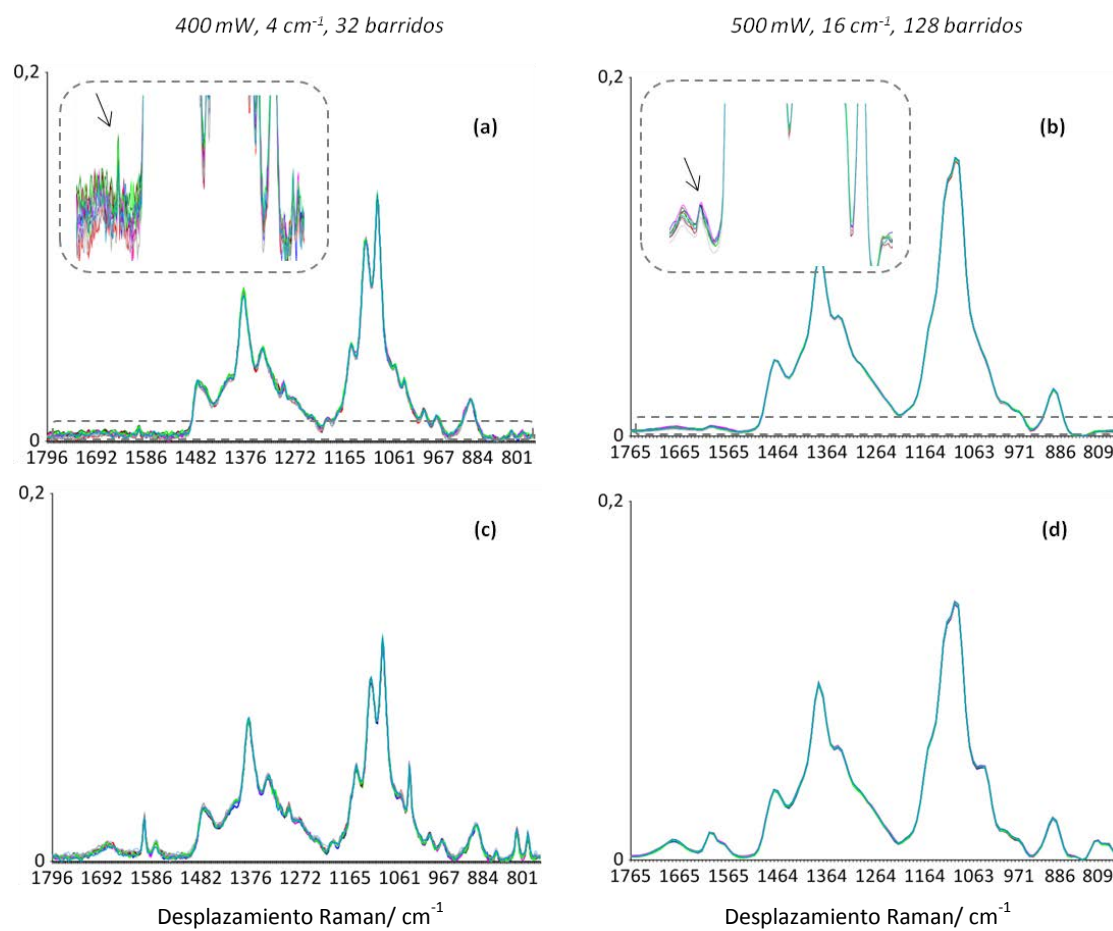


Figura 7.10 Espectros registrados en el macro-Raman en modo repetitividad sobre una tableta que contiene 1 % p/p de KHP (a y b) y 5 % p/p de KHP (c y d), para dos conjuntos de parámetros de adquisición que resultan en tiempos de registro similares, pero con distinto efecto sobre la *SNR*.

a los enlaces C=O del KHP. De la misma manera que anteriormente se vio que al disminuir la resolución de 1 a 4 cm^{-1} , en apariencia no cambia el ancho de banda natural en las zonas donde se distinguen bandas debidas exclusivamente al KHP o PS (Figura 7.6), en el paso de 4 a 16 cm^{-1} sí que varía, y se nota en la relación de alturas de las bandas a 1601 y 1678 cm^{-1} . A 16 cm^{-1} la proporción de estas bandas no coincide con lo que se vio para el KHP puro (comparar Figuras 7.10d y 7.6b). Pero tal y como se dijo anteriormente, al final lo que importa es la capacidad de extraer la información que se pretende de los espectros, y en adición hay un estudio en el que se estimó una diferencia muy pequeña en la precisión de las mediciones en un análisis cuantitativo por espectroscopía Raman al cambiar la resolución de 2 a 16 cm^{-1} . En estas nuevas mediciones se disminuyó la resolución y se aumentó el número de barridos para mejorar la *SNR*, pero también se aplicaron mayores

Tabla 7.6 Valores F_{exp} calculados con la ecuación (7.3) a partir las intensidades a 1601 cm^{-1} , medidas usando el macro Raman sobre las mezclas con y sin compactar de KHP (segundo grupo de mezclas según la Tabla 7.1). Se muestran los resultados antes y después de aplicar una normalización a vector unidad. $F_{0.95} = 3.18$

Potencia láser	% p/p	Mezclas de KHP en el macro-Raman			
		Compactadas		Sin compactar	
		Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm
500 mW	1 %	1.79	1.38	1.98	1.90
	3 %	3.40	3.73	20.11	19.57
	5 %	6.77	9.57	13.21	10.56
	7 %	22.99	33.56	100.98	87.94
	10 %	35.63	71.84	12.34	10.05
900 mW	1 %	2.30	2.46	1.19	1.61
	3 %	7.76	6.92	6.90	6.67
	5 %	12.44	14.76	18.26	18.38
	7 %	174.94	351.58	98.21	101.75
	10 %	32.01	18.24	91.16	91.89

potencias de láser (Tabla 7.5) y esto también sirve para mejorar la SNR , como se demostró anteriormente con los datos de la Tabla 7.2.

La Tabla 7.6 muestra los resultados de las pruebas F para el segundo grupo de mezclas. Lo primero que destaca es que para la mezcla de 1 % p/p los F_{exp} crecen en comparación a lo que se mostró para este nivel de concentración en la Tabla 7.3. Incluso para la mezcla compactada a 900 mW el F_{exp} supera el $F_{0.95}$ de 2.25 que se venía aplicando hasta ahora. Lo que ocurre es que para estas mezclas sólo se registró un grupo de espectros por repetitividad (3 posiciones se

habían registrado con el primer grupo de mezclas), por lo que hay menos grados de libertad en el denominador y el $F_{0.95}$ sube hasta 3.18. Para el resto de niveles de concentración, considerando las mezclas compactadas las conclusiones son las mismas que cuando los espectros se registraron a una mayor resolución y con un número menor de barridos. Pero en el caso de las mezclas sin compactar, ahora el límite en el que predomina el error analítico ha bajado considerablemente. El aporte significativo del error de muestreo al error global total era apreciable sólo para las mezclas que contenían un 10 % en peso de KHP. Con los nuevos parámetros de adquisición, la hipótesis alternativa se cumple a partir de la mezcla que contiene un 3 % en peso de KHP, indistintamente de la potencia aplicada. Esto es resultado de una menor dispersión en el conjunto de intensidades registradas en modo repetitividad, producto de los cambios en la combinación 'menos resolución + más barridos'. El que a 4 cm^{-1} hubiesen desplazamientos en la posición del máximo de la banda de 1601 cm^{-1} también queda descartado, se trata de

una banda fina donde el extremo superior de la banda siempre cayó en el mismo desplazamiento Raman.

Finalmente en la Tabla 7.7 se muestran los resultados de las mezclas usando los nuevos parámetros para el microscopio Raman. En la selección de las condiciones de registro no se tuvo en cuenta que los cambios representarían un incremento importante en el tiempo de adquisición, y efectivamente cada espectro tomó 4.5 veces más tiempo que cuando se registró el primer grupo de mezclas. Los resultados son completamente distintos a lo reportado en la Tabla 7.4 para el primer grupo de mezclas: a 16 cm^{-1} y 256 barridos el error analítico ya no predomina en las mediciones de mapeo, y se encuentra lo que se esperaría para el diámetro de irradiación y la profundidad de la que extrae información el microscopio Raman: el error de muestreo contribuye significativamente al error global de estimación. Como se muestra en la Tabla 7.7 bajo estas condiciones se midieron 3 mezclas con una concentración superior al 10 % p/p, y aún para un 20 % p/p se estimó un F_{exp} superior al $F_{0.95}$.

Tabla 7.7 Valores F_{exp} calculados con la ecuación (7.3) a partir las intensidades a 1601 cm^{-1} , medidas usando el microscopio Raman (objetivo 10X) sobre las mezclas con y sin compactar de KHP (segundo grupo de mezclas según la Tabla 7.1). Se muestran los resultados antes y después de aplicar una normalización a vector unidad. $F_{0.95} = 3.18$

Potencia láser	% p/p	Mezclas de KHP en el microscopio			
		Compactadas		Sin compactar	
		Antes norm	Desp norm	Antes norm	Desp norm
900 mW	1 %	*	*	*	*
	3 %	7.35	6.75	*	*
	5 %	7.33	7.42	2.98	6.90
	7 %	4.02	4.41	5.53	4.74
	10 %	3.03	5.26	16.32	5.98
	12 %	6.02	7.37	11.56	6.07
	15 %	8.12	8.72	3.27	3.43
	20 %	5.30	12.69	5.68	10.15

* A esta concentración, para esta mezcla y potencia de láser, no fue posible distinguir visualmente la banda a 1601 cm^{-1}

7.3.2.7 Conteo de partículas en cada mezcla

Retomando los conceptos de la Teoría de Muestreo mencionados en el Capítulo 1, en las mezclas binarias la heterogeneidad constitucional viene dada principalmente por la distinta composición química de los materiales usados, aunque en realidad cada uno se

encuentra además en un rango de tamaños y con distintas formas de partícula. Luego se puede mirar las mezclas desde más arriba, ya sean como polvo suelto o tableta firme, y hablar de la heterogeneidad distribucional, la cual tiene que ver con los incrementos, es decir, los grupos de partículas de los cuales se obtienen los datos Raman posterior a la irradiación. Todas las mezclas se prepararon mediante pesado en una balanza, pero la proporción de partículas presentes en las mezclas, así como el número de partículas del cual se obtienen los espectros Raman, pueden variar según se considere un mismo porcentaje en peso de KHP o PS.

Se conoce el porcentaje en peso (% p/p) de cada mezcla, y en el caso de las tabletas se conoce su masa y volumen, y por tanto la masa de cada compuesto que contienen. De la bibliografía se puede obtener la densidad absoluta de cada componente (Tabla 7.8), y es posible conocer el volumen de cada uno en cada mezcla con el fin de calcular un

Tabla 7.8 Densidad absoluta (ρ) del KHP, PS y MCC

Compuesto	ρ (g/cm ³)
KHP	1.64
PS	1.08
MCC	1.57

porcentaje en volumen (% v/v). Seguidamente cada volumen puede dividirse entre el volumen de cada tipo de partícula para saber el número de partículas contenidas.

Respecto a la definición de un volumen para cada partícula, sólo en el caso de las microesferas de PS se puede calcular fácilmente. El mismo nombre del material indica la fórmula para el cálculo. Para el KHP y la MCC es considerablemente más complejo, y en este trabajo se usó como apoyo las imágenes registradas en los distintos tipos de tabletas con los objetivos 10 X y 40 X del microscopio. La Figura 7.11 muestra una imagen de la tableta que contiene 1 % p/p de PS en MCC vista con el objetivo 40X (a), y dos posiciones registradas con el objetivo 10X sobre una tableta que contiene un 3 % p/p de KHP (c y d). Adicionalmente en (b) se muestra una imagen obtenida con un microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de una MCC de 20 μ m que se vende para la fabricación de medicamentos sólidos.

A partir de las imágenes por microscopía óptica y SEM de la MCC de 20 μ m, se concluyó que el material está constituido mayoritariamente por partículas que parecen pequeñas varillas, no obstante con el fin de tomar en cuenta que hay una dispersión considerable en la forma y tamaños de las partículas de MCC, el volumen total de MCC (luego del cálculo usando su densidad aparente y la masa que hay en cada tableta) se dividió entre 4, y cada cuarta parte se dividió entre un volumen de partícula distinto.

- MCC1: varillas de $20 \times 4 \times 4 \mu\text{m}$ ↘ el 75 % del volumen de partículas son partículas
- MCC2: varillas de $20 \times 4 \times 8 \mu\text{m}$ → que tienen forma de prisma rectangular
- MCC3: varillas de $20 \times 8 \times 8 \mu\text{m}$ ↗

- MCC4: varillas de $10 \times 8 \times 8 \mu\text{m}$ → el 25 % del volumen de partículas son partículas de forma casi cúbica

Respecto al KHP, a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio y considerando que el rango de tamaños empleado se obtuvo a partir de molturación y tamizado, se supuso que estas partículas son esferas de $20 \mu\text{m}$ de diámetro.

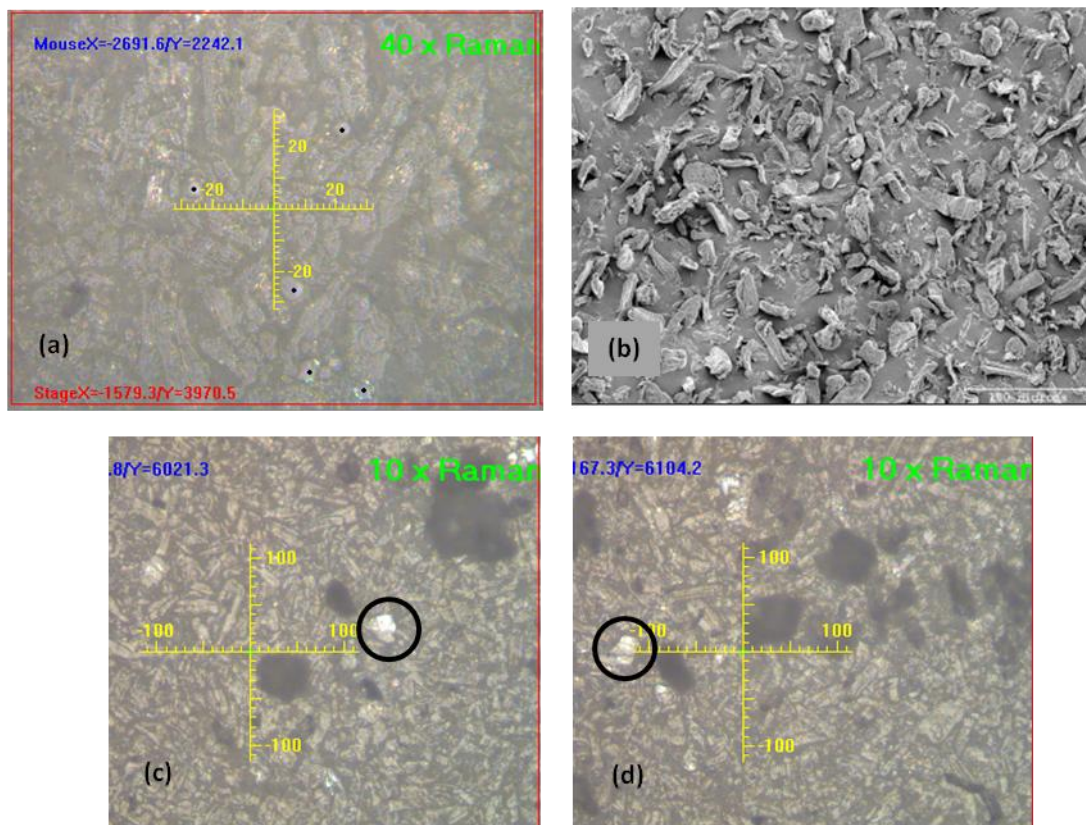


Figura 7.11 (a) Imagen de una tableta que contiene 1 % p/p de PS en MCC obtenida con el objetivo 40X del microscopio Raman. (b) Imagen SEM de la MCC de $20 \mu\text{m}$ (Tomada de Reier, G.E. Avicel ® PH Microcrystalline Cellulose, NF, Ph Eur., JP, BP. FMC Corporation). (c y d) Imagen de dos posiciones de la tableta que contiene 3 % p/p de KHP en MCC, obtenidas con el objetivo 10X del microscopio Raman.

Finalmente con el número de partículas de cada compuesto que aproximadamente hay en cada una de las mezclas preparadas mediante pesada, se puede calcular un porcentaje de partículas de PS o MCC en el total de partículas. Los resultados se muestran en la Tabla 7.9.

Cuando se comparan los dos bloques de datos superiores aparece la justificación de todo lo que reveló la aplicación de la prueba *F* midiendo las intensidades de la banda a 1601 cm^{-1} en cada tipo de mezcla. Ni siquiera un 10 % en peso de KHP en MCC contiene un

Tabla 7.9 Conversión del % en peso que se preparó de cada mezcla mediante una balanza, a % en volumen (usando la densidad absoluta de cada material), para finalmente estimar la probabilidad de encontrar partículas de KHP/PS o MCC en cada mezcla. Se muestra además el % de empaquetamiento en cada tableta. Los cálculos corresponden al primer grupo de muestras según la Tabla 7.1

Mezclas KHP/MCC	Porcentaje de KHP en MCC		Probabilidad de encontrar partículas de KHP o MCC		% partículas KHP en el total de partículas	% de empaquetamiento de la tableta	
	p/p	v/v	KHP	MCC			
		1.03	0.98	0.0012	0.9988	0.12	84.2
	3.07	2.95	0.0042	0.9958	0.42	75.1	
	5.27	5.07	0.0073	0.9927	0.73	77.0	
	6.82	6.57	0.0096	0.9904	0.96	74.0	
	10.25	9.88	0.0145	0.9855	1.45	78.5	
					Prom % empaq	77.8	
Mezclas PS/MCC	Porcentaje de PS en MCC		Probabilidad de encontrar partículas de PS o MCC		% partículas PS en el total de partículas	% de empaquetamiento de la tableta	
	p/p	v/v	PS	MCC			
		1.02	1.58	0.0348	0.9652	3.5	78.3
		3.09	4.42	0.0874	0.9126	8.7	78.6
		4.56	6.43	0.1247	0.8753	12.5	81.2
		6.25	8.75	0.1676	0.8324	16.8	73.3
		8.23	11.47	0.2179	0.7821	21.8	71.1
					Prom % empaq	76.5	
Recálculo para las mezclas PS/MCC usando la densidad del KHP	Porcentaje de PS en MCC		Probabilidad de encontrar partículas de PS o MCC		% partículas PS en el total de partículas	% de empaquetamiento de la tableta	
	p/p	v/v	PS	MCC			
		1.02	0.97	0.0012	0.9988	1.2	78.3
		3.09	2.96	0.0042	0.9958	4.2	78.6
		4.56	4.38	0.0063	0.9937	6.3	81.2
		6.25	6.00	0.0087	0.9913	8.7	73.3
		8.23	7.91	0.0116	0.9884	11.6	71.1

número de partículas de KHP superior al de una mezcla de 1 % en peso de PS en MCC. Conceptualmente se puede entender que al tener el analito de interés en un tamaño más fino es más probable encontrarse sus partículas, las cuales en nuestro caso son las responsables de la intensidad Raman a 1601 cm^{-1} . Entonces desde un principio se podía prever que el error de muestreo de la estrategia de mediciones por mapeo probada a lo largo de este trabajo, podría contribuir significativamente al error global total con una mayor probabilidad en el caso de la mezcla KHP/MCC que en la PS/MCC. No obstante en el cálculo hay además un paso previo en el que se pasa de masa a volumen usando la densidad absoluta de cada compuesto. En la Tabla 7.8 se ve que la densidad absoluta del KHP y la MCC son muy similares, mientras que la del PS es mucho menor. Se procedió a recalcular los porcentajes de partícula asignándole al PS la densidad absoluta del KHP (tercer bloque de la Tabla 7.9), y aquí queda en evidencia que lo observado es una combinación del distinto tamaño de partícula del analito + una distinta densidad absoluta de cada material, donde lo segundo ocasiona una mayor diferencia en el porcentaje de partículas del analito que incluye cada tipo de mezcla.

7.4 Conclusiones

El trabajo presentado surge de cierta bifurcación que aparentemente existe entre los estudios publicados sobre el uso de la espectroscopía Raman para diversos análisis cuantitativos dentro del control de calidad farmacéutico, donde incluso hay trabajos específicos sobre la definición del límite de detección en la espectroscopía Raman ^{26,27}; y por otro lado toda la teoría que de manera especial se ha desarrollado para procesos de muestreo extractivos, que aborda la relación entre el error de muestreo y el número de partículas de la muestra, la masa de la muestra, o el número de muestras que se deben tomar.

En la práctica toda formulación farmacéutica se produce añadiendo distintas cantidades medidas en peso de cada uno de los componentes, y como se ha discutido anteriormente el fabricante determina de alguna manera el tamaño óptimo que debe tener cada uno de ellos para garantizar algo tan fundamental como la uniformidad de contenido. No obstante esto no es el tema de la tesis. Los trabajos que se han realizado en esta tesis tienen que ver con la calidad del muestreo que se puede alcanzar con las configuraciones de los instrumentos Raman disponibles en el mercado; y dado que el análisis se hace de manera que el material no se altera durante su medición, repasando los conceptos de la teoría de la espectroscopía Raman es evidente que el factor tamaño de partícula es muy importante.

En el Capítulo anterior se presentaron nuevos resultados respecto a la evolución de las intensidades Raman en función del tamaño de partícula. Ahora lo que se presenta es un análisis sobre el impacto del tamaño de partícula en la eficiencia de una determinada estrategia de registro por mapeo, dejando constante uno de los datos que más vende cuando se publica un nuevo estudio que presenta una aplicación analítica de la espectroscopía Raman: el porcentaje que representa lo que se está determinando, del total que constituye el material bajo estudio.

Šašić y Whitlock presentaron en 2008 un trabajo ²⁸ en el que demuestran que un microscopio Raman (con un objetivo 20X) puede usarse para detectar una forma no deseada de un API (la cual representa menos de 1 % p/p del total de la tableta), en un medicamento que entre forma deseada y no deseada contiene alrededor del 6 % en peso de API, por medio de un muestreo optimizado basado en la estadística. Este en la práctica se refiere a un número de posiciones de registro por mapeo que deben medirse para asegurar la detección de la forma no deseada del API con un 95 % de confianza. No obstante, en su trabajo no se toma en cuenta el tamaño de partícula de lo que se está buscando, posiblemente debido a la dificultad de incorporar este factor en el diseño estadístico. En otro trabajo Steven Bell y colaboradores ⁹ muestran cómo al aumentar el diámetro de irradiación, los espectros registrados en distintas posiciones de tabletas incautadas de extasis (las cuales tienen una homogeneidad de distribución del activo muy mala por ser de fabricación artesanal) se van haciendo más similares entre sí. Los cristales de la droga tenían un tamaño de 40 μm , y el láser un diámetro de 150 μm . Nosotros aplicando también una estrategia de mediciones por mapeo, hemos hecho un análisis usando la altura de una banda muy importante en el análisis de medicamentos por espectroscopía Raman, para determinar si el error de muestreo es un contribuidor despreciable del error global total, y dijimos que esto ocurre si el error total se puede aproximar mediante el error analítico.

En muchos tipos de análisis el paso que posee el mayor grado de incertidumbre es el primer muestreo, seguidamente se obtienen submuestras y a la hora del ensayo analítico éste último aporta muy poca incertidumbre a la medición ²⁹. No obstante en la estrategia de mediciones por mapeo que se evaluó, el análisis de los F_{exp} calculados reflejaron toda clase de situaciones:

-por un lado, que las intensidades medidas por mapeo en muchas ocasiones se encontraban en el límite dado por el error analítico del instrumento, y por tanto no era

posible evaluar la estrategia de mapeo para determinadas concentraciones de las mezclas bajo ciertos parámetros de adquisición.

-se encontró también que la estrategia de mediciones por mapeo aplicada a las mezclas PS/MCC resulta en un error de muestreo que es despreciable respecto al error global total.

-y evidentemente para las mezclas KHP/MCC, se encontró que la combinación de 10 posiciones de mapeo + un diámetro de irradiación de 500 μm resulta en un error de muestreo que impacta significativamente en el error global total.

Finalmente la distinta cantidad de partículas del analito que están presentes para cada % en peso en las mezclas PS/MCC o KHP/MCC es lo que justifica lo observado. Es evidente que esta diferencia es detectada en los espectros registrados en cada mezcla, donde podemos decir que el volumen muestreado (v_m) en el interior de la muestra sigue la fórmula $v_m = \pi r^2 h X$, con $r=250 \mu\text{m}$, $h=1000 \mu\text{m}$ (valor determinado en este estudio para la MCC compactada), y $X > 1$, debido a la dispersión aleatoria de los fotones en el interior de la muestra. Otra cosa que no se ha dicho es que aún cuando 10 posiciones de mapeo puede parecer un número elevado de puntos (al menos desde un punto de vista práctico en el control de calidad farmacéutico, donde deben analizarse un número determinado de unidades pertenecientes a un lote de fabricación), estos 10 espectros respecto al área de las tabletas representan cubrir únicamente un 1.4 % de la superficie de las tabletas. En el siguiente trabajo se aplican todos los hallazgos experimentales de los trabajos presentados en este capítulo y en el anterior, para la determinación del contenido de API en tabletas comerciales de baja dosificación, analizando las mismas tabletas con distintos espectrómetros Raman de retrodispersión y transmisión, donde el distinto volumen muestreado en cada uno se reflejará en la precisión de los resultados obtenidos.

7.5 Referencias

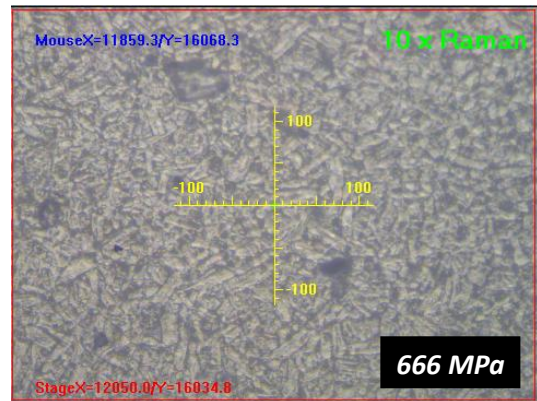
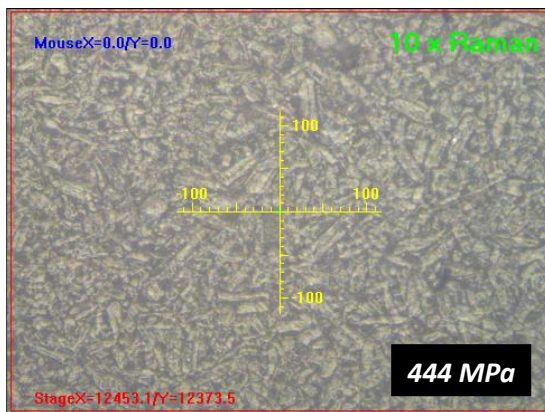
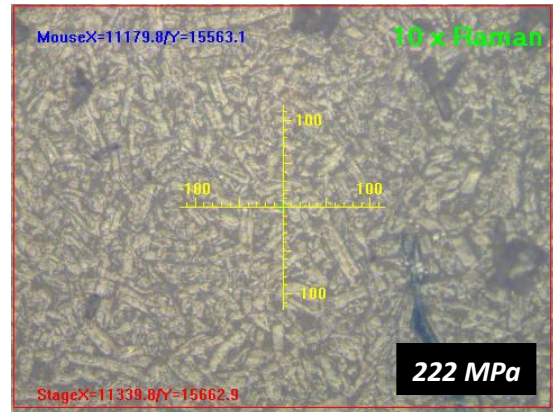
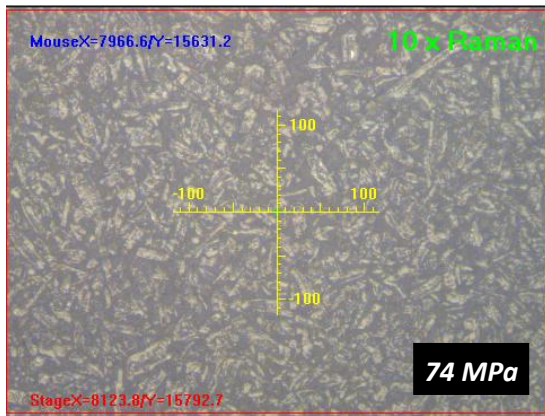
- (1) Fricke, G. H.; Mischler, P. G.; Staffieri, F. P.; Housmyer, C. L. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1213–1217.
- (2) Gao, Z.; Kratochvil, B. *Analyst* **2001**, *126* (6), 943–946.
- (3) Kratochvil, B.; Taylor, J. K. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (8), 924A–938A.
- (4) Harris, W. E.; Kratochvil, B. *Anal. Chem.* **1974**, *46* (2), 313–315.
- (5) Gy, P. M. *Sampling of particulate materials. Theory and practice.*, 2nd ed.; Elsevier, 1982.

- (6) Pitard, F. F. *Pierre Gy's sampling theory and sampling practice: heterogeneity, sampling correctness, and statistical process control*, 2nd ed.; CRC Press, 1993.
- (7) Ingamells, C. O.; Switzer, P. *Talanta* **1973**, *20* (6), 547–568.
- (8) Kratochvil, B.; Wallace, D.; Taylor, J. K. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 113–129.
- (9) Bell, S. E. J.; Beattie, J. R.; McGarvey, J. J.; Peters, K. L.; Sirimuthu, N. M. S.; Speers, S. J. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (5), 409–417.
- (10) Fraser, S. J.; Gordon, K. C. *Eur. Pharm. Rev.* **2014**, *19* (1), 3–8.
- (11) Thoorens, G.; Krier, F.; Leclercq, B.; Carlin, B.; Evrard, B. *Int. J. Pharm.* **2014**, *473* (1), 64–72.
- (12) Avicel ® for solid dose forms. FMC Health and Nutrition <http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceutical/Products/Avicelforsoliddoseforms.aspx> (accessed May 22, 2017).
- (13) Reier, G. E. In *Avicel ® PH Microcrystalline Cellulose, NF, Ph Eur., JP, BP*. FMC Corporation; 2000.
- (14) Çelik, M. *Pharmaceutical powder compaction technology*, 2nd ed.; Informa Healthcare, 2011.
- (15) Khan, A. S.; Huang, S. *Continuum theory of plasticity*; Wiley, 1995.
- (16) Sun, C. C.; Atalla, R. H.; Chanzy, H.; Bolhuis, G. K.; Lerk, C. F. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94* (10), 2132–2134.
- (17) Yeboah, S. A.; Wang, S.-H.; Griffiths, P. R. *Appl. Spectrosc.* **1984**, *38* (2), 259–264.
- (18) Oelkrug, D.; Brun, M.; Rebner, K.; Boldrini, B.; Kessler, R. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66* (8), 934–943.
- (19) Blanco, M.; Alcalá, M. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *557* (1), 353–359.
- (20) Arruabarrena, J.; Coello, J.; Maspocho, S. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465* (1), 299–305.
- (21) Zafar, U.; Vivacqua, V.; Calvert, G.; Ghadiri, M.; Cleaver, J. A. S. *Powder Technol.* **2017**, *313*, 389–401.
- (22) Rimai, D. S.; Demejo, L. P.; Bowen, R. C. *J. Adhes. Sci. Technol.* **1994**, *8* (11), 1333–1355.
- (23) Christy, A. A.; Liang, Y.-Z.; Hui, C.; Kvalheim, O. M.; Velapoldi, R. A. *Vib. Spectrosc.* **1993**, *5* (2), 233–244.
- (24) Beattie, J. R.; Glenn, J. V.; Boulton, M. E.; Stitt, A. W.; McGarvey, J. J. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (4), 429–435.
- (25) McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.

- (26) Vandenabeele, P.; Moens, L. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43* (11), 1545–1550.
- (27) Li, B.; Calvet, A.; Casamayou-Boucau, Y.; Morris, C.; Ryder, A. G. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (6), 3419–3428.
- (28) Šašić, S.; Whitlock, M. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62* (8), 916–921.
- (29) Whitaker, T. B. *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49* (11), 1709–1717.

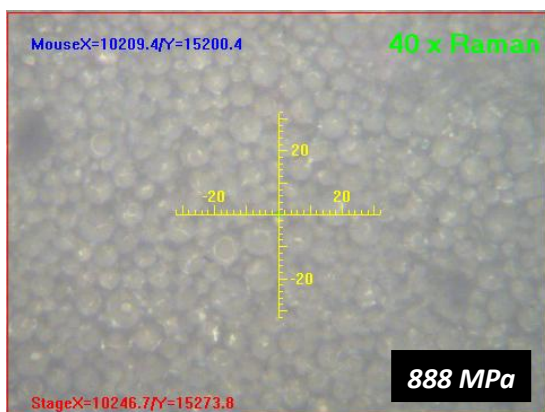
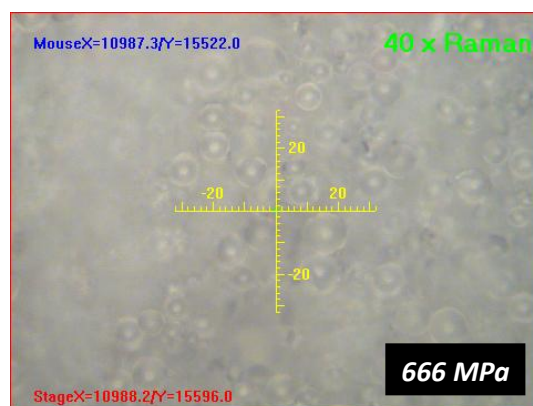
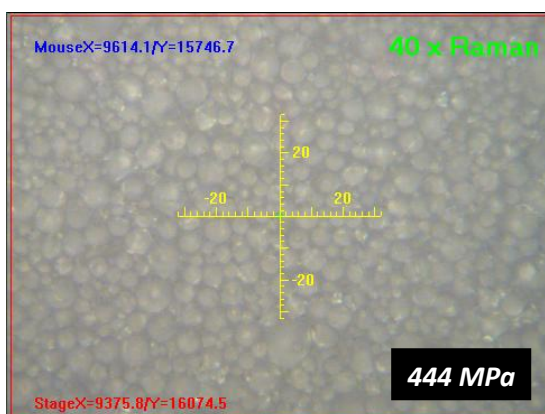
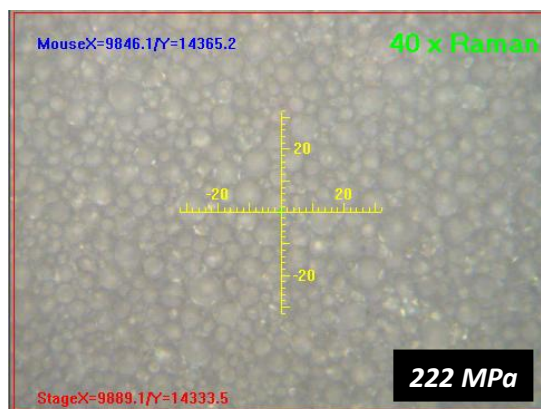
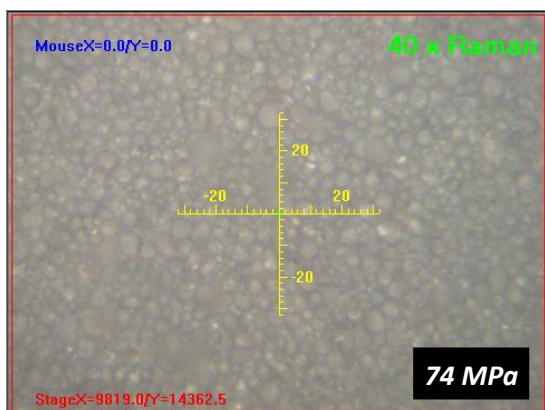
Anexo 7.1

Imágenes registradas con el microscopio Raman usando el objetivo 10 X, de la superficie de las tabletas de MCC compactadas a distinta presión.



Anexo 7.2

Imágenes registradas con el microscopio Raman usando el objetivo 40 X, de la superficie de las tabletas de PS compactadas a distinta presión.



CAPÍTULO 8

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACENOCUMAROL EN TABLETAS DE SINTROM USANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONALES

8.1 *Introducción*

Cada producto farmacéutico autorizado para su comercialización previamente ha pasado por un largo proceso, en el cual se ha tenido que demostrar a las autoridades regulatorias pertinentes que el producto es adecuado para el tratamiento de la condición hacia la cual está dirigido. Estos requisitos están relacionados tanto con la eficacia del producto como con su seguridad ¹. Cuando se considera el tema de la seguridad, hay un grupo de fármacos que requieren especial atención: los medicamentos de índice terapéutico estrecho (NTI por sus siglas en inglés), para los cuales hay un rango de dosis muy pequeño en el cual el medicamento produce un efecto beneficioso sin causar complicaciones severas y potencialmente fatales. Un segmento de productos farmacéuticos ampliamente conocidos por su NTI son los anticoagulantes orales, los cuales requieren un gran cuidado durante su uso ².

Alrededor de un millón de personas actualmente usan tratamientos orales en España para prevenir la coagulación sanguínea excesiva que puede terminar en un accidente cerebrovascular. Estos pacientes en su mayoría, pero no exclusivamente, son personas mayores y el porcentaje de personas que están sujetos a este tratamiento se incrementa con la edad ³. Dado el actual envejecimiento que se observa en la sociedad española, esto representa un verdadero foco de atención para las instituciones relacionadas con el cuidado de la salud.

El Sintrom ® (API, acenocumarol) es el anticoagulante oral más usado en España ^{4,5}. Este medicamento requiere un control sanguíneo regular y frecuente en cada paciente debido a su ventana terapéutica estrecha, la gran variabilidad en la respuesta individual -la dosis individual también puede cambiar durante el tratamiento, y debido a que tiene múltiples

interacciones con otros fármacos, incluso con los alimentos. Su ingesta es diaria y en muchas ocasiones se prescribe indefinidamente ^{6,7}.

Este anticoagulante es vendido como dos productos medicinales distintos: tabletas que contienen 1 mg (Sintrom 1) o 4 mg (Sintrom 4), que corresponde a una proporción en masa de 2 % y 0.7 % respectivamente. Las tabletas de Sintrom 4 tienen una cruz grabada en una de sus caras, la cual ha llevado tanto a pacientes como a los profesionales de la salud a considerar su división en mitades o cuartos para obtener subdosis (Figura 8.1). El titular de la autorización de comercialización del Sintrom fue Novartis hasta noviembre de 2014, y posteriormente Novartis vendió los dos productos a otra compañía farmacéutica llamada Merus Labs ⁸.



Figura 8.1 Diseño de la presentación comercial de las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4. Debajo se muestran ambas caras de una tableta de cada producto. Las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 tienen un diámetro de 5.1 y 13.2 mm, respectivamente (en la figura se ha tomado en cuenta la proporción real del tamaño de cada tableta).

Como parte del trabajo de esta tesis se hicieron dos estudios con el Sintrom. El primero se encuentra publicado ⁹, y fue realizado con lotes adquiridos en distintas farmacias de Barcelona durante los primeros seis meses del año 2013, por lo que el titular de la autorización de comercialización era Novartis. La ficha técnica de los medicamentos incluye un apartado sobre la forma farmacéutica, y para el conjunto de lotes analizados en este primer estudio, respecto al Sintrom 4 únicamente se indicaba que en una de las caras del comprimido había una cruz, pero no se menciona si esta tiene alguna funcionalidad ¹⁰. Este estudio se hizo con el FT-Raman que se describió en el Capítulo 5, y que pertenece al grupo de Quimiometría Aplicada de la UAB.

El segundo estudio se hizo con lotes recolectados durante los primeros seis meses de 2016, por lo que el titular de la autorización de comercialización era Merus Labs. Al revisar la ficha técnica correspondiente a estos lotes, ahora sí que se indica algo respecto a la cruz grabada en las tabletas de Sintrom 4, textualmente: la ranura sirve únicamente para fraccionar y facilitar la deglución, pero no para dividir en dosis iguales ¹¹. Para este segundo estudio todas las tabletas que se midieron (comerciales, y las confeccionadas en el laboratorio para el conjunto de calibración) se prepararon en la UAB, y posteriormente fueron analizadas usando distintos instrumentos NIR y Raman en el Departamento de Tecnología Farmacéutica y Desarrollo del Centro de Investigación de AstraZeneca en Gotemburgo, Suecia, durante una estancia de 3 meses. El diseño de los experimentos y todas las mediciones realizadas en los espectrómetros NIR y Raman fueron supervisados por los doctores Anders Sparén y Olof Svensson, los cuales formaron parte del primer estudio sobre el uso de la espectroscopía Raman por transmisión para la determinación del contenido de ingrediente activo en tabletas y cápsulas ¹², y desde entonces han realizado diversos trabajos en esta técnica específica. Las tabletas se trajeron de vuelta a Barcelona y la obtención de los valores de referencia de las tabletas, así como los modelos de calibración se obtuvieron bajo la supervisión de los científicos de AstraZeneca y los directores de esta tesis, Dr. Santiago MasPOCH y Dr. Jordi Coello.

Volviendo al tema de los comprimidos de Sintrom 4 que sugieren su división para obtener subdosis, en varios estudios se ha reseñado la falta de claridad en la información que concierne a las tabletas ranuradas ¹³⁻¹⁵; no obstante la división de comprimidos es una práctica muy común, considerada tanto por médicos como por pacientes cuando se medica con esta forma farmacéutica.

La técnica analítica más usada para la determinación del API en productos farmacéuticos es el HPLC ¹⁶⁻¹⁸. A pesar del amplio reconocimiento que tiene esta herramienta en la calidad de los resultados obtenidos, esta implica el procesamiento de la muestra en varios pasos que requieren su tiempo, el uso de reactivos, y por supuesto conlleva a la destrucción de la muestra. Por otro lado, ya sea desde el punto de vista del control de calidad clásico, o considerando los requisitos analíticos emergentes debido a la implantación progresiva de la iniciativa PAT en las líneas de producción, las técnicas espectroscópicas tales como NIR ¹⁹⁻²¹ y Raman ²²⁻²⁶ han probado ser alternativas reales al HPLC tradicional. Ambas técnicas son rápidas, no requieren el uso de disolventes y son no destructivas. Si bien es cierto que la implantación de la espectroscopía Raman ha sido claramente más lenta que la del NIR, los avances en los instrumentos Raman han impulsado el surgimiento de aplicaciones de esta técnica en los últimos 10-15 años ²⁷.

En el caso del análisis de formas farmacéuticas de dosificación, el espectro Raman que resulta está dominado por la fuerte señal debida a la dispersión inelástica de los anillos aromáticos comúnmente presentes en el(los) API(s), y menos a los excipientes, que son en su mayoría compuestos alifáticos. Esto es una ventaja respecto a la espectroscopía NIR, especialmente si se considera el análisis de productos de baja dosificación.

En la actualidad existe un gran interés en desarrollar métodos cuantitativos para el control de calidad de materias primas y productos terminados, haciendo uso de técnicas espectroscópicas dada la rapidez con que se pueden obtener los resultados, lo que implica un mayor número de muestras que se pueden analizar en un tiempo determinado y con la ventaja de que son técnicas no destructivas. La transición de los métodos tradicionales a estas otras técnicas no será rápida, ya que la industria farmacéutica se encuentra fuertemente regulada, sin embargo las empresas están destinando muchos recursos para la investigación sobre los alcances y limitaciones de estas metodologías. Durante la estancia en AstraZeneca fue posible realizar mediciones utilizando los espectrómetros comerciales de infrarrojo cercano y Raman más modernos, todos basados en los principios de cada técnica espectroscópica, pero con variaciones en las geometrías de adquisición de los espectros, así como en la cantidad de material que es irradiada y muestreada en cada caso. En este trabajo primeramente se desarrollaron modelos específicos para cada instrumento, y seguidamente se hizo una comparación de los resultados de las calibraciones y predicciones obtenidas en cada uno de ellos, asociando todos estos datos con la calidad de la señal y el muestreo que es posible con cada uno de ellos.

Como se mencionó antes, los comprimidos de Sintrom se midieron por espectroscopía Raman y NIR. De los capítulos previos ha quedado en evidencia que el énfasis de la tesis ha estado en todo momento en la espectroscopía Raman, sin embargo no se puede negar que la técnica espectroscópica vibracional más implementada a nivel industria farmacéutica es NIR, y como parte de los resultados que se mostrarán en este Capítulo se presentan modelos cuantitativos para el Sintrom 1 usando esta técnica bajo las modalidades reflectancia difusa y transmitancia. A continuación se presenta una breve explicación sobre la espectroscopía en el infrarrojo cercano.

8.2 Fundamentos de la espectroscopía en el infrarrojo cercano

La espectroscopía NIR en gran medida se volvió popular debido al volumen de material relativamente grande que se muestrea durante la adquisición del espectro. Esta técnica caracteriza los materiales según su absorción en la región entre 4000 y 12500 cm^{-1} , que

corresponde a los modos vibracionales de sobretono (armónico) y combinación, los cuales son mucho más débiles que los modos fundamentales medidos en el infrarrojo medio (a esta técnica comúnmente se le llama Infrarrojo de Transformada de Fourier, FTIR). Dado que cada absorción fundamental en la región del infrarrojo medio tiene varias bandas de sobretono y combinación correspondientes, muchas de las cuales se superponen y están ensanchadas, los espectros NIR se caracterizan por rasgos espectrales mucho más amplios en comparación a los espectros en el infrarrojo medio, y por lo general no es posible hacer asignaciones directas de enlace para cada frecuencia particular ²⁸. Las bandas observadas en NIR provienen predominantemente de los enlaces O-H, C-H y N-H, y dado que estas subestructuras son muy comunes en las moléculas orgánicas, las diferencias entre los espectros NIR de diferentes compuestos son por lo general muy sutiles, lo que resulta en una selectividad molecular inherente mucho menor respecto al FTIR ²⁸.

Un espectrómetro NIR por lo general está compuesto por una fuente de luz, un monocromador, un portamuestras o una interfaz de presentación de muestra, y un detector (Figura 8.2a), y es posible hacer mediciones en modo reflectancia y transmitancia (Figuras 8.2b y c) ²⁹. A pesar de la debilidad de las bandas NIR, su mayor ventaja está en que no hay requerimientos especiales sobre cómo preparar la muestra a diferencia del FTIR; así mismo los instrumentos NIR son más sencillos de construir que los instrumentos de FTIR ²⁸.

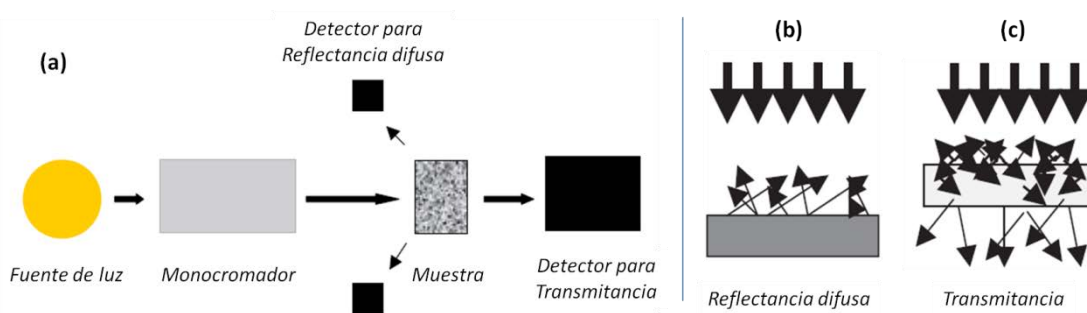


Figura 8.2 (a) Configuración básica de un espectrómetro NIR. (b) y (c): Dos de los modos de medición en NIR: reflectancia difusa y transmitancia. Tomado de Reich, G. *Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications*

Lo más ilustrativo en esta breve introducción es hacer una comparación de las tres técnicas que se han mencionado en párrafos anteriores: FTIR, Raman y NIR. Esto se presenta en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1 Comparativa de los instrumentos FTIR, Raman y NIR ²⁸

	FTIR	Raman	NIR
<i>Selectividad</i>	Alta, los espectros pueden interpretarse directamente	Alta, los espectros pueden interpretarse directamente	Baja, es difícil hacer una interpretación directa de los espectros
<i>Interferencia</i>	Las mediciones están fuertemente influenciadas por la presencia del agua	La fluorescencia, aunque dependiendo del láser usado esta va a impactar en distinto grado	Mediciones influenciadas por el agua. La señal se ve afectada por atributos físicos tales como la dureza de la partícula, tamaño y forma
<i>Muestreo</i>	Requiere una preparación de muestra: Pellets de KBr, suspensiones de Nujol o cristales para reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés)	No hay preparación previa de la muestra. El muestreo a través de vidrio o un plástico es posible, y se pueden acoplar fibras ópticas	No hay preparación previa de la muestra. Se puede medir a través de materiales como el vidrio. Es común usar fibras ópticas y el volumen muestreado es grande
<i>Portabilidad</i>	Por lo general son instrumentos grandes de laboratorio, diseñados para un ambiente estático	Los hay de sobremesa y portátiles. Permiten la medición de procesos.	Los hay de sobremesa y portátiles. Permiten la medición de procesos.

En general las principales ventajas de la espectroscopía Raman respecto a la espectroscopía en el infrarrojo cercano son las siguientes ³⁰:

- El agua se puede usar como disolvente.
- La técnica es muy adecuada para la medición de muestras biológicas en su estado nativo (nuevamente debido a que se puede usar el agua como disolvente).
- A pesar de que los espectros Raman resultan de las vibraciones moleculares en las frecuencias del infrarrojo, los espectros pueden obtenerse mediante irradiación en el ultravioleta, visible o infrarrojo cercano.
- Hay muy pocas bandas de sobretono o de combinación intensas, por lo que hay pocos solapamientos espectrales.
- Las vibraciones totalmente simétricas son observables.
- Las intensidades Raman son proporcionales a la concentración y la potencia del láser.

Por otro lado, dentro de las ventajas de la espectroscopía en el infrarrojo se pueden mencionar ³⁰:

- La instrumentación es más sencilla y barata.
- Los espectros adquiridos son menos dependientes del instrumento que los espectros Raman.
- El límite de detección es menor que en la espectroscopía Raman convencional
- Es más adecuada para la detección de las vibraciones de los enlaces con una polarizabilidad muy baja (por ejemplo enlaces C-F).

A modo de comparación, en la Figura 8.3 se muestra un espectro Raman de una tableta que contiene únicamente acenocumarol, y a su derecha el espectro NIR de la misma tableta.

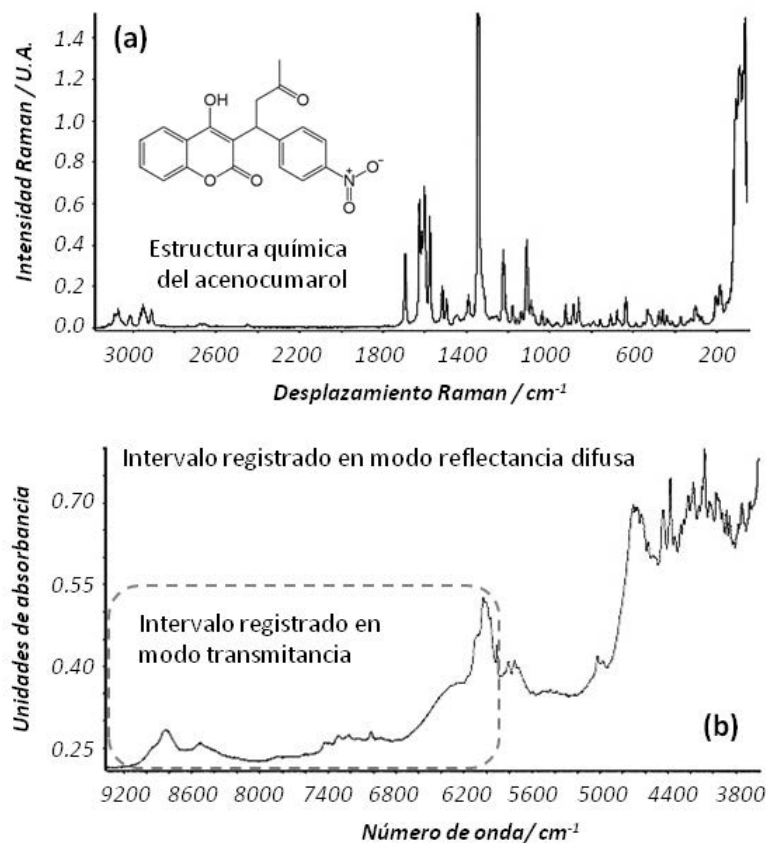


Figura 8.3 Espectros obtenidos con un FT-Raman (a) y el FT-NIR usado en esta tesis (b) de una tableta que contiene únicamente acenocumarol. En (b) se comparan los intervalos que se registran con el instrumento utilizado en modo reflectancia difusa y transmitancia.

8.3 Presentación de los instrumentos Raman dispersivos usados en esta tesis

Todas las mediciones correspondientes a este capítulo se realizaron con los siguientes instrumentos:

- Dos instrumentos Raman por retrodispersión: se usó el FT-Raman descrito en el Capítulo 6, y un instrumento dispersivo acoplado a una sonda que permite la irradiación de grandes áreas (conocida como sonda PhAT -*Pharmaceutical Area Testing*).
- Dos instrumentos Raman por transmisión: como se mencionó en el Capítulo 3 no fue hasta el año 2005 cuando la geometría por transmisión se demostró experimentalmente por primera vez, de manera que se trata de tecnología considerablemente reciente. Los dos instrumentos usados salieron al mercado en 2010, y algo fundamental que los diferencia de los instrumentos retrodispersivos mencionados antes, es que en su diseño ambos fabricantes consideraron la ventaja de disponer de portamuestras que permitan la colocación de varias muestras (tabletas, cápsulas o viales) y programar una secuencia de medición.
- Y en adición se usó un FT-NIR, con el cual se hicieron mediciones por reflectancia difusa y transmitancia. Este instrumento también incorpora un carrusel para programar una secuencia de medición de muestras.

8.3.1 Instrumento Raman por retrodispersión dispersivo acoplado a una sonda PhAT

El instrumento Raman utilizado en todas las mediciones descritas hasta ahora, usa como estrategia para reducir el problema del submuestreo el incorporar una platina motorizada que permite obtener espectros de múltiples posiciones del material bajo estudio. Con los espectros registrados se procede al cálculo del espectro promedio, y de esta manera un instrumento con un diámetro de irradiación considerablemente pequeño puede usarse para hacer un análisis cuantitativo representativo.

No obstante, la manera más eficiente de registrar espectros Raman representativos de una muestra consiste en la irradiación simultánea de áreas grandes con el fin de hacer el muestreo de un volumen grande, sin necesidad de usar otras estrategias tales como la rotación de la muestra. El instrumento que se presenta en la Figura 8.4 permite hacer esto. A la derecha en (a) y (b) se muestra un módulo que es el espectrómetro Raman en sí (o como lo llama el fabricante, el analizador), el cual tiene acoplada una sonda PhAT (cilindro azul con rojo), a la cual se pueden unir distintos lentes. Para cada lente el fabricante

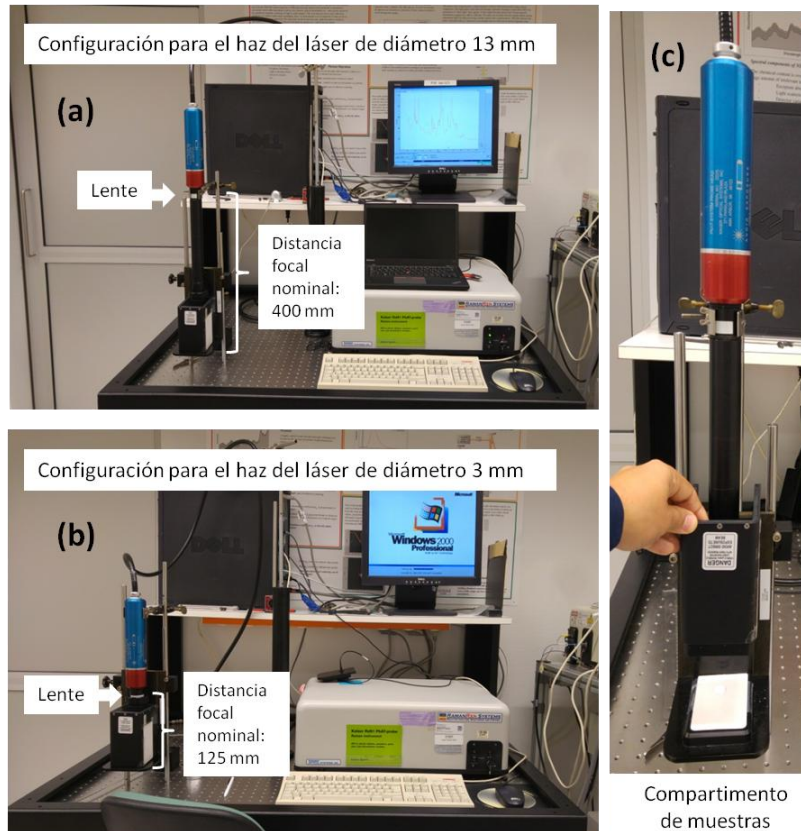


Figura 8.4 Espectrómetro Raman modelo RamanRXN1 (Kaiser) acoplado a una sonda PhAT. Distintos lentes se pueden colocar en el extremo inferior de la sonda, los cuales para ciertas distancias entre la tableta y el lente, permiten obtener haces de láser de distinto tamaño. Se muestra la configuración para un haz de diámetro (a) 13 mm y (b) 3 mm. En (c) se muestra el compartimiento donde se colocan las muestras.

establece una distancia focal nominal, con la cual finalmente se obtiene cierto diámetro de irradiación específico ³¹. Las sondas PhAT fueron desarrolladas por Kaiser Optical Systems, y este es el fabricante también del espectrómetro usado (modelo RamanRXN1). En este instrumento el láser de excitación (785 nm, diodo láser) se introduce usando un arreglo de 50 fibras ópticas, el cual se magnifica para formar un área circular de iluminación grande. Seguidamente la señal Raman dispersada se recolecta por las mismas fibras ópticas y se lleva al detector CCD, el cual tiene una resolución de 1024 x 256 píxeles y se encuentra enfriado a -40 °C mediante una celda Peltier. Las sondas PhAT sacan provecho de la recolección eficiente de señal que resulta de una iluminación global no confocal, y por su parte el analizador almacena y co-adiciona las señales de las fibras individuales en 10 canales para minimizar el tiempo de adquisición de los espectros ³². Por tanto, de cada adquisición que se hizo sobre cada tableta en realidad se guardan 10 espectros, pero estos no tienen la misma intensidad dado que cada uno refleja lo adquirido

por cierto grupo de fibras ópticas; en sentido las que están más al centro de la sonda permiten obtener un espectro más intenso. En la práctica el programa del instrumento permite seleccionar qué hacer con los datos adquiridos en los 10 canales, y para este trabajo se procedió a sumarlos y obtener el espectro promedio.

La sonda PhAT además de permitir mediciones sin contacto, admite también el acoplamiento de una óptica de inmersión. Por otro lado, aparte de que el muestreo es muy reproducible, tiene la ventaja de que el alineamiento se hace libre de enfoque ³³, y esto es muy importante para aplicaciones de monitorización de procesos donde es muy difícil mantener una distancia de muestreo constante debido a la dinámica del proceso. Para este tipo de aplicaciones un instrumento que requiera un enfoque muy preciso para hacer mediciones de forma correcta es desventajoso ³⁴.

Finalmente como se muestra en la Figura 8.4, las distintas tabletas se midieron usando dos lentes distintos: con una distancia focal nominal de 400 mm se obtiene un diámetro de irradiación de 13 mm con uno de los lentes, mientras que con el otro con una separación de 125 mm se obtiene un diámetro de irradiación de 3 mm. Esto de entrada es ideal considerando los diámetros de las tabletas comerciales analizadas (13.2 y 5.1 mm, Figura 8.1), así como el tamaño de las tabletas que se prepararon usando la prensa hidráulica descrita en los Capítulos 6 y 7 (13.4 mm). Sin embargo como se explicará en la sección experimental, con el fin de evaluar si la irradiación de las tabletas grandes con el diámetro de láser pequeño se traduce en una afectación de los resultados por cuestiones de muestreo, también se hicieron mediciones de las tabletas de 13.4 mm irradiando con el lente que produce un diámetro de irradiación de 3 mm. Esto último es un análogo de las mediciones de mapeo que se pueden hacer con el equipo MultiRAM, pero cambiando la posición de medición por rotación a mano de la tableta.

8.3.2 Instrumentos Raman por transmisión

La Figura 8.5 muestra imágenes de los dos instrumentos de Raman por transmisión para los cuales se desarrollaron modelos de calibración, así como el compartimento de muestras que incorpora cada uno. El esquema de funcionamiento de ambos instrumentos es muy similar: una primera fibra óptica conecta el láser con un primer colimador, del lado opuesto al de irradiación se encuentra la óptica de recolección y un segundo colimador conectado al monocromador mediante un haz de fibras. Finalmente un CCD es usado para

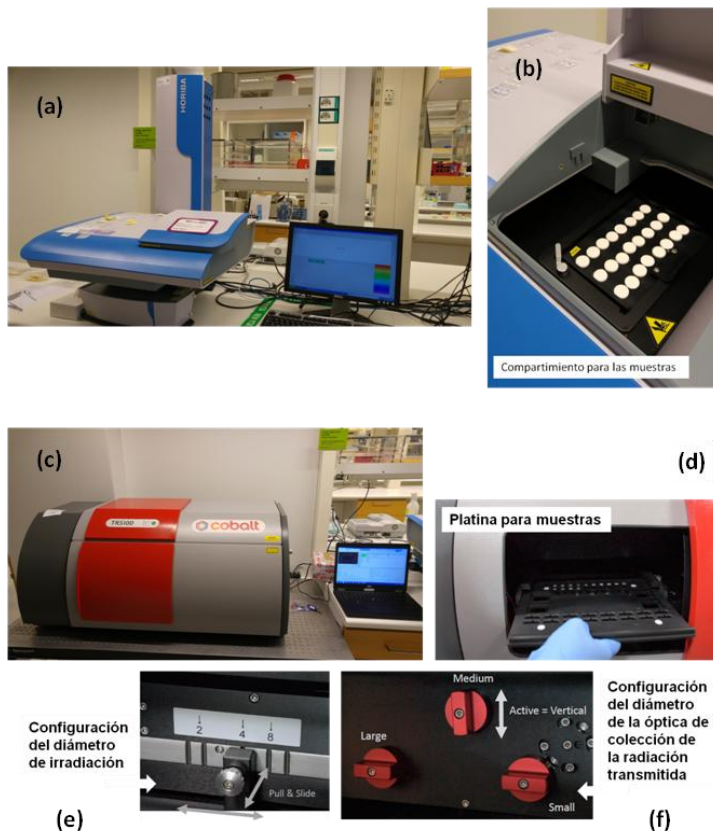


Figura 8.5 (a) Instrumento Raman de transmisión modelo AccuRA (Horiba), en (b) se muestra su compartimento de muestras, con una platina que permite la medición de 24 tabletas en una misma secuencia. (c) Instrumento Raman de transmisión modelo TRS100 (Cobalt), en (d) se muestra la platina de muestras genérica que viene incluida, apta para unas cuantas unidades de distintos tipos de muestras. En (e) y (f) se muestran los selectores del diámetro de irradiación y recolección de la radiación (en f, pequeño = 4 mm, mediano = 6 mm, grande = 8 mm).

Tabla 8.2 Comparativa de los instrumentos Raman de transmisión usados

Atributo	Horiba AccuRA	Cobalt TRS100
Capacidad de la platina de muestras	32 o 24 tabletas o cápsulas	Hasta 300 tabletas, cápsulas o viales
Longitud de onda de irradiación	785 nm	830 nm
Diámetro de irradiación	4.3 mm, fijo	2-4-8 mm, seleccionable
Diámetro del lente que recolecta la radiación	Fijo	4-6-8 mm, seleccionable
Temperatura del detector	-70 °C	-70 °C
Preprocesamiento de los espectros con el software del instrumento	Suavizado por interpolación de puntos	Calibración del eje x usando un estándar ASTM de poliestireno Corrección de la intensidad registrada (eje y) usando el estándar SRM2246 (vidrio verde), el cual es específico para la excitación Raman usando un láser de 830 nm

detectar la señal Raman ^{35,36}. En estos instrumentos el detector se encuentra enfriado a -70 °C, también usando una celda Peltier.

La Tabla 8.2 resume las principales diferencias que se pueden mencionar de ambos instrumentos. Los dos admiten la colocación de platinas de muestras para distintas formas farmacéuticas sólidas (tabletas redondas, alargadas, cápsulas), no obstante el instrumento marca Cobalt fue diseñado para platinas mucho más grandes. Esto es sumamente beneficioso, incluso para el presente estudio en el cual se midieron más de 300 comprimidos. Sin embargo este instrumento llegó a AstraZeneca en el último mes de la estancia, y en ese momento únicamente se disponía de una platina que admite la colocación de pocas unidades de distintos tipos de materiales (Figura 8.5d). Por este motivo para las mediciones realizadas en este estudio se adaptaron las platinas del instrumento Horiba al soporte de platinas del espectrómetro Cobalt. De esta manera en ambos instrumentos se programaron secuencias de 24 tabletas, las cuales se fueron midiendo gracias a los soportes motorizados en los ejes x-y que incorporan estos. Considerando exclusivamente el paso de excitación, la irradiación a 830 nm tiene una eficiencia del 80 % en comparación a la de 785 nm, por lo que es posible que con el instrumento Cobalt sea necesario hacer las mediciones aplicando potencias de láser más elevadas. Este instrumento permite seleccionar el diámetro de irradiación y el de la óptica de recolección de la radiación, sin embargo el primero se tuvo que dejar en 4 mm para todas las tabletas dado que los agujeros de las platinas del Horiba tienen un diámetro de 5 mm (en este último el diámetro de irradiación no es configurable). La selección que es posible realizar de los dos diámetros mencionados anteriormente con el instrumento Cobalt da pie a unas consideraciones interesantes: un diámetro de irradiación mayor ilumina un área más grande, por lo que se incrementa el volumen muestreado; no obstante para una potencia de láser fija al incrementar el diámetro de irradiación ocurre una disminución en la densidad de potencia. Respecto al lente de recolección, uno más grande permite recolectar radiación Raman en un área mayor, de manera que se incrementa el volumen muestreado; sin embargo los lentes más grandes desenfocan la recolección, y como resultado hay una disminución en la intensidad del espectro. En resumen hay 9 combinaciones posibles, y para nuestras tabletas se decidió usar el lente recolector de 4 mm para las tabletas pequeñas (tabletas de Sintrom 1), y el de 8 mm para las tabletas grandes (tabletas de Sintrom 4 y tabletas preparadas en la prensa hidráulica).

Por último, el instrumento Cobalt permite además colocar las tabletas sobre un "vidrio unidireccional", que sirve como potenciador de haces. Haciendo uso de este soporte cualquier fotón del láser que es reemitido hacia atrás desde la superficie de la tableta es

nuevamente reflejado hacia la muestra, y entonces el efecto neto de dirigir un número mayor de fotones del láser hacia el material es un incremento en la cantidad de fotones Raman que salen del lado opuesto al de irradiación ³⁷. De acuerdo a una nota técnica del fabricante, usando este dispositivo es posible registrar espectros hasta 10 veces más rápido ³⁸. Cuando se compró este instrumento se solicitó con el vidrio unidireccional, sin embargo por cuestiones de tiempo no fue posible realizar mediciones haciendo uso de éste. No obstante es otra diferencia a mencionar respecto al instrumento marca Horiba.

8.3.3 Instrumento FT-NIR

El instrumento utilizado se muestra en la Figura 8.6. Se trata de un espectrómetro muy versátil. Aparte de las mediciones de muestras sólidas (ya sean comprimidos, o viales con un polvo o granulado) por reflectancia difusa y transmitancia, este incluye un compartimento de muestras específico para la medición de líquidos en cubetas o viales, el cual tiene sistema de calentamiento (sección azul del módulo en la Figura 8.5a). Así mismo se pueden acoplar hasta dos sondas ópticas para la medición directamente en contenedores. Para las mediciones realizadas se sacó ventaja del carrusel de 30 posiciones que incluye el instrumento, no obstante éste se puede reemplazar por otro módulo que permite el uso cubetas de diámetro mayor, e incluso hacer su rotación durante el registro del espectro de manera que el área irradiada corresponda a un anillo.

Todas las mediciones se hacen con la misma fuente, sin embargo el detector es distinto en cada caso: un detector de sulfuro de plomo a temperatura ambiente (RT-PbS) es utilizado para las mediciones por reflectancia difusa, mientras que un detector InGaAs, el cual se encuentra en un brazo movable del espectrómetro, se utiliza para las mediciones por transmitancia. Al emplearse un detector distinto en cada modo de adquisición, el intervalo espectral que se registra también es distinto: 12800-3600 cm^{-1} (780-2780 nm) en reflectancia difusa, y 12800-5800 cm^{-1} (780-1725 nm) en transmitancia. El camino óptico es el mismo en ambos instrumentos hasta llegar a la esfera integradora, el cual es un módulo que se encuentra debajo de la ventana para la irradiación de las muestras (Figura 8.6a). La esfera integradora tiene tres posiciones (Figura 8.7): abierto para las medidas por reflectancia difusa, cerrado para la adquisición del espectro del background (con lo cual no es necesario quitar las muestras para el registro de este espectro) y la posición de lente, que sirve para que en las mediciones de transmisión el haz enfocado de radiación infrarroja salga verticalmente hacia la muestra.

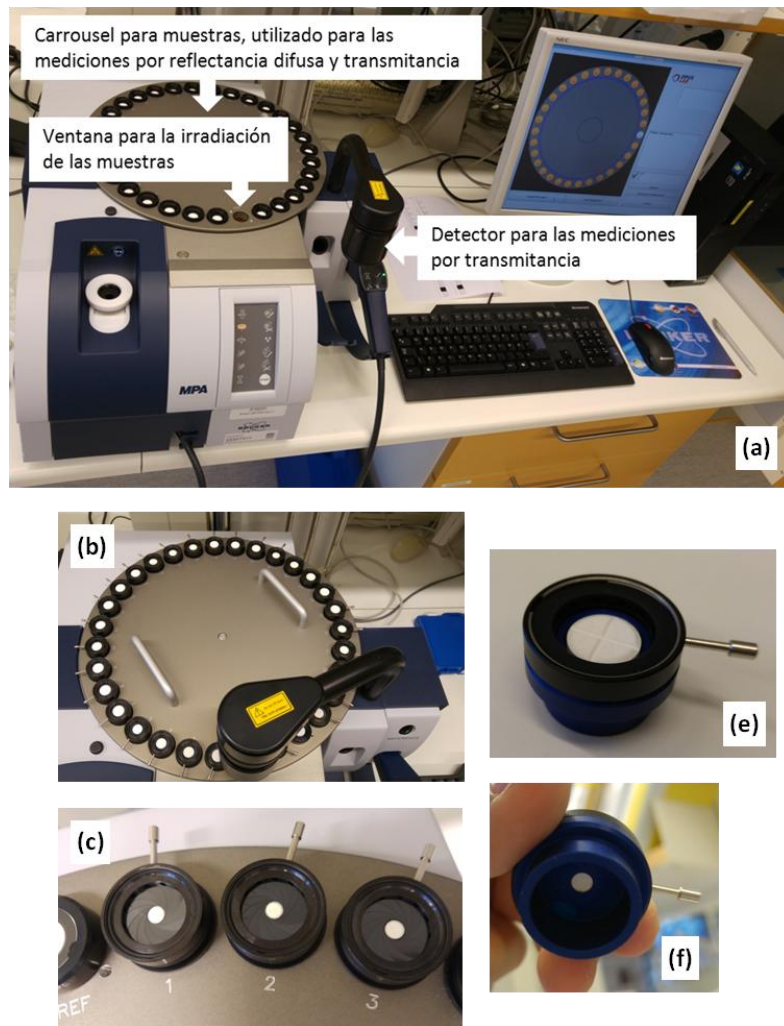


Figura 8.6 Instrumento FT-NIR modelo MPA (Bruker) utilizado para las mediciones de las tabletas de Sintrom. En (a) el carrusel de muestras incluye los soportes hechos en AstraZeneca para las mediciones por reflectancia difusa de las tabletas de diámetro grande. (b) Carrusel de muestras con los soportes de Bruker para las mediciones por transmitancia, los cuales tienen un iris ajustable para centrar las muestras. En (b) y (e) se muestran los soportes para las mediciones por transmitancia de las tabletas de diámetro grande, y en (c) para las tabletas de Sintrom 1. En (f) se muestra la parte inferior de estos soportes, que tienen un agujero de 4.5 mm.

Los comprimidos se presentaron al instrumento usando portamuestras distintos para cada tipo de medición: en el caso de reflectancia difusa, las tabletas de diámetro mayor se midieron usando unos soportes metálicos de color negro, diseñados en AstraZeneca para estas tabletas en específico. Estos tienen un agujero de diámetro 11.5 mm, con lo cual se maximizó la superficie de las tabletas que estaba siendo irradiada, siendo posible además el uso del carrusel del instrumento. En el caso de las tabletas comerciales de Sintrom 1, se hicieron pruebas utilizando soportes similares con un agujero de menor diámetro, sin embargo se vio que la gran superficie metálica que quedaba expuesta al momento de la medición resultaba en espectros con una gran interferencia, probablemente debida a las

múltiples reflexiones de la luz de irradiación en la superficie de estos. Como alternativa se usaron unos viales de vidrio diseñados por Bruker para las mediciones por reflectancia difusa, los cuales fueron pensados para contener muestras en polvo, por lo que tienen un cuello estrecho. Las tabletas de diámetro mayor no pueden ser colocadas dentro de ellos, pero sí las tabletas pequeñas de Sintrom 1. Se hicieron pruebas para verificar que el material del que están hechos no interfiere en los espectros adquiridos. Respecto a las mediciones por transmitancia, se usaron unos portamuestras vendidos por Bruker que son específicos para este modo de adquisición, los cuales tienen un agujero de diámetro 4.5 mm en su parte inferior. En la parte superior tienen un iris ajustable, el cual sirve para centrar las tabletas en cada portamuestras individual.

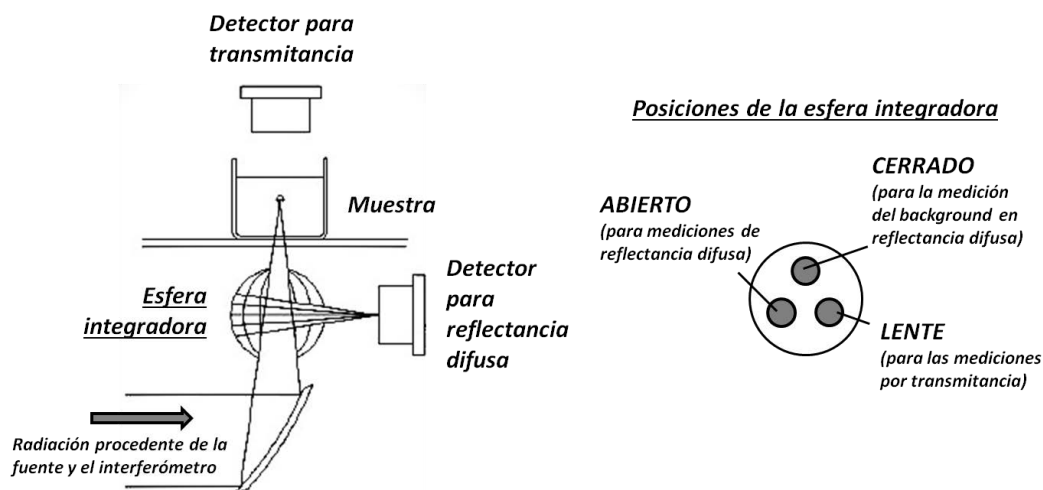


Figura 8.7 Esquema de la esfera integradora que forma parte del espectrómetro FT-NIR modelo MPA. La ilustración de la izquierda corresponde propiamente a una medición por reflectancia difusa, pero se incluye la ubicación de los dos detectores usados para las mediciones realizadas.

8.4 Materiales y métodos

Como parte de este capítulo se detallarán las muestras y mediciones realizadas durante la estancia en Suecia. Se harán algunas comparaciones para la descripción de las mediciones del equipo MultiRAM, respecto a los parámetros que se usaron para el estudio que está publicado. Más detalles sobre este primer estudio se encuentran en la referencia ⁹.

8.4.1 Muestras comerciales y compuestos de referencia

Varias cajas de 6 lotes de Sintrom 1, y 5 lotes de Sintrom 4 (Merus Labs, Madrid, España) se compraron en diferentes farmacias de Barcelona. En la Figura 8.8 se presentan las características de las tabletas analizadas. 12 tabletas fueron aleatoriamente seleccionadas de todos los blisters de cada lote para las mediciones con los distintos instrumentos Raman y NIR, tabletas que posteriormente fueron procesadas por un método de cromatografía líquida para la obtención de los valores de referencia. Acenocumarol puro (aportado por Novartis) y alfa-D-lactosa (Acros) se usaron para obtener las tabletas preparadas en el laboratorio que forman parte del set de calibración, siendo la lactosa el excipiente mayoritario de la formulación. Acetonitrilo (Panreac, grado UV-IR-HPLC) y ácido fosfórico al 50 % (Panreac) se usaron para el método HPLC.

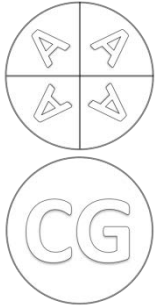

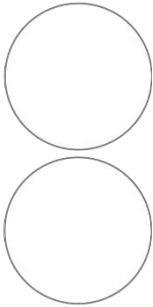
			
	Tableta comercial de Sintrom 4	Tableta comercial de Sintrom 1	Tabletas preparadas en el laboratorio (Sintrom 1 y Sintrom 4)
<i>Diámetro (mm)</i>	13.2	5.1	13.4
<i>Grosor (mm)</i>	3.5	1.9	1.7
<i>Masa (mg)</i>	571.2	50.2	300
<i>Contenido de API (mg)</i>	4	1	-
<i>% p/p de API</i>	0.7	2	70-130 % del contenido nominal

Figura 8.8 Dimensiones de las tabletas comerciales de Sintrom, y de las tabletas preparadas en el laboratorio usando una prensa hidráulica. Se muestran ambas caras de las tabletas. Figuras a escala real

8.4.2 Tabletillas preparadas en el laboratorio

Se prepararon tabletas en el laboratorio con un porcentaje en peso por debajo y por encima del contenido nominal, mediante la adición de pequeñas cantidades de lactosa o del ingrediente activo a tabletas comerciales previamente pulverizadas en un mortero ³⁹. Estas mezclas en polvo fueron homogeneizadas en un mezclador Turbula T2C (WAB,

Basilea), y luego fueron compactadas a 140 MPa en una prensa Perkin Elmer 15.001. La preparación de estas tabletas se basó en un diseño de experimentos, en el cual se introdujeron como factores las distintas concentraciones respecto al valor nominal, distintos lotes usados como base para la preparación de las tabletas, y la presión de compactación. Los distintos niveles para cada factor se resumen en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3 Variaciones incorporadas en las muestras preparadas en el laboratorio, que forman parte del set de calibración. Este conjunto se preparó para cada producto comercial

Rango de concentración	70-130 % de la concentración nominal, en 5 niveles equidistantemente separados
Presión de compactación	120-140-160 MPa
Lotes comerciales que se pulverizaron	Todas las combinaciones posibles de las dos variables anteriores se realizaron 3 veces, en cada caso usando como base un lote comercial pulverizado distinto

Todas las combinaciones de los factores anteriores fueron preparadas por duplicado, por lo que se dispone de 90 tabletas preparadas en el laboratorio para cada producto comercial

8.4.3 Método de referencia por cromatografía líquida

El acenocumarol se extrajo de las tabletas siguiendo el procedimiento descrito por De Orsi y colaboradores ⁴⁰. Se siguieron también las condiciones descritas para el análisis cromatográfico, únicamente cambiando el gradiente de elución: la fase móvil utilizada estaba constituida por una mezcla acetonitrilo-agua a pH 3 (ajustado con ácido ortofosfórico), con una composición inicial 60:40, y luego se aplicó un gradiente lineal hasta un 80 % de acetonitrilo en 10 min. El caudal era de 1.5 mL/min. Se inyectaron 20 µL y la temperatura de elución fue de 25 °C. El tiempo de retención del acenocumarol era de aproximadamente 4 min. Se prepararon 7 disoluciones de calibración, en una concentración entre 10 y 120 mg/L mediante el pesado del API puro; estas disoluciones y los extractos de las tabletas fueron filtrados a través de una membrana de nylon (0.45 µm). Para el análisis por HPLC se utilizó un instrumento Agilent 1100 (Santa Clara, CA, EUA), con una columna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula marca Symmetry-Shield -Waters) y un detector de arreglo de diodos ($\lambda = 280$ nm).

8.4.4 Adquisición de los espectros, pretratamientos espectrales y quimiometría

Dado que en este trabajo se emplearon varios instrumentos, los parámetros de adquisición específicos para cada uno serán mencionados al inicio del apartado correspondiente a cada instrumento en la sección de Resultados y Discusión. Respecto a los pretratamientos espectrales, la secuencia general consistió en aplicar primero una corrección de línea base y seguidamente una normalización; para lo primero se aplicó una de las siguientes opciones: las correcciones de línea base del Unscrambler (que fue el programa utilizado para el pretratamiento de los espectros y todo el análisis multivariable), las cuales corrigen el offset y la pendiente de los espectros (abreviado 2BLC en este capítulo), una segunda derivada de Savitzky-Golay, o el SNV; mientras que para normalizar los espectros se usó la normalización a vector unidad (abreviado UNorm) o el SNV.

Considerando que el mejor modelo de calibración es el más sencillo, se intentó construir modelos usando solo las muestras sub- y sobredosificadas descritas en la sección 8.4.2. En este trabajo no se probó obtener una calibración basada en la altura o área de pico a diferencia del estudio que está publicado, sin embargo esta es una manera válida para obtener calibraciones con datos obtenidos por espectroscopía Raman, dada la elevada resolución de los espectros adquiridos. Con ninguno de los instrumentos se obtuvieron predicciones satisfactorias usando modelos que incluían sólo las tabletas preparadas en el laboratorio, por lo que a continuación se probó la estrategia basada en un conjunto de muestras de calibración mixto. Esta metodología de calibración se reportó a finales de los años 1990 ⁴¹ como una estrategia de calibración expandida que incluye la variabilidad química (dado que el rango de concentraciones está extendido mediante la inclusión de muestras sub- y sobredosificadas), pero también la variabilidad física de las muestras, al añadir comprimidos comerciales en el conjunto de muestras de calibración. Las muestras comerciales a incluir se seleccionan haciendo un PCA de todas las muestras analizadas, y se escogen los dos lotes que se encuentran más alejados del centro del modelo. De esta manera los conjuntos de muestras de calibración para ambos productos estaban constituidos por las tabletas preparadas en el laboratorio, y 24 tabletas pertenecientes a dos de los lotes comerciales analizados. Las predicciones que se obtuvieron con los distintos modelos se consideraron aceptables si los valores de RMSEP eran bajos, y una prueba t de datos pareados (HPLC vs valores Raman para cada tableta) mostraba que no había una diferencia estadísticamente significativa para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Los modelos PLS se construyeron por validación cruzada excluyendo secuencialmente una muestra del conjunto de calibración (procedimiento leave-one-out en inglés), y para la selección del número de variables latentes se estableció un límite de aumento de la varianza residual del 6 %. Este se calcula de la varianza residual de dos componentes consecutivos, entonces si la varianza del siguiente componente es menor que un 6 % más bajo respecto al componente previo, el número de componentes óptimos se deja en el número anterior. Este es el criterio que utiliza la versión 10.3 del programa Unscrambler para sugerir un número óptimo de variables latentes, sin embargo se verificó el incremento en el tanto por ciento de varianza explicada en Y al hacer la adición de un componente más. Si el incremento rondaba el 1 % se añadió una variable latente más.

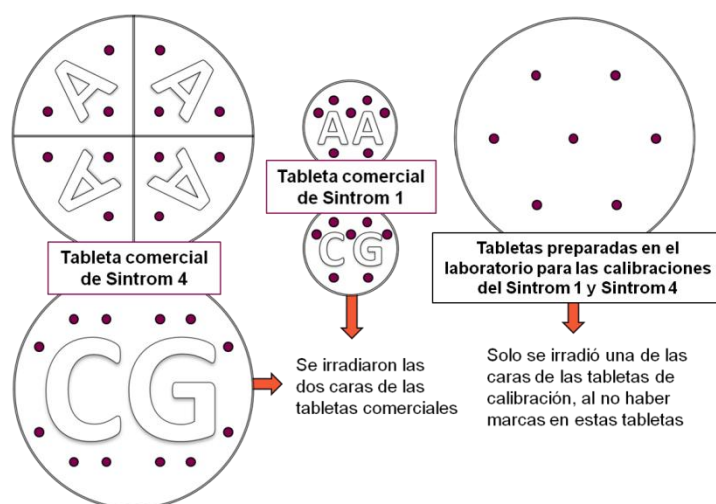
8.5 Resultados y discusión

8.5.1 Obtención de los modelos de calibración con el equipo Bruker MultiRAM

8.5.1.1 Parámetros para la adquisición de los espectros

El trabajo publicado como parte de esta tesis con el Sintrom, se llevó a cabo usando este instrumento. En la Figura 8.9 se representa a escala real el tamaño de las tabletas medidas, y la distribución de los puntos sobre los cuales se hicieron mediciones por mapeo. Al pie de la figura se comparan los parámetros de adquisición usados en el trabajo publicado, y en el estudio comparativo que se está presentando.

Como se observa en el pie de la figura, la potencia de láser fue el único parámetro que se mantuvo constante. La resolución en las segundas mediciones se redujo a 4 cm^{-1} (solo los FT-Raman permiten seleccionar la resolución de los espectros), un valor acorde con el ancho de banda natural que se puede esperar en los espectros obtenidos al analizar una tableta farmacéutica. Eso sí, el ruido de los espectros se disminuye considerablemente con este cambio. Con la resolución definida se probaron diferentes números de barridos y se concluyó que la diferencia entre 16 y 32 barridos era muy pequeña, no obstante esta reducción se traduce en un 50 % menos de tiempo de adquisición (dejando los otros parámetros constantes). Respecto al número de posiciones registradas en cada cara de las tabletas, se hizo una pequeña reducción en la cantidad de espectros para todas las tabletas excepto para las tabletas ranuradas. Esto porque como se mostrará en el siguiente Capítulo, la espectroscopía Raman se usó para determinar el contenido de API en las posibles mitades o cuartos que se pueden obtener luego de dividir, nuevamente



	Primer trabajo			Segundo trabajo		
Potencia de láser	800 mW			800 mW		
Resolución	1 cm ⁻¹			4 cm ⁻¹		
Número de barridos	32			16		
Espectros registrados por cara en cada tipo de tableta *	Comerciales	Sintrom 1	9	Comerciales	Sintrom 1	7
		Sintrom 4	12		Sintrom 4	12
	Preparadas en el laboratorio	12		Preparadas en el laboratorio	7	
Tiempo necesario por espectro	3.5 min			0.5 min		

* Solo las tabletas comerciales se irradiaron por las dos caras.

Figura 8.9 Tamaño relativo del haz del láser del espectrómetro FT-Raman MultiRAM (círculo morado en las figuras, diámetro: 500 μm), respecto al diámetro de las tabletas. El porcentaje de la superficie irradiada fue del 6.7 %, y 1.7 % para las tabletas comerciales de Sintrom 1 y Sintrom 4, respectivamente.

de una forma no destructiva. Para esto se consideró que 3 espectros por cada cuarto de tableta era lo mínimo que se debía registrar. Debe recordarse que con este instrumento se puede definir con mucha precisión la posición de irradiación, y en este sentido se evitó registrar espectros sobre las marcas que poseen las tabletas comerciales.

La Figura 8.10 muestra espectros adquiridos en una tableta que contiene acenocumarol, y en una tableta de Sintrom 1 y Sintrom 4. Los espectros Raman registrados en todos los instrumentos presentan las mismas bandas, y de todas las bandas observadas debe destacarse el grupo centrado en 1600 cm^{-1} . Estas bandas están relacionadas a la vibración de los enlaces de los anillos aromáticos y enlaces C=O de la molécula de acenocumarol, y fueron muy importantes para el desarrollo de los modelos de calibración. En el otro extremo del espectro, un pequeño hombro que aparece a 513 cm^{-1} es la última banda en la que se podían distinguir las distintas concentraciones de API en las tabletas de calibración

preparadas en el laboratorio. Los espectros en el equipo MultiRAM se adquirieron entre 3600 y 50 cm^{-1} , por lo que se trata del instrumento que permite registrar el intervalo espectral más amplio. No obstante es totalmente válido usar intervalos espectrales más cortos, y de hecho todos los modelos que se desarrollaron para el Sintrom 1 y Sintrom 4 en los distintos instrumentos, se hicieron usando uno de los 3 intervalos que se señalan como 1-2-3 en la ampliación de la Figura 8.10.

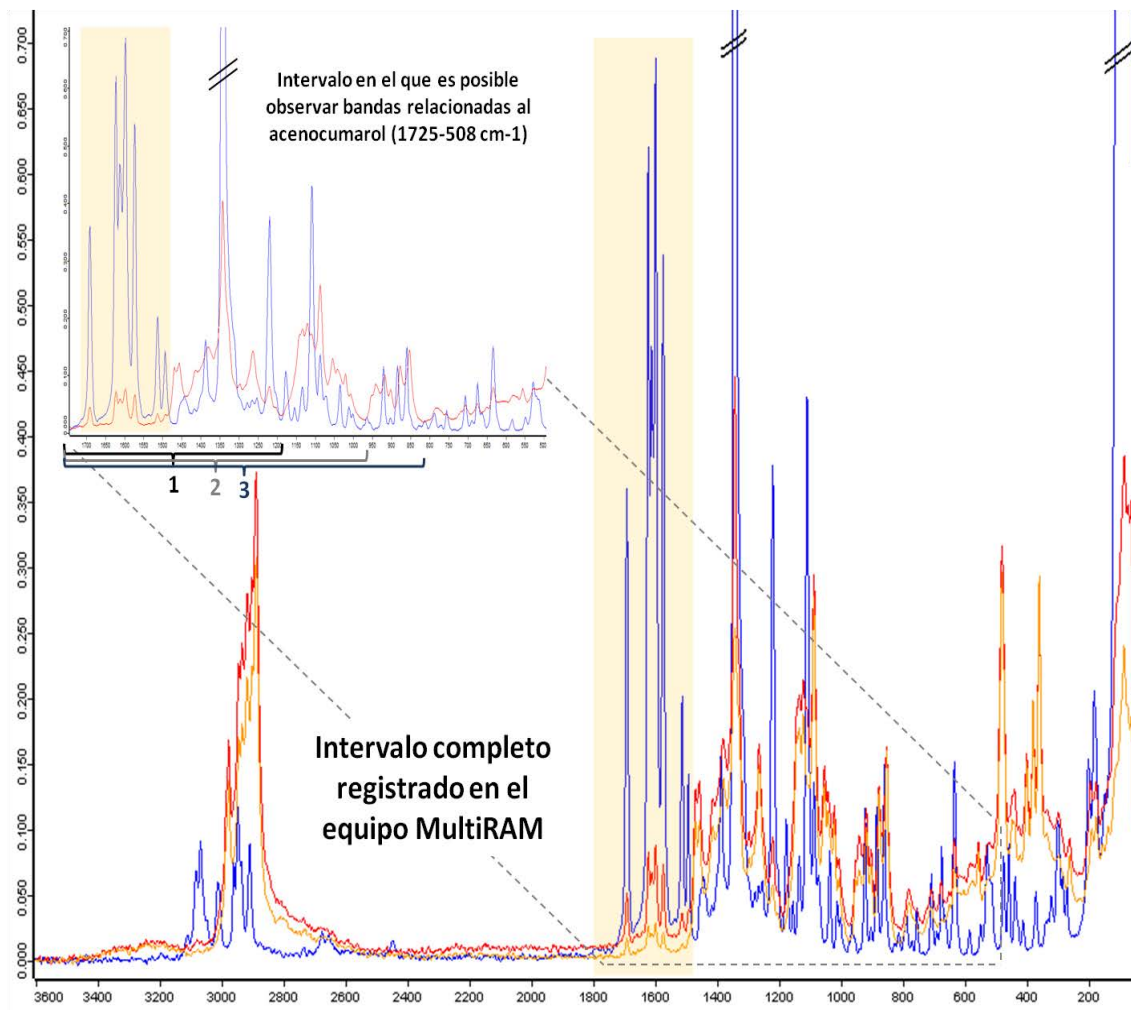


Figura 8.10 Espectro Raman sin pretratar del acenocumarol (en azul), y una tableta comercial de Sintrom 1 y Sintrom 4 (en rojo y naranja, respectivamente) registrados en el equipo MultiRAM. Se ha resaltado un grupo de bandas centrado en 1600 cm^{-1} , que se debe a vibraciones de las moléculas del API. En el recuadro se ha incluido solo el espectro del Sintrom 1 y del acenocumarol, y se muestran los tres intervalos que se probaron para generar todos los modelos de calibración mediante espectroscopía Raman.

8.5.1.2 Determinaciones previas antes de la obtención de los modelos: detección de las distintas presiones de compactación, y de las diferencias en los espectros que se adquieren de las tabletas comerciales intactas, y las tabletas preparadas en el laboratorio que tienen una composición igual al valor nominal

De los parámetros planificados en el diseño de experimentos del cual se basó la preparación de las tabletas hechas en el laboratorio, la presión de compactación es el más interesante de estudiar por separado. Respecto a los distintos niveles de concentración, evidentemente es indispensable que los incrementos de excipiente o API realizados se reflejen en los espectros adquiridos. En el Capítulo anterior se mostraron los resultados para la compactación de MCC en un intervalo de presiones mucho más amplio que el considerado en este estudio, y se vio que si bien en los espectros sin pretratar parece que la presión menor se distingue de las otras presiones, al normalizar las diferencias desaparecen. Esto cuando se realiza un PCA y se representan los scores del PC2 vs PC1 (Figura 7.3).

En el presente trabajo, si se hace un PCA incluyendo las 90 tabletas que se prepararon en el laboratorio para cada producto, el PC1 muestra las tabletas en un orden 70-85-100-115-130 % p/p de API respecto al valor nominal, por lo que deben graficarse componentes que explican una menor cantidad de la varianza total para detectar algún efecto debido a la presión de compactación. Esto se muestra en la Figura 8.11, con las tabletas preparadas para la calibración del Sintrom 1 (a-f) y del Sintrom 4 (g-h). En todas las representaciones correspondientes al Sintrom 1 se grafica el PC-2 o PC-3, vs PC-4 o PC-5, solo de esta forma aparentemente se observa cierto orden según la presión de compactación, aunque hay un solapamiento considerable. A la derecha de cada gráfico de scores se representa el/los loadings de los factores que explican el orden de colores que se muestra en los primeros, y es llamativo que para los dos tipos de instrumentos (retrodispersión y transmisión) se observa una característica espectral muy similar a la de una segunda derivada donde el eje x se cruza a 1342 cm^{-1} , posición a la que aparece una banda muy intensa en los espectros de las tabletas comerciales, del acenocumarol y de la lactosa.

Si bien parece que esta banda es la responsable de observar cierto agrupamiento según la presión de compactación, no fue problemática para obtener las calibraciones del Sintrom 1, pero sí para las del Sintrom 4; para obtener los modelos de este se recortaron los espectros para eliminar todas las intensidades en el intervalo cubierto por esta banda (aproximadamente $1365\text{-}1305\text{ cm}^{-1}$). El PCA que corresponde a las Figuras 8.11g-h se

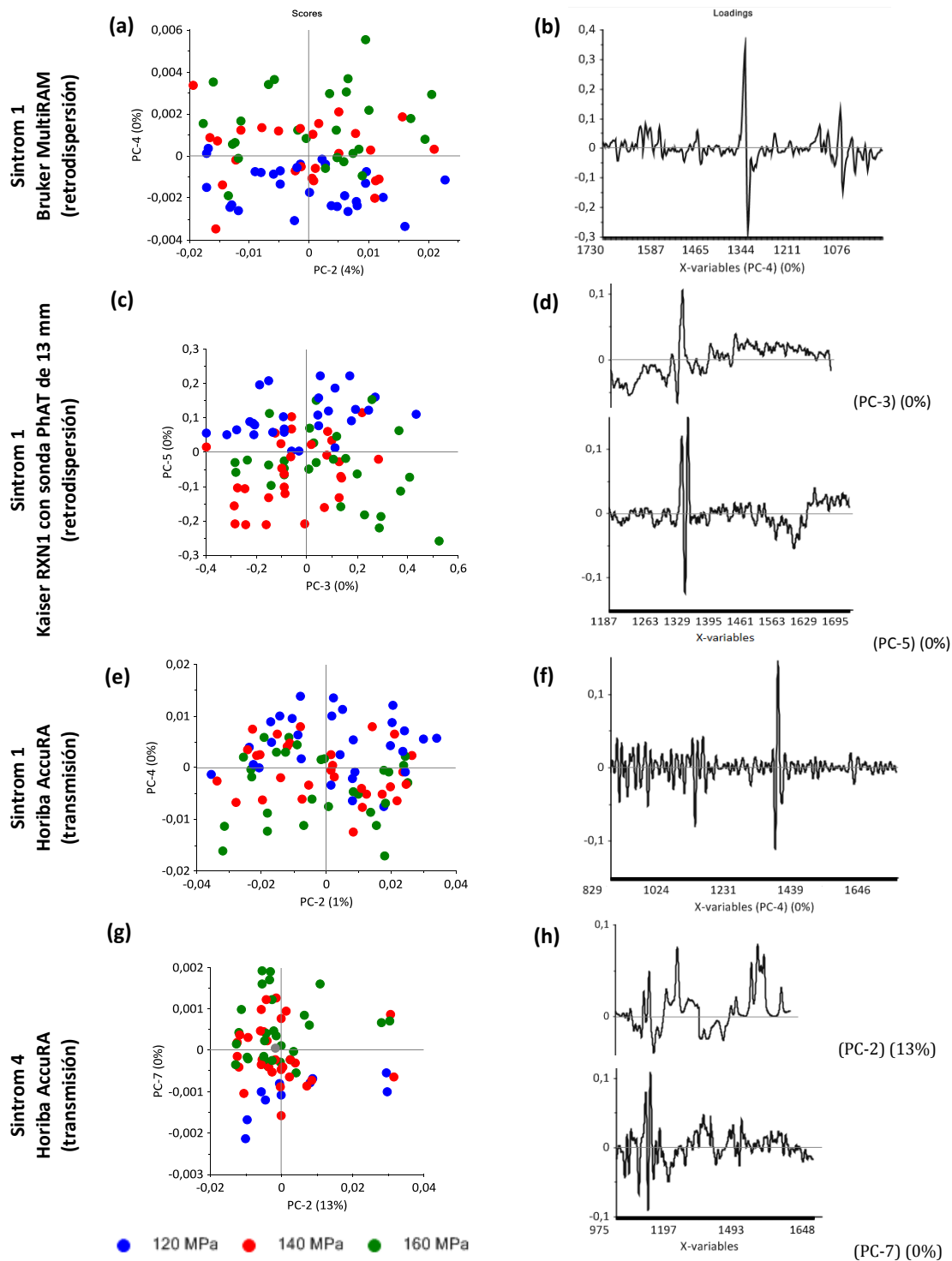


Figura 8.11 PCA's de los espectros registrados con las tabletas preparadas en el laboratorio compactando a tres presiones distintas; usando los espectros después de aplicar el pretratamiento necesario para obtener el modelo de calibración en el instrumento específico, y se menciona el intervalo espectral usado según la Figura 8.10. (a-b) Tablet as para el Sin trom 1 en el equipo MultiRAM -intervalo 2, pretratamiento: UNorm. (c-d) Tablet as para el Sin trom 1 en el equipo RamanRXN1 y la sonda PhAT de 13 mm (un único espectro por tableta) -intervalo 1, pretratamiento: 2BLC + SNV. (e-f) Tablet as para el Sin trom 1 en el equipo AccuRA (un espectro por tableta) -intervalo 3, pretratamiento: 2D SG45p + UNorm. (g-h) Tablet as para el Sin trom 4 en el equipo AccuRA (un espectro por tableta) -intervalo 2, pretratamiento: 2BLC + UNorm.

obtuvo eliminando esta banda, y como se puede apreciar es mucho más difícil dar con algún agrupamiento según la presión de compactación.

La Figura 8.12 compara lo que ocurre para el Sintrom 1 y Sintrom 4 cuando se selecciona uno de los 3 intervalos espectrales que se han considerado para la elaboración de los modelos, y se quita o no la señal centrada en 1342 cm^{-1} . El PCA que se muestra en las Figuras 8.12a y b fue el utilizado en la selección de los lotes para el modelo del Sintrom 4 con el equipo MultiRAM. Se usó el intervalo 1 y se eliminó la señal mencionada

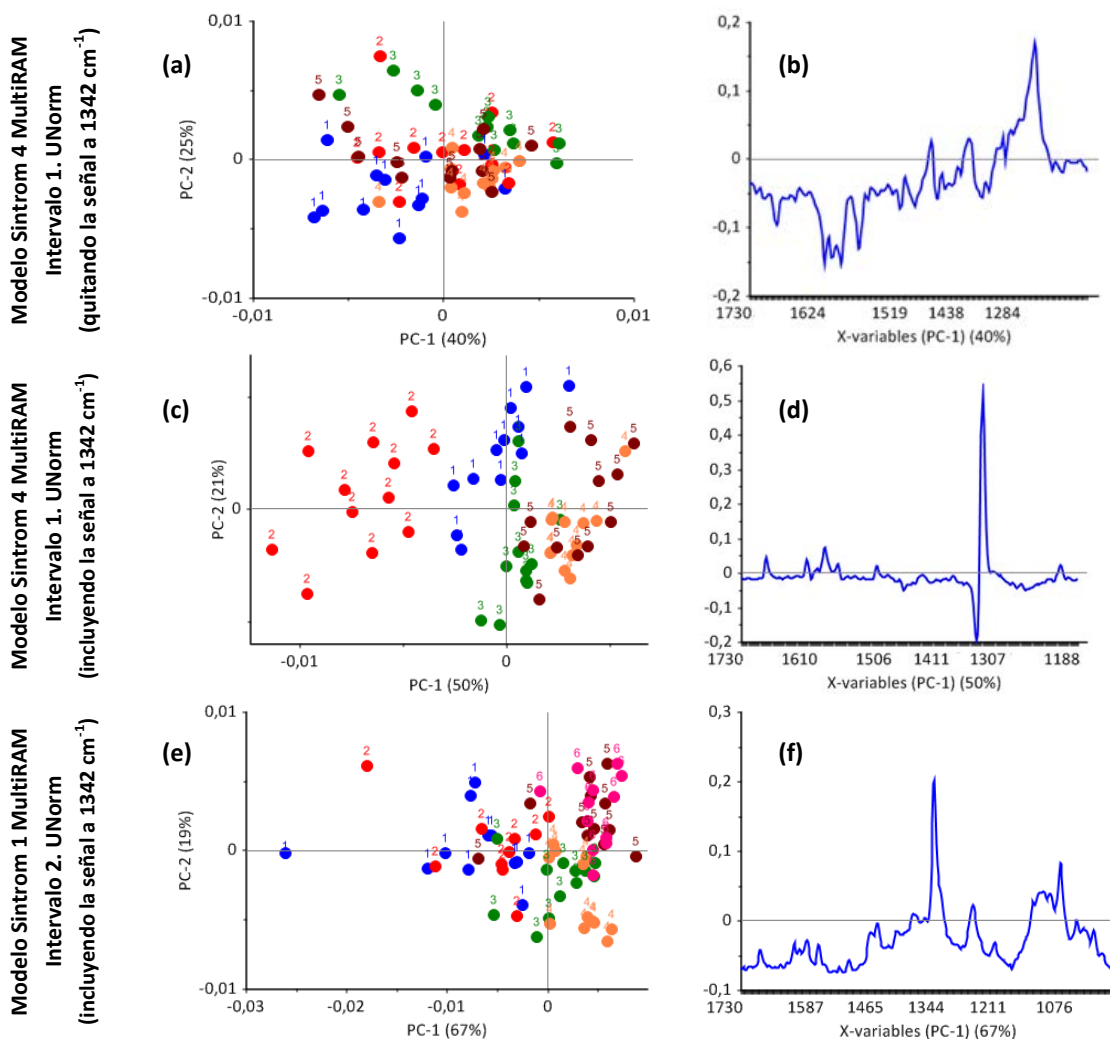


Figura 8.12 PCA's usados en la selección de los lotes de tabletas comerciales que formaron parte del conjunto de muestras de calibración, para la obtención de los modelos en el equipo MultiRAM siguiendo la estrategia de la calibración mixta. (a-b): PCA para el modelo del Sintrom 4 (intervalo 1 quitando la señal a 1342 cm^{-1}). Con fines comparativos en (c-d) se muestra el PCA obtenido cuando no se elimina la señal mencionada anteriormente. (e-f) PCA para el modelo del Sintrom 1 (intervalo 2 completo). Estos PCA se generaron con los espectros pretratados (para ambos productos únicamente se aplicó una normalización a vector unidad en el intervalo correspondiente).

anteriormente, y a continuación se hizo una normalización a vector unidad. De esta forma los lotes 1 y 3 pasaron a formar parte del conjunto de muestras de calibración. El loading del PC1 muestra que hay varios grupos de bandas que son relevantes para el ordenamiento de los lotes, de los cuales se puede destacar el centrado en 1600 cm^{-1} . Este aparece en las tabletas comerciales debido a vibraciones del API (Figura 8.10), y se observa claramente en este loading. Por otro lado, en el PCA de las Figuras 8.12c y d se muestra lo obtenido para el mismo intervalo espectral y mismo pretratamiento sin eliminar la señal centrada en 1342 cm^{-1} . Si bien en el loading del PC1 ligeramente se distingue el grupo de bandas debidas al API, el rasgo espectral con forma de segunda derivada que cruza el eje x a 1342 cm^{-1} es lo más relevante para el ordenamiento de los lotes en el gráfico de scores correspondiente. Por último, el PCA que se muestra en las Figuras 8.12e y f fue el utilizado para la selección de los lotes comerciales que se pasaron al conjunto de muestras de calibración para el modelo del Sintrom 1 en el equipo MultiRAM. En este caso se seleccionó el intervalo 2 (sin quitar la señal centrada a 1342 cm^{-1}) y se aplicó una normalización a vector unidad. En un extremo del modelo está el lote 1, pero en el otro aparecen superpuestos el lote 5 y 6. Como se mostrará posteriormente las predicciones son igual de buenas si se trasladan los lotes 1 y 5, o 1 y 6 al conjunto de calibración; por ahora lo que más se puede resaltar es la forma del loading del PC1, el cual muestra claramente el grupo de señales debidas al API, y el resto de la silueta se parece a una tableta comercial de Sintrom 1.

Se verificó la apariencia del PCA para cada producto, usando los espectros recortados en el intervalo con el cual se obtuvieron los modelos pero sin aplicar ningún pretratamiento espectral, y como se aprecia para el Sintrom 4 en la Figura 8.13 el gráfico de scores refleja claramente el orden en el cual se registraron las tabletas. Durante la medición de las tabletas se fueron intercalando tabletas comerciales intactas y tabletas preparadas en el laboratorio; respecto a las primeras se disponía de 12 tabletas por lote, las cuales se fueron midiendo de tres en tres de los distintos lotes, y siempre poniendo en medio las tabletas obtenidas con la prensa hidráulica. Evidentemente este efecto no es de interés, y desaparece luego de aplicar la normalización a vector unidad (Figuras 8.12 a,b).

Anteriormente se discutió lo difícil que puede ser distinguir las tres presiones con las cuales se compactaron las mezclas sub y sobredosificadas en el laboratorio. A pesar de esto se procedió a hacer un PCA incluyendo ahora todas las tabletas comerciales intactas, y las tabletas preparadas que corresponden a una composición de 100 % el valor nominal. Esto se muestra en la Figura 8.14, distinguiendo en el caso de las tabletas preparadas en el laboratorio, las tres presiones usadas. Como se puede apreciar en todos los casos hay

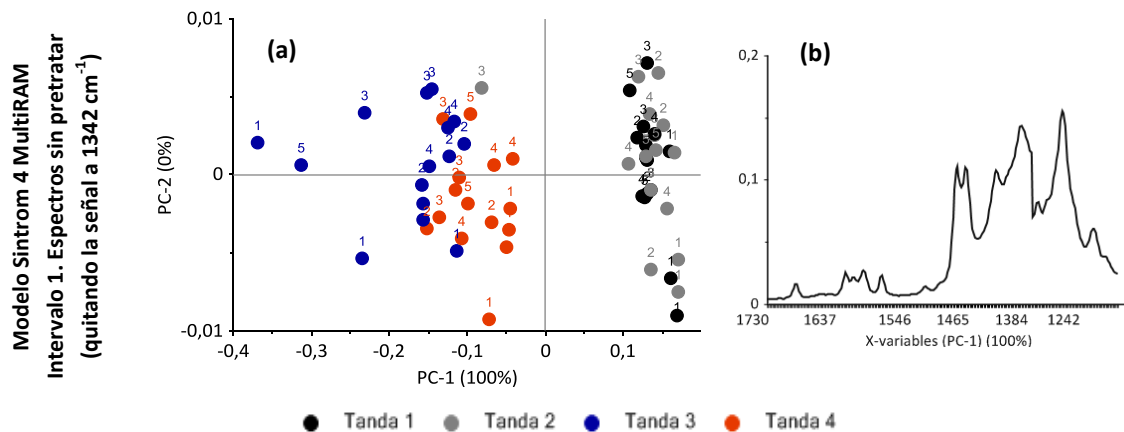
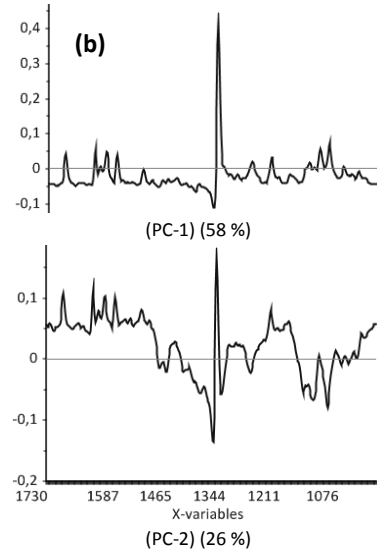
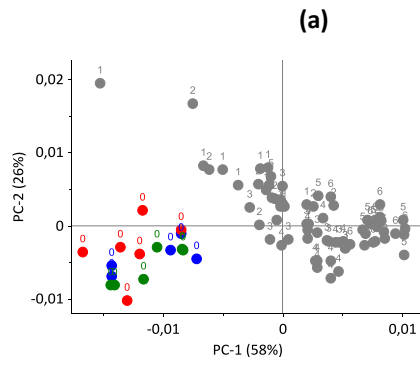


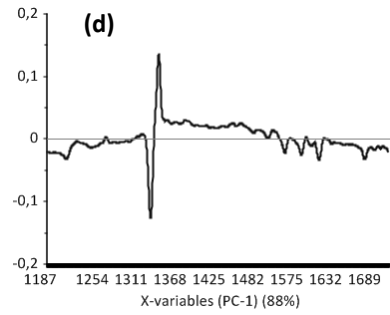
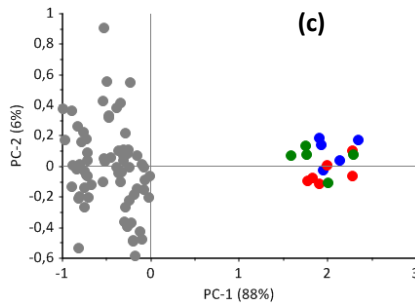
Figura 8.13 PCA de las tabletas comerciales de Sintrom 4, usando los espectros crudos en el intervalo 1 y quitando la señal centrada a 1342 cm^{-1} . Nótese el ordenamiento de los puntos según la tanda en que se registraron las distintas tabletas, indistintamente del lote al que corresponde cada una (que son los números del 1 al 5 mostrados en el gráfico de scores).

evidentes clusters según sean tabletas intactas o preparadas en el laboratorio, por lo que no hay ninguna presión que a través de este tipo de análisis, se acerque a la presión con la cual el fabricante forma los comprimidos en la planta de manufactura. Muy probablemente la causa real de los agrupamientos está en lo distintos que son los equipos usados en la industria para la obtención de comprimidos, y la prensa hidráulica que estaba disponible en el laboratorio. La relevancia de todo esto está en que se hace muy evidente la necesidad de aplicar la estrategia de la calibración mixta con el fin de obtener los modelos de calibración para ambos productos en los distintos instrumentos. En los loadings que se muestran nuevamente destaca la señal con forma de segunda derivada que cruza el eje x a 1342 cm^{-1} en el caso de los PCA obtenidos usando los espectros para los modelos del Sintrom 1.

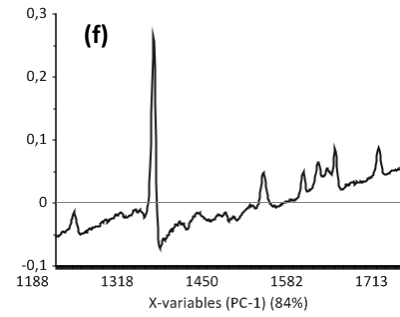
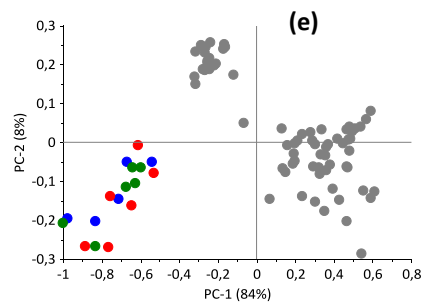
Sintrom 1
Bruker MultiRAM
Intervalo 2. UNorm



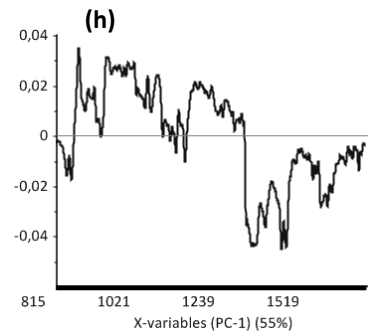
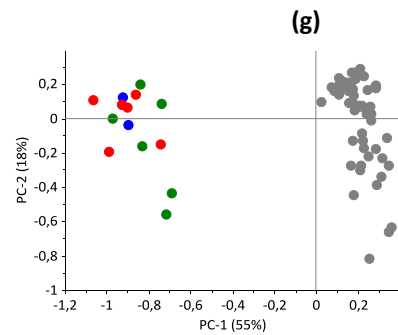
Sintrom 1
Kaiser RXN1 con sonda PhAT de 13 mm para las tabletas preparadas en el lab, 3 mm para las tabletas comerciales intactas
Intervalo 1 2BLC SNV



Sintrom 1
Cobalt TRS100
Intervalo 1 SNV



Sintrom 4
Kaiser RXN1 con sonda PhAT de 13 mm para las tabletas preparadas en el laboratorio y las tabletas comerciales intactas
Intervalo 3 2BLC SNV
(quitando la señal a 1342 cm⁻¹)



...continuación de la página anterior

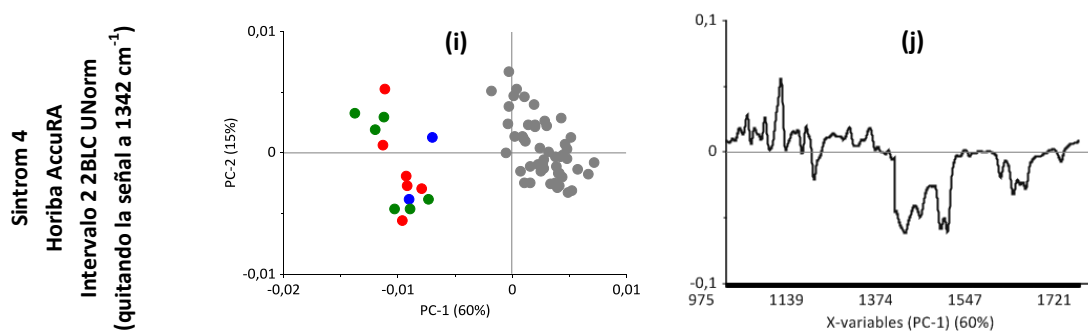


Figura 8.14 PCA's de los espectros registrados con las tabletas preparadas en el laboratorio con una composición 100 % el valor nominal, y las tabletas intactas que se midieron (pertenecientes a 6 o 5 lotes comerciales, Sintrom 1 o Sintrom 4 respectivamente); para esto se usaron los espectros luego de aplicar el pretratamiento necesario para obtener el modelo de calibración en el instrumento específico, y se menciona el intervalo espectral usado según la Figura 8.10. (a-b) Tabletás para el Sintrom 1 en el equipo MultiRAM -intervalo 2, pretratamiento: UNorm. (c-d) Tabletás para el Sintrom 1 en el equipo RamanRXN1, usando la sonda PhAT de 13 mm para las tabletás preparadas en el laboratorio, y la de 3 mm para las tabletás intactas -intervalo 1, pretratamiento: 2BLC + SNV. (e-f) Tabletás para el Sintrom 1 en el equipo TRS100 -intervalo 1, pretratamiento: SNV. (g-h) Tabletás para el Sintrom 4 en el equipo Raman RXN1, usando la sonda PhAT de 13 mm para la irradiación de los dos tipos de tabletás -intervalo 2, pretratamiento: 2BLC + SNV. (i-j) Tabletás para el Sintrom 4 en el equipo AccuRA -intervalo 2, pretratamiento: 2BLC + UNorm.

8.5.1.3 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 usando el equipo MultiRAM

Siguiendo la estrategia de registro de espectros presentada en la Figura 8.9 (tabletas preparadas en el laboratorio irradiadas sólo por una de las caras, tabletas comerciales por ambas caras), se probaron distintos intervalos y combinaciones de pretratamientos espectrales para encontrar los modelos de calibración de cada producto. El modelo seleccionado fue aquel que permitió obtener predicciones de un conjunto de muestras externo (todos los otros lotes que no están en los extremos del PCA), que no difirieran significativamente de los valores correspondientes de referencia, usando para esto una prueba t de datos apareados *. Estos modelos se distinguirán como M#S1 o M#S4 para el Sintrom 1 o Sintrom 4 respectivamente, donde # se refiere al número de modelo que se obtuvo para cada producto en cada instrumento (en algún caso hasta 3 modelos se

* Se determinaron además dos parámetros que por cuestiones de espacio no se presentarán en las tablas: la distribución de los residuales, es decir, por cada lote que se predijo cuantas muestras están por arriba y por debajo de su correspondiente valor de referencia; y se verificó que ninguna de las muestras en su predicción, difiriese en más del 5 % respecto al valor obtenido por HPLC.

obtuvieron, dependiendo de si se registraron las tabletas de distintas maneras, cambiando la óptica de irradiación/recolección de la radiación).

La justificación del porqué las tabletas compradas en la farmacia se irradiaron por las dos caras, mientras que las preparadas en el laboratorio solo por una, radica en el conocimiento previo que se tiene de la manufactura de cada tipo de comprimido: de las primeras no se conoce nada, por lo que para estar del lado seguro se irradiaron por las dos caras; mientras que para las tabletas preparadas en el laboratorio se inició con una mezcla en polvo que contiene la misma composición de los comprimidos comerciales, se hicieron pequeños añadidos de API o lactosa y se compactaron una a una mediante una prensa hidráulica. En este caso se conoce el proceso de obtención del comprimido y por eso se consideró que solo irradiar una de las caras era suficiente, aparte de que las tabletas que se obtienen no poseen ninguna marca en su superficie.

No obstante un supuesto más se puso a prueba: ¿qué pasa si para un modelo de calibración desarrollado de cierta manera (por ejemplo, tabletas comerciales que se incluyen en el modelo irradiadas por las dos caras, tabletas preparadas en el laboratorio sólo por una), en cierto punto se decide que para simplificar trabajo, las tabletas de nuevos lotes que se quieren predecir sólo se irradiarán por una de las caras?. Finalmente, se mostrarán también modelos generados incluyendo sólo los espectros de una de las caras de las tabletas, y haciendo la cuantificación del conjunto externo usando sólo los espectros de esa misma cara. De esta forma se generaron 2 modelos más para cada producto, que se distinguirán como M-AA-S1 y M-CG-S1, y M-AA-S4 y M-CG-S4 según se hayan incluido sólo los espectros de las caras AA o CG para su obtención.

Las Tablas 8.4 y 8.5 muestran los resultados para el Sintrom 1 y Sintrom 4 en el equipo MultiRAM, respectivamente. La mayoría de tablas que se mostrarán para los instrumentos por retrodispersión incluyen 4 bloques, no obstante en la Tabla 8.4 hay dos modelos M1S1, los cuales se generaron al seleccionar los lotes 1 y 6, o 1 y 5 de acuerdo a la distribución de los scores mostrada en la Figura 8.12e. Respecto al Sintrom 1, las predicciones que resultan de ambos modelos (M1S1 y M1S1 extra) no difieren significativamente de los valores de referencia, siendo prácticamente iguales las figuras de mérito del conjunto de muestras de calibración y predicción. El bloque 2 incluye nuevamente los valores de referencia y las predicciones del bloque 1, pero en adición se presentan los resultados cuando únicamente se toman los espectros de una cara para predecir las muestras, usando el mismo PLS (el PLS del bloque 1). Como se dijo anteriormente esto supone que se creó un modelo, pero que en cierto punto se decidió

registrar espectros en solo una de las caras las tabletas que se quieren analizar. No obstante, con esta determinación también se puede verificar qué tan distintas son las caras de la tableta respecto a la distribución del API, asociando una mejor o peor distribución con las predicciones que resultan de cada cara. Como se puede apreciar las predicciones son muy parecidas ya sea que se tomen los espectros de las dos caras o de una sola, y las diferencias no son estadísticamente significativas de acuerdo a un ANOVA de un factor. Por último los bloques 3 y 4 corresponden a nuevos PLS, en los cuales desde la selección de los lotes de tabletas comerciales que formarán parte del conjunto de calibración, y la posterior predicción de las tabletas restantes, se ha hecho incluyendo los espectros de sólo una de las caras. Es por este motivo que los lotes que se trasladaron al conjunto de calibración no son los mismos en cada caso. Nuevamente las predicciones obtenidas no difieren significativamente de los valores de referencia.

Los resultados para el Sintrom 4 con el equipo MultiRAM se muestran en la Tabla 8.5. El modelo del bloque 1 (usando los espectros de ambas caras de las tabletas comerciales para los conjuntos de calibración y predicción) también permite obtener predicciones que no difieren significativamente de los valores de referencia. La selección de los lotes para el conjunto de calibración se hizo con el gráfico de scores de la Figura 8.12a. No obstante en la comparativa del bloque 2 aparece algo muy interesante: para el mismo PLS, usando los espectros de la cara AA las predicciones son significativamente mayores que los valores de referencia, y lo opuesto ocurre si únicamente se toman los espectros de la cara CG (sólo el lote 4 se predice bien). Los parámetros del error de la predicción casi duplican el valor del bloque 1, y el bias calculado muestra claramente la tendencia de las predicciones. Esta diferencia entre las caras se investigó con más detalle, pero por ahora para terminar la explicación de la Tabla 8.5, en los bloques 3 y 4 se presentan PLS generados incluyendo sólo los espectros de una de las caras y las predicciones correspondientes. Ahora las pruebas t muestran que no hay diferencias significativas entre las predicciones y los valores de referencia, aunque sí que se observa un incremento en los parámetros de error respecto al bloque 1.

Se estudió el posible origen de la diferencia entre caras encontrada para las tabletas comerciales de Sintrom 4, la cual no se detectó para las tabletas de Sintrom 1. Para esto se hicieron PCA's usando los espectros individuales registrados en cada tableta, y también calculando un espectro promedio por tableta (siempre con los espectros ya pretratados acorde al modelo del bloque 1 de las Tablas 8.4 y 8.5). Los gráficos de scores obtenidos se muestran en la Figura 8.15. Considerando los espectros individuales, los gráficos que

Tabla 8.5 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo MultiRAM, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 1 (quitando la señal centrada en 1342 cm⁻¹)

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M1S4 Cal L1 y L3 UNorm	3	99.3	0.016	L2	0.706	0.010	0.698	0.018	0.017	2.4
				L4	0.706	0.006	0.712	0.010	0.012	1.7
				L5	0.713	0.007	0.718	0.013	0.011	1.6

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP = 0.014, RSEP = 1.9, Bias (% p/p) = 0.001

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		Raman 2 caras		Raman cara AA		Raman cara CG	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Predicciones usando M1S4 Cal L1 y L3 UNorm	L2	0.706	0.010	0.698	0.018	0.728	0.025	0.667	0.022
	L4	0.706	0.06	0.712	0.010	0.723	0.014	0.701	0.015
	L5	0.713	0.07	0.718	0.013	0.737	0.019	0.699	0.020

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA →: RMSEP = 0.027, RSEP = 3.9, Bias (% p/p) = 0.021

CG →: RMSEP = 0.030, RSEP = 4.2, Bias (% p/p) = -0.019

BLOQUE 3	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-AA-S4 Cal L1 y L3 UNorm	3	98.6	0.023	L2	0.706	0.010	0.717	0.025	0.024	3.4
				L4	0.706	0.006	0.712	0.014	0.014	1.9
				L5	0.713	0.007	0.725	0.020	0.021	2.9

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP = 0.020, RSEP = 2.8, Bias (% p/p) = 0.010

BLOQUE 4	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-CG-S4 Cal L2 y L4 UNorm	3	99.0	0.019	L1	0.707	0.007	0.694	0.018	0.021	3.0
				L3	0.702	0.014	0.705	0.010	0.015	2.2
				L5	0.713	0.007	0.712	0.020	0.019	2.6

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP = 0.018, RSEP = 2.6, Bias (% p/p) = -0.004

corresponden a PCA's con más de 1000 espectros (Sintrom 1) y 1400 espectros (Sintrom 4) muestran un solapamiento importante de los puntos rojos y azules (Figuras 8.15a y b). No obstante al pretratar los espectros individuales y obtener dos espectros promedio por tableta (uno por cara), aparece un agrupamiento de puntos para el caso del Sintrom 4 (Figuras 8.15c y d).

La Figura 8.15d muestra mediante un análisis multivariable que los espectros promedio de cada cara de las tabletas de Sintrom 4 no son exactamente iguales. Una respuesta rápida que se puede dar es relacionar lo observado al menor porcentaje de superficie que

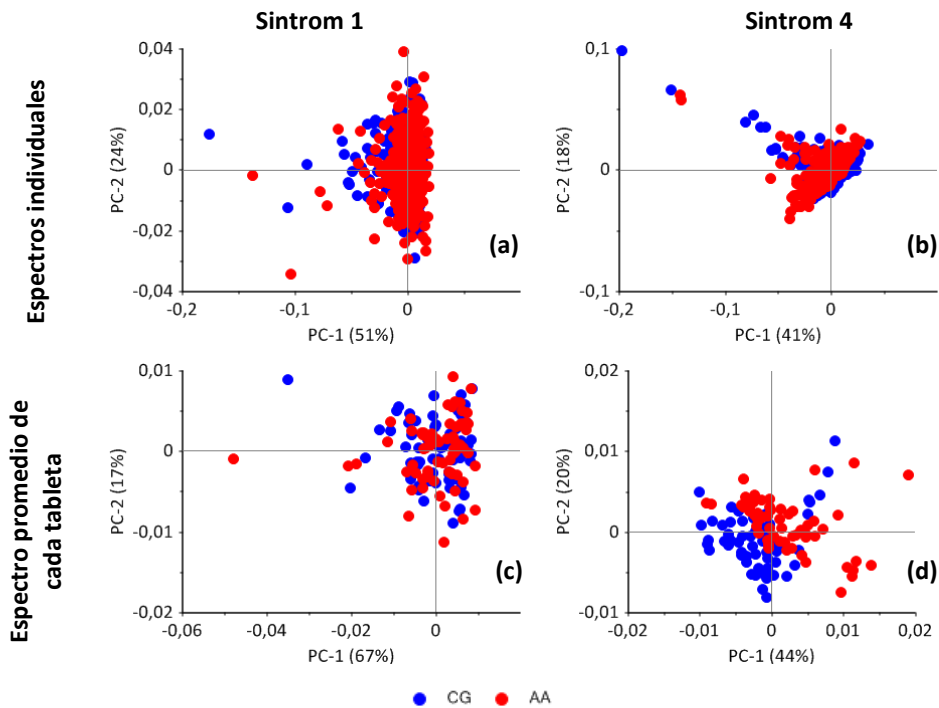


Figura 8.15 Gráficos de scores incluyendo los espectros individuales pretratados según el modelo del Sintrom 1 (a) y Sintrom 4 (b). En (c) y (d) se muestra el gráfico correspondiente cuando se usa el espectro promedio de cada cara para todas las tabletas comerciales.

se cubrió durante la medición de las tabletas comerciales de Sintrom 4 (1.7 %) en comparación a las de Sintrom 1 (6.7 %), no obstante lo cierto es que es un porcentaje muy bajo en ambos casos. Otra opción que posiblemente es menos fácil de detectar, está relacionada con la distribución de las posiciones en las cuales se registraron espectros en las caras de cada tipo de tableta: la distribución fue la misma para el Sintrom 1, pero no para el Sintrom 4, donde en el caso de la cara CG parece que todos los espectros se han registrado en puntos cercanos al borde de la tableta (Figura 8.9). Esto se hizo así por la relativa dificultad que suponía registrar un espectro en el centro de la cara CG, sin medirlo sobre alguna de las letras grabadas. La relevancia de esto radica en que la radiación se dispersa radialmente por debajo de cada posición de irradiación, y entonces si el espectro se registra más al borde de la tableta, teóricamente es más probable que parte de los fotones se pierdan en la interfaz muestra-aire. Se revisaron los valores predichos en cada tableta al seleccionar los espectros de solo una de las caras, y se hizo un análisis adicional con las 10 tabletas para las cuales los valores entre caras diferían más. A continuación los 24 espectros que se registraron en cada tableta se dividieron según la posición en internos y externos (Figura 8.16a). Los PCA's que se hicieron con los 12 espectros de cada cara de estas tabletas no mostraron ningún agrupamiento según la posición en que se midió cada espectro, pero sí que aparecen en los gráficos de scores al incluir los 24 espectros de cada

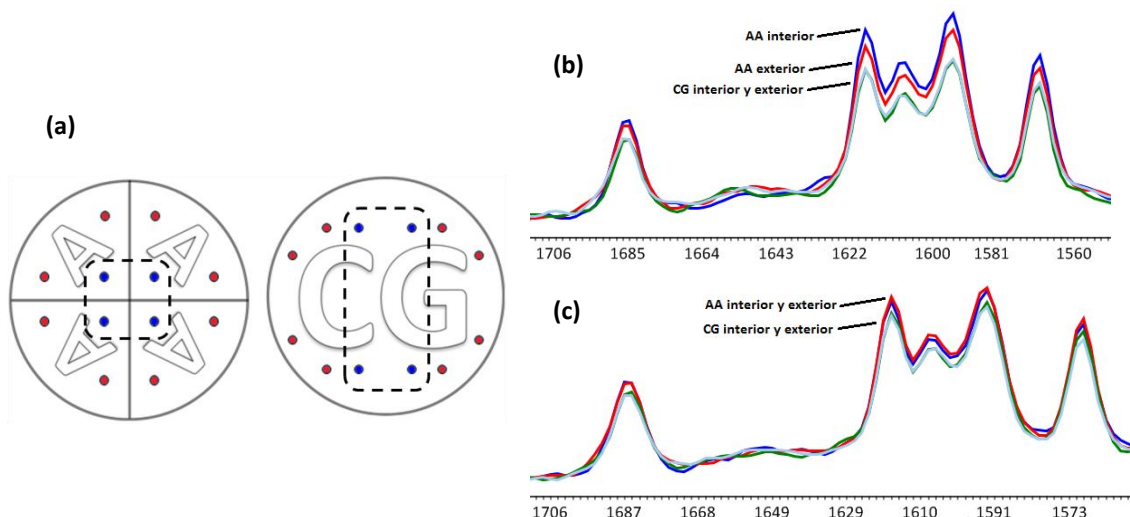


Figura 8.16 (a) Distribución de los puntos de mapeo en las caras de las tabletas de Sintrom 4, según se encuentran más en su interior (puntos azules), o más a los bordes (puntos rojos). (b y c) Superposición de los 4 espectros que resultan de promediar los puntos azules y rojos de cada cara, para dos tabletas del lote 2 que daban una diferencia muy grande en las predicciones. Las diferencias eran del 9 % y 18 % para las tabletas representadas en (b) y (c). Este análisis se hizo con los espectros pretratados.

tableta: los espectros de cada cara aparecen separados en la representación PC2 vs PC1. Se calculó el espectro promedio de los puntos azules y rojos para estas tabletas y se superpusieron, y el resultado se muestra en las Figuras 8.16b y c para dos tabletas del lote 2, recortando en la zona donde aparecen las vibraciones del API. Como se puede apreciar los espectros promedios de las caras AA son más intensos que los espectros de las caras CG, en total concordancia con las predicciones del bloque 2 de la Tabla 8.5. Por tanto, se concluye que en la medición de espectros por ambas caras de las tabletas comerciales de Sintrom 4, se encontró más API en la cara marcada con la cruz que en la cara que tiene grabadas las letras CG.

Como último punto de discusión respecto a las mediciones en el equipo MultiRAM, es interesante considerar la dispersión de los valores predichos cuando se cuantifican los espectros individuales. Para la obtención de los modelos que se han presentado y las predicciones posteriores, los espectros se pretrataron individualmente y luego se obtuvo un espectro por tableta (ya sea preparada en el laboratorio o comprimido comercial). Los modelos de calibración sí o sí se construyen con el espectro promedio de cada tableta perteneciente a este conjunto, esto con el fin de no hacerlo exageradamente complejo; pero las predicciones se pueden hacer con los espectros individuales o usando un espectro por tableta. En ambos casos el resultado es el mismo. Para el Sintrom 1 (contenido nominal, 2 % p/p), los valores extremos que se predijeron en los espectros individuales

fueron 1.6 y 2.4 % p/p, y luego los RSD % para cada tableta (desviación estándar de los 14 puntos/promedio de los 14 puntos *100) estaban entre 1.9 y 7.1 %. Respecto al Sintrom 4 (contenido nominal, 0.7 % p/p), los valores extremos de los espectros individuales fueron 0.53 y 1.18 % p/p, y los RSD % para cada tableta estaban entre 5.4 y 15.7 %. Estos resultados no sorprenden si se toma en cuenta que las tabletas de Sintrom 4 son mucho más grandes, por lo que a pesar de que se tomaron 24 espectros por tableta, el porcentaje de superficie irradiado es mucho menor que en los 14 espectros por tableta de Sintrom 1, aparte de que estas últimas tienen un mayor porcentaje en peso del analito. Aún a pesar de las dispersiones observadas en los valores individuales, el promedio por tableta no difiere significativamente del valor de referencia correspondiente.

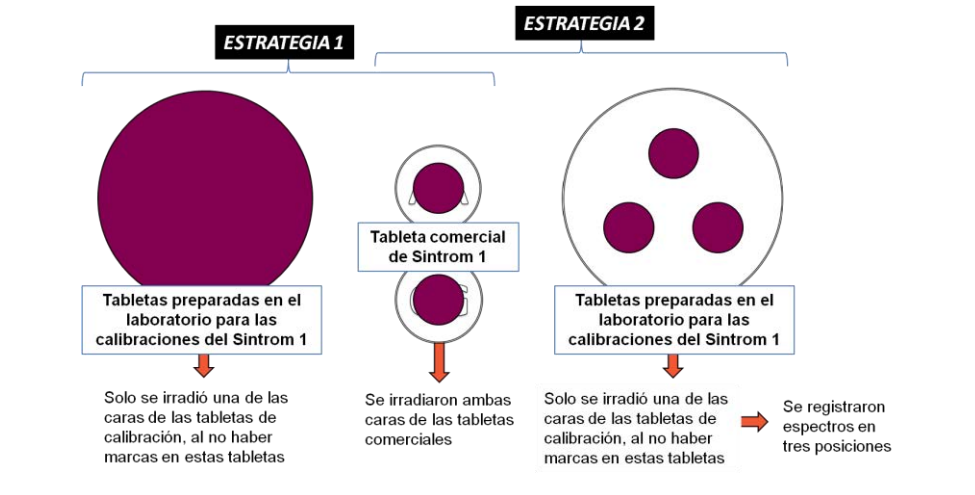
8.5.2 Obtención de los modelos de calibración con el equipo Kaiser Raman RXN1

8.5.2.1 Parámetros para la adquisición de los espectros

Dada la versatilidad en el diámetro de irradiación que es posible al cambiar el lente de la sonda PhAT y considerando las dimensiones de los distintos tipos de tabletas, se desarrollaron modelos para cada producto mediante distintas formas de registro de los espectros. La Figura 8.17 resume las estrategias bajo las cuales se combinaron los espectros registrados en las tabletas preparadas en el laboratorio y las tabletas intactas; en total se probaron dos estrategias para el Sintrom 1 y tres estrategias para el Sintrom 4.

Este instrumento incorpora un láser con una potencia máxima de 400 mW, y para las mediciones realizadas se usó una potencia de 300 mW. Seguidamente hay tres parámetros seleccionables: el tiempo de exposición, el número de acumulaciones y la aplicación opcional del filtro de rayos cósmicos. El tiempo de exposición es el periodo en el cual la sonda está emitiendo la radiación de excitación y simultáneamente recolecta la radiación emitida por la muestra. A mayor tiempo la intensidad de las señales crecen, y como se dijo en la sección 8.3.1 en realidad por cada medición se graban 10 espectros (uno por cada canal de la sonda); luego es posible ver el porcentaje de saturación de cada canal, el cual es más alto entre mayor sea la señal adquirida. El número de acumulaciones es el número de veces que se recolecta un espectro en un periodo de tiempo, los espectros luego se coañaden para producir un espectro final. Se hicieron mediciones preliminares verificando la intensidad de las señales y el porcentaje de saturación de los canales, y se vio que al final lo que importa es el producto 'tiempo de exposición x número de acumulaciones'. Por último en todas las mediciones se aplicó el filtro de rayos cósmicos. Al seleccionar esta

ESTRATEGIAS PARA EL SINTROM 1



ESTRATEGIAS PARA EL SINTROM 4

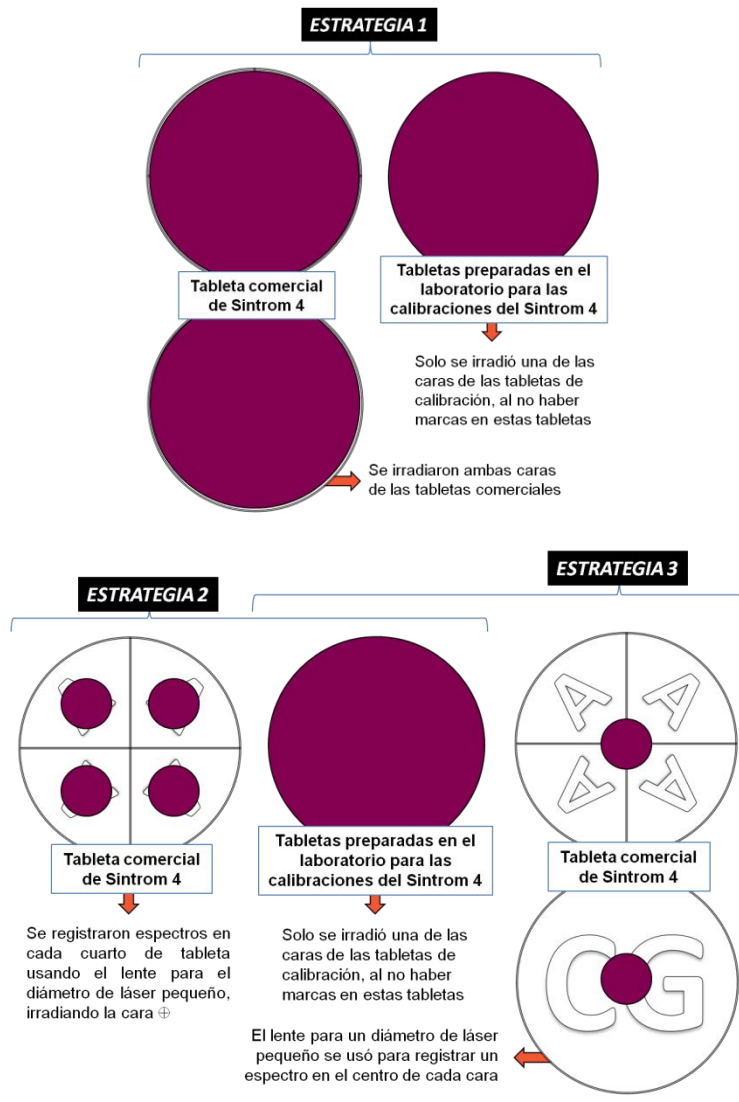


Figura 8.17 Combinaciones que se hicieron de los distintos conjuntos de espectros registrados usando el equipo Raman RXN1 acoplado a una sonda PhAT en las tabletas comerciales, y tabletas preparadas en el laboratorio, para la obtención de los modelos de calibración del Sintrom 1 y Sintrom 4. Colocando distintos lentes a la sonda, se tenían diámetros de irradiación de 13 mm (grande) y 3 mm (pequeño). El diámetro de láser y el tamaño de las tabletas están representados a escala real

opción el tiempo de registro total se duplica: por cada número de acumulaciones que se selecciona, cada una de ellas se contrasta con otra para verificar que no hayan rayos cósmicos en los espectros antes de hacer la co-adición final. Para todas las mediciones realizadas con las tabletas de Sintrom se hizo una adquisición, y los tiempos de adquisición seleccionados para la lente que permite irradiar 3 mm y 13 mm fueron de 60 s y 150 s respectivamente (tiempo real de registro por espectro debido al filtro de rayos cósmicos: 120 s y 300 s). Todos los espectros se adquirieron a una resolución de 0.3 cm^{-1} .

El uso de un tiempo de adquisición distinto según el lente que se ha acoplado a la sonda tiene que ver con la separación entre este elemento y la tableta en cada caso (dato que viene establecido por el fabricante para cada lente): con el fin de irradiar un área circular de diámetro 13 mm hay 40 cm de separación, mientras que para 3 mm la separación es de solo 12.5 cm. La radiación que se reemite de la muestra sale dirigida en múltiples direcciones, y la recolección será distinta según la distancia que haya hasta el elemento de captación; está claro que entre más cerca se encuentre éste, más radiación será recolectada. No obstante, aún con este incremento de tiempo no es posible compensar la diferencia en la intensidad de las señales (y el porcentaje de saturación del detector) al usar un lente distinto. Esto se muestra en las Figuras 8.18a y b con un espectro adquirido en una tableta comercial de Sintrom 1 y uno obtenido de una tableta preparada en el laboratorio que contiene un 100 % el valor nominal del Sintrom 1, esta última irradiada usando los lentes de 13 mm y 3 mm (para las estrategias 1 y 2 según la Figura 8.17, respectivamente). Es evidente que a pesar del incremento en el tiempo de exposición cuando se usó la sonda de 13 mm para irradiar las tabletas grandes, el espectro en este caso es considerablemente menos intenso que cuando se usa la sonda de 3 mm, donde la distancia de la tableta al elemento de recolección es mucho menor. No obstante luego de recortar los espectros, corregir la línea base y aplicar una normalización (en este caso un SNV), los espectros se superponen. Y esto es muy bueno en la obtención de los modelos multivariados generados con las distintas colecciones de espectros.

Es posible hacer alguna suposición respecto al volumen muestreado con cada lente al comparar el porcentaje de saturación de los canales que están más al centro de la sonda, cuando se comparan los datos para las tabletas comerciales de Sintrom 4, y las tabletas preparadas en el laboratorio con la misma composición que el valor nominal. Esto no se puede hacer para el Sintrom 1 dada la diferencia tan grande en los diámetros de cada tipo de tableta, pero sí para el Sintrom 4, donde las tabletas mencionadas anteriormente tienen prácticamente el mismo diámetro pero distinto espesor. Y curiosamente usando la lente que permite una irradiación de 13 mm, el porcentaje de saturación con las tabletas

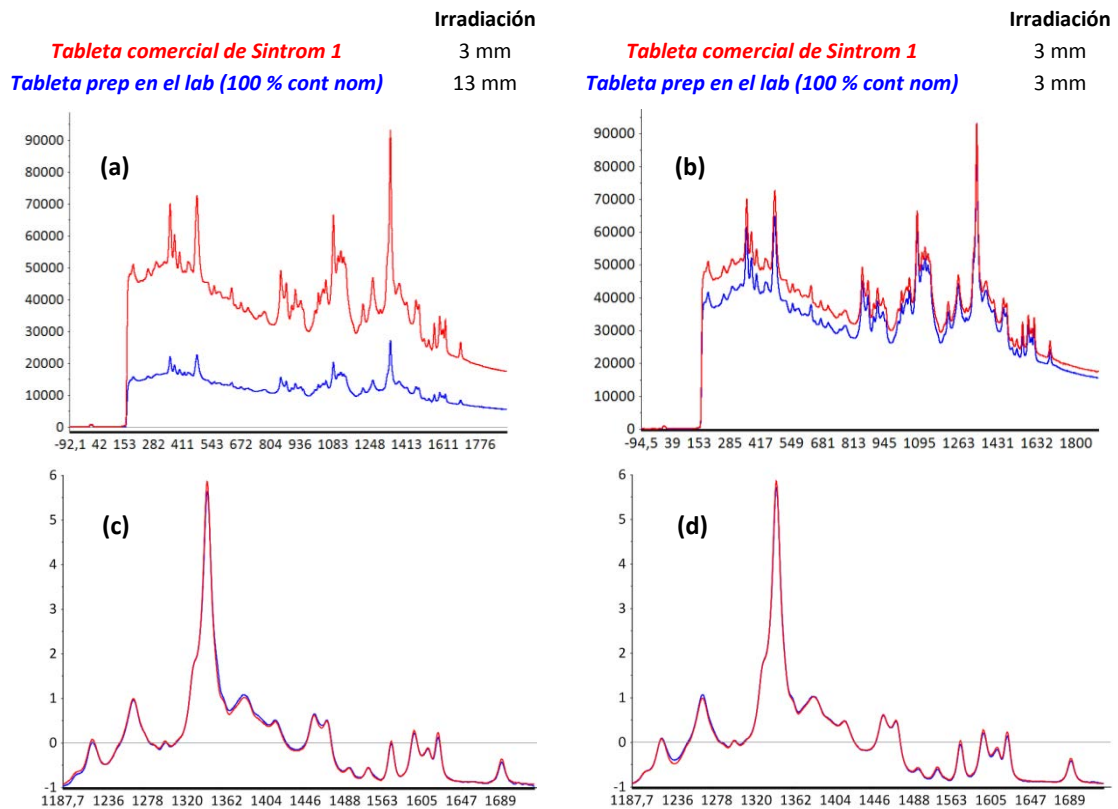


Figura 8.18 Comparación de los espectros crudos adquiridos para tabletas de la misma composición pero dimensiones diferentes, midiendo en un caso mediante lentes distintos para maximizar el área irradiada en cada tableta tipo de tableta (a), o midiendo ambos tipos de tableta con el mismo diámetro de irradiación (b). En (c) y (d) se representan los espectros recortados en el intervalo 1 luego de aplicar las correcciones de línea base del Unscramber y un SNV.

comerciales en los canales que están más al centro estaba entre el 12 y 13 %, mientras que para las tabletas preparadas en el laboratorio rondaba el 8-9 %. Estas últimas tabletas son la mitad de gruesas que las tabletas comerciales, y esta diferencia de espesor podría ser la causa de la menor saturación de los canales centrales de la sonda.

8.5.2.2 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 usando el equipo Raman RXN1 acoplado a una sonda PhAT

Las Tablas 8.6 y 8.7 muestran las calibraciones obtenidas para el Sintrom 1, siguiendo las Estrategias 1 y 2 según se indicó en la Figura 8.18, respectivamente. Considerando la medición de cada tipo de tableta usando el lente maximiza el área irradiada para cada tamaño (Estrategia 1), los resultados son muy similares a los reportados en la Tabla 8.4 para estas tabletas en el equipo MultiRAM. El modelo generado usando los espectros de las

Tabla 8.6 Figuras de mérito de los modelos de calibración obtenidos al usar la Estrategia 1 para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo Raman RXN1, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 1

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					Prom	SD	Prom	SD		
M1S1 Cal L2 y L6 2BLC SNV	2	98.1	0.047	L1	1.95	0.01	1.97	0.03	0.030	1.5
				L3	1.94	0.01	1.95	0.01	0.017	0.9
				L4	1.94	0.01	1.91	0.03	0.042	2.2
				L5	1.95	0.01	1.95	0.02	0.026	1.3

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.030, RSEP (%)= 1.5, Bias= -0.001

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		Raman 2 caras		Raman cara AA		Raman cara CG	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Predicciones usando M1S1 Cal L2 y L6 2BLC SNV	L1	1.95	0.01	1.97	0.03	1.96	0.04	1.97	0.03
	L3	1.94	0.01	1.95	0.01	1.94	0.02	1.95	0.04
	L4	1.94	0.01	1.91	0.03	1.92	0.04	1.90	0.06
	L5	1.95	0.01	1.95	0.02	1.94	0.04	1.96	0.03

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA→: RMSEP (% p/p)= 0.036, RSEP (%)= 1.8, Bias= -0.004

CG→: RMSEP (% p/p)= 0.045, RSEP (%)= 2.3, Bias= 0.001

BLOQUE 3	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					Prom	SD	Prom	SD		
M-AA-S1 Cal L2 y L6 2BLC SNV	2	98.1	0.048	L1	1.95	0.01	1.97	0.04	0.041	2.1
				L3	1.94	0.01	1.95	0.02	0.018	0.9
				L4	1.94	0.01	1.93	0.04	0.036	1.8
				L5	1.95	0.01	1.95	0.04	0.039	2.0

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.035, RSEP (%)= 1.8, Bias= 0.003

BLOQUE 4	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					Prom	SD	Prom	SD		
M-CG-S1 Cal L2 y L6 2BLC SNV	2	98.1	0.048	L1	1.95	0.01	1.97	0.03	0.031	1.6
				L3	1.94	0.01	1.94	0.04	0.040	2.1
				L4	1.94	0.01	1.90	0.06	0.069	3.5
				L5	1.95	0.01	1.96	0.03	0.033	1.7

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.045, RSEP (%)= 2.3, Bias= -0.003

dos caras de las tabletas comerciales (bloque 1), permite obtener predicciones que no difieren significativamente de los valores de referencia. Eso sí, estas predicciones se generaron usando sólo dos factores en el modelo, mientras que para el modelo con el equipo MultiRAM se usaron 4 factores. La magnitud del error de calibración es muy

similar en ambos casos. Por otro lado los resultados que se muestran en el bloque 2 también son muy similares a lo visto en el MultiRAM: las predicciones varían poco cuando se usa un mismo modelo, y se cuantifican las tabletas del conjunto de predicción usando sólo los espectros de una u otra cara. Finalmente en los bloques 3 y 4 se muestran los resultados para nuevos modelos, generados con los espectros de sólo una de las caras de las tabletas, y prediciendo sólo con los espectros de esa misma cara. Al igual que con el equipo MultiRAM, estos modelos también predicen valores que no difieren significativamente de los valores obtenidos con el HPLC.

Los resultados para la Estrategia 2 se muestran en la Tabla 8.7. Debe mencionarse que para el registro de las 3 posiciones en las tabletas preparadas en el laboratorio, estas fueron rotadas 120 grados a mano, en algo parecido a las mediciones por mapeo con el equipo MultiRAM, pero sin disponer de un módulo que permita el desplazamiento de las tabletas. Para esta Estrategia solo se muestran los resultados correspondientes al bloque 1, y nuevamente las predicciones obtenidas no difieren significativamente de los valores de referencia. Eso sí, para obtener estas predicciones se incluyeron 4 factores en el modelo de calibración, a diferencia del modelo generado al irradiar toda la superficie de las tabletas preparadas en el laboratorio, que únicamente requería 2 factores. Esta diferencia podría deberse a la disminución considerable en el área irradiada: con las tres posiciones usando la lente para una iluminación de diámetro 3 mm se cubrió un 16 % de la superficie de las tabletas preparadas en el laboratorio, mientras que con la lente para un diámetro de irradiación de 13 mm se cubrió un 94 % de la superficie de la tableta. A modo de comparación, en el equipo MultiRAM con las 7 posiciones en que se adquirieron espectros únicamente se irradió un 6.7 % de la superficie de estas tabletas.

Tabla 8.7 Figuras de mérito de los modelos de calibración obtenidos al usar la Estrategia 2 para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo Raman RXN1, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 2

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M2S1 Cal L3 y L6 2DSG Norm	4	97.8	0.048	L1	1.95	0.01	1.96	0.02	0.017	0.9
				L2	1.94	0.01	1.95	0.02	0.022	1.1
				L4	1.94	0.01	1.93	0.03	0.023	1.2
				L5	1.95	0.01	1.97	0.02	0.027	1.4

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.022, RSEP (%)= 1.2, Bias= 0.007

8.5.2.3 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 4 usando el equipo Raman RXN1 acoplado a una sonda PhAT

En el caso de los comprimidos de Sintrom 4 se generaron modelos siguiendo tres estrategias (Figura 8.17). Los resultados para cada una se muestran en las Tablas 8.8, 8.9 y 8.10. Considerando la irradiación de todas las tabletas con el haz de 13 mm los resultados son muy buenos (Tabla 8.8): las predicciones del bloque 1 de la Tabla 8.8 no difieren significativamente de los valores de referencia; y respecto al modelo, llama la atención que este contempla el mismo número de factores que los modelos del equipo MultiRAM (Tabla

Tabla 8.8 Figuras de mérito de los modelos de calibración obtenidos al usar la Estrategia 1 para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo Raman RXN1, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 3

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M1S4 Cal L2 y L4 2BLC SNV	3	99.6	0.012	L1	0.707	0.007	0.709	0.009	0.005	0.8
				L3	0.702	0.014	0.699	0.003	0.015	2.1
				L5	0.713	0.007	0.711	0.004	0.005	0.8

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.010, RSEP (%)= 1.4, Bias= -0.001

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		Raman 2 caras		Raman cara AA		Raman cara CG	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Predicciones usando M1S4 Cal L2 y L4 2BLC SNV	L1	0.707	0.007	0.709	0.009	0.714	0.009	0.703	0.009
	L3	0.702	0.014	0.699	0.003	0.700	0.005	0.699	0.005
	L5	0.713	0.007	0.711	0.004	0.716	0.004	0.706	0.006

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA→: RMSEP (% p/p)= 0.011, RSEP (%)= 1.5, Bias= 0.003

CG→: RMSEP (% p/p)= 0.011, RSEP (%)= 1.6, Bias= -0.005

BLOQUE 3	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-AA-S4 Cal L2 y L4 2BLC SNV	3	99.6	0.012	L1	0.707	0.007	0.708	0.009	0.005	0.7
				L3	0.702	0.014	0.693	0.005	0.017	2.5
				L5	0.713	0.007	0.709	0.004	0.007	0.9

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.011, RSEP (%)= 1.6, Bias= -0.004

BLOQUE 4	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-CG-S4 Cal L2 y L4 2 BLC SNV	3	99.5	0.013	L1	0.707	0.007	0.710	0.009	0.007	1.0
				L3	0.702	0.014	0.706	0.005	0.016	2.2
				L5	0.713	0.007	0.714	0.005	0.006	0.9

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.010, RSEP (%)= 1.5, Bias= 0.003

8.5), a pesar de que el área cubierta en las tabletas comerciales con la sonda PhAT es del 97 %, mientras que para el FT-Raman con las 12 posiciones medidas únicamente se abarcó un 1.7 % de la superficie. La varianza explicada en Y es ligeramente mayor y el RMSEC ligeramente menor para los modelos con el equipo Raman RXN1, pero la diferencia es mínima.

En el bloque 2 se muestran las predicciones para el modelo del bloque 1, cuando se usan sólo los espectros de una de las caras. A diferencia de lo visto para el equipo MultiRAM en el bloque 2 de la Tabla 8.5, con la sonda PhAT de 13 mm si bien los promedios de las predicciones de los 3 lotes con los espectros de la cara AA son mayores que cuando se usan los espectros de las dos caras, y la cara CG da lo opuesto, las diferencias son significativas sólo para el lote 1 cuando se usa la cara AA, y para el lote 5 cuando se usa la cara CG. La magnitud del bias de estas predicciones es comparativamente mayor que cuando las predicciones se hacen usando los espectros de las dos caras. No obstante debe destacarse que los lotes predichos con los modelos de cada instrumento son distintos (comparar los bloques número 2 de las Tablas 8.5 y 8.8); eso sí la pauta siempre fue seleccionar los dos lotes más alejados en la representación del gráfico de scores PC2 vs PC1 usando los espectros recortados en alguno de los tres intervalos espectrales probados, y luego de aplicar una combinación específica de pretratamientos. Con el fin de comparar la Figura 8.15 (PCA's de los espectros registrados en cada cara de las tabletas comerciales de Sintrom 4 con el equipo MultiRAM), en la Figura 8.19 se presenta el PCA obtenido al incluir los espectros de ambas caras de los 5 lotes de tabletas comerciales adquiridos con la sonda PhAT de 13 mm, luego de aplicar el pretratamiento espectral usado para el modelo de calibración. Como se puede apreciar, el gráfico de scores del PC2 vs PC1 no muestra ningún agrupamiento a diferencia de lo visto para el equipo MultiRAM.

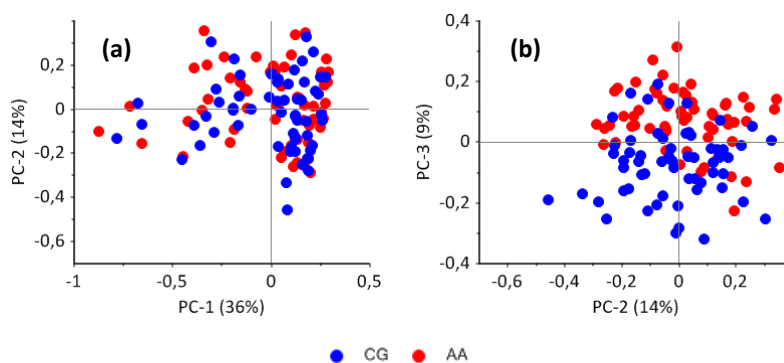


Figura 8.19 Gráficos de scores incluyendo los espectros pretratados según el modelo del Sintrom Sintrom 4 (espectros adquiridos con el equipo Raman RXN1 usando el lente que permite una irradiación de 13 mm). (a) PC2 vs PC1, (b) PC3 vs PC2.

Debe representarse el PC3 vs PC2 para notar la separación de los espectros según la cara de la cual se adquirieron, con lo cual al hacer la irradiación de las tabletas con una iluminación que cubre prácticamente toda la superficie de la tableta, la diferencia entre caras se detecta menos que en el caso de que los espectros se registren usando un láser de diámetro mucho más pequeño.

Las Tablas 8.9 y 8.10 muestran los resultados para la irradiación de las tabletas comerciales usando el lente que proporciona una iluminación de 3 mm (Estrategias 2 y 3 de la Figura 8.17). Debe resaltarse que en el caso de la irradiación de los 4 cuartos de las tabletas, esto únicamente se hizo adquiriendo espectros de la cara AA, mediante la rotación a mano de los comprimidos cada 90 grados (porcentaje de área irradiada, 20.8

Tabla 8.9 Figuras de mérito de los modelos de calibración obtenidos al usar la Estrategia 2 para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo Raman RXN1, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 3

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M3S4 Cal L1 y L3 2 BLC UNorm	3	99.2	0.017	L2	0.706	0.010	0.707	0.013	0.008	1.1
				L4	0.706	0.006	0.709	0.007	0.008	1.2
				L5	0.713	0.007	0.717	0.006	0.008	1.1

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.008, RSEP (%)= 1.1, Bias= 0.003

Tabla 8.10 Figuras de mérito de los modelos de calibración obtenidos al usar la Estrategia 3 para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo Raman RXN1, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 3

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M3S4 Cal L2 y L4 2BLC.SNV	3	99.4	0.014	L1	0.707	0.007	0.710	0.021	0.017	2.4
				L3	0.702	0.014	0.702	0.004	0.015	2.1
				L5	0.713	0.007	0.710	0.009	0.010	1.4

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.010, RSEP (%)= 1.4, Bias= -0.0009

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		Raman 2 caras		Raman cara AA		Raman cara CG	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Predicciones usando M3S4 Cal L2 y L4 2BLC.SNV	L1	0.707	0.007	0.710	0.021	0.719	0.028	0.701	0.017
	L3	0.702	0.014	0.702	0.004	0.705	0.006	0.699	0.006
	L5	0.713	0.007	0.710	0.009	0.722	0.012	0.698	0.010

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA→: RMSEP (% p/p)= 0.021, RSEP (%)= 2.9, Bias= 0.008
CG→: RMSEP (% p/p)= 0.015, RSEP (%)= 2.2, Bias= -0.008

%), mientras que cuando se adquirió un único espectro con este lente, se irradiaron las dos caras de las tabletas comerciales (porcentaje de área irradiada en cada cara, 5.2 %). Las figuras de mérito de los dos modelos son las mismas, y los valores predichos no difieren significativamente de los valores de referencia. No obstante algo que se puede destacar es que los bias son más bajos cuando los modelos y las predicciones se generan usando los espectros adquiridos en ambas caras de las tabletas (comparar los bloques 1 de las Tablas 8.8 y 8.10, con los demás bloques de estas dos tablas).

Respecto a las Estrategias 2 y 3 se pueden hacer comentarios sobre las particularidades de estas mediciones. En el caso de la irradiación de todos los cuartos de las tabletas comerciales de Sintrom 4 (Estrategia 2), existe la posibilidad de que los espectros adquiridos contengan información generada de volúmenes de material que se hayan muestreado más de una vez: el diámetro de irradiación son 3 mm, pero en el interior de la muestra los fotones se desplazan radialmente, existiendo cierta posibilidad de que el espectro que uno esperaría que contenga información de sólo un cuarto, en realidad también tenga información de los cuartos de tableta vecinos. Al respecto se puede decir que para la determinación del contenido de API en la tableta completa esto no representa un problema, pero sí que lo sería en el caso de que se quiera determinar el contenido de API en los cuartos de tableta que se pueden obtener luego de su división. Esto es algo que se investigó y los resultados se mostrarán en el Capítulo siguiente.

Por otro lado, se ha incluido un bloque 2 para la Estrategia 3 con el fin de determinar qué tan sensible es la irradiación con un haz de 3 mm respecto a las diferencias entre caras. Ya se vio que los 12 puntos muestreados con el MultiRAM son muy sensibles a esto, mientras que al irradiar prácticamente toda la superficie de la tableta esto prácticamente no se detecta. Curiosamente los resultados que se muestran en la Tabla 8.10, se encuentran en medio de lo visto en los bloques 2 de las Tablas 8.5 y 8.8: con la cara AA siempre se predice por encima, y con la cara CG por debajo en los 3 lotes que se cuantifican. Las diferencias son numéricamente mayores que en el caso de una irradiación con un haz de 13 mm, pero son estadísticamente significativas únicamente para los valores del lote 5. La importancia de la Estrategia 3 (irradiación con un haz de 3 mm en las tabletas comerciales) está en que es muy similar a la irradiación hecha en los instrumentos por transmisión (irradiación de 4.3 mm, y 4 mm para los equipos marca Horiba y Cobalt respectivamente, adquiriendo un espectro en el centro de estas tabletas). Los resultados obtenidos para los espectrómetros Raman de transmisión se presentan a continuación.

8.5.3 Obtención de los modelos de calibración con el equipo Horiba AccuRA

8.5.3.1 Parámetros para la adquisición de los espectros

Dado que en las mediciones por transmisión, la obtención del espectro involucra las dos caras de las tabletas (una es irradiada, y por la cara opuesta se recoge la radiación de interés), en la Figura 8.20 se representan a escala real las tres dimensiones de las tabletas y el diámetro de irradiación. Aquí se quiere resaltar que las tabletas preparadas en el laboratorio para el Sintrom 1, tienen un espesor similar a las tabletas comerciales de Sintrom 1, mientras que para el Sintrom 4 los dos tipos de tableta se asemejan en su diámetro, pero el espesor de las preparadas en el laboratorio es la mitad del grosor de las tabletas comerciales. No obstante a pesar de estas diferencias, con los dos instrumentos por transmisión fue posible construir modelos que predijeran sin diferencia significativa respecto a los valores de referencia.

Para las mediciones por transmisión se pudo haber considerado la obtención de espectros irradiando cada una de las caras, volteando las tabletas de la misma forma que se hizo para las medidas por retrodispersión. Sin embargo en base a lo reportado en la literatura

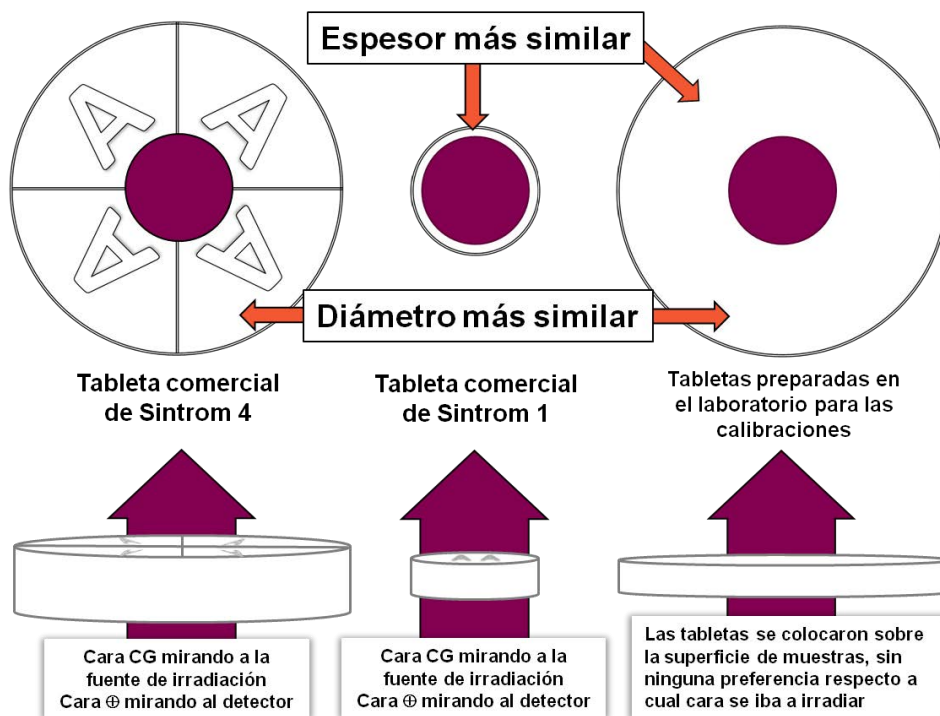


Figura 8.20 Representación a escala real de los distintos tipos de tableta para los cuales se generaron modelos de calibración, y el diámetro de irradiación con el equipo Horiba AccuRA (4.3 mm). La flecha únicamente indica el sentido de irradiación, evidentemente la radiación sale por la cara opuesta a la de irradiación en múltiples direcciones.

respecto a la mucho menor dependencia de los espectros dependiendo de la cara irradiada cuando se registra por esta geometría, y también en base a los trabajos previos realizados por los científicos de AstraZeneca en Raman por transmisión, se decidió que se registraría un único espectro por tableta. No obstante, este único espectro no se registró de la misma forma en los dos instrumentos por transmisión: para el AccuRA (Horiba) las tabletas comerciales se colocaron siempre con la cara CG mirando a la fuente de irradiación, y recogiendo la radiación por la cara AA en el caso del Sintrom 1, y por la cara marcada con una cruz para el Sintrom 4, mientras que para el equipo TRS100 (Cobalt) las tabletas comerciales se colocaron aleatoriamente respecto a la cara irradiada en la platina de muestras.

Respecto a los parámetros de adquisición de los espectros en los instrumentos por transmisión, son configurables los mismos que se mencionaron anteriormente para el equipo Kaiser: potencia de láser, tiempo de exposición y número de acumulaciones, no obstante los valores óptimos se determinan de una forma distinta. Los dos instrumentos de Raman por transmisión incorporan un chip CCD que se satura al llegar a 65000 cuentas (estas son las unidades en las que se determinan las intensidades en el eje 'y' de los espectros), y entonces debe jugarse con los 3 parámetros mencionados antes para no sobrepasar este valor, con el fin de no tener bandas cuya parte superior se vea cuadrada. Incluso los fabricantes recomiendan no registrar las bandas de interés hasta antes del valor de saturación: en el caso del equipo TRS100 el fabricante menciona que debe trabajarse por debajo de las 40000 cuentas, ya que la señal no es lineal por encima de este valor. No es indispensable tener todo el espectro con las bandas completas, es decir, si a la hora de registrar los espectros se sabe que las bandas de interés llegan hasta cierto desplazamiento Raman, se pueden buscar las condiciones para las cuales se maximice el pico más intenso de interés, y de hecho para las mediciones realizadas las condiciones óptimas se determinaron midiendo las intensidades de las bandas a 1342 cm^{-1} y 1086 cm^{-1} (ver Figura 8.10). Luego debe seleccionarse uno de los 3 tipos de tabletas que se estudiaron para las mediciones de optimización. Entre más delgadas sean las tabletas más luz llega al detector, por lo que el caso más propenso a saturarlo corresponde a las tabletas preparadas en el laboratorio (Figura 8.8). Luego de entre las 10 posibles tabletas a usar (5 niveles de concentración para el Sintrom 1 y lo mismo para el Sintrom 4), se evaluó cuál de ellas era más propensa a dar espectros con una mayor pendiente, dado que con ésta es más fácil alcanzar el límite de 40000 cuentas. Por este motivo se seleccionó la tableta que contiene un 70 % del valor nominal del Sintrom 4 para la optimización de los parámetros. En general la fluorescencia se asocia a los excipientes y las tabletas de esta composición contienen un 99.5 % p/p de compuestos que no son el API.

La potencia máxima con la que se puede irradiar es de 500 mW y 1000 mW para los equipos AccuRA y TRS100 respectivamente; con el primero habitualmente en AstraZeneca habían trabajado a 300 mW, mientras que con el TRS100 finalmente se decidió irradiar con la potencia máxima. Esta diferencia se tradujo en una disminución considerable en el tiempo de adquisición total por espectro en el equipo marca Cobalt. El número de acumulaciones no modifica el número de cuentas de las bandas espectrales, únicamente sirve para mejorar la *SNR* de los espectros, por lo que antes de optimizar este número se define el tiempo de exposición, el cual fue de 20 s para el equipo AccuRA, y 2 s para el TRS100; y al hacer 15 acumulaciones en el primero, y 64 en el segundo, el tiempo total de registro fue de 5 min, y un poco más de 2 min por espectro para los equipos AccuRA y TRS100 respectivamente. En cuanto al intervalo espectral registrado en cada espectrómetro, en el instrumento Horiba los espectros se adquieren entre 2240 y 135 cm^{-1} , mientras que con el Cobalt es un poco más amplio, 2300-50 cm^{-1} , y la resolución de los espectros con los cuales se trabaja (que no es configurable al igual que con el equipo Kaiser) es de 0.3 cm^{-1} y 1 cm^{-1} respectivamente. Finalmente respecto a la eliminación de los rayos cósmicos, en ambos instrumentos esto se hace automáticamente cuando se selecciona un número superior a 1 acumulación en el equipo Horiba, y 3 en el caso del Cobalt.

En la Figura 8.21 se muestra el efecto de un pretratamiento espectral sobre las intensidades de los espectros registrados en tabletas de distintas dimensiones pero con la misma composición (tabletas preparadas en el laboratorio de composición 100 % el valor nominal, y la tableta comercial correspondiente). Efectivamente las tabletas preparadas en el laboratorio resultan en espectros crudos más intensos en comparación a las tabletas comerciales, pero estos se superponen luego de la corrección de línea base y normalización.

8.5.3.2 Comparativa de las mediciones en modo retrodispersión (instrumento Kaiser) y transmisión (instrumento Horiba), al irradiar el centro, o cada cuarto de tableta de Sintrom 4

A diferencia de las mediciones hechas con el equipo marca Kaiser, donde el lente que permite una iluminación de 3 mm se usó para la obtención de espectros en el centro de las tabletas y en cada cuarto de tableta de Sintrom 4, en los instrumentos por transmisión los 5 lotes de Sintrom 4 únicamente se midieron registrando un espectro en el centro de cada tableta. No obstante, como parte de un conjunto de pruebas preliminares con el equipo

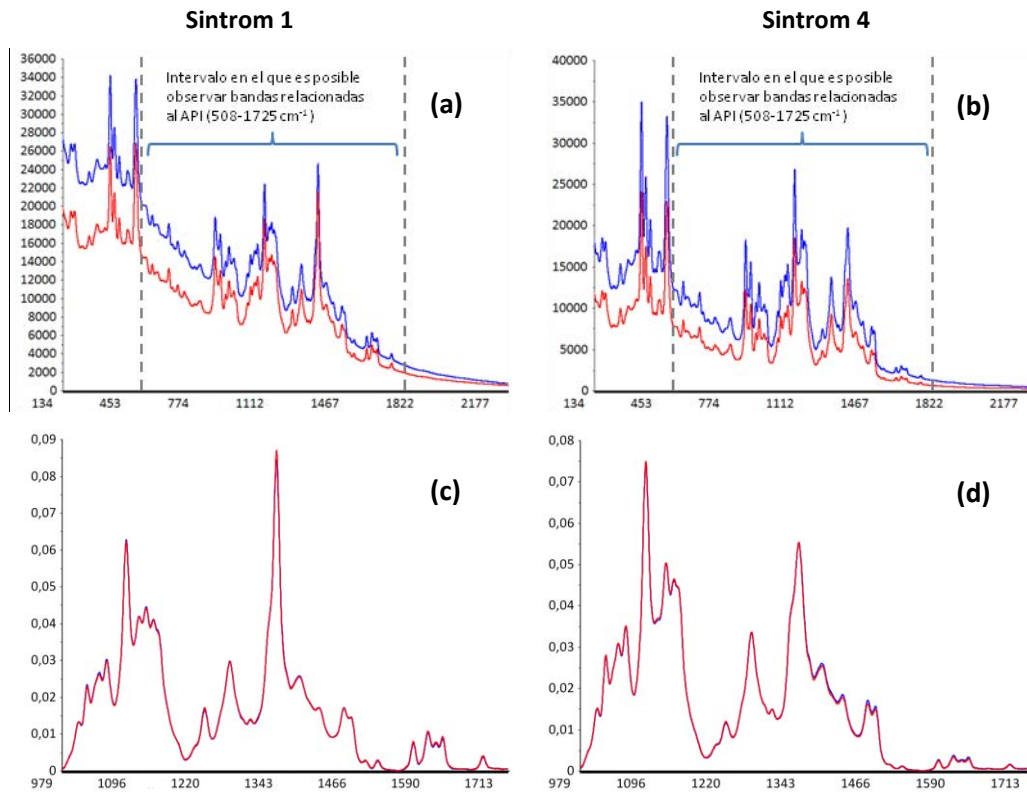


Figura 8.21 Espectros Raman de una tableta comercial (en rojo), y una tableta de calibración correspondiente al 100 % del valor nominal (en azul) de: (a) y (c) Sintrom 1, (b) y (d) Sintrom 4, antes y después de aplicar las correcciones de línea base del Unscrambler y normalización a vector unidad, registrados con el equipo Horiba AccuRA.

AccuRA se tomaron 3 tabletas del lote 1 y se registraron espectros en cada cuarto de tableta (irradiando la cara CG), y además espectros en el centro irradiando las dos caras (en total 6 espectros por tableta). Se dispone de este mismo conjunto de espectros para estas 3 tabletas con el equipo Raman RXN1, y en la Figura 8.22 se compara la evolución de los espectros promedios de los 12 cuartos, las 3 caras AA, y las 3 caras CG con los pretratamientos espectrales (para los modelos del Sintrom 4 en ambos instrumentos se aplicaron las correcciones de línea base del Unscrambler y la normalización a vector unidad como pretratamientos espectrales, usando los intervalos 2 y 3 para los equipos Horiba y Kaiser respectivamente, eso sí quitando siempre la señal centrada en 1342 cm⁻¹). Como cabría esperar, la posición en la cual se adquirieron los espectros se nota más en los espectros crudos y luego de las correcciones de línea base (esta última únicamente corrige la pendiente de los espectros). No obstante, la separación entre los espectros en las Figuras (a-d) puede que no sea casual: en el modo retrodispersión los espectros obtenidos en el centro de cada cara se diferencian mucho, estando el espectro de la cara AA por encima del de la cara CG (lo cual está acorde a la diferencia entre caras cuantificada

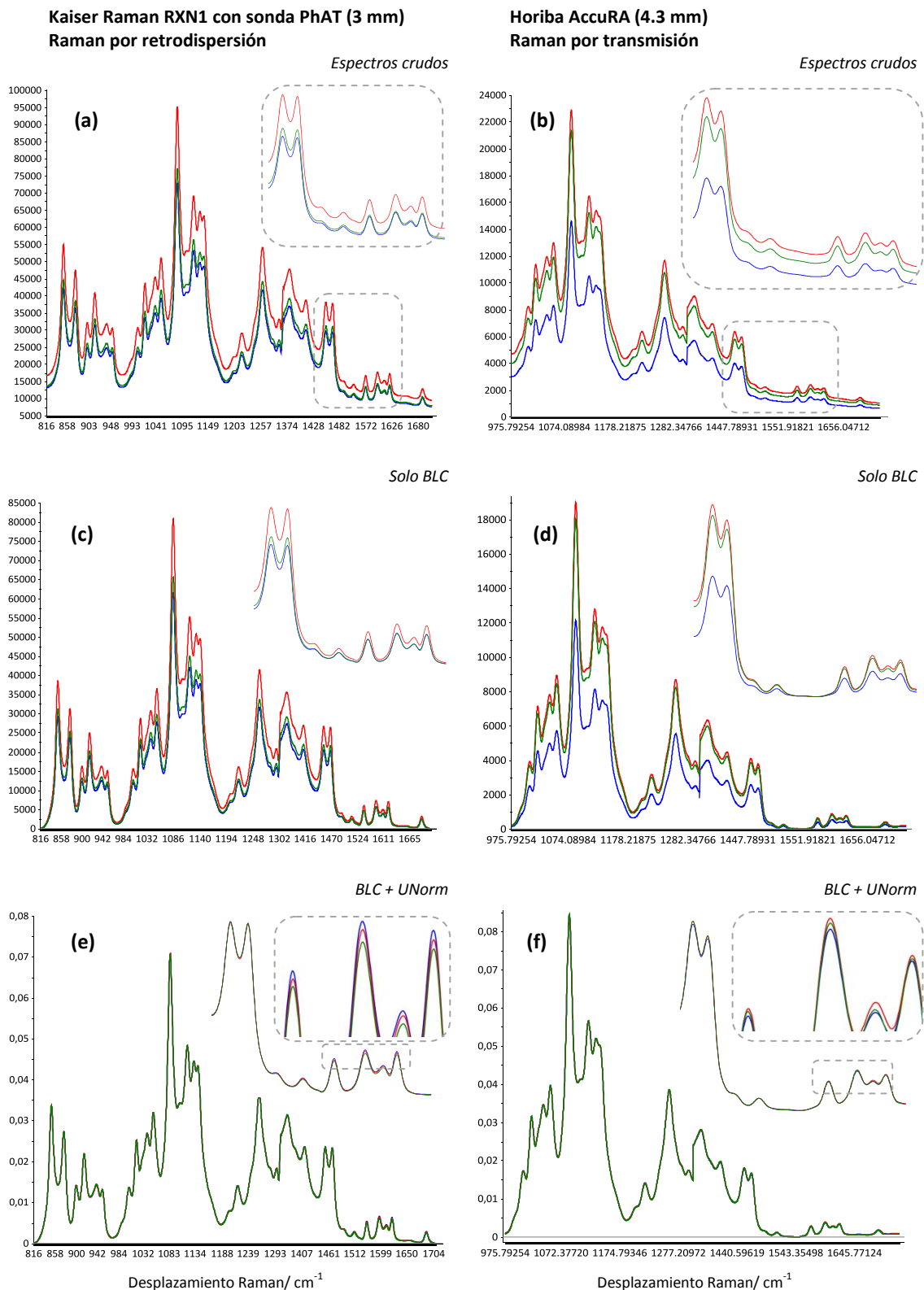


Figura 8.22 Espectros adquiridos en tres tabletas de Sintrom 4 del lote 1, irradiando con un haz de 3 mm (Figuras a,c,e) o 4.3 mm (Figuras b,d,f) por Raman de retrodispersión (equipo Kaiser, intervalo espectral 3) y transmisión (equipo Horiba, intervalo espectral 2). Con ambos instrumentos se registraron espectros en los 4 cuartos de las tabletas (la línea azul representa el promedio de los 12 cuartos), el centro de la cara marcada con una cruz (línea roja), y el centro de la cara CG (línea verde).

usando la Estrategia 3 para el Sintrom 4 en el equipo Kaiser -bloque 2 de la Tabla 8.10); y por otro lado, en modo transmisión los espectros adquiridos en el centro de cada cara están más juntos, y el menos intenso corresponde al promedio de todos los cuartos (y se observa que es considerablemente menos intenso). Luego al normalizar las diferencias son más difíciles de detectar, pero la secuencia de colores tiene mucho sentido: en modo retrodispersión aparecen por encima el espectro promedio de los cuartos y el registrado en el centro de la cara marcada con una cruz (todos estos espectros se adquirieron de la misma cara), y por debajo el espectro de la cara CG; y en modo transmisión aparece el espectro del centro de la cara con la cruz por arriba, luego el de la otra cara y por debajo el espectro promedio de los cuartos. Estos cambios a pesar de ser pequeños, guardan mucha relación con lo reportado en la literatura sobre estas dos geometrías en las que se pueden medir espectros Raman: el modo retrodispersión es más sensible a la cara irradiada, mientras que en transmisión la dependencia de los espectros respecto a la cara irradiada, y la cara por la cual sale la radiación que atraviesa es menos importante. El hecho de que el espectro promedio de los cuartos en modo transmisión resulte en intensidades un poco menores podría deberse a una mayor importancia de la pérdida de radiación en las interfaces muestra-aire cuando no se irradia en el centro de la tableta, y la radiación de interés se recoge en el lado opuesto al de iluminación.

8.5.3.3 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 usando el equipo Horiba

Las Tablas 8.11 y 8.12 muestran las calibraciones y predicciones obtenidas para el Sintrom 1 y Sintrom 4 respectivamente, con los espectros adquiridos en el equipo marca Horiba. El número óptimo de factores para ambos modelos fue de 3, y las predicciones obtenidas no difieren significativamente de los valores de referencia.

Tabla 8.4 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo AccuRA, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 2

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
MIS1 Cal L3 y L6 2DSG UNorm	3	97.9	0.046	L1	1.95	0.01	1.95	0.03	0.023	1.2
				L2	1.94	0.01	1.95	0.03	0.025	1.3
				L4	1.94	0.01	1.93	0.04	0.036	1.9
				L5	1.95	0.01	1.96	0.03	0.028	1.5

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.029, RSEP (%)= 1.5, Bias= 0.002

Tabla 8.5 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo AccuRA, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 1 (quitando la señal centrada en 1342 cm⁻¹)

BLOQUE 1	# <i>factores</i>	% <i>Y-Exp</i>	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>			
M1S4 Cal L1 y L4 2BLC UNorm	3	99.3	0.016	L2	0.706	0.010	0.709	0.015	0.013	1.9
				L3	0.702	0.014	0.703	0.006	0.017	2.4
				L5	0.713	0.007	0.713	0.011	0.012	1.7

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.014, RSEP (%)= 2.0, Bias= 0.001

8.5.4 Obtención de los modelos de calibración con el equipo Cobalt TRS100

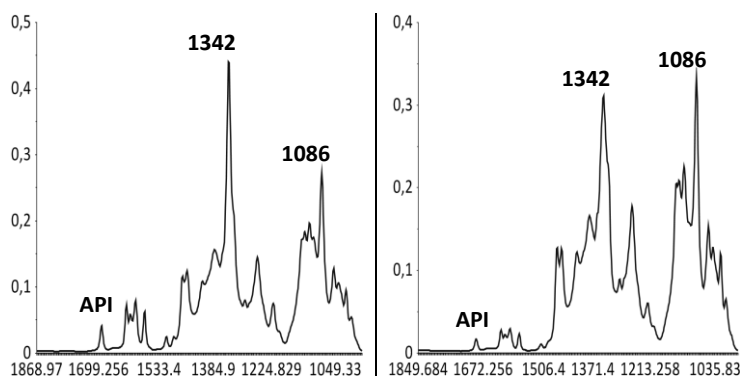
8.5.4.1 Parámetros para la adquisición de los espectros

Dado que los parámetros configurables en los dos instrumentos Raman por transmisión son los mismos, en la sección 8.4.4.1 se mencionaron también los valores para las mediciones en el equipo Cobalt: 1 W de potencia de láser, 2 s de tiempo de exposición y 64 acumulaciones. No obstante se omitió el asunto del diámetro de láser y el de la óptica de recolección, que a diferencia del instrumento marca Horiba son seleccionables en este espectrómetro: el primero se dejó en 4 mm debido a que se emplearon los mismos portamuestras del equipo Horiba (que tienen un agujero de 5 mm), mientras que el de recolección se dejó en 8 mm para las tabletas de diámetro grande, y 4 mm para las pequeñas. Se usó 4 mm para las tabletas pequeñas considerando que la diferencia entre el diámetro de irradiación y el diámetro de estas tabletas es muy pequeña, por lo que la dispersión radial de los fotones en el interior de la muestra está muy limitada dada la cercanía de la interfaz muestra-aire en los bordes de la tableta, aunque es verdad que luego los fotones salen por la cara opuesta en múltiples direcciones, y entonces no se puede descartar el uso de diámetros de recolección mayores para estas tabletas. No obstante se obtuvieron modelos adecuados para las condiciones de registro mencionadas anteriormente.

Estos modelos se obtuvieron luego del preprocesamiento con lo que el fabricante llama 'estándar de Cobalt', que es la combinación de las dos correcciones para los ejes 'x' e 'y' de los espectros que se mencionaron en la Tabla 8.2. Dado que con el instrumento Cobalt se culmina la presentación de los modelos obtenidos mediante espectroscopía Raman, en la

Tabla 8.6 se muestra la relación de alturas entre distintos picos de los espectros, y se ha incluido por separado lo que se observa en los espectros crudos y luego del "pretratamiento interno" en el instrumento Cobalt. Se reportan los resultados para las tabletas comerciales de cada producto, y las tabletas preparadas en el laboratorio con un contenido del 100 % el valor nominal, valores obtenidos al promediar todos los espectros adquiridos en cada instrumento para cada tipo de tableta mencionado anteriormente. Con el fin de medir la relación de alturas sin el efecto de la pendiente de los espectros, para estos cálculos todos los espectros se recortaron en el intervalo 2 y se aplicaron las correcciones de línea base del Unscrambler, las cuales son muy buenas en la eliminación de la pendiente de los espectros (en el caso del Sintrom 4 para estos cálculos no se hizo la eliminación de la señal centrada a 1342 cm⁻¹). Por otro lado, en el pretratamiento de los espectros para este apartado se incluyó una zona del espectro sin bandas al lado del grupo de bandas del API, que se usó para unos cálculos respecto al ruido de la línea base que se mostrarán posteriormente.

Tabla 8.6 Relación de alturas entre 3 picos de los espectros del Sintrom (los espectros de muestra que se incluyeron corresponden a mediciones hechas con el equipo MultiRAM, luego de aplicar las correcciones de línea base del Unscrambler).



Instrumento y tipo de tableta	SINTROM 1		SINTROM 4	
	1086/API	1342/1086	1086/API	1086/1342
Horiba (100 % Cal)	17.1	1.3	51.3	1.3
Horiba (tab comercial)	15.6	1.4	54.4	1.4
Cobalt (100 % Cal) PreProc	8.1	1.6	28.2	1.2
Cobalt (tab comercial) PreProc	7.2	1.7	29.6	1.3
Cobalt (100 % Cal) Raw	14.5	1.1	45.6	1.6
Cobalt (tab comercial) Raw	14.3	1.2	46.4	1.7
MultiRAM (100 % Cal)	7.2	1.6	21.5	1.1
MultiRAM (tab comercial)	6.7	1.6	20.3	1.1
Kaiser (100 % Cal) Spot grande	6.3	1.7	21.4	1.1
Kaiser (tab comercial) Spot peq	6.2	1.8	23.0	1.1
Kaiser (100 % Cal) Spot peq	6.7	1.7	-	-
Kaiser (tab comercial) Spot grande	-	-	23.2	1.1

Los valores de las tabletas comerciales y las tabletas preparadas en el laboratorio de la misma composición varían poco como cabría esperar. Luego respecto a los valores antes y después de aplicar la corrección del 'estándar de Cobalt', es evidente que antes de su aplicación la relación de alturas es muy distinta a lo calculado para los otros instrumentos. Pero en la tabla también se puede apreciar que los cocientes para el instrumento Horiba son considerablemente distintos a los de los otros instrumentos, en especial cuando se considera la relación 1086/API: tanto para el Sintrom 1 como para el Sintrom 4 este cociente es mucho más alto que para los otros instrumentos. Esta diferencia en los espectros obtenidos con el instrumento Horiba no se corrige con la normalización a vector unidad de los espectros que ya previamente tienen corregida su línea base, tal como se muestra en la Figura 8.23 para los espectros obtenidos con las tabletas comerciales de Sintrom 1, registrados en los dos instrumentos usados de Raman por transmisión.

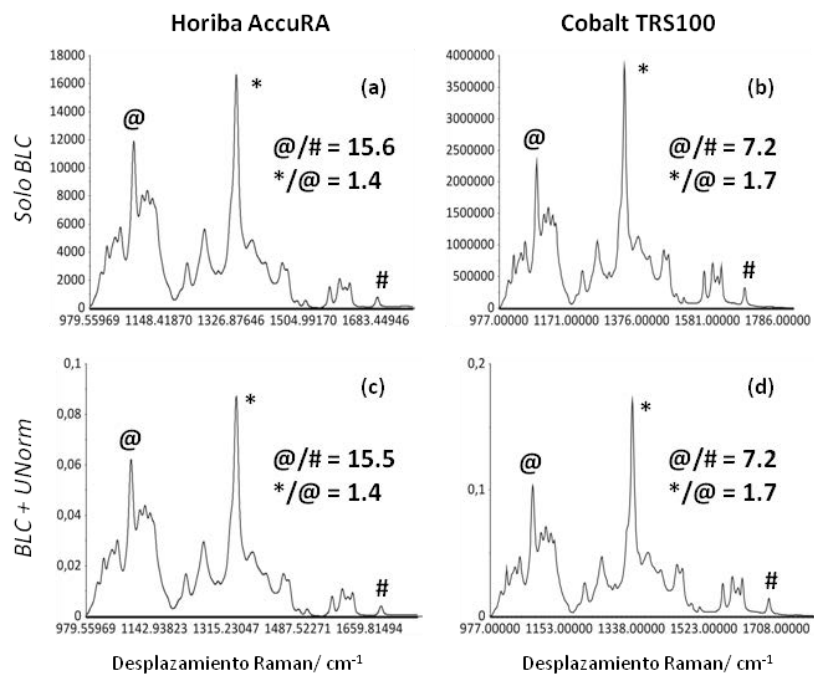


Figura 8.23 Espectros promedios de todas las tabletas comerciales de Sintrom 1 registrados en los instrumentos Horiba AccuRA (Figuras a y c) y Cobalt TRS100 (Figuras b y d, en este caso partiendo de los espectros ya corregidos con el 'estándar de Cobalt'). Se representa el cociente de la altura de distintas bandas, antes y después de aplicar la normalización a vector unidad.

8.5.4.2 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 usando el equipo Cobalt

Las Tablas 8.7 y 8.8 muestran las calibraciones y predicciones obtenidas para el Sintrom 1 y Sintrom 4 respectivamente, usando los espectros adquiridos con el equipo marca Cobalt. El número óptimo de factores para el modelo del Sintrom 1 fue 4, uno más que en el modelo del equipo Horiba, aunque para el modelo del Cobalt únicamente fue suficiente con aplicar un SNV para la corrección de línea base y normalización de los espectros y obtener el modelo de calibración, mientras que para el Horiba se aplicó una segunda derivada a todos los espectros. Respecto al Sintrom 4, el modelo del instrumento Cobalt tiene sólo 2 factores (modelo para el instrumento Horiba, 3 factores), las figuras de mérito de la calibración son muy similares y en ambos casos se realizó un paso de corrección de línea base (correcciones del Unscrambler o segunda derivada), y luego la normalización a vector unidad. Finalmente respecto al porcentaje de API encontrado en las tabletas comerciales con estos modelos, las predicciones no difieren significativamente de los valores de referencia.

Tabla 8.7 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo TRS100, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 1

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M1S1 Cal L1 y L6 SNV	4	98.8	0.032	L2	1.94	0.01	1.96	0.02	0.021	1.1
				L3	1.94	0.01	1.95	0.02	0.014	0.7
				L4	1.94	0.01	1.93	0.02	0.021	1.1
				L5	1.95	0.01	1.94	0.01	0.012	0.6

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.017, RSEP (%)= 0.9, Bias= 0.001

Tabla 8.8 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 4 (valor nominal de las tabletas: 0.7 % p/p) con el equipo TRS100, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía Raman con los valores de referencia. Para obtener estos resultados se usó el intervalo espectral 2 (quitando la señal centrada en 1342 cm⁻¹)

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		Raman (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M1S4 Cal L2 y L3 2D SG UNorm	2	99.2	0.017	L1	0.707	0.007	0.708	0.014	0.010	1.4
				L4	0.706	0.006	0.712	0.010	0.013	1.8
				L5	0.713	0.007	0.712	0.009	0.009	1.3

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.011, RSEP (%)= 1.5, Bias= 0.002

8.5.5 Obtención de los modelos de calibración para el Sintrom 1 con el equipo de infrarrojo cercano Bruker MPA (modos reflectancia difusa y transmitancia)

8.5.5.1 Parámetros para la adquisición de los espectros

La Figura 8.24 resume las estrategias para el registro de las tabletas comerciales y preparadas en el laboratorio de Sintrom 1 en modo reflectancia y transmitancia. La justificación del uso de distintos soportes se detalló en la presentación de este instrumento (sección 8.3.3), por lo que ahora se quiere mostrar el impacto que tuvo sobre los espectros adquiridos en modo reflectancia, el hecho de que las tabletas comerciales se midiesen con un vidrio en medio (el del vial usado, que hizo posible emplear el carrusel de muestras), mientras que la superficie de las tabletas preparadas en el laboratorio se irradió directamente dado el agujero tan amplio que tenían los soportes que se diseñaron en AstraZeneca para estas tabletas.

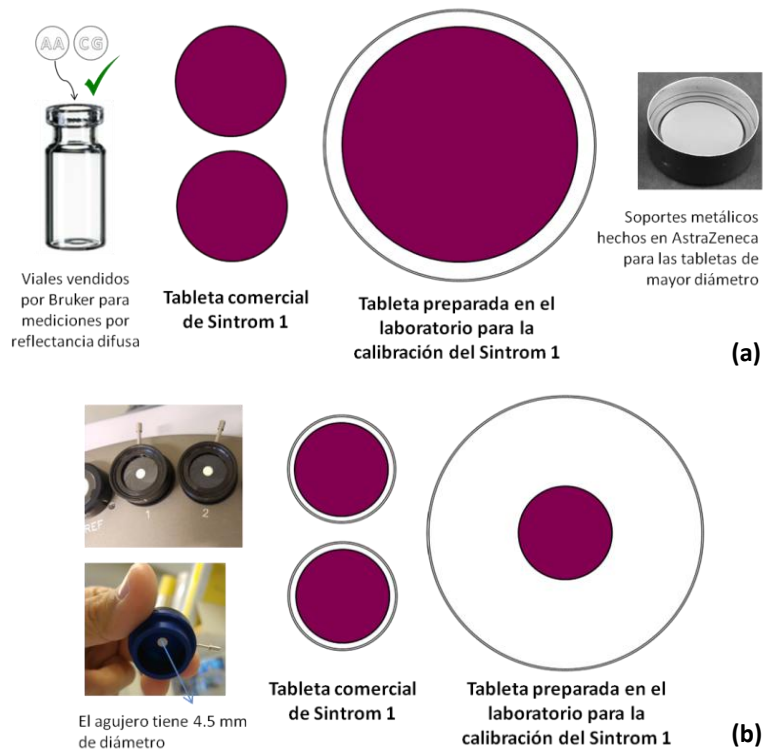


Figura 8.24 Representación a escala real del diámetro de las tabletas, y el diámetro de irradiación, en las mediciones por reflectancia difusa (a) y transmitancia (b) de los comprimidos para los modelos del Sintrom 1 por infrarrojo cercano. Nótese que debido al uso de los viales para las tabletas pequeñas, en este caso se irradió el 100 % de la superficie de cada cara. Al igual que en las mediciones Raman, las tabletas preparadas en el laboratorio se irradiaron sólo por una de las caras, mientras que las tabletas comerciales se irradiaron en ambas caras (incluso en modo transmitancia).

En la Figura 8.25 se compara el efecto del uso de un vial para la medición de las tabletas comerciales de Sintrom 1 sobre la adquisición en modo reflectancia difusa (a), con el espectro obtenido al poner la misma tableta directamente en la ventana del espectrómetro (b), y los espectros promedios de seis tabletas preparadas en el laboratorio con una composición 100 % el valor nominal (c) compactadas a tres presiones distintas (estos medidos con el soporte para tabletas grandes mencionado anteriormente. De acuerdo al diseño de experimentos que se usó, cada tableta a una presión distinta se compactó por duplicado, por eso se superponen 3 espectros). En la segunda fila se muestra el intervalo espectral usado para la obtención de los modelos (7095-4865 cm^{-1}). Específicamente

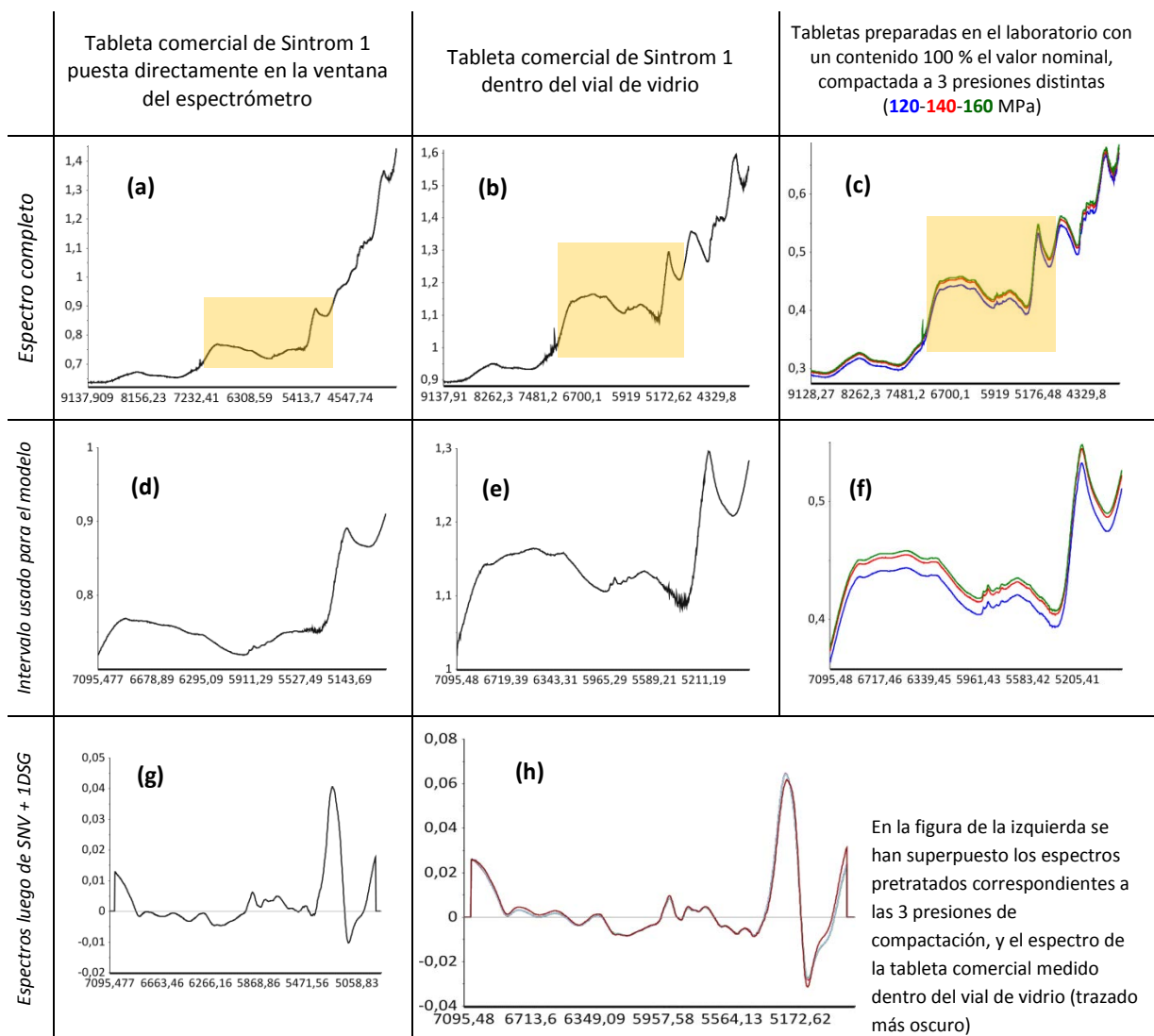


Figura 8.25 Comparativa del espectro registrado en una tableta de Sintrom 1 colocada directamente en la ventana del espectrómetro (a), dentro del vial de vidrio (b, el modo en que se registraron todas las tabletas comerciales) y tabletas preparadas en el laboratorio compactadas en las 3 presiones contempladas en el diseño de experimentos (c). La segunda fila muestra el intervalo seleccionado para la obtención de los modelos, y la tercera la apariencia de los espectros luego del SNV y la primera derivada (en h se ha superpuesto el espectro de las 3 presiones con el espectro de la tableta comercial registrado con esta dentro del vial).

respecto a la figura (f), a pesar de que para el conjunto de tabletas representado se ve una mayor pendiente al aumentar la presión de compactación, esto no se observó en todos los subgrupos de 6 tabletas con la misma composición pero compactadas a presiones distintas que se pueden hacer. Alcalà y colaboradores ⁴² reportaron el efecto de la presión de compactación en la pendiente de los espectros en su trabajo, pero usaron un rango de presiones mucho más amplio que el considerado en este trabajo. Luego al pretratar los espectros las diferencias debido a la presión prácticamente desaparecen (Figura h); en un PCA con todos los espectros de las tabletas preparadas en el laboratorio, estos aparentemente aparecen acomodados por el orden de compactación a lo largo del PC-4 en el gráfico de scores del PC-4 vs PC-3, con el primero que representa menos del 1 % de toda la varianza, siendo la señal con el máximo en 5250 cm^{-1} la principal característica del loading de este PC. En la Figura h se puede apreciar que el espectro de la tableta registrado en el vial, y el de las tabletas preparadas en el laboratorio con la misma composición, se superponen considerablemente.

Respecto a la selección de los parámetros de adquisición, al ser un FT-NIR (y fabricado por Bruker, al igual que el FT-Raman que se usó durante esta tesis), las observaciones para distintas resoluciones y número de barridos siguen la misma tendencia que en las mediciones Raman, por este motivo con el fin de no incrementar demasiado el ruido de la línea base (debido a una resolución muy alta) y el tiempo de adquisición (por hacer muchos barridos), estos parámetros se dejaron en 4 cm^{-1} y 64 barridos. Bajo estas condiciones cada espectro tomó aproximadamente 1 min, y se usaron las mismas condiciones en modo reflectancia difusa y transmitancia.

8.5.5.2 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 por NIR en modo reflectancia difusa

La Tabla 8.9 muestra los resultados por NIR en modo reflectancia difusa para las tabletas de Sintrom 1. En el bloque 1 se muestra el modelo y las predicciones cuando se usan los espectros registrados en ambas caras de las tabletas comerciales de Sintrom 1. El número óptimo de factores en el modelo es 5, y los 4 lotes fueron predichos sin diferencia significativa respecto a los valores de referencia, no obstante el RSEP % global para los lotes predichos es más alto que para todas las mediciones hechas por Raman por

Tabla 8.9 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo MPA en modo reflectancia difusa, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía en el infrarrojo cercano con los valores de referencia.

BLOQUE 1	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
MIS1 Cal L4 y L5 SNV 1DSG	5	96.6	0.056	L1	1.95	0.01	1.95	0.06	0.060	3.1
				L2	1.94	0.01	1.94	0.03	0.029	1.5
				L3	1.94	0.01	1.96	0.04	0.043	2.2
				L6	1.95	0.01	1.97	0.03	0.038	2.0

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.045, RSEP (%)= 2.3, Bias= 0.007

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		NIR 2 caras		NIR cara AA		NIR cara CG	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Predicciones usando MIS1 Cal L4 y L5 SNV 1DSG	L1	1.95	0.01	1.95	0.06	1.93	0.08	1.97	0.07
	L2	1.94	0.01	1.94	0.03	1.91	0.06	1.98	0.05
	L3	1.94	0.01	1.96	0.04	1.94	0.06	1.98	0.06
	L6	1.95	0.01	1.97	0.03	1.98	0.05	1.96	0.04

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA→: RMSEP (% p/p)= 0.068, RSEP (%)= 3.5, Bias= -0.008

CG→: RMSEP (% p/p)= 0.059, RSEP (%)= 3.0, Bias= 0.022

BLOQUE 3	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-AA-S1 Cal L1 y L5 1DSG SNV	5	95.9	0.062	L2	1.94	0.01	1.91	0.05	0.065	3.3
				L3	1.94	0.01	1.94	0.06	0.062	3.2
				L4	1.94	0.01	1.93	0.07	0.064	3.3
				L6	1.95	0.01	1.97	0.05	0.053	2.7

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.061, RSEP (%)= 3.1, Bias= -0.005

BLOQUE 4	# factores	% Y-Exp	RMSEC (% p/p)	HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)	
				Prom	SD	Prom	SD			
M-CG-S1 Cal L2 y L6 1DSG SNV	5	96.9	0.055	L1	1.95	0.01	1.94	0.10	0.094	4.8
				L3	1.94	0.01	1.96	0.07	0.066	3.4
				L4	1.94	0.01	1.94	0.07	0.064	3.3
				L5	1.95	0.01	1.87	0.12	0.140	7.2

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.096, RSEP (%)= 4.9, Bias= -0.018

retrodispersión y transmisión. Luego al usar el mismo modelo pero cuantificando las tabletas del conjunto de predicción usando sólo los espectros de una cara (bloque 2), las pruebas t dan que no hay diferencias significativas respecto a los valores de referencia, sin embargo hay un número considerable de muestras que se predicen con una diferencia superior al 5 % del valor que obtenido por HPLC (las predicciones para el lote 1 dan tres muestras con una diferencia superior al 5 %, no obstante los residuales no están repartidos tan desigualmente respecto al número de unidades por encima y por debajo del

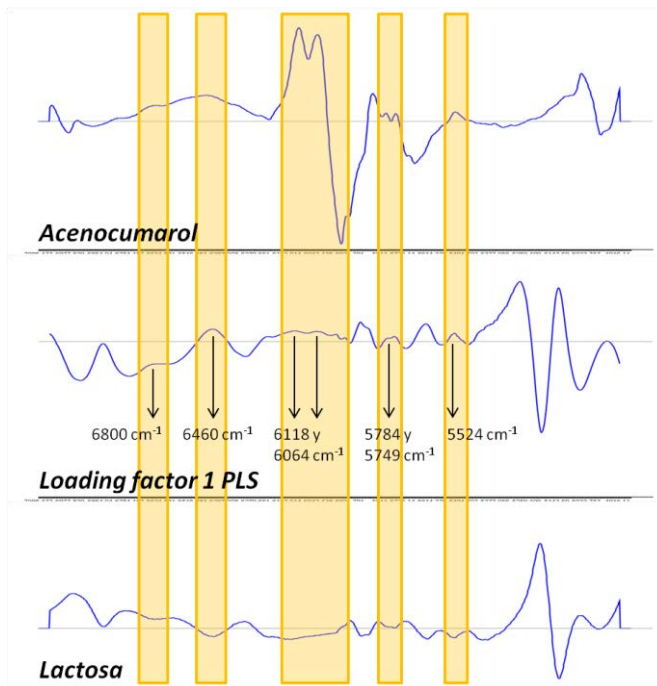


Figura 8.26 Representación del loading del PC-1 del modelo usado para la cuantificación de las tabletas de Sintrom 1 por reflectancia difusa (en el centro), y el espectro del API y uno de los excipientes mayoritarios luego del pretratamiento aplicado a los espectros en el modelo (a los extremos). Se resaltan las bandas del API que se reflejan en el loading

valor de referencia). En un PCA incluyendo los espectros registrados en cada cara de la tableta no es posible distinguir clusters según la cara irradiada, lo cual concuerda con lo visto con los espectros Raman para estas tabletas (ver por ejemplo Figuras 8.15a y c). Finalmente en la Figura 8.26 se muestra el loading del PC-1 del modelo correspondiente al bloque 1 (el PC-1 representa el 76 % de la varianza total de Y), y el espectro del acenocumarol y la lactosa luego de los pretratamientos espectrales. Se resaltan las bandas del API que parecen reflejarse en el loading del PC-1, y se ha incluido a modo de comparación el espectro de uno de los excipientes en mayor proporción de la formulación, la lactosa.

Se procedió a rehacer los modelos usando únicamente los espectros adquiridos en una de las caras (bloques 3 y 4), y nuevamente las pruebas t dan que no hay diferencia significativa respecto a los valores de referencia, pero hay un número elevado de muestras que dan por encima del 5 % de diferencia respecto al HPLC (por ejemplo, para el lote 1 en el bloque 4, a pesar de que la diferencia en las medias es de solo 0.01, 4 de 12 las tabletas predichas superan el 5 % de diferencia, y en el caso del lote 5 hay 3 tabletas con una diferencia superior al 5 %, en este caso las medias son bastante más distintas). Es posible que mediante la aplicación de una combinación de pretratamientos distintos para la elaboración de los modelos usando una cara se obtuviesen mejores predicciones, sin embargo para los modelos por Raman lo que se hizo fue mantener la misma combinación que se empleó cuando se incluyeron los espectros de ambas caras.

8.5.5.3 Modelos de calibración para las tabletas de Sintrom 1 por NIR en modo transmitancia

Con el fin de completar los parámetros de adquisición para este modo de registro, debe mencionarse que la única forma en que se pudieron registrar las distintas tabletas de Sintrom 1 (todas con un espesor cercano a 1.8 mm), fue usando uno de los filtros que incorpora el espectrómetro para la prueba de linealidad fotométrica. El instrumento incorpora tres filtros que permiten distintos niveles de transmisión (los cuales se ubican justo frente a la fuente NIR), y mediante el uso de uno de ellos fue posible reducir la cantidad de luz que llegaba al detector. La única consecuencia que trae es la incorporación de una zona ruidosa desde 12800 cm^{-1} hasta 10000 cm^{-1} , lo cual a efectos de comparar los intervalos que se registran en NIR por reflectancia difusa y transmitancia, hace más grande la diferencia entre ambos modos de adquisición (ver Figura 8.3b). En la Figura 8.27 se muestra el espectro de una tableta comercial sin pretratar, y luego de la aplicación del SNV, el cual fue el único pretratamiento necesario para la obtención del modelo de calibración.

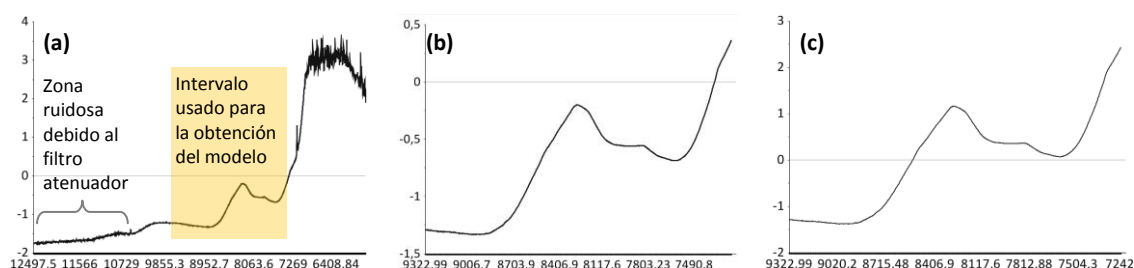


Figura 8.27 (a) Espectro NIR completo de una tableta comercial de Sintrom 1 registrado en modo transmitancia. (b y c) Intervalo espectral seleccionado para los modelos (9323-7232 cm^{-1}), antes y después de aplicar el SNV.

La Tabla 8.10 muestra los resultados de las calibraciones y predicciones para las tabletas de Sintrom 1 usando los espectros NIR adquiridos en modo transmitancia. Respecto a las figuras de mérito de la calibración del bloque 1 (que corresponde a la inclusión de los espectros obtenidos al irradiar las dos caras de las tabletas comerciales), la varianza explicada en Y y el RMSEC son iguales a los valores del modelo para el modo reflectancia difusa, aunque el modelo por transmitancia requiere únicamente de 3 factores. Las predicciones no difieren significativamente de los valores de referencia en ninguno de los 4 lotes predichos. Las predicciones para el mismo modelo del bloque 1, pero usando sólo los espectros de una de las caras (bloque 2) también pasan la prueba t, aunque a diferencia de lo visto en la Tabla 8.9 al usar solo los espectros de una de las caras no se incrementó el número de muestras que resultaban en una diferencia superior al 5 % respecto al valor de

Tabla 8.10 Figuras de mérito de los modelos de calibración para el Sintrom 1 (valor nominal de las tabletas: 2 % p/p) con el equipo MPA en modo transmitancia, y comparativa de las predicciones obtenidas por espectroscopía en el infrarrojo cercano con los valores de referencia.

BLOQUE 1	# <i>factores</i>	% <i>Y-Exp</i>	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>		
M1S1 Cal L3 y L6 SNV	3	96.9	0.055	L1	1.95	0.01	1.95	0.03	0.027	1.4
				L2	1.94	0.01	1.94	0.02	0.014	0.7
				L4	1.94	0.01	1.95	0.04	0.040	2.1
				L5	1.95	0.01	1.97	0.05	0.047	2.4

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.035, RSEP (%)= 1.8, Bias= 0.008

BLOQUE 2		HPLC (% p/p)		NIR 2 caras		NIR cara AA		NIR cara CG	
		<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>
Predicciones usando M1S1 Cal L3 y L6 SNV	L1	1.95	0.01	1.95	0.03	1.96	0.05	1.94	0.03
	L2	1.94	0.01	1.94	0.02	1.94	0.02	1.95	0.03
	L4	1.94	0.01	1.95	0.04	1.96	0.07	1.94	0.05
	L5	1.95	0.01	1.97	0.05	1.95	0.03	1.99	0.09

Resultados conjuntos de todas las tabletas: AA→: RMSEP (% p/p)= 0.047, RSEP (%)= 2.4, Bias= 0.008

CG→: RMSEP (% p/p)= 0.055, RSEP (%)= 2.8, Bias= 0.008

BLOQUE 3	# <i>factores</i>	% <i>Y-Exp</i>	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>		
M-AA-S1 Cal L3 y L6 SNV	3	96.6	0.057	L1	1.95	0.01	1.96	0.04	0.036	1.8
				L2	1.94	0.01	1.95	0.03	0.032	1.7
				L4	1.94	0.01	1.95	0.03	0.028	1.4
				L5	1.95	0.01	1.95	0.04	0.034	1.7

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.033, RSEP (%)= 1.7, Bias= 0.006

BLOQUE 4	# <i>factores</i>	% <i>Y-Exp</i>	RMSEC (% p/p)		HPLC (% p/p)		NIR (% p/p)		RMSEP (% p/p)	RSEP (%)
					<i>Prom</i>	<i>SD</i>	<i>Prom</i>	<i>SD</i>		
M-CG-S1 Cal L3 y L6 SNV	3	96.3	0.061	L1	1.95	0.01	1.95	0.02	0.022	1.1
				L2	1.94	0.01	1.95	0.03	0.030	1.6
				L4	1.94	0.01	1.93	0.05	0.046	2.4
				L5	1.95	0.01	1.95	0.06	0.059	3.0

Resultados conjuntos de todas las tabletas predichas: RMSEP (% p/p)= 0.041, RSEP (%)= 2.1, Bias= -0.002

referencia. Luego el resultado de rehacer los modelos incluyendo sólo los espectros de una de las caras de las tabletas comerciales también es bueno (bloques 3 y 4): las predicciones pasan la prueba t, y se mantiene en cero el número de muestras que superan una diferencia del 5 % respecto al valor de referencia, manteniendo evidentemente el mismo intervalo espectral y pretratamiento que en el modelo que incluye los espectros correspondientes a la irradiación de las dos caras.

El intervalo usado para el modelo con los espectros adquiridos por transmitancia también está disponible en los espectros de reflectancia difusa. Ambos intervalos (9323-7232 cm^{-1} y 7095-4865 cm^{-1}) se encuentran separados por una señal fina que aparece a 7184 cm^{-1} , la cual es bastante particular considerando el patrón típico de los espectros NIR. Esta se debe al talco ⁴³ que contienen las tabletas de Sintrom 1, y lo que se ve es que la zona alrededor de este pico en los espectros de reflectancia difusa es mucho más ruidosa que en los espectros por transmitancia, por lo que habría que usar un intervalo más corto que el usado en los modelos por transmitancia, si se quiere aplicar este mismo rango espectral para el modelo con los espectros adquiridos por reflectancia difusa. Es posible que este mayor ruido se deba al vidrio de los viales con los cuales se registraron los espectros de las tabletas pequeñas en modo reflectancia difusa.

8.5.6 Sobre el uso de distintos intervalos espectrales y combinaciones de pretratamientos para la obtención de los modelos cuantitativos por espectroscopía Raman

A lo largo de la presentación de los distintos modelos que se obtuvieron para todos los instrumentos Raman, el tema de los pretratamientos espectrales que se aplicaron apenas ha sido mencionado. En la mayoría de los casos se hizo un paso de corrección de línea base, ya fuese usando las correcciones del Unscrambler, una derivada o SNV, y siempre eso sí una normalización a vector unidad o SNV. En este punto es posible preguntarse por qué tanta variedad de pretratamientos con el fin de obtener los modelos, si siempre estamos hablando de espectroscopía Raman e incluso en dos de los cuatro instrumentos la irradiación se realiza con un láser de 785 nm (instrumentos marca Kaiser y Horiba). En la Figura 8.28 se muestra el espectro promedio de todas las tabletas comerciales sin pretratar, registrado en cada uno de los instrumentos. La diferencia que se observa en los espectros de partida, y más específicamente la distinta pendiente que presentan éstos, probablemente es la causa de que para cada instrumento se haya usado una combinación distinta de pretratamientos. Como se puede apreciar los espectros obtenidos con el FT-Raman son los que presentan menos pendiente, y en el otro extremo están los espectros del equipo Horiba; en el primero la irradiación se hace con un láser de 1064 nm por lo que la fluorescencia está considerablemente más reducida que para las otras radiaciones de excitación. Las tres longitudes de onda de láser usadas se encuentran en el infrarrojo cercano, sin embargo la diferencia en nanómetros es mucho mayor para el FT-Raman y por este motivo al comparar los espectros de los otros 3 instrumentos, se pueden justificar

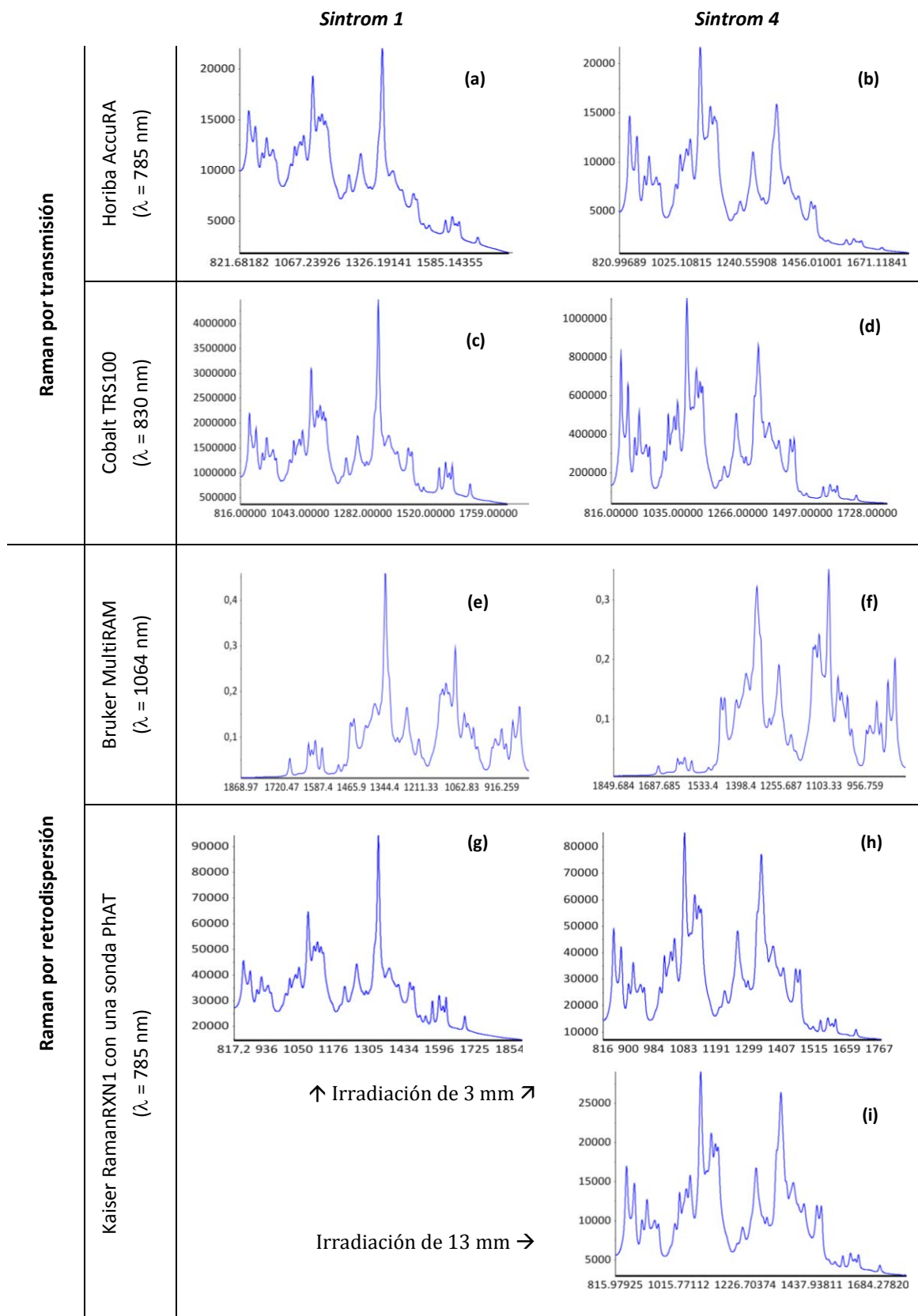


Figura 8.28 Comparativa de los espectros promedios adquiridos para las tabletas comerciales de Sintrom 1 y Sintrom 4 en los distintos instrumentos Raman. Los espectros se han recortado en el intervalo 3, y se muestran sin aplicar ningún pretratamiento espectral.

las diferencias no en un menor o mayor impacto de la fluorescencia, sino en la distinta forma en que cada instrumento hace la eliminación de la radiación Rayleigh.

Tabla 8.11 Relación altura de pico de API/ruido de la línea base (según se definieron estos términos para generar los datos de la Tabla 8.6) en los espectros de las tabletas comerciales de Sintrom 1 y Sintrom 4 registrados en los distintos instrumentos Raman.

Instrumento y tipo de tableta	SINTROM 1	SINTROM 4
Horiba (100 % Cal)	60.0	16.0
Horiba (tab comercial)	57.0	12.0
Cobalt (100 % Cal) PreProc	222.2	102.6
Cobalt (tab comercial) PreProc	495.9	71.9
MultiRAM (100 % Cal)	37.2	16.9
MultiRAM (tab comercial)	38.8	16.2
Kaiser (100 % Cal) Spot grande	67.3	28.9
Kaiser (tab comercial) Spot peq	234.6	61.8
Kaiser (100 % Cal) Spot peq	208.5	-
Kaiser (tab comercial) Spot grande	-	37.9

La Tabla 8.11 muestra la relación pico API/ruido de la línea base para los espectros adquiridos en los distintos instrumentos Raman, habiendo aplicado únicamente las correcciones de línea base del Unscramber con el fin de eliminar la pendiente de los espectros (lo que se hizo para los espectros que se muestran en la Tabla 8.6). Lo primero que se

puede mencionar es que la relación siempre es más alta para los espectros del Sintrom 1 que para los del Sintrom 4, lo cual tiene mucho sentido debido a la diferencia en el porcentaje de API que contiene cada comprimido comercial. Considerando las mediciones por retrodispersión, en el caso del MultiRAM no hay diferencia en los valores entre las tabletas comerciales y las tabletas preparadas en el laboratorio; y para el instrumento Kaiser no hay diferencias siempre que se use el mismo lente para la irradiación: el cociente calculado es menor cuando se usa el haz de 13 mm que cuando se irradia con un diámetro de 3 mm, y esto tiene que ver con la diferencia tan grande que hay en la distancia entre este elemento óptico y la superficie de la muestra en cada caso. Para los instrumentos por transmisión se puede decir que la relación calculada es mayor en las tabletas preparadas en el laboratorio que para las tabletas comerciales, y esto es especialmente evidente para el caso del Sintrom 4, donde hay mucha diferencia en el espesor de cada tipo de tableta, y entonces más fotones llegan al detector entre más delgado sea el comprimido. No obstante, para el instrumento Cobalt el cociente para las tabletas comerciales de Sintrom 1 es mucho mayor que para las tabletas preparadas en el laboratorio. Aquí debe recordarse que las tabletas pequeñas se registraron en este instrumento con un lente colector más pequeño (4 mm, mientras que se usaron 8 mm para las tabletas de mayor diámetro). El fabricante indica que el lente grande recoge la señal en un área mayor pero que la desenfoca, por lo que hay una disminución en la intensidad, y

efectivamente esto es lo que se refleja en las mediciones de las tabletas preparadas en el laboratorio y comerciales de Sintrom 1 con el equipo Cobalt.

8.5.7 Comparativa de los modelos por espectroscopía Raman y NIR

La Tabla 8.12 resume las figuras de mérito de los modelos presentados en secciones anteriores y los valores predichos para cada lote con su desviación estándar; y se ha incluido para cada modelo el porcentaje de área irradiado en cada cara de los distintos tipos de tableta. Ya se sabe que los espectros adquiridos provienen de un volumen y no de un área muestreada, y para calcular lo primero se necesita una profundidad de penetración de la radiación. De esto se hicieron aproximaciones con el equipo MultiRAM, para materiales que tienen un tamaño de partícula considerablemente pequeño ($\sim 20 \mu\text{m}$). Ahora se tratará de aproximar este dato en las tabletas analizadas para los dos instrumentos de Raman por retrodispersión que se usaron.

Respecto al equipo Kaiser, Wikström y colaboradores ⁴⁴ hicieron mediciones para determinar el volumen de muestreo con la sonda PhAT usando el lente que permite una irradiación de 3 mm. Las mediciones se hicieron con teofilina anhidra pero no se menciona el tamaño de partícula del material con el cual prepararon comprimidos de distinto espesor. Hicieron entonces experimentos similares a los reportados en los capítulos anteriores para el KHP, PS y MCC y encontraron que las intensidades dejaban de crecer para un espesor de 2 mm. En nuestras mediciones para el KHP y MCC de $20 \mu\text{m}$ esto ocurría a 1.3 mm y 1 mm, y como parte de las conclusiones del trabajo con el KHP se dijo que la profundidad de penetración dependía del tamaño de partícula, siendo mayor entre más grandes sean estas. En el Capítulo 1 se citaron algunos excipientes farmacéuticos y sus tamaños de partícula, y el valor más bajo mencionado fue de $50 \mu\text{m}$, por lo que se puede decir que la profundidad de penetración en la mezcla multicomponente que constituyen las tabletas de Sintrom es bastante mayor respecto a los reportados como parte de esta tesis para los compuestos puros estudiados. El punto al que se quiere llegar es que, sin decirlo con un 100 % de seguridad, es probable que en todas las tabletas irradiadas para los modelos de Sintrom 1 se haya muestreado todo el espesor de la tableta. El grosor de las tabletas preparadas en el laboratorio era de 1.7 mm, y el de las tabletas comerciales 1.9 mm, ambos valores por debajo de los 2 mm profundidad de penetración reportada en la literatura para la sonda PhAT con el lente de 3 mm de irradiación. Aquí podría radicar parte de la justificación de que usando un mismo modelo, pero incluyendo sólo los espectros de una de las caras las predicciones sean prácticamente las mismas que

Tabla 8.12. Comparativa de los resultados de calibración y predicción para las tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 con los distintos instrumentos Raman y NIR usados a lo largo de este trabajo.

Sintrom 1 Contenido nominal 2 % p/p	LOTE	HPLC		Raman										NIR			
				Retrodispersión						Transmisión				Retrodispersión		Transmisión	
				MultiRAM		Kaiser				Horiba		Cobalt					
						Estrategia 1		Estrategia 2									
				Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
1	1.95	0.01	Set de calibración		1.97	0.03	1.96	0.02	1.96	0.03	Set de calibración		1.95	0.06	1.96	0.03	
2	1.94	0.01	1.96	0.02	Set de calibración		1.95	0.02	1.95	0.03	1.96	0.02	1.94	0.03	1.94	0.02	
3	1.95	0.01	1.95	0.02	1.95	0.01	Set de calibración		Set de calibración		1.95	0.02	1.96	0.04	Set de calibración		
4	1.94	0.01	1.92	0.02	1.91	0.03	1.93	0.03	1.93	0.04	1.93	0.02	Set de calibración		1.95	0.04	
5	1.95	0.01	1.96	0.02	1.95	0.02	1.97	0.02	1.96	0.03	1.94	0.01	Set de calibración		1.97	0.05	
6	1.95	0.01	Set de calibración		Set de calibración		Set de calibración		Set de calibración		Set de calibración		1.97	0.03	Set de calibración		
% irradiado en tableta comercial				6.7		34.6		34.6		71.1		61.5		100		77.9	
% irradiado en tabletas prep @ lab				1.0		94.1		15.0		10.3		8.9		73.7		11.3	
Número de factores				4		2		4		3		4		5		3	
% Y-Exp				98.6		98.1		97.8		97.9		98.8		96.6		96.9	
RMSEC (% p/p)				0.037		0.047		0.048		0.046		0.032		0.056		0.055	
RMSEP (% p/p)				0.025		0.030		0.022		0.029		0.017		0.045		0.035	
Bias (% p/p)				0.004		-0.001		0.007		0.002		0.001		0.007		0.008	

Sintrom 4 Contenido nominal 0.7 % p/p	LOTE	HPLC		Raman por retrodispersión									Raman por transmisión				
				MultiRAM		Kaiser						Horiba		Cobalt			
						Estrategia 1		Estrategia 2		Estrategia 3							
				Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
				1	0.707	0.007	Set de calibración		0.709	0.009	Set de calibración		0.710	0.021	Set de calibración		0.708
2	0.706	0.010	0.698	0.018	Set de calibración		0.707	0.013	Set de calibración		0.709	0.015	Set de calibración				
3	0.702	0.014	Set de calibración		0.699	0.003	Set de calibración		0.702	0.004	0.703	0.006	Set de calibración				
4	0.706	0.006	0.712	0.010	Set de calibración		0.709	0.007	Set de calibración		Set de calibración		0.712	0.010			
5	0.713	0.007	0.718	0.013	0.711	0.004	0.717	0.006	0.710	0.009	0.713	0.011	0.712	0.009			
% irradiado en tableta comercial				1.7		97.0		20.8		5.2		10.6		9.2			
% irradiado en tabletas prep @ lab				1.0		94.1		94.1		94.1		10.3		8.9			
Número de factores				3		3		3		3		3		2			
% Y-Exp				99.3		99.6		99.2		99.4		99.3		99.2			
RMSEC (% p/p)				0.016		0.012		0.017		0.014		0.016		0.017			
RMSEP (% p/p)				0.014		0.010		0.008		0.014		0.014		0.011			
Bias (% p/p)				0.001		-0.001		0.003		-0.0001		0.001		0.002			

si se incluyen los espectros de las dos caras que se irradiaron de las tabletas comerciales. En el caso del Sintrom 1 parece que hay una relación entre la robustez del modelo y el volumen que se ha muestreado en los distintos tipos de tableta para su obtención, esto porque la Estrategia 1 para el instrumento marca Kaiser resultó en un modelo cuyo número óptimo de factores era 2, el número más bajo de todos los mostrados para el Sintrom 1. Los porcentajes de irradiación de las tabletas preparadas en el laboratorio y las tabletas comerciales varían mucho en cada modelo, sin embargo debe tenerse en cuenta que la mayoría del modelo está conformado por tabletas preparadas en el laboratorio, y las últimas son indispensables para incluir la variabilidad física en el modelo, dada la distinta forma de preparación de las tabletas de la planta de manufactura, de los comprimidos que se obtienen mediante la prensa hidráulica utilizada. Aparte del asunto del muestreo en la literatura el tema de la combinación de pretratamientos espectrales también se menciona como un factor que puede llevar a un modelo más o menos complejo (con más o menos factores). Por ejemplo, Rantanen y colaboradores mencionan que el uso de derivadas puede llevar a modelos que requieran más factores para llegar al número óptimo, esto como resultado de un pretratamiento que incrementa el peso de pequeñas diferencias espectrales e incluso el nivel de ruido del espectro. Al respecto en los modelos en los cuales se aplicaron derivadas a los espectros, se escogieron ventanas lo suficientemente grandes con el fin de reducir el ruido de los espectros resultantes, sin tampoco perder la información contenida en ellos (en la estrategia 2 con el instrumento Kaiser la ventana de la segunda derivada fue de 19 cm^{-1} , y de 15 cm^{-1} para el modelo del Horiba). Finalmente queda comparar los modelos Raman con los obtenidos por infrarrojo cercano. El modelo NIR por reflectancia difusa requirió 5 factores a pesar del elevado porcentaje de irradiación de los distintos tipos de tabletas. Entonces aquí la justificación podría estar relacionada con la considerablemente menor selectividad del NIR en comparación a la espectroscopía Raman. Tomando en cuenta que las tabletas analizadas contienen únicamente un 2 % p/p de API, no parece extraño que el modelo requiera más factores. Incluso con 5 factores, la varianza explicada en Y llega al 96.6 %, un valor "bajo" respecto a lo explicado por Raman independientemente de la geometría del instrumento. El modelo NIR por transmitancia es más sencillo, lo cual tiene sentido considerando el intervalo tan estrecho con el cual se obtuvo el modelo. Como se mencionó anteriormente no era posible usar este intervalo para el modo reflectancia difusa dado el mayor ruido que presentaban los espectros en esta zona.

Por otro lado el Sintrom 4 representó el reto mayor respecto a la obtención de los modelos de calibración, considerando el menor porcentaje en peso que contienen estas tabletas. No

obstante, como se demostró en el estudio del Capítulo 7, la eficiencia de cierta estrategia de medición de los comprimidos depende de la distribución y porcentaje de partículas de cada tipo que esté presente en la mezcla heterogénea bajo estudio, y no del porcentaje en peso que es el número más accesible previo al análisis. Se usaron distintas estrategias de medición de espectros, tomando en cuenta la mayor superficie disponible para irradiar en estas tabletas y el factor tiempo de registro, el cual en todas las mediciones se procuró que no superase los 5 min por espectro. Lo más destacable es que, dicho en palabras sencillas, todos los modelos Raman son igual de buenos, indistintamente de la geometría del instrumento y volumen muestreado. Para el instrumento Kaiser se generaron 3 modelos, y no sorprende que todos requieran la misma cantidad de factores si estos contienen mayoritariamente tabletas de 13.4 mm, las cuales para los 3 modelos se irradiaron con un haz de 13 mm, por lo que el porcentaje irradiado es sumamente alto. Pero luego a la izquierda tenemos el modelo para el MultiRAM, donde el porcentaje irradiado es muchísimo menor en las tabletas comerciales y preparadas en el laboratorio. La causa podría estar entonces en la calidad de las tabletas, respecto al tamaño de partícula adecuado del API y su homogenización en la tableta. Si el material bajo estudio se ha preparado adecuadamente, los pretratamientos espectrales sí que sirven para eliminar variaciones no deseables en los espectros del conjunto de calibración y en los de las muestras que se quieren cuantificar. Tales variaciones incluyen fluctuaciones en la intensidad de la radiación de irradiación, cambios en la línea base y efectos relacionados con el tamaño de partícula o su morfología, o incluso cierta detección del orden en el cual se registraron las tabletas como se mostró en el PCA de la Figura 8.13 para las tabletas de Sintrom 4 en el MultiRAM. Se puede decir que estos efectos se han eliminado de los espectros adquiridos, y los errores de muestreo son evidentemente bajos. No obstante debe recordarse que en los resultados para el Sintrom 4 en modo retrodispersión, se vio que las predicciones no eran buenas si para un mismo modelo, se decide predecir tabletas usando únicamente los espectros de una de las caras irradiadas. Esto podría deberse a dos motivos: por un lado, evidentemente el usar solo los espectros de una de las caras implica un menor volumen muestreado que si se incluyen las dos caras, o que esto no tenga que ver con muestreo sino a diferencias entre las caras de las tabletas. Aquí debe recordarse que las tabletas comerciales de Sintrom 4 tienen casi el doble de espesor que las equivalentes del Sintrom 1. Al respecto se vio que en los espectros se detecta una mayor cantidad de API si se irradia la cara marcada con la cruz que la cara CG. Esto se detectó para las tabletas comerciales de Sintrom 4, pero respecto a las de Sintrom 1 no se puede decir con seguridad si esto ocurre o no, dado que es altamente probable que se haya muestreado todo el grosor de estas tabletas, por lo que no se detectan diferencias entre las

caras. Finalmente se puede hacer un comentario respecto a las diferencias en los modelos de los Raman por transmisión para el Sintrom 1 y Sintrom 4. En el caso del Horiba los dos modelos requieren 3 factores, pero con el Cobalt el modelo del Sintrom 1 requirió un factor más y el del Sintrom 4 uno menos; en el caso del primero debe recordarse que se usaron dos ópticas para la recolección de la radiación, mientras que en el segundo se usó el lente recolector más grande que permite configurar el TRS100. Esto podría justificar la diferencia entre el número de factores en estos modelos, considerando que el diámetro de irradiación es prácticamente el mismo.

8.6 Conclusiones

La determinación no destructiva del contenido de API en tabletas de Sintrom 1 y Sintrom 4 mediante espectroscopía Raman y espectroscopía NIR es plenamente viable. Diferentes estrategias para la irradiación de la muestra y posterior recolección de la radiación de interés fueron probadas, variando el volumen muestreado y en todos los diseños probados fue posible predecir el porcentaje de activo sin diferencia significativa respecto a los valores de referencia. Esto habla bien de la calidad de los productos analizados, respecto al adecuado control del tamaño de partícula del API y los excipientes que se refleja en los productos terminados, pero que seguramente es producto también de la verificación de la homogeneidad de la mezcla multicomponente antes de la compactación. Para el diámetro de irradiación más pequeño, siguiendo un razonamiento meramente intuitivo se comprobó que es necesario adquirir espectros en más de una posición de la superficie; luego para diámetros de irradiación más grandes también puede hacerse el análisis no destructivo a partir de un único espectro, sin riesgos de que el espectro no provenga de un espécimen sino que se deba a una muestra lo suficientemente representativa del total que constituyen los lotes estudiados (cada tableta individual completa). Por otro lado los pretratamientos espectrales aplicados cumplen con el fin de mantener la información pero eliminando diferencias que no son de interés, por ejemplo, las distintas pendientes que presentan los espectros individuales adquiridos. Se trata de algo que no es repetible entre muestras, pero que luego de aplicar las correcciones de línea base del Unscrambler o una derivada se hace desaparecer de los datos. Incluso en el caso de los modelos para el equipo MultiRAM fue posible obtener modelos y predicciones adecuadas únicamente aplicando una normalización. En todo caso, la apariencia de los espectros crudos era distinta entre los distintos instrumentos, lo cual requiere el uso de uno u otro intervalo espectral y

combinación de pretratamientos espectrales, a pesar de que se usaron 4 espectrómetros Raman.

8.7 Referencias

- (1) Sandell, D.; Tougas, T. *Stat. Biopharm. Res.* **2012**, *4* (2), 125–135.
- (2) Tamargo, J.; Le Heuzey, J.-Y.; Mabo, P. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71* (5), 549–567.
- (3) Navarro, J. L.; Cesar, J. M.; Fernández, M. A.; Fontcuberta, J.; Reverter, J. C.; Gol-Freixa, J. *Rev. Española Cardiol.* **2007**, *60* (12), 1226–1232.
- (4) Cesar, J. M.; García-Avello, A.; Navarro, J. L.; Herraiez, M. V. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2004**, *15* (8), 673–676.
- (5) Javier Roncalés, F. *Med. Clin. (Barc).* **2008**, *131* (3), 98–100.
- (6) Roncalés, J. *Med. Clin. (Barc).* **2005**, *124* (9), 338–340.
- (7) Ansell, J.; Hirsh, J.; Hylek, E.; Jacobson, A.; Crowther, M.; Palareti, G. *Chest* **2008**, *133* (6), 160S–198S.
- (8) Merus Labs - 2014 Press Releases <http://www.meruslabs.com/2014.html> (accessed May 27, 2017).
- (9) Gómez, D. A.; Coello, J.; Maspoch, S. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *124*, 207–215.
- (10) *Ficha Técnica Sintrom 1 mg comprimidos, Sintrom 4 mg comprimidos. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Setiembre de 2011.*
- (11) *Ficha Técnica Sintrom 1 mg comprimidos, Sintrom 4 mg comprimidos. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Noviembre de 2014.*
- (12) Johansson, J.; Sparén, A.; Svensson, O.; Folestad, S.; Claybourn, M. *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61* (11), 1211–1218.
- (13) Quinzler, R.; Gasse, C.; Schneider, A.; Kaufmann-Kolle, P.; Szecsenyi, J.; Haefeli, W. E. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2006**, *62* (12), 1065–1073.
- (14) Verrue, C.; Mehuys, E.; Boussery, K.; Remon, J.-P.; Petrovic, M. *J. Adv. Nurs.* **2011**, *67* (1), 26–32.
- (15) Elliott, I.; Mayxay, M.; Yeuichaixong, S.; Lee, S. J.; Newton, P. N. *Trop. Med. Int. Heal.* **2014**, *19* (7), 754–760.
- (16) Hill, S.; Varker, A. S.; Karlage, K.; Myrdal, P. B. *J. Manag. Care Pharm.* **2009**, *15* (3), 253–261.
- (17) Smajić, M.; Vujić, Z.; Mulavdić, N.; Brborić, J. *Chromatographia* **2013**, *76* (7–8), 419–425.

- (18) Mohammadi, A.; Rezanour, N.; Ansari Dogaheh, M.; Ghorbani Bidkorbeh, F.; Hashem, M.; Walker, R. B. *J. Chromatogr. B* **2007**, *846* (1), 215–221.
- (19) Zhao, N.; Zidan, A.; Tawakkul, M.; Sayeed, V. A.; Khan, M. *Int. J. Pharm.* **2010**, *401* (1), 25–31.
- (20) Palou, A.; Cruz, J.; Blanco, M.; Tomàs, J.; de los Ríos, J.; Alcalà, M. *J. Pharm. Anal.* **2012**, *2* (2), 90–97.
- (21) Mantanus, J.; Ziémons, E.; Lebrun, P.; Rozet, E.; Klinkenberg, R.; Streel, B.; Evrard, B.; Hubert, P. *Talanta* **2010**, *80* (5), 1750–1757.
- (22) Arruabarrena, J.; Coello, J.; MasPOCH, S. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465* (1), 299–305.
- (23) Townshend, N.; Nordon, A.; Littlejohn, D.; Myrick, M.; Andrews, J.; Dallin, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4671–4676.
- (24) Kim, J.; Noh, J.; Chung, H.; Woo, Y.-A.; Kemper, M. S.; Lee, Y. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598* (2), 280–285.
- (25) Farkas, A.; Vajna, B.; SÓti, P. L.; Nagy, Z. K.; Pataki, H.; Van der Gucht, F.; Marosi, G. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46* (6), 566–576.
- (26) Firkala, T.; Farkas, A.; Vajna, B.; Farkas, I.; Marosi, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *76*, 145–151.
- (27) Vankeirsbilck, T.; Vercauteren, A.; Baeyens, W.; Van der Weken, G.; Verpoort, F.; Vergote, G.; Remon, J. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21* (12), 869–877.
- (28) Thermo Scientific. Technology Comparison: FTIR, NIR, And Raman For Raw Material Inspection <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/ftir-nir-raman-for-raw-material-inspection-0002> (accessed May 27, 2017).
- (29) Reich, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (8), 1109–1143.
- (30) Raman Lecture. Department of Chemistry. University of Crete http://www.chemistry.uoc.gr/courses/suprachem/spectroscopies/1_Raman/2-Raman_Lecture19_clh_class.ppt.
- (31) Shin, K.; Chung, H. *Analyst* **2013**, *138* (12), 3335.
- (32) Li, B.; Calvet, A.; Casamayou-Boucau, Y.; Morris, C.; Ryder, A. G. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (6), 3419–3428.
- (33) *Nota técnica. PhAT System Analyzer. Kaiser Optical Systems, Inc.*
- (34) Wikström, H.; Lewis, I. R.; Taylor, L. S. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59* (7), 934–941.
- (35) Fransson, M.; Johansson, J.; Sparén, A.; Svensson, O. *J. Chemom.* **2010**, *24* (11–12), 674–680.
- (36) Adar, F.; Lee, E. Transmission Raman: A Method for Quantifying Bulk Materials

<http://www.spectroscopyonline.com/transmission-raman-method-quantifying-bulk-materials?id=&sk=&date=&pageID=2> (accessed May 28, 2017).

- (37) Griffen, J. A.; Owen, A. W.; Matousek, P.; Svensson, O.; Hammond, S. V.; Matousek, P.; Matousek, P. *Analyst* **2015**, *140* (1), 107–112.
- (38) *Cobalt Application Note CAN022-1-EN. Beam Enhancer Technology for High-Speed Transmission Raman Spectroscopy.*
- (39) Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; Pou, N. *Analyst* **2001**, *126* (7), 1129–1134.
- (40) De Orsi, D.; Gagliardi, L.; Turchetto, L.; Tonelli, D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17* (4–5), 891–895.
- (41) Blanco, M.; Coello, J.; Eustaquio, A.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392* (2), 237–246.
- (42) Alcalà, M.; Roperó, J.; Vázquez, R.; Romáach, R. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (8), 2747–2758.
- (43) Dumas, A.; Mizrahi, M.; Martin, F.; Requejo, F. G. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (11), 5451–5463.
- (44) Wikström, H.; Lewis, I. R.; Taylor, L. S. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59* (7), 934–941.

CAPÍTULO 9

EVALUACIÓN DE LA UNIFORMIDAD DE LAS UNIDADES DE DOSIFICACIÓN EN LOS COMPRIMIDOS DE SINTROM 1 Y SINTROM 4

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE API EN LAS MITADES Y CUARTOS DE LOS COMPRIMIDOS DE SINTROM 4 POR ESPECTROSCOPÍA RAMAN

9.1 *Introducción*

La demostración de que un lote de producción tiene la calidad adecuada se hace mediante la verificación del cumplimiento de la especificación del producto. Es común que varias de las pruebas en una especificación se refieran a metodologías establecidas por las farmacopeas, y a ciertos criterios de aceptación estipulados en ellas. Una de estas pruebas es la evaluación de la Uniformidad de las Unidades de Dosificación (abreviado UDU), la cual se encuentra armonizada entre las Farmacopeas Europea (-EP por sus siglas en inglés, capítulo general 2.9.40) y la de Estados Unidos (-USP por sus siglas en inglés, capítulo general 905).

Esta prueba se usa con el fin de asegurar la consistencia de las unidades de dosis, y para esto cada unidad en un lote debe tener un contenido de la sustancia activa en un rango estrecho alrededor del valor declarado en la etiqueta. Evidentemente se trata de una propiedad crítica de un lote de determinado medicamento. Además de esta prueba, la Farmacopea Europea aún incluye dos capítulos anteriores, 2.9.5 Uniformidad de masa de las preparaciones de dosis individual y 2.9.6 Uniformidad de contenido de las preparaciones de dosis individual (Uniformidad de Contenido, prueba CU por sus siglas en inglés), los cuales aún aplican para medicamentos que fueron aprobados antes de la introducción de la prueba UDU. Se considera que la prueba UDU es superior a la CU dado

que tanto los lotes aceptados como los rechazados son examinados con más precisión usando la prueba más reciente.

Por otro lado, la división de comprimidos es una práctica bastante común considerada por pacientes y médicos. Existen diversos motivos por los que se recurre a esto, los cuales incluyen aumentar la flexibilidad de la dosis, facilitar la deglución y el ahorro en costos para pacientes y los sistemas de salud. A pesar de que es una práctica ampliamente extendida, en diversos estudios se ha resaltado lo delicado del acto de división. Por ejemplo, las tabletas divididas pueden estar sujetas a una mayor fragmentación y friabilidad, y también se han reportado fluctuaciones significativas en la uniformidad de masa de las mitades de tableta, lo cual hace más amplia la variabilidad en la dosis cuando se usan fracciones de tableta respecto al caso de suministrar únicamente comprimidos completos.

La división de comprimidos se ha abordado en diversas ocasiones en los estándares de las farmacopeas, así como por parte de agencias regulatorias y de manera especial por la FDA. La Tabla 9.1 resume el estado actual de las pruebas requeridas y propuestas relacionadas con la uniformidad de contenido del API, según la última edición de la Farmacopea Europea y de Estados Unidos, y por parte de la FDA, siendo la FDA la última entidad que propuso una guía que trata exclusivamente sobre la verificación de los comprimidos ranurados, la cual está dirigida a la industria farmacéutica. La principal idea de esta propuesta es que cada porción dividida de una tableta completa debe considerarse una unidad de dosis, por lo que debe cumplir con lo establecido por la prueba UDU.

Como parte de este trabajo se determinó la uniformidad de contenido, y la variación de masa, de los fragmentos en los que se pueden dividir los comprimidos de Sintrom 4, que son los que tienen una ranura grabada y de los cuales actualmente en su ficha técnica se menciona que solo sirve para facilitar la deglución pero no para dividir en dosis iguales. Tal como se dijo en el capítulo anterior, esta aclaración no estaba incluida en la ficha técnica de los comprimidos analizados para el trabajo que está publicado como parte de esta tesis, pero lo cierto es que la división de los comprimidos de Sintrom 4 sigue siendo un hábito común, ya sea a mano o usando un cortador de tabletas. No obstante en la práctica también se realiza la división de comprimidos que no contienen ninguna ranura. Recientemente la FDA publicó un estudio sobre la aplicación de la guía publicada por ellos para la determinación de la uniformidad de dosis de tabletas con y sin ranuras; las primeras tienen un contenido de API muy elevado y tanto los comprimidos completos como luego de dividir (a mano y usando dos cortadores de tableta) pasan la prueba UDU

Tabla 9.1 Resumen de las pruebas para evaluar el contenido de API y la variación de masa en tabletas completas y sus fracciones, de acuerdo a la EP, USP y FDA. Se ha dado énfasis a lo que es requerido para comprimidos de baja dosificación, que es la categoría a la cual pertenece el Sintrom 1 y Sintrom 4.

Tableta completa	Porción de tableta
<p><i>Uniformidad de las Unidades de Dosificación (UDU, incluida en la EP y USP):</i> Se divide en dos pruebas (uniformidad de contenido o variación de masa), dependiendo del contenido de API (umbral: 25 mg o 25 % p/p). Incluye un término relacionado con el contenido nominal del medicamento. Se calcula un valor de aceptación (AV por sus siglas en inglés).</p>	<p>Actualmente no hay pruebas en la EP ni en la USP para la verificación de la uniformidad de contenido en las porciones de una tableta, que deba realizarse como prueba de rutina. En el año 2013 la FDA publicó una guía para la industria en la cual se propone la aplicación de la prueba UDU: cada porción de una tableta se considera una nueva unidad de dosis, y todas deben evaluarse. Esto es distinto a la prueba incluida en la EP sobre la evaluación de la subdivisión de tabletas (ver abajo), para la cual solo se toma uno de los fragmentos en los que se divide la tableta y el resto son descartados.</p>
<p><i>Uniformidad de contenido de las preparaciones de dosis individual (incluida en la EP):</i> Es una prueba anterior a la UDU, y es requerida para productos que contienen menos de 2 mg o 2 % p/p de API. Se estima la desviación respecto al valor promedio de las 10 unidades analizadas que pertenecen a un lote. No se toma en cuenta el valor nominal del medicamento.</p>	<p><i>Prueba de subdivisión de tabletas (incluida en la EP):</i> La calidad de la división debe evaluarse para determinar la uniformidad en la masa de las porciones del comprimido. Se determina la desviación respecto al valor promedio de la fracción en el lote analizado.</p>
<p><i>Uniformidad de masa de las preparaciones de dosis individual (incluida en la EP):</i> No se requiere si se realiza la prueba de Uniformidad de contenido.</p>	<p><i>Determinación de la pérdida de masa (incluida en la guía de la FDA de 2013):</i> La pérdida debe ser inferior al 3 % cuando se dividen los comprimidos.</p>

(se analizaron comprimidos de 6 fabricantes), mientras que las segundas se dividieron usando dos cortadores de tableta y ninguno de los 5 fabricantes analizados pasó la prueba considerando fragmentos de tabletas (sí aprobaban para el caso de tabletas completas). En este trabajo se analizaron distintos fabricantes de cada producto porque la guía de la FDA menciona que las propiedades de división de los medicamentos genéricos debe ser igual al del medicamento de referencia. No está de más mencionar que los análisis del contenido de API se hicieron por HPLC. Finalmente respecto a la división de los comprimidos de

Sintrom 1, en la literatura se menciona la fragmentación de estos comprimidos, e incluso la obtención de octavos de tableta de Sintrom 4, aunque se reconoce lo difícil que puede ser esto para un adulto mayor (los cuales son los principales usuarios del Sintrom).

En este capítulo se presentan los resultados de la verificación de los lotes de Sintrom 1 y Sintrom 4 analizados mediante técnicas espectroscópicas al aplicar las pruebas de las Farmacopeas, así como de la evaluación de las mitades y cuartos de tableta de Sintrom 4 que se pueden obtener luego de su fraccionamiento, esto último siguiendo la guía publicada por la FDA en el año 2013. Para las tabletas completas se dispone de los datos obtenidos por HPLC y por espectroscopía Raman y NIR, de los cuales se demostró en el capítulo anterior que no difieren significativamente entre ellos (valores de referencia versus cada técnica espectroscópica). Respecto a la evaluación de las mitades y cuartos de tableta de Sintrom 4, se presentará una comparación entre las mediciones con el equipo MultiRAM, y el equipo Kaiser con una sonda PhAT usando el lente que permite una irradiación de 3 mm (equipos en los que se registran los espectros en modo retrodispersión). Para el primero dado que siempre se marcaron las posiciones de mapeo siguiendo el mismo patrón, es fácil saber cuales 3 espectros pertenecen a cada uno de los 4 cuartos; mientras que para el equipo Kaiser se "reutilizaron" los espectros de la Estrategia 2 del capítulo anterior (es decir, cuando se irradió cada uno de los 4 cuartos de las tabletas comerciales de Sintrom 4). Al hacer la evaluación de las posibles fracciones de tableta mediante espectroscopía Raman, y recordando que los espectros provienen de un volumen muestreado en el interior de la tableta, es fundamental asegurarse que la cuantificación de una de las mitades no recoge información de la otra mitad, o que al hacer lo mismo para un cuarto de tableta, no se están muestreando los cuartos vecinos. Para esto se hicieron pruebas adicionales midiendo un conjunto de tabletas comerciales de Sintrom 4 antes y después de dividir, y los resultados de estas mediciones se mostrarán en apartados posteriores.

9.2 *Materiales y métodos*

El detalle de las muestras analizadas y condiciones de registro de los espectros se presentaron en el capítulo anterior. Las únicas mediciones adicionales que se realizaron corresponden a las tabletas cuantificadas con los instrumentos retrodispersivos antes y después de dividir a mano, a continuación se explica brevemente en qué consistió este experimento.

9.2.1 Pruebas para la determinación del efecto de la dispersión de la radiación en el interior de los comprimidos de Sintrom 4

Se tomaron 10 tabletas adicionales de las cajas correspondientes al lote 3, de las cuales se registraron espectros por la cara AA con el equipo MultiRAM y con la sonda PhAT y el lente 3 mm de irradiación, con este último irradiando cada cuarto de tableta y también en el centro de la superficie. Este grupo de tabletas se manipuló con especial cuidado, ya que era de interés seguir en todo momento de cual cuarto de tableta se estaba registrando el espectro; se tomó la masa de las tabletas completas y se procedió a su división a mano. Seguidamente se midió la masa de cada cuarto y se registró un espectro en cada cuarto de tableta dividida. Para estas mediciones era de interés comparar los espectros antes y después de dividir, y si hay diferencias significativas en los valores predichos en los cuartos de tableta, por lo que los fragmentos no se procesaron por HPLC.

9.3 Resultados y discusión

9.3.1 Aplicación de la prueba UDU a los lotes analizados de Sintrom 1 y Sintrom 4

La Uniformidad de las Unidades de Dosificación (UDU) se define como el nivel de uniformidad en la cantidad de la sustancia activa entre las unidades de dosificación. Evidentemente cada unidad en un lote debe tener un contenido de API en un intervalo estrecho alrededor del valor nominal; por tanto hay dos aspectos que deben considerarse: la proximidad del valor promedio del lote al valor declarado en la etiqueta, y las diferencias entre unidades de dosificación (en este caso, entre comprimidos de un mismo lote). Estos conceptos se expresan matemáticamente mediante el cálculo del Valor de Aceptación (AV por sus siglas en inglés), el cual se define como:

$$AV = |M - X| + ks \quad (9.1)$$

donde

X es el valor promedio del porcentaje declarado en la etiqueta de las unidades analizadas.

$M = 98.5\%$ si $X < 98.5\%$, $M = X$ si $98.5\% \leq X \leq 101.5\%$, y $M = 101.5\%$ si $X > 101.5\%$.

s es la desviación estándar del valor promedio del porcentaje declarado en la etiqueta.

k es la constante de aceptabilidad, $k = 2.4$ para 10 unidades.

Y el AV máximo para pasar la prueba es de 15.0.

Como primer paso para la aplicación de la prueba UDU debe hacerse la conversión de los porcentajes en peso de los valores de referencia, y los valores predichos por técnicas espectroscópicas, a miligramos de ingrediente activo por comprimido. Estos valores se muestran en la Tabla 9.2. Con los datos de las Tablas 8.12 y 9.2 se puede calcular un valor de RSD % para cada lote en cada instrumento, usando las unidades en las que se reportan los resultados en cada tabla. La comparación de los valores predichos por los distintos modelos respecto a los valores de referencia se hace usando porcentajes en masa, dado que lo que interesa es comparar la precisión de los distintos métodos. Luego en la prueba UDU se evalúa qué tan distintos son los valores encontrados para las tabletas analizadas, respecto al valor nominal del medicamento (los miligramos de API en cada comprimido). Y se observa que hay un incremento considerable en el RSD % cuando se usan los datos de mg/tableta, el cual es 4 veces mayor respecto a los valores usando % p/p para el Sintrom 1, y aproximadamente 1.5 veces más grande usando los datos para el Sintrom 4. El aumento en los RSD % se debe al aporte que hace la variabilidad en la masa de los comprimidos sobre el error total. La variabilidad en las masas es relativamente similar para ambos tipos de comprimidos (un 1.2 %, y 1.7 %, usando para el cálculo todos los comprimidos comerciales de todos los lotes analizados de Sintrom 1 y Sintrom 4,

Tabla 9.2 Valores de referencia de los lotes analizados de Sintrom 1 y Sintrom 4, y las predicciones correspondientes obtenidas por espectroscopía Raman y NIR, expresados en mg de API/comprimido

<i>Sintrom 1 / 1 mg de acenocumarol por comprimido</i>																
LOTE	HPLC		Raman										NIR			
			Retrodispersión						Transmisión				Retrodispersión		Transmisión	
			MultiRAM		Kaiser				Horiba		Cobalt					
					Estrategia 1		Estrategia 2									
Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	
1	0.96	0.02	Set calibración		0.97	0.02	0.96	0.02	0.96	0.02	Set calibración		0.96	0.04	0.96	0.02
2	0.97	0.01	0.98	0.02	Set calibración		0.97	0.02	0.97	0.02	0.97	0.02	0.96	0.02	0.96	0.02
3	0.97	0.02	0.97	0.02	0.97	0.02	Set calibración		Set calibración		0.97	0.02	0.98	0.02	Set calibración	
4	0.94	0.02	0.94	0.02	0.93	0.03	0.94	0.03	0.94	0.03	0.94	0.02	Set calibración		0.95	0.02
5	0.96	0.02	0.96	0.02	0.96	0.03	0.97	0.02	0.96	0.02	0.95	0.02	Set calibración		0.97	0.03
6	0.96	0.02	Set calibración		Set calibración		Set calibración		Set calibración		Set calibración		0.97	0.01	Set calibración	

<i>Sintrom 4 / 4 mg de acenocumarol por comprimido</i>														
LOTE	HPLC		Raman por retrodispersión								Raman por transmisión			
			MultiRAM		Kaiser						Horiba		Cobalt	
					Estrategia 1		Estrategia 2		Estrategia 3					
			Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
1	3.92	0.04	Set calibración		3.93	0.05	Set calibración		3.94	0.12	Set calibración		3.93	0.09
2	3.95	0.11	3.90	0.15	Set calibración		3.96	0.13	Set calibración		3.96	0.12	Set calibración	
3	3.93	0.12	Set calibración		3.92	0.06	Set calibración		3.93	0.05	3.94	0.05	Set calibración	
4	3.91	0.06	3.95	0.09	Set calibración		3.93	0.06	Set calibración		Set calibración		3.95	0.09
5	3.98	0.06	4.01	0.07	3.97	0.04	4.01	0.06	3.97	0.06	3.98	0.08	3.98	0.08

respectivamente), pero dado que los comprimidos de Sintrom 1 pesan en promedio únicamente 50 mg, el impacto es mucho mayor para los resultados en mg de API/tableta de estos comprimidos, que para los de Sintrom 4 (masa promedio ~550 mg).

Seguidamente siguiendo las indicaciones de la prueba UDU, las cuales son iguales ya sea que se mire la EP o la USP, se puede calcular el AV. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.3, y para estos se usaron los valores de las 12 unidades analizadas de cada lote, a pesar de que el procedimiento de la farmacopea indica que deben analizarse solo 10 unidades del lote en verificación. Como se puede apreciar todos los lotes resultaron en valores de aceptación por debajo de 15, de manera que las unidades que conforman los lotes analizados de Sintrom 1 y Sintrom 4 son uniformes respecto al contenido de ingrediente activo. Dado que anteriormente se demostró que los valores obtenidos por las técnicas espectroscópicas y por HPLC no difieren de forma significativa, la conclusión es la misma indistintamente del método usado para la determinación del contenido de API.

Tabla 9.3 Valores de aceptación para las tabletas completas de Sintrom 1 y Sintrom 4, calculados usando los valores de referencia (HPLC), y los valores predichos por espectroscopía Raman y NIR.

Sintrom 1								
LOTE	Valores de Aceptación							
	HPLC	MultiRAM	Kaiser ESTRATEGIA 1	Kaiser ESTRATEGIA 2	Horiba	Cobalt	NIR Retrodispersión	NIR Transmisión
1	6.4	Set calibración	6.6	6.8	7.6	Set calibración	11.1	7.8
2	5.3	5.1	Set calibración	6.2	6.5	6.1	7.1	5.9
3	6.4	6.7	6.7	Set calibración	Set calibración	6.5	5.8	Set calibración
4	7.9	9.3	12.2	10.5	11.9	9.0	Set calibración	9.6
5	7.5	7.1	8.6	7.9	8.1	8.3	Set calibración	9.6
6	6.7	Set calibración	Set calibración	Set calibración	Set calibración	Set calibración	3.5	Set calibración

Sintrom 4								
LOTE	Valores de Aceptación							
	HPLC	MultiRAM 2 caras (Bloque 1 Tabla 8.5)	MultiRAM sólo cara AA (Bloque 3 Tabla 8.5)	Kaiser ESTRATEGIA 1	Kaiser ESTRATEGIA 2	Kaiser ESTRATEGIA 3	Horiba	Cobalt
1	2.9	Set calibración	Set calibración	3.1	Set calibración	6.9	Set calibración	5.5
2	6.5	9.6	10.6	Set calibración	7.5	Set calibración	7.3	Set calibración
3	7.6	Set calibración	Set calibración	3.7	Set calibración	3.4	3.1	Set calibración
4	4.1	5.6	5.4	Set calibración	4.1	Set calibración	Set calibración	5.7
5	3.5	4.5	7.0	2.6	3.7	3.9	4.8	4.6

↑: Modelos usados para la determinación del contenido de API en las mitades y cuartos de tableta que se pueden obtener luego de su división.

9.3.2 Análisis del contenido de API en los posibles fragmentos de las tabletas de Sintrom 4 por espectroscopía Raman

9.3.2.1 Comparativa de los espectros registrados en el centro, o en los cuartos de las tabletas, usando el mismo diámetro de irradiación

En el capítulo anterior se presentaron modelos, y las predicciones para un conjunto de muestras externo, para los espectros registrados con el equipo Kaiser y la sonda PhAT con la lente de 3 mm acoplada, ya sea irradiando los 4 cuartos de la tableta de Sintrom 4 (Estrategia 2 según la Figura 8.17), o adquiriendo únicamente un espectro en el centro de las dos caras de las tabletas (Estrategia 3). El modelo de la Estrategia 3 se puede rehacer incluyendo sólo los espectros adquiridos en el centro de la cara AA, y a continuación comparar las predicciones que se obtienen con las que resultan de la aplicación de la Estrategia 2 (irradiación de los 4 cuartos, también sólo por la cara AA). Se hizo una prueba t de muestras emparejadas y se vio que la diferencia no es significativa al comparar las predicciones en cada caso (esto únicamente se puede hacer para el lote 5, que es el único lote que se predice en común entre las Estrategias 2 y 3, ver Tablas 8.9 y 8.10).

Como se mencionó en la sección experimental, de 10 tabletas de Sintrom 4 se tomaron diversos espectros antes y después de dividir. Estando completas se registraron espectros usando la iluminación de 3 mm del equipo Kaiser en el centro y en cada cuarto de la cara AA. La Figura 9.1 muestra el espectro promedio para cada posición de irradiación (centro o cuartos), ya sean crudos, luego de las correcciones de línea base del Unscrambler, y luego de las BLC + normalización a vector unidad; y se muestra el gráfico de scores del PC2 vs PC1 obtenido al incluir los espectros pretratados. Los espectros crudos registrados en el centro de la tableta son más intensos que los adquiridos en los cuartos, pero luego de la normalización los espectros se superponen considerablemente. No obstante en un PCA de los espectros pretratados aún es posible distinguirlos según la posición en que se adquirieron. Es evidente entonces que la irradiación ya sea en el centro de las tabletas o en los cuartos, donde en el segundo caso hay una zona alrededor de la posición de irradiación que está relativamente cercana a la interfaz muestra-aire, se refleja en los espectros adquiridos. Esta comparación se hizo para el equipo MultiRAM, pero para la irradiación de 0.5 mm que es posible usando este instrumento no se notó esta diferencia (ver Figura 8.16). Esto es una primera señal de que el riesgo de tomar información de los otros cuartos, al hacer la irradiación sobre uno de ellos, es mayor cuando más grande es el área irradiada.

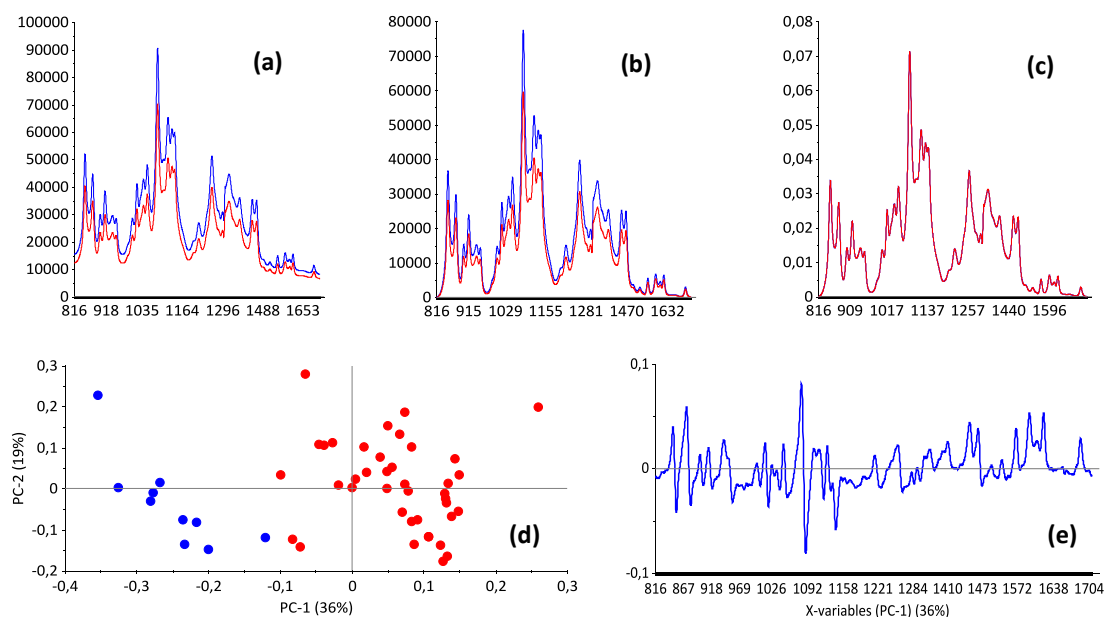


Figura 9.1 Comparación de los espectros promedios registrados en el centro (en azul), y en los cuartos de las tabletas de Sintrom 4 (en rojo), usando el equipo Kaiser con la sonda PhAT y la lente que permite una irradiación de 3 mm. (a) Espectros crudos, (b) Espectros luego de las correcciones de línea base del Unscramber (BLC), (c) Espectros luego de las BLC + normalización a vector unidad (UNorm). En (d) y (e) se muestra el gráfico de scores del PC2 vs PC1, y el loading del PC1, incluyendo los espectros individuales luego de la combinación BLC + UNorm

9.3.2.2 Comparativa de los espectros adquiridos en los cuartos de tableta, antes y después de su división a mano

Los resultados que se muestran en esta sección corresponden al conjunto de tabletas de las cuales se siguió cuidadosamente su registro como comprimido completo, y luego de su división a mano para identificar en todo momento parejas de espectros -cuarto antes y cuarto después- de dividir. Los espectros promedios de los cuartos antes y después de dividir se muestran en la Figura 9.2, y en la Figura 9.3 los gráficos de scores y el loading del PC-1, generados con los espectros luego de la BLC + UNorm. Con los espectros crudos, y luego de las correcciones de línea base, el espectro promedio de los cuartos considerando la tableta completa es más intenso que el de los cuartos luego de la fragmentación. Esto se aprecia tanto para el equipo MultiRAM (Figuras 9.2 a-c) como para el Kaiser (Figuras 9.2 d-f), aunque la diferencia es mayor para el segundo. Luego de la normalización los espectros promedios prácticamente se superponen.

En el PCA de los espectros pretratados del equipo MultiRAM (Figuras 9.3 a-d) se nota cierta agrupación de los cuartos según se irradiaron como tableta completa o luego de pretratar. Se representó la elipse de Hotelling sobre el gráfico de scores, y se procedió a

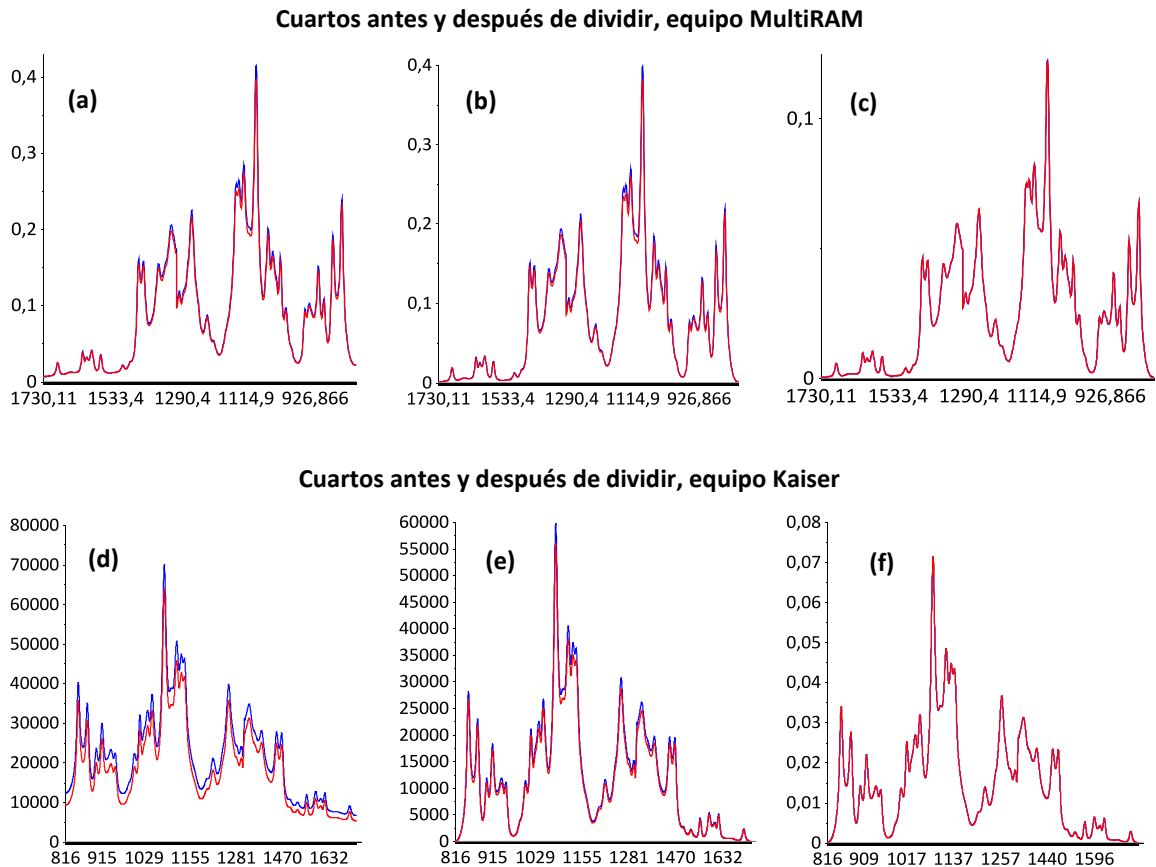


Figura 9.2 Espectro promedio de los cuartos antes (en azul) y después de dividir (en rojo) adquiridos con el equipo MultiRAM y el equipo Kaiser usando una sonda PhAT y la lente para una irradiación de 3 mm. Se muestran los espectros crudos (a,d), luego de las BLC (b,e) y luego de las BLC + UNorm (c-f).

identificar a qué cuarto correspondían los scores fuera de la elipse, y se vio que hay un par de cuartos cuyos espectros promedios aparecen fuera, o muy cerca del área delimitada por la elipse, tanto cuando se considera la tableta completa y luego de dividir (cuartos 6Q1 y 5Q4). En las Figuras 9.3 c-d se repite el PCA quitando los scores que están fuera de la elipse, y como se puede apreciar la mayoría de puntos azules (cuartos usando la tableta completa) están separados de los rojos (cuartos luego de dividir). Lo mismo pero para los espectros adquiridos en el equipo Kaiser se muestra en las Figuras 9.3 e-f. Aquí es mucho más evidente la separación de los cuartos según se registraron antes o después de dividir, y curiosamente aparecen dos cuartos fuera de la elipse, que corresponden al mismo cuarto de tableta antes y después de dividir (nuevamente el cuarto 6Q1).

Se puede hacer una última comparación considerando únicamente los cuartos luego de dividir, seleccionando aquellos que resultaron en masas más distintas. La Figura 9.4 muestra los espectros promedios de los cuartos más y menos pesados, y como se puede apreciar el promedio de los cuartos más pesados (línea azul) es más intenso que el de los

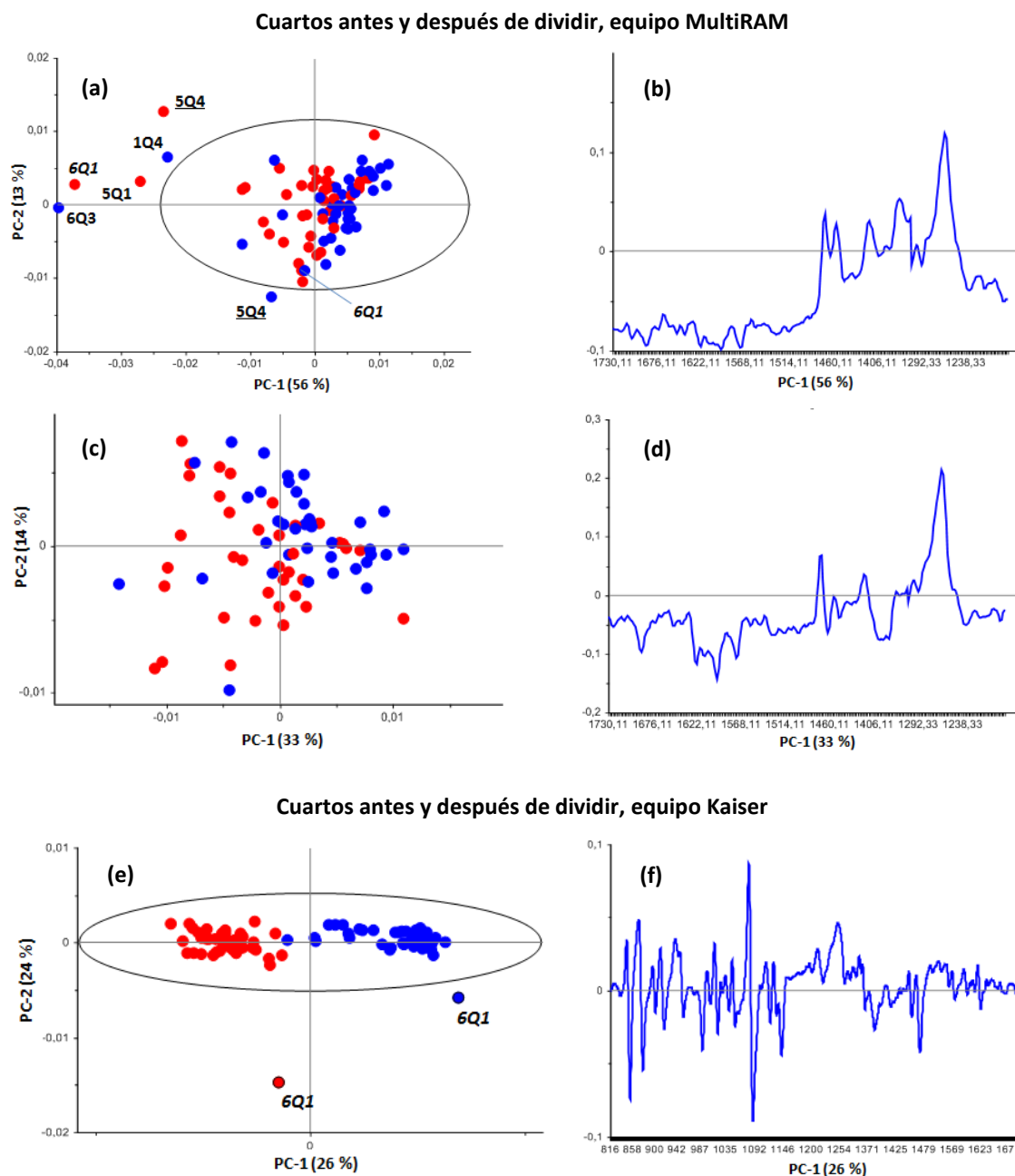
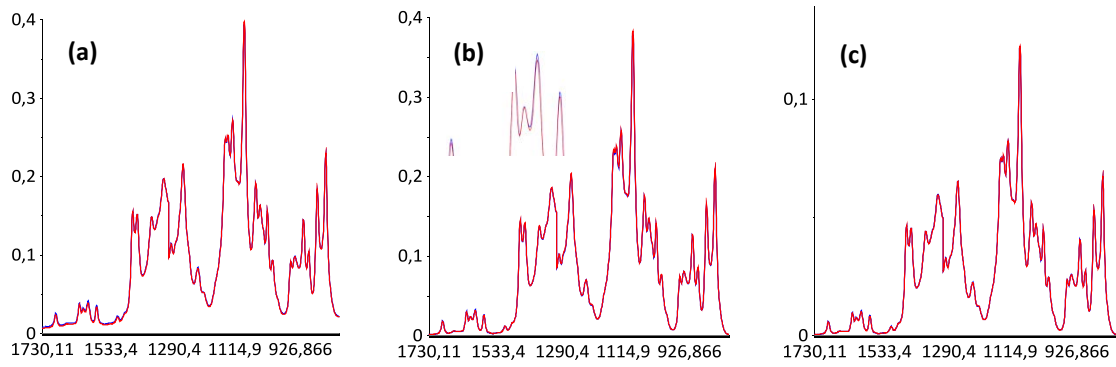


Figura 9.3 Gráficos de scores PC2 vs PC1, de los cuartos de tableta de Sintrom 4 antes (en azul) y después de dividir (en rojo). (a-d) usando los espectros del equipo MultiRAM, para c-d se repitió el PCA removiendo los scores que están fuera de la elipse de Hotelling, (e-f) usando los espectros del equipo Kaiser.

cuartos de menor masa (línea roja). Esto se aprecia incluso luego de las BLC, aunque es más evidente para las mediciones en el equipo Kaiser. No obstante de los PCA incluyendo los espectros de estos cuartos, se puede decir que se hace difícil diferenciar clusters según la masa del cuarto del cual se registraron los espectros (Figura 9.5).

Espectro promedio cuartos más pesados y más livianos, equipo MultiRAM



Espectro promedio cuartos más pesados y más livianos, equipo Kaiser

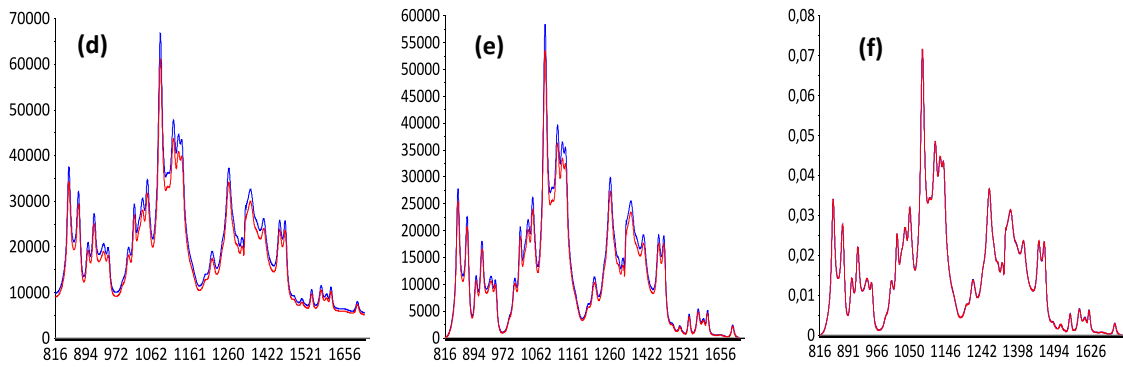


Figura 9.4 Espectro promedio de los cuartos más pesados (en azul) y menos pesados (en rojo) luego de dividir las tabletas, adquiridos con el equipo MultiRAM y el equipo Kaiser usando una sonda PhAT y la lente para una irradiación de 3 mm. Se muestran los espectros crudos (a,d), luego de las BLC (b,e) y luego de las BLC + UNorm (c-f).

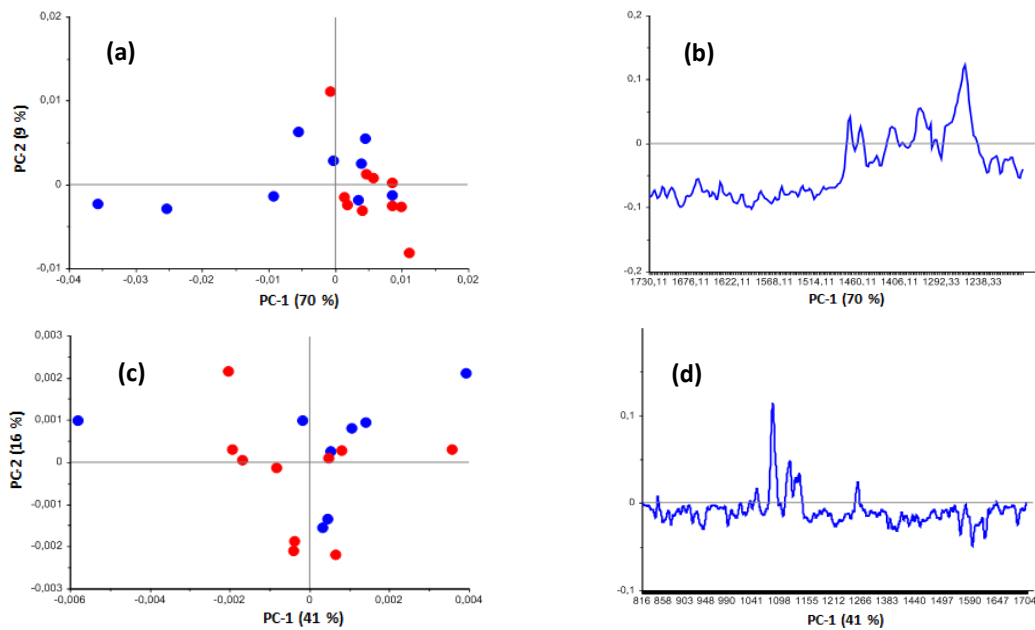


Figura 9.5 Gráficos de scores PC2 vs PC1, de los cuartos de tableta de Sintrom 4 más pesados (en azul) y menos pesados (en rojo). (a-b) usando los espectros del equipo MultiRAM, (c-d) usando los espectros del equipo Kaiser.

9.3.2.3 Cuantificación de los cuartos de tableta de Sintrom 4, antes y después de su división a mano mediante espectroscopía Raman

Habiendo descrito lo que se aprecia a simple vista mediante la superposición de espectros, y lo que revela una herramienta multivariable como es el PCA, queda evaluar qué tan distinto se cuantifican los cuartos de tableta cuando se usan los espectros registrados en los comprimidos completos o los fragmentos divididos. En cada cuarto hay 1 mg de acenocumarol, pero dadas las dimensiones de estas tabletas esta cantidad representa aproximadamente un 0.7 % p/p de API. La Tabla 9.4 muestra el promedio y la desviación estándar para el porcentaje en peso del API en los 40 cuartos analizados antes y después de dividir, y se ha incluido además los resultados en el caso de que estos 40 cuartos se distribuyan en 4 grupos de 10 cuartos, tomando un cuarto de cada tableta. En ninguno de los casos la diferencia en las predicciones antes y después de dividir es significativa luego de aplicar una prueba t de datos emparejados, tanto para el equipo MultiRAM como para el Kaiser. Dado que en este cálculo únicamente se está determinando el porcentaje de API presente en una cuarta parte de la masa total que constituye, es posible considerar los valores de la Tabla 9.4 como el valor predicho con cada instrumento para el comprimido completo, siguiendo la "extraña" estrategia de adquirir el(los) espectro(s) solo en un cuarto de tableta. Recordando que las 10 tabletas usadas para este experimento pertenecen al lote 3, y que el valor de referencia para este lote es de 0.702 % p/p (Tabla 8.12). considerando el equipo Kaiser los resultados obtenidos para estas tabletas son bastante coherentes, mientras que con el equipo MultiRAM la media de los 40 cuartos es un poco menor, pero eso sí hay mucha variación dependiendo del cuarto usado en la cuantificación. El experimento con el equipo Kaiser se asemeja a la Estrategia 3 según la Figura 8.17, sólo que usando únicamente el espectro de la cara AA, y desplazando la

Tabla 9.4 Valores predichos (en % p/p) para los cuartos de las 10 tabletas de Sintrom 4 de las cuales se registraron espectros antes y después de dividir a mano. Para las predicciones del equipo MultiRAM se usó el modelo del bloque 3 de la Tabla 8.5, mientras que los valores del equipo Kaiser corresponden al modelo de la Estrategia 2 de esta instrumento (Figura 8.17)

		Equipo MultiRAM				Equipo Kaiser			
		Antes de dividir		Después de dividir		Antes de dividir		Después de dividir	
		Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
40 cuartos		0.696	0.033	0.689	0.029	0.701	0.014	0.700	0.026
4 grupos de 10 cuartos	Grupo 1	0.685	0.021	0.693	0.037	0.704	0.023	0.709	0.051
	Grupo 2	0.689	0.024	0.695	0.022	0.702	0.009	0.698	0.011
	Grupo 3	0.699	0.039	0.685	0.028	0.702	0.009	0.700	0.010
	Grupo 4	0.710	0.043	0.682	0.027	0.697	0.010	0.693	0.009

posición de irradiación a uno de los cuartos de tableta; y en el caso del equipo MultiRAM lo que se está haciendo es cuantificar la tableta completa a partir del promedio de sólo 3 espectros, cada uno adquirido al irradiar con un haz de sólo 0.5 mm de diámetro.

Dado que no se dispone de valor de referencia para las 10 tabletas con las que se generó la Tabla 9.4, se hicieron pruebas t de datos emparejados para:

- Los valores predichos irradiando solo un cuarto de tableta vs los valores de referencia para el HPLC, esto para los lotes 2, 4 y 5 tanto en el caso del equipo MultiRAM (usando el modelo del bloque 3 de la Tabla 8.5, dado que todo este estudio solo tiene que ver con la cara AA de las tabletas), como para el equipo Kaiser (Estrategia 2 según la Figura 8.17, usando el modelo del bloque 1 de la Tabla 8.9).

- Los valores predichos irradiando usando solo un cuarto de tableta vs los valores predichos cuando se irradian los 4 cuartos de tableta.

Y en ninguno de los casos la diferencia es significativa, por lo que aparentemente la "estrategia extraña" de adquirir espectro(s) sólo en uno de los cuartos de tableta, sirve para obtener predicciones cuya diferencia es pequeña respecto al valor del HPLC, y al valor que se predice al usar los espectros de los 4 cuartos. Se procedió a aplicar la prueba UDU a los valores predichos mediante esta estrategia y los valores de aceptación que resultan se muestran en la Tabla 9.5. En el caso de las predicciones del equipo Kaiser todos los AV están por debajo de 15, por lo que a pesar de estar haciendo la cuantificación irradiando en una posición relativamente extraña (al menos no es la más intuitiva si se quiere adquirir un único espectro y el haz de irradiación tiene un diámetro de 3 mm), la conclusión respecto a la uniformidad de contenido de los lotes es la misma que se reportó en la Tabla 9.3 para otras estrategias de adquisición "más lógicas". Pero por otro lado, según las mediciones con el equipo MultiRAM y dependiendo del cuarto con el cual se haga la cuantificación, los lotes 2 y 5 no pasarían la primera parte de la prueba, que es la que se

Tabla 9.5 Valores de aceptación para las 4 posibles combinaciones de los cuartos de las tabletas de Sintrom 4, con el fin de evaluar el contenido del API en los comprimidos completos. En el caso del equipo MultiRAM, cada cuarto de tableta corresponde al promedio de 3 espectros.

	Valores de aceptación, registro de los cuartos con el equipo MultiRAM						Valores de aceptación, registro de los cuartos con el equipo Kaiser			
	Grupo 1 de cuartos	Grupo 2 de cuartos	Grupo 3 de cuartos	Grupo 4 de cuartos			Grupo 1 de cuartos	Grupo 2 de cuartos	Grupo 3 de cuartos	Grupo 4 de cuartos
B2	10.7	13.0	14.7	17.7		B2	11.9	8.9	8.0	6.5
B4	7.8	10.1	9.6	7.4		B4	4.4	5.8	4.6	6.3
B5	15.3	10.4	17.8	10.8		B5	4.7	5.6	6.1	6.7

hace analizando sólo 10 unidades de dosificación. Entonces tendrían que analizarse 20 unidades más de cada lote y repetir el cálculo del AV. Debe mencionarse nuevamente que los resultados de la Tabla 9.3 muestran que los lotes están bien respecto a este atributo crítico de calidad, y entonces el error está en el procedimiento de registro de los espectros. La causa probablemente está en que al considerar hacer un promedio de solo 3 espectros para cuantificar la tableta completa de Sintrom 4, el valor que se predice puede fluctuar mucho dependiendo de la proporción de API o excipientes que se encuentre el haz de 0.5 mm en cada punto de medición. En el capítulo anterior se vio que los valores que se predicen de las tabletas de Sintrom 4 usando espectros individuales pueden variar desde 0.53 hasta 1.18 % p/p (valor nominal 0.7 % p/p), y evidentemente estaremos más cerca del valor real entre más espectros (más posiciones de la superficie) se registren. Se hizo la prueba de predecir las tabletas completas de Sintrom 4 usando un espectro de cada cuarto de la tableta (nuevamente para el equipo MultiRAM). Se probaron 2 combinaciones de 4 espectros, y en uno de los casos las predicciones obtenidas no difirieron significativamente de los valores de referencia pero en el otro sí; para el segundo caso se aplicó la prueba UDU y dos de los 3 lotes resultaron en AV por arriba de 15. Por tanto, la estrategia de registrar un espectro en cada cuarto de las tabletas comerciales de Sintrom 4, tampoco es adecuada para predecir el contenido de API en el comprimido completo.

9.3.2.4 Sensibilidad de la espectroscopía Raman en la irradiación de un cuarto de tableta de Sintrom 4 antes y después de dividir, versus el valor cuantificado antes y después de dividir. ¿Es válido el análisis no destructivo de los posibles fragmentos?

De los resultados presentados en las secciones anteriores, debe sacarse una conclusión respecto a si la espectroscopía Raman es una herramienta válida para evaluar el contenido de API en las posibles mitades o cuartos que se pueden obtener al fraccionar las tabletas, ya sea a mano o usando un cortador de tabletas. En el apartado 9.3.2.1 se mostró que con los espectros adquiridos usando la sonda PhAT, aún luego de las correcciones de línea base y normalización, se agrupan según se hayan adquirido en el centro de la superficie irradiada o sobre alguno de los cuartos. Todo este análisis se hizo con las tabletas intactas. Se presentó también una comparativa incluyendo sólo espectros adquiridos en los comprimidos fragmentados, luego de identificar cuáles eran los cuartos de mayor y menor masa. Aquí en los PCA prácticamente no se nota agrupamiento según la masa del cuarto del cual se adquirieron los espectros (Figura 9.5). Y finalmente la primera parte de la sección 9.3.2.2 compara lo que ocurre en los cuartos antes y después de dividir. En ambos

instrumentos se observa un agrupamiento según los espectros son de la tableta completa o dividida, quedando muy en evidencia para el equipo Kaiser. No obstante en la cuantificación de todos los cuartos que se pueden obtener de las 10 tabletas analizadas antes y después de dividir, se ve que las diferencias en las predicciones no son significativas (Tabla 9.4). En este punto debe recordarse que la división se hizo a mano, aplicando cierta presión sobre ambas caras de la tableta para finalmente lograr romperlas, y como posible causa del agrupamiento observado se propone una deformación a nivel interno de los comprimidos debido a la presión aplicada. Esta presión podría aumentar el número de partículas que son muestreadas en el interior del material, y esto llevaría a la obtención de espectros más intensos que cuando no se ha alterado de ninguna manera la tableta en medición. Dicho lo anterior, a continuación se presenta el análisis cuantitativo para las posibles mitades y cuartos de tableta que se pueden obtener de los comprimidos de Sintrom 4, pero realizado de manera no destructiva.

9.3.2.5 Determinación del contenido de API en las mitades y cuartos de los comprimidos de Sintrom 4 por espectroscopía Raman

La Tabla 9.6 presenta los resultados de la cuantificación del API para las dos maneras en las que se pueden dividir los comprimidos de Sintrom 4 para obtener mitades (tomando la pastilla en posición \oplus , se pueden obtener mitades a lo largo de la línea vertical u horizontal), y los resultados de la aplicación de la prueba UDU a estos fragmentos. Para estos cálculos, la masa que se introduce para pasar de % p/p predicho por Raman a mg de API/mitad es la mitad de la masa registrada para el comprimido completo. Los valores determinados por espectroscopía Raman con ambos instrumentos para las mitades pasan la prueba UDU, aunque es evidente que los AV están más próximos al valor límite en el caso del equipo MultiRAM (las cuantificaciones de estos posibles nuevos comprimidos de 2 mg se hicieron usando 6 espectros en el caso de este instrumento).

Los resultados para la cuantificación en los cuartos de tableta se muestran en la Tabla 9.7. Aquí se puede apreciar que para el equipo Kaiser todos los cuartos de los 3 lotes analizados aprueban la prueba UDU, pero haciendo el análisis usando los 3 espectros por cuarto registrados en el equipo MultiRAM, la conclusión es que algunos grupos de cuartos de los lotes 2 y 5 no pasan la prueba. Los AV reportados en la primera mitad de la Tabla 9.7 son los mismos que se indicaron en la Tabla 9.5 para el caso de la cuantificación de la tableta completa irradiando sólo uno de los cuartos, esto debido a que para los valores de la Tabla 9.7, se asume que cada cuarto pesa exactamente la cuarta parte del comprimido

Tabla 9.6 Contenido promedio (mg de API/mitad) y desviación estándar (n=12) encontrado en las mitades de los comprimidos de Sintrom 4 usando los equipos MultiRAM y Kaiser. Se muestran también los valores de aceptación correspondientes para la prueba UDU.

			Primer grupo de mitades				Segundo grupo de mitades			
			Mitad 1		Mitad 2		Mitad 1		Mitad 2	
Mitades MultiRAM	mg de API / mitad y SD	B2	2.00	0.08	2.02	0.12	2.01	0.09	2.01	0.10
		B4	1.96	0.05	1.99	0.04	1.97	0.06	1.98	0.06
		B5	2.03	0.07	2.02	0.09	2.04	0.10	2.01	0.06
	AV (UDU)	B2	10.0		14.0		11.4		12.0	
		B4	6.7		5.3		6.8		6.7	
		B5	8.7		10.7		12.7		6.6	
Mitades Kaiser	mg de API / mitad y SD	B2	1.99	0.08	1.97	0.05	1.98	0.07	1.97	0.06
		B4	1.95	0.03	1.97	0.04	1.97	0.04	1.96	0.03
		B5	2.01	0.03	2.00	0.04	2.00	0.03	2.01	0.04
	AV (UDU)	B2	9.2		6.5		8.5		7.3	
		B4	4.6		5.0		4.6		4.1	
		B5	4.0		4.4		3.9		4.5	

completo. Y tal como se dijo antes, el motivo de esta diferencia entre instrumentos está en lo deficiente que resulta hacer la cuantificación promediando sólo 3 espectros, adquiridos estos con una irradiación de 0.5 mm. Finalmente en la Tabla 9.7 se han incluido los resultados para la prueba antecesora a la UDU, la prueba de Uniformidad de Contenido de las Preparaciones de Dosis Individual. Un lote supera la primera parte de esta prueba si tomando aleatoriamente 10 unidades de dosificación, todas se encuentran entre el 85 y 115 por ciento del contenido promedio (en esta prueba no se evalúa qué tan desviado está este promedio respecto al valor indicado en la caja del medicamento). Como se puede apreciar en la Tabla 9.7 usando esta prueba ahora todos los cuartos del lote 2 cumplen, pero hay un cuarto en el lote 5 que da por encima del 115 % del valor promedio. Al igual que con la prueba UDU tendrían que analizarse 20 unidades más de este lote, y de las 30 unidades no más de una podría estar fuera de los límites indicados anteriormente (y ninguna fuera del 75-125 %). El que ahora el lote 2 pase esta prueba alternativa de uniformidad no es extraño, por tratarse de una prueba menos exigente que la UDU.

Tabla 9.7 Contenido promedio (mg de API/cuarto) y desviación estándar (n=12) encontrado en los cuartos de los comprimidos de Sintrom 4 usando los equipos MultiRAM y Kaiser. Se muestran también los valores de aceptación correspondientes para la prueba UDU, y el valor mínimo y máximo encontrado al aplicar la prueba de Uniformidad de Contenido de las Preparaciones de Dosis Individual (para aprobar la prueba usando 10 unidades, todos los valores deben estar entre el 85 y 115 %).

		Primer grupo de cuartos		Segundo grupo de cuartos		Tercer grupo de cuartos		Cuarto grupo de cuartos		
Cuartos MultiRAM	mg de API / cuarto y SD	B2	0.99	0.04	1.01	0.05	1.02	0.06	1.00	0.07
		B4	0.97	0.03	0.99	0.04	1.00	0.04	0.99	0.03
		B5	1.02	0.06	1.01	0.04	1.02	0.07	1.00	0.05
	AV (UDU)	B2	10.7		13.0		14.7		17.7	
		B4	7.8		10.1		9.6		7.4	
		B5	15.3		10.4		17.8		10.8	
	Prueba anterior a la UDU	B2	93.1-108.4 %		92.5-107.8 %		91.3-112.3 %		88.6-113.1 %	
		B4	95.7-104.3 %		93.7-108.4 %		96.3-111.3 %		94.2-104.6 %	
		B5	93.1-110.9 %		92.4-105.5 %		93.2-120.2 %		93.8-109.3 %	
	Cuartos Kaiser	mg de API / cuarto y SD	B2	0.99	0.05	0.99	0.04	0.97	0.03	0.99
B4			0.98	0.02	0.98	0.02	0.99	0.02	0.99	0.03
B5			1.00	0.02	1.00	0.02	1.01	0.03	0.99	0.03
AV (UDU)		B2	11.9		8.9		8.0		6.5	
		B4	4.4		5.8		4.6		6.3	
		B5	4.7		5.6		6.1		6.7	
Prueba anterior a la UDU		B2	94.3-113.9 %		94.2-106.7 %		95.5-106.1 %		95.9-105.7 %	
		B4	97.1-103.2 %		95.1-102.4 %		96.9-104.4 %		93.5-102.8 %	
		B5	95.6-101.9 %		96.2-103.0 %		96.3-103.7 %		95.6-106.3 %	

9.3.3 Evaluación de las masas de los fragmentos que se obtienen al dividir los comprimidos de Sintrom 4

La prueba de subdivisión de comprimidos incluida actualmente en la Farmacopea Europea establece que deben tomarse 30 tabletas del mismo lote y dividirse a mano. Seguidamente a diferencia de la propuesta de la FDA para la determinación de la uniformidad de contenido en las posibles fracciones que se pueden obtener del comprimido, donde todos los fragmentos deben analizarse para verificar si cumplen la prueba UDU, en el presente caso únicamente se toma una de las mitades, o uno de los cuartos del comprimido para calcular un promedio correspondiente a las 30 unidades iniciales. El resto de fragmentos se descarta. Con el fin de pasar esta prueba, la masa de los 30 fragmentos (ya sean mitades

o cuartos) debe estar dentro del 85-115 % de la masa promedio (máximo una masa individual puede estar fuera de este rango). En caso de haber más de uno fuera del 85-115 %, o con sólo que uno esté fuera del 75-125 % el lote no pasa esta prueba.

No obstante, comúnmente los médicos recomiendan hacer uso de cortadores de comprimidos en caso de que deba recurrirse a esta práctica. La superficie de estos dispositivos es apta para evitar que la tableta se desplace una vez se ha colocado en la posición correspondiente, y entonces el paciente únicamente debe cerrar el cortador, aplicando un poco de presión, para hacer la división. En la Tabla 9.8 se compara el resultado de esta prueba, dividiendo a mano y usando un cortador de tabletas modelo Safety Shield (marca Ezydose). Se incluye además la estimación de la pérdida de masa luego de dividir en mitades, y luego de la segunda división hasta los cuartos. Esta prueba se hace con 15 comprimidos, y la pérdida debe ser menor al 3 % en comparación a la tableta completa.

Tabla 9.8 Pruebas considerando masas para evaluar la subdivisión de los comprimidos de Sintrom 4 en mitades y cuartos (n=30). La pérdida máxima en la división se determinó siguiendo la guía de la FDA del 2013 (n=15). Se muestran los resultados cuando se hace la división a mano, o usando un cortador comercial de comprimidos.

	División a mano		División con cortador	
	Mitades	Cuartos	Mitades	Cuartos
<i>Masa promedio (MA), mg</i>	271.4	140.7	279.4	141.8
<i>85-115 % de MA, mg</i>	230.7-312.2	119.6-161.8	237.5-321.3	120.6-163.1
<i>Masa mínima, mg</i>	240.7	108.3	261.2	122.8
<i>Masa máxima, mg</i>	319.3	175.4	310.4	152.9
<i># de muestras fuera de los límites</i>	2	5	0	0
<i>Pérdida máxima (%)</i>	0.56	0.34	0.78	0.55

Los resultados de la Tabla 9.8 muestran que a pesar de que la prueba de subdivisión incluida en la Farmacopea Europea no requiere medir la masa de todos los fragmentos que se obtienen al dividir, el promedio de las mitades y los cuartos seleccionados al azar, se aproximan mucho ya sea que se dividan a mano o usando un cortador. No obstante la separación de los valores individuales respecto al promedio es muy distinta según cómo se haga la división: a mano no se pasa la prueba ni siquiera para la fragmentación a mitades, mientras que usando el cortador todas las 30 mitades y los 30 cuartos se encuentran entre el 85 y el 115 % del valor promedio. En el trabajo publicado como parte de esta tesis únicamente se realizó la división a mano, y en aquel momento la prueba se pasó considerando las mitades pero no para los cuartos. Para aquellos comprimidos en su ficha

técnica no se indicaba nada sobre la funcionalidad de la grabación en forma de cruz que tienen los comprimidos de Sintrom 4, sin embargo para las tabletas analizadas en el trabajo presentado en el capítulo anterior, ahora sí que se menciona que ésta únicamente sirve para facilitar la deglución y no para obtener dosis igual. Textualmente lo que indica la Farmacopea Europea en la descripción de esta prueba, es que efectivamente las tabletas pueden dividirse en partes, ya sea para facilitar la toma o cumplir con la posología, y que en el segundo caso la subdivisión debe evaluarse y quedar autorizada por el ente correspondiente. Dado que el actual fabricante del Sintrom ha puesto una nota aclaratoria en la información que tiene aprobada de su producto, legalmente ya no está obligado a cumplir con la prueba de subdivisión, sin embargo la revisión de guías para pacientes que son tratados con Sintrom demuestra que en la práctica el comprimido de 4 mg se usa para obtener dosis de 2 o 1 mg. Respecto a la pérdida de masa debido a la división, la pérdida usando el cortador de comprimidos es ligeramente mayor a cuando la fragmentación se hace a mano, sin embargo en ambos casos se está muy por debajo del límite del 3 % que establece la guía de la FDA.

En la metodología de análisis propuesta para las posibles nuevas unidades de dosificación que se pueden obtener al dividir las tabletas de Sintrom 4, la única forma de pasar del % p/p que se obtiene por espectroscopía Raman a mg de API/masa de unidad de dosis es asumiendo que cada mitad y cuarto tienen la masa que resulta de dividir el dato del comprimido completo entre 2 o 4. De esta forma se obtuvieron los AV de las Tablas 9.6 y 9.7. No obstante, de los 10 comprimidos que se analizaron antes y después de dividir a mano, se dispone del dato cuantificado por espectroscopía Raman para cada cuarto, y la masa exacta de cada fragmento dividido. En la Tabla 9.9 se muestran los resultados para estas porciones de tableta: de los 40 cuartos generados, que corresponden a 10 tabletas, se puede tomar uno de cada comprimido completo y hace 4 grupos de 10, y de los datos de mg de API/porción de tableta aplicar la prueba UDU (se han incluido solo los datos correspondientes al equipo Kaiser, dado que ya se demostró que la cuantificación mediante el promedio de 3 espectros que se hace con las mediciones del equipo MultiRAM, no es adecuada para el análisis de los cuartos de tableta). Los datos de esta tabla combinan el efecto del contenido del API en cada área irradiada y la dispersión de las masas de los fragmentos luego de la división a mano, pero visto desde el punto de vista de un paciente lo que se muestra es la variación en la dosis que puede ingerir a partir de la división a mano de los comprimidos comerciales de Sintrom 4. Los resultados no son para nada buenos, para la mayoría de grupos de cuartos la dosis máxima es un 70 % mayor que el

Tabla 9.9 Contenido promedio (mg de API/cuarto) y desviación estándar (n=10) encontrado en los cuartos de los comprimidos de Sintrom 4 obtenidos luego de su división a mano. El % p/p de las nuevas unidades de dosificación se determinó con el equipo Kaiser. Se muestran también los valores de aceptación correspondientes para la prueba UDU.

	Primer grupo de cuartos		Segundo grupo de cuartos		Tercer grupo de cuartos		Cuarto grupo de cuartos	
mg de API/cuarto y SD	1.10	0.19	0.98	0.12	0.95	0.17	0.85	0.15
mg mínimo en los 10 cuartos	0.89		0.71		0.74		0.69	
mg máximo en los 10 cuartos	1.53		1.19		1.20		1.19	
AV (UDU)	53.7		29.5		44.3		49.1	

valor mínimo de estas 10 "nuevas" unidades de dosificación. Luego las pruebas UDU dan mal. Con solo considerar la desviación estándar de los 10 valores de contenido de API, convertidos cada uno a porcentaje del valor nominal (1 mg por cuarto) en 3 de los 4 grupos ya se supera el valor límite de 15.0.

9.4 Conclusiones

Los comprimidos de Sintrom 1 y Sintrom 4 analizados por espectroscopía Raman y NIR poseen una uniformidad de contenido adecuada, la cual se demuestra mediante la prueba armonizada UDU incluida en la Farmacopea Europea y la de Estados Unidos. El desarrollo del proceso de manufactura y la formulación de medicamentos como el Sintrom, que son de baja dosificación, implican una serie de retos adicionales para el fabricante; uno de estos es alcanzar la uniformidad de contenido debido a la baja concentración del API, y en este sentido se puede decir que este parámetro crítico de calidad estuvo bajo control en los lotes analizados.

Como parte de esta tesis se propuso también el uso de la espectroscopía Raman para la determinación no destructiva del contenido de API en los posibles fragmentos de tableta que se pueden obtener luego de la división de los comprimidos de Sintrom 4. Mediante el análisis de un conjunto de tabletas, de las cuales se irradiaron los cuartos antes y después de dividir, se demostró que las predicciones no difieren significativamente ya sea que el análisis se haga con el comprimido completo o con los cuartos divididos. En las distintas comparaciones que se presentaron de los espectros adquiridos, aparecen clusters según estos provienen del comprimido completo o dividido, sin embargo al haber hecho la división a mano, los pequeños cambios que pueden ocurrir en el interior y en la superficie de los materiales pueden verse reflejados en los espectros adquiridos. Al fin y al cabo la

información de interés, que es cuantificar el contenido de API en cada cuarto pero sin necesidad de hacer la fragmentación, se extrae adecuadamente.

La guía publicada por la FDA sobre comprimidos ranurados se aplicó a los datos del contenido de API en las mitades y cuartos de comprimido de Sintrom 4, los cuales se obtuvieron haciendo uso de dos instrumentos retrodispersivos. Los valores cuantificados en las mitades de comprimido pasan la prueba UDU, y se llegó a la misma conclusión en ambos instrumentos; no obstante los resultados de esta prueba fueron distintos para cada espectrómetro: todos los cuartos de los 3 lotes analizados la pasan según el equipo Kaiser, pero en el caso del equipo MultiRAM en 2 de los 3 lotes analizados hay algún grupo de cuartos que resulta en un AV superior a 15.0, por lo que estos posibles nuevos comprimidos no cumplirían. La causa de esta diferencia está en que para el análisis de los cuartos con el equipo MultiRAM, y disponiendo de una irradiación de diámetro 0.5 mm, sólo 3 espectros se promediaron, y anteriormente se demostró que los valores predichos en cada posición con este instrumento pueden estar muy dispersos, pero que a pesar de esto luego la media se acerca mucho al valor que se obtiene mediante otros instrumentos con los cuales la irradiación es mucho mayor, eso sí promediando un mayor número de espectros. La estrategia de 3 puntos por cuarto no es adecuada para analizar el contenido de API en ese cuarto, pero posiblemente adquiriendo unos cuantos espectros más es posible llegar a la misma conclusión que con la sonda PhAT del equipo Kaiser y su lente que irradia 3 mm. Finalmente la aplicación de la prueba de subdivisión de comprimidos incluida actualmente en la Farmacopea Europea, la cual requiere hacer la fragmentación a mano, resultó en una dispersión de los valores de masa de las mitades y cuartos de tableta mayor que el límite establecido en la prueba. En comparación, cuando se usa un cortador de tabletas comercial para la fragmentación, los resultados fueron adecuados tanto para mitades y cuartos. No obstante, dado que el fabricante aclara que esta marca sólo sirve para facilitar la deglución y no para obtener dosis menor concentración, el fabricante no está obligado a demostrar que sus comprimidos cumplen con esta prueba.

9.5 Referencias

