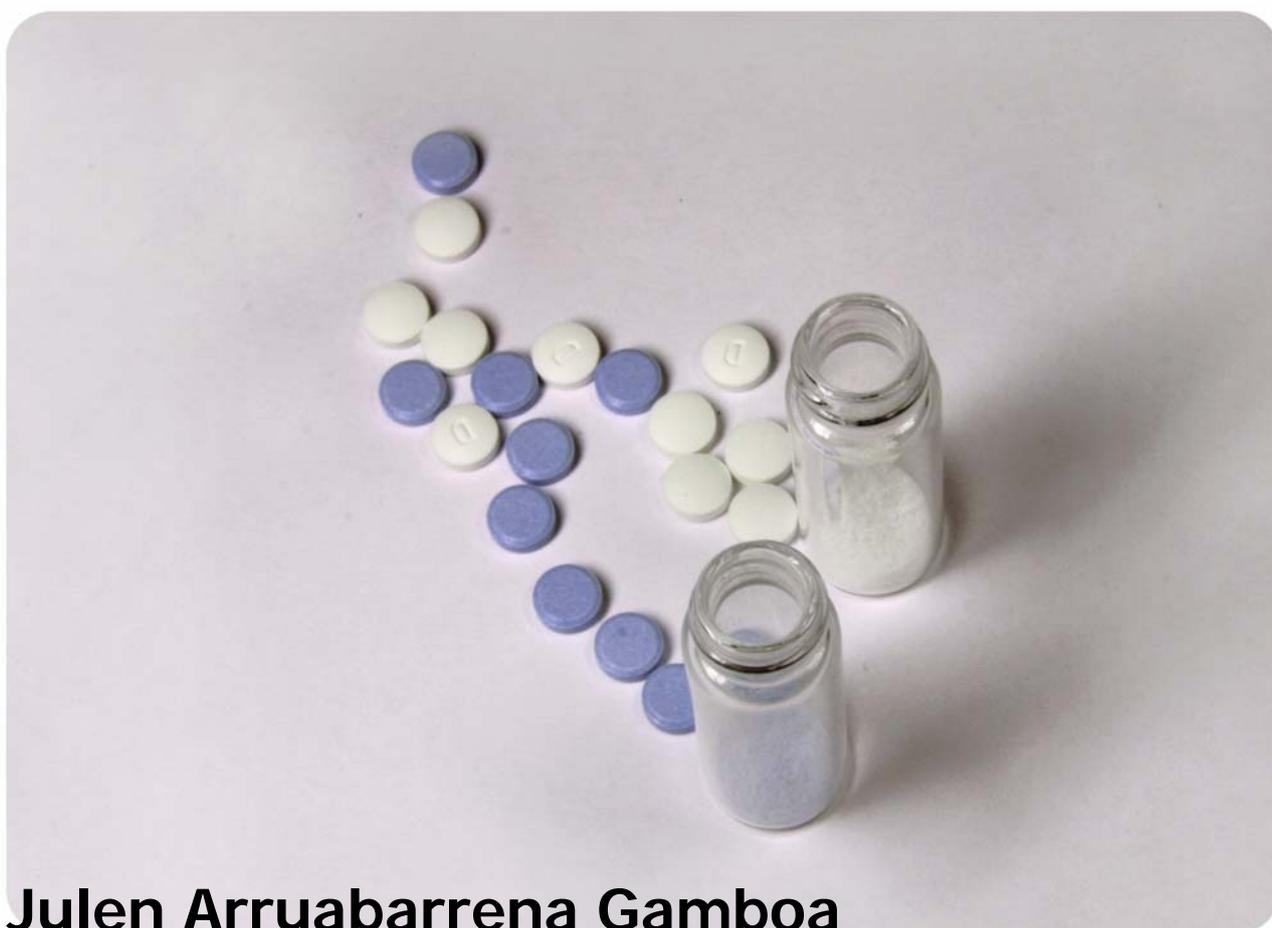


CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS POR ESPECTROSCOPÍA NIR: COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN



Julen Arruabarrena Gamboa

Iniciació a la recerca i treball fi de màster
Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Químiques
Directores: Santiago MasPOCH Andrés y Jordi Coello Bonilla
Departament de Química, Facultat de Ciències
Setembre 2010

Memòria presentada per superar el mòdul Laboratori d'Iniciació a la recerca i treball fi de màster corresponent al Màster Universitari Ciència i tecnologia químiques.

Julen Arruabarrena

Vist i plau,

Dr. Santiago Maspoch Andrés

Dr. Jordi Coello Bonilla

Bellaterra 01:09:2010

Antes de empezar este trabajo quisiera agradecer a toda la gente que me ha rodeado durante estos 6 meses de arduo trabajo, imprevistos, sorpresas y mucho aprendizaje.

En primer lugar agradecer al Dr. Maspoch y al Dr. Coello la ocasión que me han brindado para ampliar mis conocimientos y desarrollar un trabajo de investigación a largo plazo que todavía no ha hecho más que empezar.

Por otro lado, quisiera agradecer toda la sabiduría aportada por los veteranos del grupo, que va más allá de la Química para adentrarse en la Filosofía (en especial a la Dra. Iturriaga).

Como es evidente, queda agradecer a los compañeros de laboratorio todos sus consejos, advertencias y demás ayudas necesarias en la aproximación al mundo de la investigación y a la espectroscopía NIR. Rubén, Lisi, Anna, David, Ricardo, Juan, Sergio, Eva, Jordi...

Un agradecimiento especial para Berta, que ha volcado todo su lado artístico para que este trabajo tuviera un bonito y atrayente aspecto.

Por último, me queda agradecer al GTS el inestimable favor de haberme dejado utilizar su balanza, ya que sin ésta mi investigación no hubiera sido posible.

RESUMEN

Los principales objetivos del presente trabajo son la puesta a punto de un método NIR por reflectancia para la determinación del contenido de los principios activos (API) de un preparado farmacéutico comercial y la comparación del efecto que tiene la forma física sobre la que se registra el espectro de las muestras de calibración sobre la sensibilidad y el camino óptico; polvo o comprimidos.

El preparado comercial analizado es el Perifem® y los principios activos determinados son el valerato de estradiol y el acetato de medroxiprogesterona. El método utilizado para la preparación de las muestras de calibración ha sido la sobredosificación con API o con una mezcla de excipientes comprimidos comerciales molturados y como procedimiento de calibración se ha utilizado la Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS). Además, se ha desarrollado un método HPLC para ser utilizado como método de referencia.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la compactación de las muestras aumenta el camino óptico efectivo y, por tanto, la sensibilidad del método analítico.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. LA ESPECTROSCOPÍA NIR	2
2.1.1. Fundamento físico y sus consecuencias	2
2.1.2. Breve Historia de la espectroscopía NIR	2
2.1.3. Los modos de registro	3
Transmitancia	3
Reflectancia	3
Transflectancia	5
2.2. QUIMIOMETRÍA	5
2.2.1. Modelos multivariantes	5
2.2.2. Pretratamientos espectrales	6
2.2.3. Métodos de reducción de variables utilizados	7
Análisis en Componentes Principales (PCA)	7
<i>Partial Least Squares</i> (PLS)	7
2.3. DESCRIPCIÓN DE LOS ANALITOS	8
2.3.1. La industria farmacéutica	8
2.3.2. Descripción de los principios activos (API)	8
Hormonas	8
Esteroides	8
Los principios activos	8
Uso terapéutico de Perifem®:	9
3. PARTE EXPERIMENTAL	11
3.1. INSTRUMENTACIÓN Y <i>SOFTWARE</i>	11
3.1.1. Instrumentación	11
3.1.2. <i>Software</i>	12
3.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	12
3.3. MÉTODO DE REFERENCIA	13
Pruebas de estabilidad	14
3.3.1. Pruebas realizadas con el método de referencia	14

Uniformidad de contenido	14
Uniformidad de contenido en dosis individual	14
3.4. DESARROLLO DEL MÉTODO NIR	15
3.4.1. Prueba previa	15
3.4.2. Pruebas para la optimización de la preparación de muestras	15
Establecimiento del grosor mínimo de comprimido	15
Establecimiento del tiempo de mezclado	16
3.4.3. Diseño del conjunto de muestras de calibración y predicción	17
3.4.4. Preparación de muestras y registro de espectros NIR	18
3.4.5. Modelos de cuantificación	19
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	21
4.1. DIFERENCIAS ESPECTRALES ENTRE POLVO Y PASTILLA	21
Prueba de sensibilidad	23
4.2. ESTUDIO PREVIO A LA CREACIÓN DE MODELOS CUANTITATIVOS	25
Selección de los conjuntos de calibración y predicción de las muestras de producción	25
Selección de los pretratamientos espectrales	25
Selección de los intervalos de longitudes de onda	25
4.3. MODELOS DE CUANTIFICACIÓN	27
4.3.1. Pastillas blancas	27
Modelos de muestras compactadas	27
Modelos de muestras en polvo	28
4.3.2. Pastillas azules	29
5. CONCLUSIONES	31
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ANEXOS	34
7.A. Espectros UV-Vis	34
7.B. Cromatogramas de las muestras de producción	35

1. OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es el de poner a punto un método NIR que permita la cuantificación de dos principios activos presentes en un preparado farmacéutico comercial. La concentración a la que se encuentran estos preparados es de aproximadamente 2 y 8 % respectivamente.

El objetivo principal se puede desglosar en los siguientes objetivos subordinados.

- Hallar las diferencias espectrales del espectro NIR en modo reflectancia que supone el registro de una misma muestra compactada respecto al registro en polvo.
- Desarrollo de parámetros que permitan la determinación de la similitud entre dos espectros.
- Comprobar que la compactación incrementa el camino óptico efectivo y estudiar el efecto que ello tiene en la determinación de principios activos a baja concentración.
- Desarrollo de métodos de cuantificación de principios activos en comprimidos comerciales intactos en baja y media concentración a través de calibraciones multivariantes PLS basados en espectros NIR y valores de referencia.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA ESPECTROSCOPIA NIR

La espectroscopía NIR (acrónimo de *Near-Infrared*) estudia la interacción entre la radiación de longitud de onda comprendida entre los 780 y 2500 nm y la materia.

2.1.1. Fundamento físico y sus consecuencias

Una molécula es capaz de absorber radiación infrarroja cuando experimenta un cambio en el momento dipolar neto como consecuencia de un movimiento de vibración. Así, es posible una interacción entre el campo eléctrico asociado a la radiación y el campo eléctrico asociado al momento dipolar. La absorción sólo será posible en coincidencia de las frecuencias (y por tanto energías) de la radiación y la vibración molecular, provocando un aumento de la amplitud de la misma.

En la región MIR (*Mid-Infrared*) se observan las bandas fundamentales, las debidas a la transición entre los niveles energéticos de número cuántico vibracional 0 y 1. En la región NIR aparecen sobretonos ($\Delta u \geq 2$) y bandas de combinación, producidas por la interacción dos o más modos de vibración. Estas transiciones producen bandas de absorción mucho menos intensas que las fundamentales, observándose espectros de bandas anchas y solapadas [1].

2.1.2. Breve Historia de la espectroscopía NIR

La publicación del descubrimiento de dicha radiación data del año 1800 [2], pero dadas sus características no fue explotada para el análisis químico hasta muchos años después.

Fue a raíz de la mejora en la instrumentación (fue necesario un aumento substancial de la sensibilidad de los detectores para la utilización de la espectroscopía NIR en el análisis químico) y el uso dado posteriormente por Norris *et al.* a mediados de los años sesenta para la determinación de humedad en grano [3], que la espectroscopía NIR dio su primer paso para establecerse como técnica en análisis de rutina, principalmente en los campos agroalimentario y farmacéutico.

Durante los años 70 comenzó la generalización en el uso de la electrónica; la espectroscopía NIR no fue una excepción. El acoplamiento de ordenadores a los espectrómetros facilitó notablemente tanto la adquisición como el tratamiento de datos, haciendo posibles nuevas herramientas en la

espectroscopía NIR como son las técnicas de regresión en variables latentes o la creación de bibliotecas de espectros para la identificación.

2.1.3. Los modos de registro.

Cuando la radiación incide sobre la muestra da lugar a fenómenos de reflexión, absorción y transmisión. La intensidad de radiación incidente es igual a la suma de las intensidades de radiación transmitida, absorbida reflejada, tal y como se muestra en la ecuación (2.1).

$$I_0 = I_T + I_A + I_R \quad (2.1)$$

Una característica de esta técnica, es que el instrumento se adapta a la muestra, en contraposición a la mayoría del análisis químico. Así, existen tres modos de registro, relativos a la posición de la muestra respecto del instrumento. Una buena elección de modo de registro puede mejorar la información que se extrae del espectro. Los modos de registro se muestran esquematizados en la figura 1.

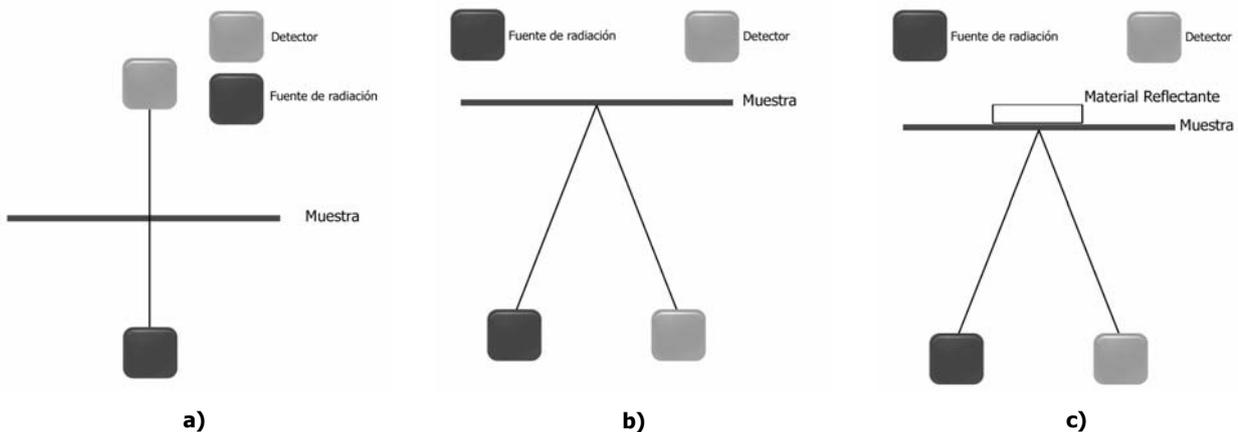


Figura 1: modos de registro utilizados en espectroscopía NIR: **a)** transmitancia, **b)** reflectancia y **c)** transreflectancia

Transmitancia: se define como la fracción de radiación que atraviesa la muestra. La absorbancia, asumiendo $I_R=0$, se calcula a través de la siguiente ecuación (2.2):

$$A = -\log T = -\log \frac{I_T}{I_0} \quad (2.2)$$

Clásicamente, este modo de registro se ha utilizado para muestras líquidas (el análisis de leche es un buen ejemplo de ello [4]). Más recientemente, el desarrollo de detectores de gran sensibilidad ha posibilitado la aplicación al análisis de muestras sólidas, como los de comprimidos farmacéuticos intactos [5].

Reflectancia: éste es el modo de registro que se ha desarrollado junto a la espectroscopía, el más utilizado y el responsable de la gran expansión de la técnica. Como se puede observar en la

figura 1, la posición de la fuente de emisión y del detector respecto a la muestra es la misma. Cabe distinguir dos formas de radiación reflejada; la especular y la difusa.

Cuando la luz incide sobre una superficie no absorbente, tiene lugar la reflexión especular regida por las ecuaciones de Fresnel **[6] (2.3)**. La intensidad de la radiación reflejada viene determinada por los índices de refracción de los medios (generalmente, aire y la superficie incidida).

$$\frac{I_R}{I_0} = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{n_1 \cos \theta_i - n_2 \cos \theta_t}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} \right)^2 + \left(\frac{n_1 \cos \theta_t - n_2 \cos \theta_i}{n_1 \cos \theta_t + n_2 \cos \theta_i} \right)^2 \right] \quad (2.3)$$

Si el ángulo de incidencia (θ_i) y el de transmisión son igual a cero la expresión se simplifica, obteniéndose la ecuación **(2.4)**.

$$\frac{I_R}{I_0} = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2} \quad (2.4)$$

Se puede observar en la ecuación anterior que la intensidad reflejada sólo está relacionada con los índices de refracción de los medios y con el ángulo de reflexión, por tanto, la información de la muestra que nos brinda este fenómeno es muy escasa.

Si la radiación incide sobre una superficie irregular (formada por interfases orientadas en cualquier dirección) y no absorbente, la luz es reflejada siguiendo también la ley de Fresnel, dando lugar a la reflexión de la luz en cualquier dirección. Así, dichas leyes describen el comportamiento de la radiación cuando no penetra en la muestra.

Si la radiación se transmite a través de la primera capa de partículas (intefase medio-muestra), puede sufrir una absorción por parte de la muestra (éste es el fenómeno que brinda información de la muestra), provocando una atenuación en la intensidad de la luz transmitida. La radiación que ha superado la primera capa de partículas difunde a través de reflexiones, refracciones, dispersiones o nuevas absorciones. Se define como reflectancia difusa la radiación reflejada que ha penetrado en la muestra.

Así, numerosas variables afectan al espectro NIR, como son: el tamaño de partícula, la fuerza de compactación (en el caso de comprimidos), la viscosidad, la temperatura; además de contener información química de casi todos los compuestos existentes.

No existe una teoría definitiva que permita describir la absorción de radiación en sistema dispersivos **[7-9] (scattering)**, por lo que es habitual el uso de aproximaciones empíricas similares a la ecuación **(2.2)**.

A efectos prácticos, se define una absorbancia aparente que permite relacionar las medidas de reflectancia con la concentración de analito **(2.5)** con una expresión análoga a la ley de Lambert-Beer, a través de una relación lineal.

$$A_{\text{aparente}} = \log \frac{1}{R} = \log \frac{1}{R_{\text{muestra}}/R_{\text{ref}}} = a \cdot c \quad \text{(2.5)}$$

Donde R es la reflectancia relativa, a es una constante de proporcionalidad y c es la concentración.

Transflectancia: éste el modo de registro menos utilizado, es una combinación de transmitancia y reflectancia, colocándose un material reflectante sobre la muestra (véase la **figura 1**) para poder eliminar el término I_T de la ecuación**(2.2)**.

2.2. QUIMIOMETRÍA

Las técnicas instrumentales modernas son capaces de generar grandes conjuntos de datos en poco tiempo, pero la mera acumulación de datos no genera información útil. Aquí es donde la quimiometría entra en juego, pudiéndose definir como *“el desarrollo y aplicación de métodos matemáticos y estadísticos para la extracción de información útil a partir de medidas químicas”* [Kowalsky, 1977].

2.2.1. Modelos multivariable

Se define como multivariable aquel modelo que relaciona más de una variable con un parámetro. Traduciéndolo al ámbito de la espectroscopía NIR supone relacionar un espectro completo o una zona espectral con una propiedad física o química de la muestra.

El modo de desarrollo de un método analítico multivariable difiere sustancialmente de aquél basado en relacionar una única medida con una propiedad. Los pasos a seguir son los siguientes **[10]**.

- a. Creación de un conjunto de calibración: Se debe seleccionar un conjunto de muestras que recojan toda la variabilidad en la respuesta a la medida. Es decir, no sólo debe recoger la variabilidad en el parámetro a analizar sino también la de aquellos parámetros que interfieren en la medida.
- b. Adquisición de los datos analíticos: en el caso de este trabajo, adquisición de los espectros NIR.

- c. Análisis por método de referencia: las muestras escogidas en el conjunto de calibración han de tener un valor "cierto" con el que relacionar la información multivariante. Por tanto, la bondad del método multivariante estará siempre supeditada a la del método de referencia.
- d. Pretratamiento de los datos: en este paso se intentan reducir las contribuciones a la señal analítica que no aportan información útil o van en detrimento de la misma y hacer evidente la señal relacionada con el parámetro de interés.
- e. Construcción del modelo: se trata de establecer relaciones matemáticas entre las variables medidas y el parámetro objetivo a través de algoritmos de regresión. Se ha de tener cuidado en no sobreajustar el modelo, ya que entonces describiría únicamente el conjunto de muestras utilizadas en la construcción del mismo y no sería capaz de predecir con exactitud nuevas muestras.
- f. Validación del modelo: para comprobar que el modelo predice de manera correcta, se aplica a muestras de las que se conoce el parámetro a analizar y no han sido utilizadas para la construcción del modelo. De esta manera resulta sencillo detectar el sobreajuste.

2.2.2. Pretratamientos espectrales utilizados

Los pretratamientos espectrales consisten en cálculos matemáticos, en general sencillos, que se aplican a los espectros originales, con el objetivo de reducir la variabilidad no asociada al parámetro a estudiar (que puede provenir de un desplazamiento de la línea base o de ruido instrumental o ambiental) y de hacer evidente la variabilidad del parámetro en cuestión.

1. Promediado de espectros: consiste en promediar el valor de la absorbancia para cada longitud de onda a una serie de espectros de la misma muestra. De esta manera se reduce la contribución espectral del ruido. Además, es una manera de reducir el error de muestreo, ya que las fuentes de error, sobre todo en el registro de muestras sólidas, son muchas.
2. *Standard Normal Variate* (SNV): se trata de un escalado independiente de cada espectro, para conseguir que la media de la señal sea cero y que la desviación estándar sea uno. Es habitualmente usado en espectros registrados en modo reflectancia, ya que reduce el desplazamiento de la línea base debida a la diferencia en el tamaño de partícula.
3. Derivación: este pretratamiento, muy utilizado, permite la eliminación de los términos constantes, como es el desplazamiento de la línea base o los términos lineales (2ª derivada). El algoritmo habitualmente utilizado para la derivación es el de Savitzky-Golay, que permite, a través de la definición de un ancho de ventana en el que realizar la derivación, reducir el ruido asociado a la derivación [11].

4. Autoescalado: es un pretratamiento ampliamente utilizado que consiste en convertir la varianza de todas las variables en 1, previo centrado de los datos. Mediante el autoescalado se consigue que todas las variables tengan la misma varianza y peso al calcular el modelo.

2.2.3. Métodos de reducción de variables utilizados

Dada la alta correlación entre valores de absorbancia medidos a diferentes longitudes de onda es conveniente la utilización de métodos que permitan la simplificación de los datos y la eliminación de la colinealidad (cuando dos o más variables son dependientes entre sí).

Análisis en Componentes Principales (PCA): Considerando una matriz **M** donde cada fila corresponde a una muestra de **k** longitudes de onda. Desde un punto de vista geométrico, las **m** muestras representan puntos en el espacio **M** de dimensión **k**.

El objetivo del PCA es reducir la dimensión de la matriz **M** calculando unos nuevos ejes que expliquen la mayor cantidad de información original. Los componentes principales (PC) se caracterizan por ser ortogonales ellos y explicar una cantidad decreciente de variabilidad de la matriz **M** en la adición de PC.

Matemáticamente, se descompone la matriz **M** en un producto de *Scores* (**T**), que son las coordenadas de cada punto en el nuevo espacio y está normalmente asociado a la muestras y *Loadings* (**P**), los cosenos de los ejes originales con los PC, asociados a las variables, quedando una matriz **E** asociada al error, como se puede ver en la ecuación (2.6).

$$M = TP^t + E \quad (2.6)$$

Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS1): este método fue publicado por H. Wold en el año 1975 [12], para el desarrollo de métodos cuantitativos multivariantes.

Este método se basa en la descomposición de matriz **X** (variables independientes) y otra **Y** (variables dependientes). Así, se realiza una descomposición simultánea de ambas matrices obteniéndose unas nuevas variables. En este caso, estos nuevos ejes no corresponden a los de máxima variabilidad, si no que responden a la máxima covarianza entre las matrices **X** e **Y**. Por tanto, la descomposición provoca una pérdida de ortogonalidad en las nuevas variables, pero

permite establecer una relación entre las matrices **X** e **Y**. La expresión matemática de la descomposición se expresa en la ecuación (2.7).

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F} \end{aligned} \quad (2.7)$$

Donde **T** y **U** son los *scores*, **P** y **Q** los *loadings*, restando las matrices residuales **E** y **F**.

2.3. DESCRIPCIÓN DE LOS ANALITOS

2.3.1. La industria farmacéutica.

Debido a las características inherentes a dicha industria, el control de calidad tiene ciertos rasgos a los que la espectroscopía NIR se adapta bien:

- Se realizan análisis sobre muestras de variables muy controladas lo que permite crear modelos de calibración que reflejen toda la variabilidad del proceso de fabricación.
- La concentración de analito es, en general, alta, lo que hace viable el uso de la espectroscopía NIR, técnica poco sensible.
- El gran número de análisis a realizar exige eficiencia en el uso de reactivos y de tiempo.
- El análisis cualitativo mediante NIR permite la discriminación rápida y no destructiva tanto de materias primas como de productos intermedios y acabados.

2.3.2. Descripción de los principios activos (API)

La muestra analizada en el presente trabajo ha sido la formulación comercial Perifem®, medicamento cuyos ingredientes activos principales (API) son el valerato de estradiol (VE) y el acetato de medroxiprogesterona (MPA); ambos compuestos son derivados de esteroides endógenos (hormonas).

Hormonas: las hormonas se pueden definir como sustancias químicas segregadas en baja concentración hacia el torrente sanguíneo que actúan sobre tejidos distantes, generalmente de forma reguladora. Representa un caso particular de señalización entre células [13].

Esteroides: los esteroides son triterpenoides modificados compuestos por un sistema tetracíclicos de anillos provenientes del lanesterol. Modificaciones sucesivas dan lugar a una amplia variedad de productos naturales de gran importancia biológica; esteroides, saponinas esteroidales, glicósidos cardioactivos, corticosteroides y hormonas sexuales de mamíferos [14].

Los principios activos: los API de Perifem® son derivados de esteroides endógenos. Así, en la **figura 2** se muestran las estructuras de los API junto a sus análogos endógenos. Se observa que las diferencias se limitan, en el caso del VE a la esterificación del hidroxilo unido al C₁₇, que facilita la acción prolongada mediante una absorción y metabolización más lentas [15] y en el caso del MPA a la metilación en C₆ (que bloquea la potencial desactivación por hidroxilación metabólica) y a la esterificación en C₁₇, que aumenta la liposolubilidad y, como en el caso anterior, ralentiza la degradación metabólica.

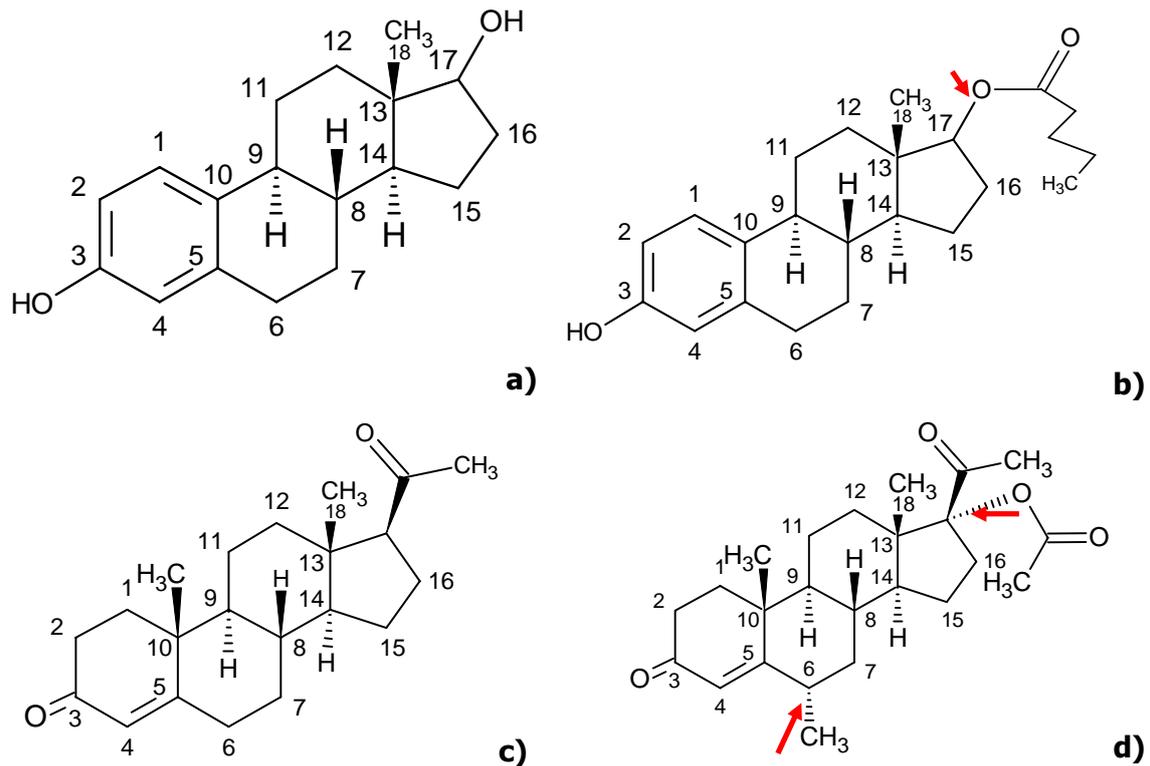


Figura 2: estructuras de a) estradiol, b) valerato de estradiol, c) progesterona y d) acetato de medroxiprogesterona. Las **flechas rojas** indican la adición de grupos funcionales en los derivados sintéticos.

Uso terapéutico de Perifem®: El uso dado al fármaco es el de la terapia hormonal sustitutiva (THS), para el tratamiento de los síntomas provocados por la menopausia tanto natural como quirúrgica [16].

El estradiol, principalmente producida en los ovarios, es la hormona encargada de la proliferación de células tanto estrómicas como epiteliales, incrementando la actividad mitótica y de síntesis de DNA, además de activar los receptores progesterénicos. En contraposición, la progesterona produce la diferenciación entre las células estromales y epiteliales.

El cese en la secreción ovárica de estas hormonas responsables del ciclo menstrual, puede provocar ciertas consecuencias en el cuerpo (amenorrea, inestabilidad vasomotora, atrofia urogenital, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares). Para contrarrestar estas consecuencias se puede aplicar a la mujer menopáusica la THS, para, imitando con análogos sintéticos a las hormonas responsables del ciclo menstrual, mitigar las consecuencias de la menopausia.

Por otra parte, se ha relacionado la THS con numerosos efectos secundarios, como son: la trombosis venosa profunda, la hiperlipidemia, la litiasis biliar o el cáncer de mama.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

3.1.1. Instrumentación

- El instrumento usado para la adquisición de los espectros NIR ha sido el FOSS NIRSSystem 5000 conectado al módulo Rapid-Content Analyzer (RCA).
- La adquisición de los espectros UV-Vis en solución se realizó en el espectrómetro HP 8453A *Diode Array*, que recoge el rango espectral comprendido entre 190 y 820nm.
- Las mezclas de sólidos se homogeneizaron con un mezclador agitador Turbula T2C.
- Las pesadas se realizaron en una balanza de precisión $\pm 0.1\text{mg}$. Se utilizó otra de $\pm 0.01\text{mg}$ cuando era necesaria una mayor precisión.
- Los valores de referencia se obtuvieron mediante análisis cromatográfico con un HPLC Agilent 1100 equipado con una columna *SymmetryShield™* RP₁₈ de 25cm de longitud y diámetro de 4,6mm termostatzada a 25°C acoplado a un detector DAD ($\lambda=280\text{nm}$) y adquiriendo el rango espectral entre 190 y 400nm, con una resolución espectral de 1nm.
- La compactación de las muestras se realizó con la prensa Perkin-Elmer 15.011 de sección de 132,7mm².

En la **figura 3**, se muestran las fotografías de los equipos anteriormente mencionados

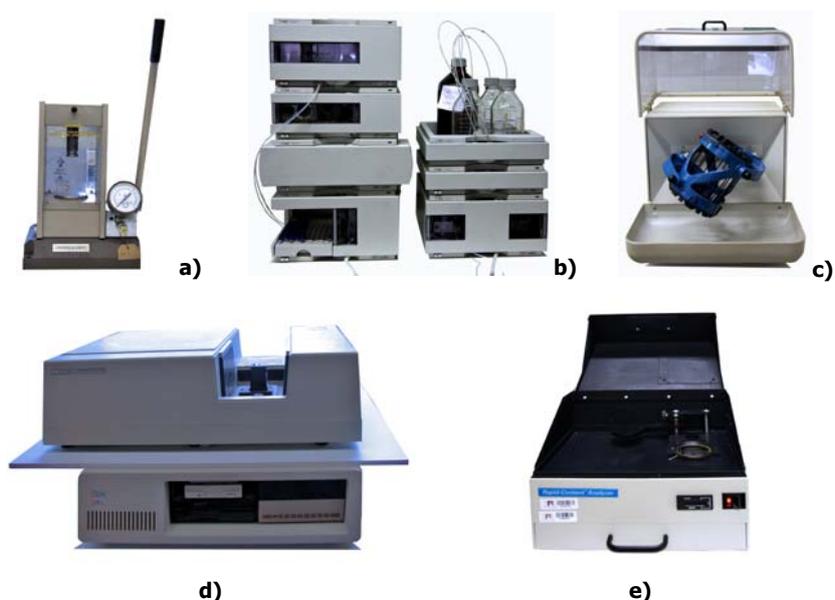


Figura 3: Instrumentos utilizados en la parte experimental; **a)** compactador, **b)** HPLC, **c)** túrbula, **d)** UV-Vis y **e)** NIR

3.1.2. Software

La adquisición de espectros se realizó mediante el *software* VISION v. 2.51 (FOSS NIRSSystem). Además el procesado de datos y la construcción de modelos PCA y PLS se realizó con la ayuda del *software* UNSCRAMBLER v.9.2 CAMO PROCESS, Norway.

3.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Los comprimidos se presentan en un empaquetado tipo blister que cuenta con 21 comprimidos circulares planos, de aproximadamente 7mm de diámetro y 2mm de grosor. Dichos comprimidos se reparten en 11 comprimidos de color blanco (que sólo contienen valerato de estradiol 2mg/comprimido) y 10 azules (que contienen valerato de estradiol, 2mg/comprimido y acetato de medroxiprogesterona, 10mg/comprimido).

El peso de las pastillas es de ≈ 120 mg, lo que da lugar a unas concentraciones de $\approx 2\%$ (w/w) en el caso del VE y $\approx 8\%$ (w/w) en el caso del MPA.

Además de los API, la composición de los comprimidos incluye lactosa monohidrato, almidón de maíz y otros excipientes minoritarios.

En la **figura 4**, se muestran los espectros de los API y de los comprimidos comerciales. En dicha figura se puede observar que las diferencias espectrales entre los dos tipos de comprimidos son escasas (el coeficiente de correlación entre los dos tipos de comprimido es en todos los casos superior al 0,998).

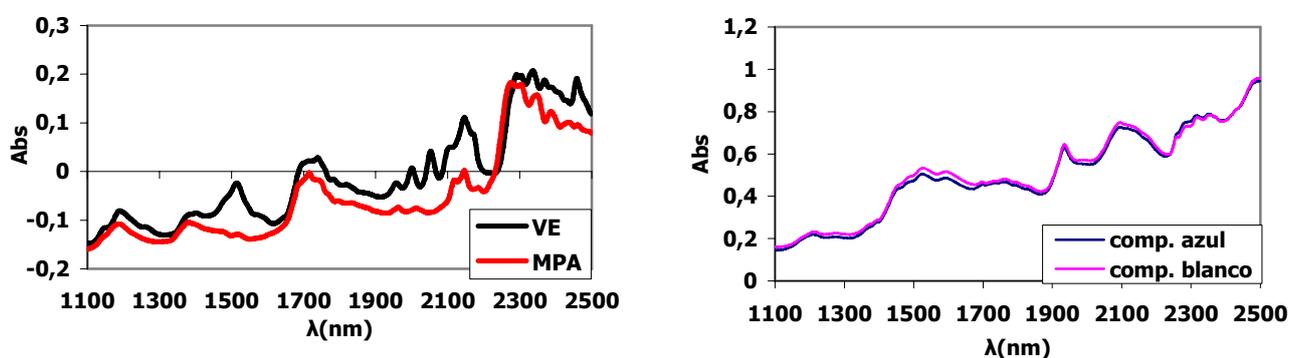


Figura 4: Espectros NIR de los principios activos (izquierda) y comprimidos comerciales (derecha)

3.3. MÉTODO DE REFERENCIA.

En primer lugar, se desarrolló un método HPLC para la determinación de las concentraciones de los principios activos para poder relacionar los espectros NIR con la concentración *real* de las muestras. Por tanto, el error cometido en la determinación por HPLC será arrastrado al método NIR.

La obtención de los valores de referencia se realizó con un cromatógrafo HPLC modelo Agilent 1100 equipado con una columna *SymmetryShield™* RP₁₈ de 25cm de longitud y diámetro de 4,6mm termostatzada a 25°C acoplada a un detector UV-DAD ($\lambda=280\text{nm}$).

Las condiciones cromatográficas óptimas se fijaron a partir de un trabajo donde se realizaba la separación cromatográfica de un medicamento con los mismos API [17], pero cambiando el acetonitrilo usado en dicho artículo por metanol. La fase móvil se fijó en una proporción 90:10 (v/v) de metanol y solución acuosa de nitrato amónico 0,070M (obteniéndose un pH de fase acuosa de $5,7 \pm 0,1$) con un caudal de 1,2mL/min. Los tiempos de retención fueron de 3,2min para el MPA y de 7,4min para el VE. El volumen de inyección fue de 20 μ L.

El tratamiento de muestra consistió en la introducción de un comprimido o de un peso equivalente del mismo en un matraz aforado de 10mL con 8mL de MeOH que se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 15min. Después se añadió 1mL de solución tampón para que la composición de las muestras fuera la más parecida posible a la de la fase móvil y se enrasó con MeOH. Finalmente se filtró la disolución con un filtro de membrana de nylon de 0,45 μ m de poro.

La recta de calibrado se realizó para un rango del $\pm 50\%$ de la concentración resultante de disolver un comprimido en 10mL ([VE]=0,2mg/mL y [MPA]=1,0mg/mL). Para la cuantificación de los API se interpoló el área de pico en una recta de calibrado obtenida a partir de diluciones de una solución estándar de concentración [VE] $\approx 2\text{mg/mL}$ y [MPA] $\approx 10\text{mg/mL}$ medidos con exactitud. Se realizaron dos inyecciones de los patrones de concentración $\pm 25\%$ y $\pm 50\%$ respecto al patrón central, que se inyectó seis veces para establecer la repetitividad en el punto central de la recta (se ajustó la concentración aproximada de las muestra a la de este punto). Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 1**:

Tabla 1: Datos de linealidad de las rectas de calibrado realizadas para la cuantificación de MPA y VE.

	Pendiente	Intercepto y	RSD(%) ^a	Coefficiente de correlación
VE	3126 ± 72	3,4±15	0,079	0,9996
MPA	470,4±2,9	0,8±3,0	0,161	0,9999

^a desviación estándar relativa (%) de los 6 replicados del punto central

Además, se preparó un patrón de la misma concentración que el punto central de la recta de calibrado cada vez que se utilizaba el equipo para corregir la posible deriva en la relación área/concentración. En el **anexo B** se muestran los cromatogramas de los comprimidos de producción.

Prueba de estabilidad: Dada la inestabilidad de los esteroides en solución [18], se realizó una prueba de estabilidad para las soluciones *stock*. Para ello, se prepararon sendas soluciones de [VE]=0,032mg/mL [MPA]=0,012mg/mL en MeOH y se registró un espectro UV-Vis una vez al día durante 5 días almacenándolos en nevera y poniéndolos a temperatura ambiente 30 minutos antes del registro. La superposición de espectros mostró un cambio en la intensidad en torno 280nm en el tercer día en el caso del VE y en el segundo día en el caso del MPA. En el **anexo A** se muestran los espectros UV de los API.

3.3.1. Pruebas realizadas con el método de referencia

Uniformidad de contenido: Por otra parte se realizaron pruebas de uniformidad de contenido (tal y como se establece en *European Pharmacopoeia* [19]), para tal de establecer el valor medio de concentración de cada lote con los que se prepararon las muestras de calibración NIR. Para ello, se preparó un molturado de 20 pastillas escogidas aleatoriamente, se homogeneizó, se cogieron tres replicados de peso equivalente al de los comprimidos y se inyectaron por triplicado.

Uniformidad de contenido en dosis individual: Para establecer la variabilidad en el contenido en API de las muestras de producción, se realizó, siguiendo el procedimiento establecido en *European Pharmacopoeia*, una prueba de uniformidad de contenido de dosis individual. Para ello, se realizó la preparación de muestra para 10 comprimidos intactos escogidos aleatoriamente de los lotes anteriormente citados y se analizaron por HPLC.

Además, se realizó el análisis de muestras comerciales individuales para añadir dichas muestras a los conjuntos de calibración y predicción del método NIR.

3.4. DESARROLLO DEL MÉTODO NIR:

Una vez desarrollado el método de referencia, se desarrollaron los métodos NIR. El primer paso consistió en una prueba previa para comprobar si la sobre e infradosificación de las muestras se reflejaba diferencias espectrales. Después se realizaron diferentes pruebas para optimizar la preparación de muestras. A estas pruebas siguió el diseño del conjunto de muestras de calibración y predicción, la preparación de dichas muestras y su registro, junto a las muestras comerciales.

Uno de los objetivos del trabajo es la comparación de dos métodos de cuantificación por NIR en modo reflectancia, el primero usando muestras en polvo para la construcción del modelo y el segundo usando el polvo anterior compactado en forma de pastilla. Para ello, inicialmente se estudiaron las diferencias entre ambos métodos.

3.4.1. Prueba previa:

Se realizó una primera prueba donde se prepararon dos muestras por cada API y tipo de comprimido. La primera consistió en la molturación de muestras de producción, el registro del espectro NIR, la compactación del polvo y el registro del espectro NIR de la pastilla. Se repitió el proceso anterior sobredosificando en un 25% la muestra de producción molturada. Así, se pudieron observar las diferencias espectrales entre el polvo y las pastillas y entre la muestra de concentración nominal y la sobredosificada. A través de esta prueba se comprobó si la sobre e infradosificación de muestras provocaba diferencias espectrales. Además, se utilizaron estas muestras para estudiar las diferencias espectrales en el registro de una misma muestras en polvo o en forma compactada.

3.4.2. Pruebas para la optimización de la preparación de muestras.

Establecimiento del grosor mínimo del comprimido: se fabricaron pastillas a base de molturado de comprimidos comerciales de 50, 75, 100, 200, 250 y 300mg. Se registró el espectro NIR de cada una de ellas y después se volvió a registrar el espectro NIR con los comprimidos cubiertos con una lámina de material reflectante. El solapamiento entre espectros confirma que no existe transreflectancia a partir de un determinado peso de muestra. Así, se halló el peso mínimo que debían tener las muestras preparadas para que la radiación incidida sobre la muestra no fuese transmitida, ya que la diferencia en la transmisión entre muestras podría dar lugar a problemas en la construcción de los modelos de cuantificación.

Establecimiento del tiempo de mezclado: Se realizó otra prueba para hallar el tiempo de mezclado idóneo para homogeneizar las muestras. Para ello, se preparó una mezcla 1:1 en peso de molturado de comprimidos y lactosa monohidrato con un peso similar al de las futuras muestras para la construcción de los modelos de cuantificación. Se introdujo la mezcla en la túbula para su homogeneización y se registró el espectro cada 5min y se volvió a introducir en la túbula hasta llegar a los 40min. Se calculó el residual medio de la absorbancia por longitud de onda de dos tiempos de mezclado consecutivos siguiendo la ecuación **(3.1)**.

$$b_{m,t} = \sqrt{\frac{\sum_{\lambda=1}^n (A_{t=x+5} - A_{t=x})^2}{n_{\lambda}}} \quad (3.1)$$

Donde $A_{t=x}$ es la absorbancia en una determinada λ en un determinado tiempo de mezclado, $A_{t=x+5}$ en su medida consecutiva y n_{λ} el número de λ medidas y $b_{m,t}$ la media de residuales para dos tiempos de mezclado consecutivos. Los resultados obtenidos se representan en la **figura 5**. Se observa un mínimo en la media de residuales relativos debido a que la agitación para la homogeneización de una mezcla de sólidos lleva, en un tiempo de mezclado suficiente, a una separación de los componentes de la mezcla.

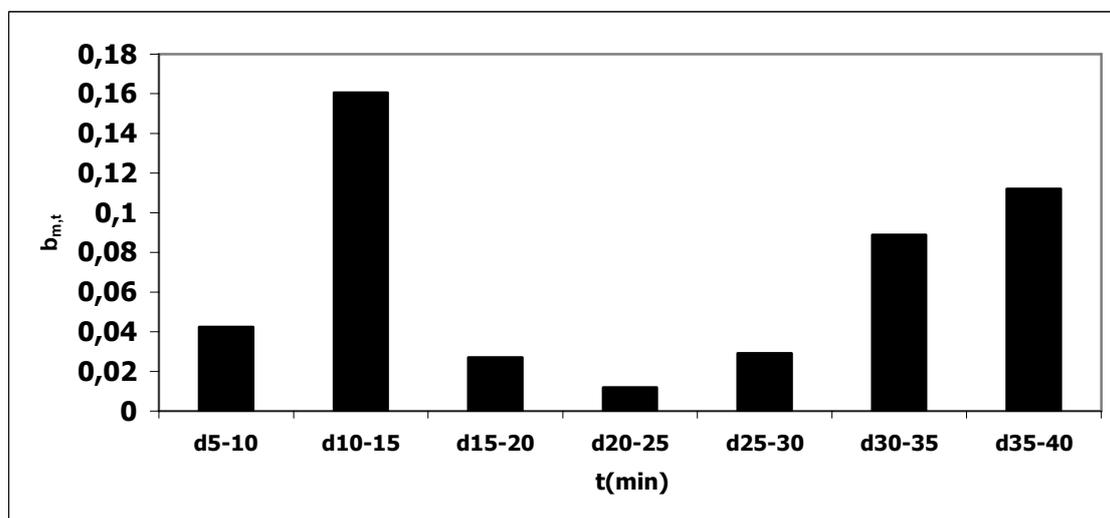


Figura 5: residual medio de la absorbancia por longitud de onda de dos tiempos de mezclado consecutivos

Además, se representó el residual de la absorbancia para cada longitud de onda mediante la ecuación**(3.2)**, dando lugar a la **figura 6**.

$$b_{\lambda} = \sqrt{(A_{t=x+5} - A_{t=x})^2} \quad (3.2)$$

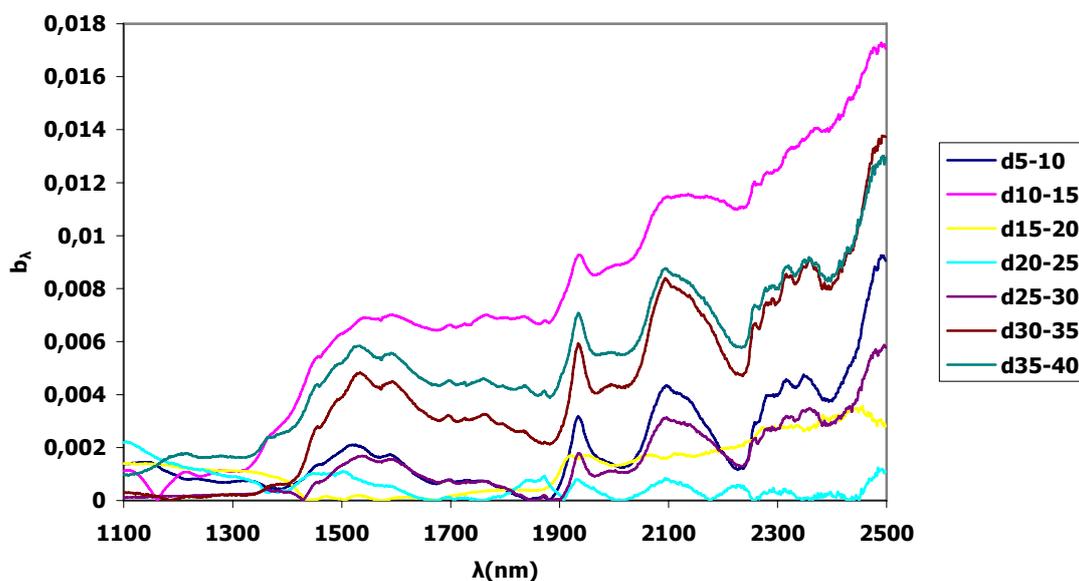


Figura 6: residual de absorbancia entre tiempos de mezclado consecutivos para frente a longitud de onda

Así, estos dos parámetros permitieron escoger un tiempo de 20min como el adecuado para la homogeneización de las muestras. Como se puede ver en la **figura 6**, el residual medio por longitud de onda tiene un mínimo entre 20 y 25 minutos. Además, en la **figura 5** se observa que el residual de dichos tiempos de mezclado es el que menos varía a largo del espectro. Teniendo en cuenta todo ello, se optó por un tiempo de mezclado de 22min como el idóneo.

3.4.3. Diseño del conjunto de muestras de calibración y predicción

La calibración multivariable encuentra en éste uno de los puntos críticos a la hora desarrollar un método analítico [20,21]. Un diseño erróneo del conjunto de muestras puede aumentar el número de muestras a preparar, provocar colinealidad entre variables (haciendo que el modelo no diferencie el incremento o disminución de un analito con un cambio en la concentración de otro analito u otro componente de la muestra).

Dado el desconocimiento de la matriz de los comprimidos comerciales, la baja concentración de los analitos y el estrecho rango de concentración de las muestras de producción, se decidió seguir la estrategia de dopaje para ampliar el rango de concentraciones de la calibración [22], ya que a través de este procedimiento se podría conseguir una mayor semejanza entre las muestras preparadas y las comerciales respecto a la preparación respecto a la preparación de muestras sintéticas (preparadas a partir de componentes puros). Así, se mezcló el molturado de

comprimidos y se añadieron los excipientes mayoritarios y los API para sobre o infradosificar las mezclas de sólidos. La calibración cubrió un rango del $\pm 25\%$ respecto a la concentración nominal. Este rango no fue elegido aleatoriamente si no que sigue los requerimientos establecidos por *European Pharmacopoeia*.

Para reducir el efecto de colinealidad entre analitos y matriz, se prepararon tres mezclas de los dos excipientes mayoritarios (1:3, 1:1, 3:1). Para cada nivel de concentración de API se prepararon tres muestras en contenido diferente de excipientes, excepto para el nivel de concentración nominal, para el que sólo se incluyó un punto, ya que las muestras de producción aportarían una variabilidad suficiente en este nivel.

Este diseño experimental no planteaba ningún problema en el caso de los comprimidos blancos (un único API) pero sí en el caso de los azules (dos API) ya que daría lugar a un número demasiado elevado de muestras a preparar. Por ello, se realizó un diseño independiente para cada API, manteniendo el otro principio activo en la concentración del valor nominal.

Así, se prepararon 13 muestras para cada API y tipo de pastilla repartidas en 5 niveles de concentración del +25%, +12%, 100%, -12% y -25% respecto al valor nominal. Como antes se ha mencionado, para cada nivel de concentración diferente del de valor nominal se prepararon tres muestras (con cada una de las mezclas de excipientes) y una para la concentración de valor nominal.

Además, se prepararon 7 muestras de concentración intermedia (entre los niveles de concentración del diseño experimental) por cada tipo de comprimido y API, para así evaluar la capacidad predictiva de los modelos generados.

Finalmente, se registraron los espectros NIR de 37 muestras de producción (17 azules y 20 blancas) provenientes de los tres lotes de producción y después analizaron por el método de referencia. Así, se pudieron usar muestras de producción tanto para la calibración como para la predicción.

3.4.4. Preparación de muestras y registro de espectros NIR

Se realizaron las mezclas de molturado de comprimidos comerciales, excipientes y API en unos viales de 4mL (el vidrio es prácticamente transparente en el infrarrojo cercano, lo que permite realizar medidas en recipientes de uso no específico), de diámetro interno ligeramente superior al

de la fuente de emisión del espectrómetro NIR, se homogeneizaron las mezclas en la túbula y se registraron los espectros NIR en estos mismos viales.

Los espectros NIR se registraron entre 1100 y 2500nm a intervalos de 2nm y en modo reflectancia. Cada espectro es el promedio de 32 barridos que el instrumento hace automáticamente. Se registraron tres espectros de cada muestra y se realizó un promedio de los mismos.

Una vez realizada la medida NIR en polvo, se cogió una cantidad de ≈ 300 mg de cada muestra y se compactó en la prensa. Por último se registró el espectro NIR de dichas pastillas colocándolas sobre la ventana del espectrómetro NIR.

3.4.5. Modelos de cuantificación

Se planteó el diseño de los modelos de cuantificación de manera que se construyó un modelo por cada API, tipo de pastilla y forma de presentación de la muestra (polvo o pastilla). Así, se pudieron estudiar las diferencias existentes entre los modelos con muestras de calibración en polvo y compactadas.

Los modelos se realizaron por *cross-validation (leave-one-out)* donde una muestra se substraía cada vez del conjunto de datos y se computa el modelo con las muestras restantes. Después se predice la muestra con el modelo generado y se calcula el residual de predicción. Se repite el proceso con cada una de las muestras y se combinan todos los residuales para calcular los parámetros de calidad del modelo. Después se valora la capacidad predictiva del modelo a través de muestras externas a las de calibración. A la hora de construir el modelo, es importante elegir adecuadamente el número de factores PLS. Así, la varianza explicada aumenta a medida que se añaden factores, pero se incrementa el riesgo de sobreajuste.

En la calibración se evaluaron además de la varianza Y explicada y el número de factores PLS, el error estándar de calibración (SEC) **(3.3)**, un parámetro que permite evaluar la desviación estándar (SD) entre los valores de referencia y los NIR (además lleva una corrección del sesgo), que servirá para evaluar la precisión del modelo junto con la pendiente y la ordenada en el origen de la representación de los valores de calibración NIR frente a los valores de referencia.

Una vez construido el modelo, se procedió a su validación. Para ello se predijo una serie de muestras que no fueron incluidas en el modelo. La evaluación de la bondad de la predicción se hizo siguiendo los parámetros de error estándar de predicción (SEP), que se calcula mediante la

ecuación **(3.3)** [23] y la pendiente y la ordenada en el origen de la representación de los valores predichos frente a los de referencia.

$$SEP(C) = \sqrt{\frac{1}{1-I} \sum_{i=1}^I \left(Y_{REF} - Y_{NIR} - \left[\frac{1}{I} \sum_{i=1}^I (Y_{REF} - Y_{NIR}) \right] \right)^2} \quad \text{(3.3)}$$

Donde Y_{NIR} es el valor hallado por el modelo (de calibración o de predicción), Y_{REF} es el valor hallado por el método de referencia e I es el número de puntos de calibración o predicción.

4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

4.1. DIFERENCIAS ESPECTRALES ENTRE POLVO Y PASTILLA

Se realizó un estudio de las posibles diferencias espectrales de muestra en polvo y compactado, así como el efecto de distintos pretratamientos espectrales. Se estudiaron los espectros recogidos en las pruebas previas. El primero de los parámetros estudiados fue el coeficiente de correlación entre los espectros en función de los pretratamientos realizados, ya que es el parámetro más utilizado en la comparación de espectros. Los resultados se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2: coeficientes de correlación entre los espectros de las muestras en polvo y en pastilla de las pruebas previas

Muestra	Abs y SNV	1D	2D, 2D+SNV, SNV+2D
Blanca, [VE]=valor nominal(VN)	0,9981	0,9945	0,9947
Blanca, [VE]=125% VN	0,9980	0,9938	0,9926
Azul, [VE]=VN, [MPA]=VN	0,9967	0,9888	0,9899
Azul, [MPA]=VN, [VE]=125% VN	0,9970	0,9895	0,9897
Azul, [VE]=VN, [MPA]=125 %VN	0,9980	0,9936	0,9931

Además se calculó la suma de residuales relativos a cada longitud de onda a través de la siguiente ecuación(4.1). Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 3**:

$$b_m = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \left(\frac{X_{\text{comp}} - X_{\text{polvo}}}{X_{\text{polvo}}} \right)^2} \quad (4.1)$$

Donde X_{comp} es el valor de la señal para cada longitud de onda en pastilla y X_{polvo} para las muestras en polvo.

Tabla 3: sumas de residuales relativos entre los espectros en polvo y en pastilla de las muestras preparadas en las pruebas previas.

Muestra	Abs	SNV	1D	1D ^a	2D	2D ^b	2D+SNV	2D+SNV ^c	SNV+2D	SNV+2D ^d
Blanca [VE]=VN	583,5	59,8	59,0	58,5	56,9	56,9	24,6	24,4	22,4	22,4
Blanca [VE]=125% VN	1184,9	60,9	57,8	57,1	79,0	79,0	41,2	41,1	31,9	31,9
Azul, [VE]=VN, [MPA]=VN	173,0	74,0	191,2	60,1	106,8	87,2	103,5	31,0	44,0	35,7
Azul, [MPA]=VN, [VE]=125%VN	160,7	69,2	73,4	61,4	797,5	111,3	86,9	55,6	357,6	45,0
Azul, [VE]=VN, [MPA]=125% VN	638,1	31,1	284,7	117,5	92,3	79,2	20,9	20,2	37,1	32,0

^a se retiró del cálculo $\lambda=1314\text{nm}$ y $\lambda=1528\text{nm}$ ya que valores cercanos a cero en la señal exageraron el valor del residual relativo

^b de manera análoga al caso ^a se retiró $\lambda=1432\text{nm}$

^c de manera análoga al caso ^a se retiraron $\lambda=1164\text{nm}$ y $\lambda=1460\text{nm}$

^d de manera análoga al caso ^a se retiró $\lambda=1432\text{nm}$

A través de estas pruebas se hace evidente, por un lado, que el coeficiente de correlación no refleja la diferencia entre espectros, ya que, por ejemplo, la adición del pretratamiento SNV antes

y después de realizar la 2ª derivada no varía el coeficiente de correlación, pero sí la suma de residuales relativos.

A través de los resultados obtenidos en la **tabla 3** se puede observar que ninguno de los pretratamientos habitualmente usados puede corregir la variación que supone el registro de la muestra en polvo respecto a la compactada.

Para poder asegurar la afirmación anterior, se calculó el residual que pudiera provenir de la variabilidad experimental. Para ello, se trataron los espectros de diversas pastillas registradas en diferentes días del mismo modo que los tratados en la **tabla 3**.

Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4**. Se observa que las sumas de residuales son significativamente inferiores y que el pretratamiento de los datos acentúa las diferencias, al contrario que en la comparación de espectros en polvo y en pastilla de la misma muestra.

Tabla 4: suma de residuales relativos entre espectros de pastillas registradas en días diferentes.

pastilla	ABS	SNV	1D ^a	2D ^b	2D+SNV ^c	SNV+2D ^d
Pastilla 1	0,3	3,9	15,8	6,6	13,5	6,6
Pastilla 2	0,4	3,9	34,2	6,6	5,7	6,6
Pastilla 3	0,6	5,0	25,7	5,5	4,7	5,5
Pastilla 4	0,2	5,6	34,7	5,4	16,3	5,4
Pastilla 5	0,4	4,2	19,2	6,7	12,1	6,7

^a se retiró del cálculo $\lambda=2006\text{nm}$ y $\lambda=2394\text{nm}$ ya que valores cercanos a cero en la señal exageraron el valor del suma residuales relativos

^b de manera análoga al caso ^a se retiraron $\lambda=1810\text{nm}$ y $\lambda=1506\text{nm}$

^c de manera análoga al caso ^a se retiró $\lambda=1358\text{nm}$

^d de manera análoga al caso ^a se retiraron $\lambda=1810\text{nm}$ y $\lambda=1506\text{nm}$

Así, a través de los resultados obtenidos se puede concluir que la suma de residuales relativos puede ser una buena herramienta para establecer la diferencia entre dos espectros. Además, visto que cuando los datos espectrales se pretratan con derivadas se pueden generar cocientes $\frac{X_{\text{comp}} - X_{\text{polvo}}}{X_{\text{polvo}}}$ muy elevados en determinadas longitudes de onda, ya que dicho pretratamiento genera valores cercano a cero, se podría establecer un valor umbral de dicho cociente, a partir del cual rechazar la longitud de onda asociada al cociente.

Por último, visto el inconveniente de establecer el valor umbral, se probó la utilización de la

mediana de los cocientes $\sqrt{\left(\frac{X_{\text{comp}} - X_{\text{polvo}}}{X_{\text{polvo}}}\right)^2}$ con el objetivo de evitar la exagerada influencia de

ciertos valores en el cálculo. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 5**. Dichos

resultados corroboran los obtenidos en la suma de residuales relativa, siendo más sencilla que ésta ya que no existe la necesidad de establecer valores umbral.

Tabla 5: mediana del cociente $\sqrt{\left(\frac{X_{\text{comp}} - X_{\text{polvo}}}{X_{\text{polvo}}}\right)^2}$ para las muestras pruebas previas

pastilla	ABS	SNV	1D ^a	2D ^b	2D+SNV ^c	SNV+2D ^d
Blanca [VE]=VN	1,98	0,06	1,03	1,00	0,17	0,10
Blanca [VE]=125% VN	2,10	0,06	1,08	1,04	0,18	0,12
Azul, [VE]=VN, [MPA]=VN	2,66	0,07	1,02	1,03	0,18	0,17
Azul, [MPA]=VN, [VE]=125% VN	2,49	0,07	0,93	0,94	0,18	0,18
Azul, [VE]=VN, [MPA]=125% VN	3,03	0,05	1,116	1,10	0,17	0,12

Este estudio da pie a pensar que es posible la utilización de parámetros diferentes al coeficiente de correlación para evaluar la similitud entre espectros. De todas maneras, es necesario un estudio ampliado para evaluar la utilidad de los parámetros anteriormente utilizados.

Prueba de sensibilidad: con el objetivo de valorar la diferencia que pudiera haber en la construcción del modelo de cuantificación en pastilla respecto al polvo, se realizó la representación del residual de la muestra sobredosificada respecto a la de valor nominal en 2^a derivada en cada longitud de onda para cada uno de las presentaciones de muestra. Para ello se siguió la ecuación(4.2):

$$b_{\lambda} = \sqrt{(X_{\lambda,125\%}^{\text{comp}} - X_{\lambda,100\%}^{\text{comp}})^2} - \sqrt{(X_{\lambda,125\%}^{\text{polvo}} - X_{\lambda,100\%}^{\text{polvo}})^2} \quad (4.2)$$

De esta manera, la representación de b vs. λ da lugar a una gráfica donde los valores positivos reflejan una mayor sensibilidad para el registro en pastilla y los valores negativos para el registro en polvo. En el análisis de dichas representaciones se obviaron las bandas del agua (1390-1490 y 1890-1990nm) ya que un ligero cambio en el grado de humedad podría sesgar los resultados y las conclusiones extraídas. Así, se observó, como se puede comprobar en la **figura 7**, que las diferencias en señal eran mayores en el registro de pastilla respecto al de polvo, lo que cobra importancia en la determinación de analitos a baja concentración (los trabajos de menor concentración de analito en espectroscopía NIR se sitúan entorno al 1% (w/w)).

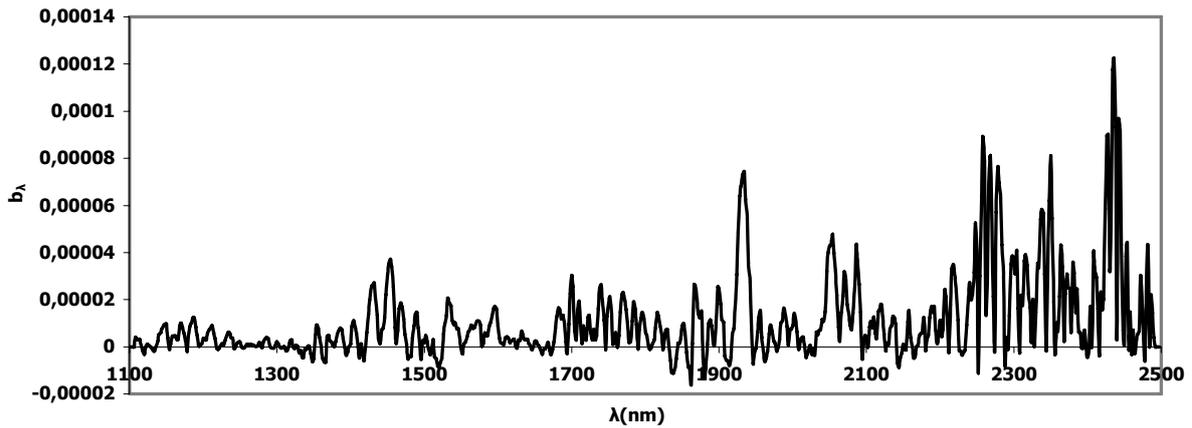


Figura 7: representación de la diferencia de sensibilidad del registro en pastilla frente al registro en polvo, a través de la ecuación(4.2) . La muestra utilizada fue el molurado de pastillas azules y su sobredosificación en un 25% con VE.

Este hecho concuerda con el modelo teórico donde la compactación de la muestra hace que se reduzca el volumen de aire presente, provocando una disminución en el *scattering*. Por tanto, la intensidad de la radiación reflejada por la muestra será menor, pero la penetración en la muestra aumentará [24,25]. Así, la compactación de la muestra hará que el camino óptico efectivo aumente, por tanto, la sensibilidad aumentará. En la **figura 8** se esquematiza este fenómeno.

[Diffuse reflectance method]

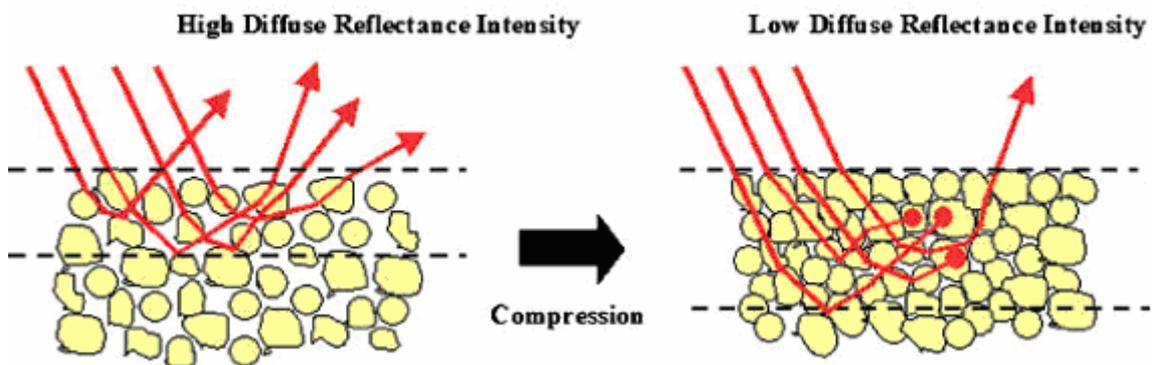


Figura 8: esquematización de las consecuencias en la reflectancia de una muestra por efecto de la compactación^[25]

4.2. ESTUDIO PREVIO A LA CONSTRUCCIÓN DE MODELOS CUANTITATIVOS

Se han desarrollado modelos cuantitativos y se ha evaluado la capacidad predictiva de los mismos.

Selección de los conjuntos de calibración y predicción de las muestras de producción:

En primer lugar, se realizaron sendos PCA para cada tipo de pastilla y pretratamiento para crear dos grupos de muestras de producción; uno de calibración y otro de predicción. El criterio que se siguió para la separación de las muestras fue que ambos grupos contuvieran la máxima variabilidad posible, en base a la inspección visual de los PCA. Así, se utilizaron 10 muestras de producción en todos los casos, 7 de predicción para los comprimidos azules y 10 de para los blancos.

Selección de los pretratamientos espectrales: la selección del pretratamiento suele ser un proceso empírico e iterativo, donde se prueban los diferentes pretratamientos hasta que se encuentra el que dé lugar a menos error. A pesar de ello, en este caso, se tomaron consideraciones previas; en el caso de la creación de modelos en polvo se escogió el SNV+2D, ya que además de errores bajos, como se observa en la **tabla 3**, es el pretratamiento donde menores sumas de residuales relativos se observan entre las muestras en polvo y en pastilla, como se ha discutido en el **apartado 4.1** lo que hace posible incluir muestras de producción intactas en el modelo de calibración.

En el caso de las muestras compactadas, la decisión se basó únicamente en el ensayo-error. A pesar de ello, la baja concentración del VE sugirió que la derivación del espectro ayudaría a hacer más evidentes las diferencias espectrales para la determinación de este analito.

Selección de los intervalos de longitudes de onda: la elección del rango de longitudes de onda fue un paso clave, sobre todo en la construcción de los modelos para la cuantificación del VE, cuya concentración en las muestras de producción es muy baja. Este hecho hizo que las diferencias espectrales se debieran en su mayor parte a las diferencias en la concentración de excipientes.

Para ello, se tomó la prueba previa (**apartado 3.4.1**) antes citada y se compararon los espectros de las muestras de valor nominal y las sobredosificadas. Así se pudieron delimitar las zonas espectrales donde el aumento de la concentración de API generaba una diferencia espectral apreciable, que a su vez correspondiese a una banda en el espectro puro.

La prueba se realizó en 2ª derivada de los espectros, ya que de esta manera las diferencias entre los dos espectros fueron más apreciables. Se obviaron las bandas debidas a la absorción del agua (1450nm, primer sobretono del enlace O-H y 1940nm, banda de combinación de las vibraciones fundamentales de tensión y oscilación), ya que las diferencias en el grado de humedad de la muestra podrían enmascarar las sutiles diferencias espectrales debidas al cambio en la concentración.

De esta manera se hallaron diferencias espectrales en el caso del VE en las regiones comprendidas entre 1100-1300nm, 1550-1700nm y 2150-2500nm. En la **figura 9** se muestran dichas diferencias en los espectros de las pastillas en 2ª derivada. Estas diferencias espectrales fueron corroboradas tanto en polvo como en comprimidos y en pastillas azules y blancas. Así, para la creación de los modelos multivariables se probaron dichas zonas espectrales y sus combinaciones.

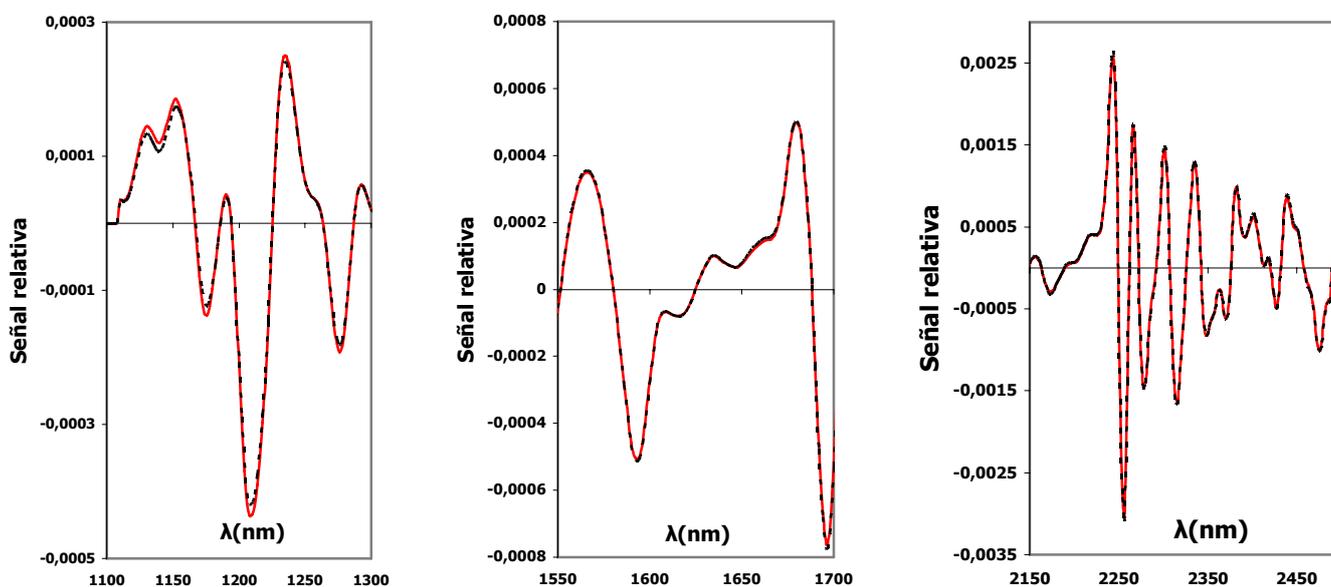


Figura 9: zonas espectrales de mayor diferenciación en la sobredosificación con VE. La **línea roja** indica el comprimido de [VE]=VN y la **línea negra discontinua** se refiere al comprimido [VE]=125% VN

En el caso del MPA la delimitación de zonas espectrales no es crítica, ya que la concentración de este API es 5 veces más elevada que el anterior y prácticamente todo el espectro refleja el aumento en concentración del MPA. Por otra parte, en la zona de 2150-2500nm se observa un efecto sistemático en la diferencia de señal debida al aumento de la concentración de MPA, como se observa en la **figura 10**. Por tanto se decidió usar para la cuantificación usar el rango antes mencionado y el espectro completo.

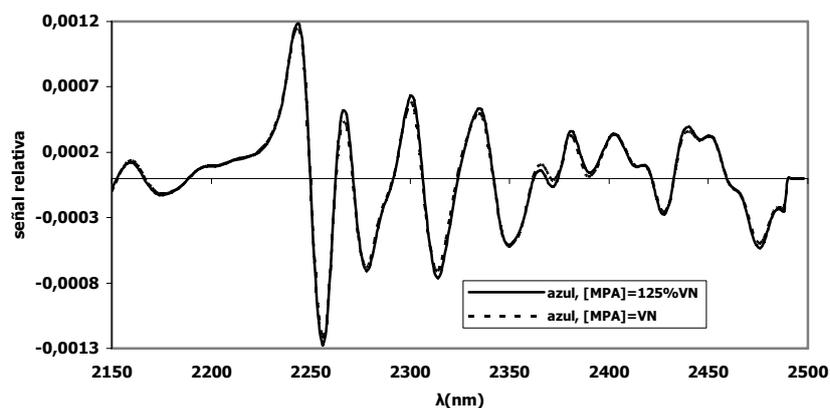


Figura 10: espectros de moltrurado de comprimidos azules en valor nominal y sobredosificado en 2ª derivada

4.3. MODELOS DE CUANTIFICACIÓN

Una vez establecido todos los posibles parámetros por interpretación de espectro, se ensayaron diferentes pretratamientos e intervalos de longitudes de onda para la construcción de los modelos.

4.3.1. Pastillas blancas

Modelos de muestras compactadas: se probaron las diferentes combinaciones posibles. En la **tabla 6** se detallan los parámetros más importantes tanto de calibración como de predicción de los modelos generados. La única restricción que se impuso a las combinaciones es que el rango espectral a (1100-1300nm) tenía que estar siempre en el modelo, ya que es la zona espectral que más información relevante contenía, debido a que los compuestos aromáticos (como es el caso del VE), absorben en esta zona del espectro [26]. De todas maneras, se comprobó mediante la construcción de modelos que dicha zona era importante a la hora de lograr una buena cuantificación.

No todas las muestras preparadas se han incluido en los modelos, ya que se halló una muestra anómala de calibración y otra de predicción. Se detectaron representando el residual del valor de predicción frente al de referencia (existen otras representaciones de residuales que son igualmente útiles y complementarios), aunque existen otros parámetros que ayudan en la detección como es la influencia de la muestra en el modelo.

Tabla 6: modelos generados para la cuantificación de VE en pastillas blancas con muestras dopadas compactadas. **En negrita** el mejor modelo encontrado.

Modelo	Pret	Rango espec	Nº fact	Pendiente (cal)	SEC	VAR Y exp.	ordenada origen(cal)	Pendiente (pred)	SEP	ordenada origen(cal)
1	SNV	a ^a	8	0,957	0,0471	95,7	0,071	1,09	0,061	-0,16
2	SNV	a+b ^b	9	0,959	0,0460	95,9	0,068	0,748	0,065	0,41
3	SNV	a+b+c ^c	7	0,964	0,038	96,4	0,059	-0,257	0,209	1,93
4	SNV	a+c	7	0,989	0,037	96,9	0,050	-0,846	0,274	2,88
5	1D	a	6	0,956	0,044	95,6	0,074	0,855	0,046	0,24
6	1D	a+b	7	0,969	0,040	96,9	0,051	0,889	0,043	0,21
7	1D	a+b+c	7	0,983	0,027	98,4	0,026	0,162	0,153	1,28
8	1D	a+c	7	0,987	0,024	98,7	0,021	0,176	0,156	1,25
9	2D	a	5	0,974	0,036	97,4	0,042	0,889	0,066	0,19
10	2D	a+b	6	0,987	0,025	98,7	0,020	0,892	0,053	0,18
11	2D	a+b+c	8	0,997	0,013	99,7	0,005	0,738	0,073	0,38
12	2D	a+c	7	0,991	0,021	99,1	0,015	0,738	0,073	0,39
13	SNV+2D	a	7	0,991	0,021	99,1	0,015	0,987	0,066	-0,01
14	SNV+2D	a+b	6	0,987	0,025	98,8	0,021	0,882	0,053	0,17
15	SNV+2D	a+b+c	6	0,987	0,025	98,8	0,025	0,817	0,048	0,243
16	SNV+2D	a+c	6	0,982	0,030	98,3	0,025	0,783	0,060	0,290
17	2D+SNV	a	6	0,988	0,024	97,3	0,019	0,945	0,066	0,077
18	2D+SNV	a+b	8	0,999	0,007	99,9	0,001	0,866	0,074	0,200
19	2d+SNV	a+b+c	5	0,954	0,048	95,4	0,076	0,506	0,098	0,785
20	2d+SNV	a+c	6	0,976	0,034	97,7	0,038	0,732	0,074	0,413

^a 1100-1300nm

^b 1550-1700nm

^c 2150-2500nm

Modelos de muestras en polvo: se repitió el procedimiento anteriormente descrito, en este caso con las muestras en polvo, imponiéndose una restricción más, el pretratamiento, como se ha explicado en el apartado de selección de pretratamiento espectrales.

En la generación de modelos para las muestras en polvo, ante la imposibilidad de registrar el espectro de muestras de producción debido a su bajo peso ($\approx 120\text{mg}$), se optó por incluir muestras de producción intactas en la calibración y predicción. Así, las características del mejor modelo hallado se describen en la **tabla 7**, junto a las del modelo en muestras compactadas. Cabe destacar que el valor anómalo de predicción que se ha mencionado en el apartado de muestras compactadas provino de la compactación o de la manipulación de la pastilla, ya que no muestra comportamiento anómalo en los modelos en polvo.

Las rectas de calibración y predicción de las pastillas blancas con muestras compactadas se presentan en la **figura 11** a modo de ejemplo:

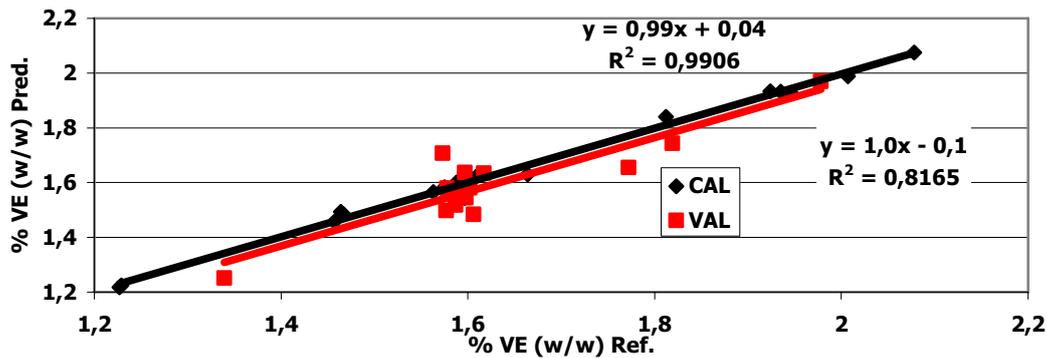


Figura 11: representación gráfica de las rectas de calibración en negro y la de predicción en rojo.

Tabla 7: Características de los mejores modelos hallados para la determinación de VE en pastillas blancas

	Muestras compactadas		Muestras en polvo	
	calibración	predicción	calibración	predicción
pretratamiento	SNV+ 2ª derivada			
intervalo espectral (nm)	1100-1300		1100-1300, 1550-1700 y 2150-2500	
nº de factores PLS	7		6	
rango de [VE] (% w/w)	1,33-2,08			
nº de muestras	12 dop. + 10 prod	6 dop. + 10 prod	12 dop + 10 prod	7 dop + 10 prod
pendiente	0,99±0,04	1,0±0,1	0,99±0,02	0,84±0,09
ordenada origen	0,01±0,02	-0,0±0,2	0,00±0,01	0,2±0,1
Varianza Y explicada (%)	99,1		99,7	
SEC/SEP	0,021	0,066	0,011	0,061

Los resultados hallados indican que la bondad de los modelos de calibración para ambas presentaciones de muestra es similar, siendo ligeramente superior en el caso de la muestras en polvo. Por otra parte, en el caso de la predicción, los resultados de las muestras compactadas son mejores a pesar de que el SEP sea ligeramente superior.

4.3.2. Pastillas azules

Se repitió el procedimiento antes descrito, esta vez para las pastillas azules. Las características de los mejores modelos hallados se describen en las siguientes tablas (**tabla 8** para la cuantificación del VE y **tabla 9** para la cuantificación del MPA).

Tabla 8: Características de los mejores modelos hallados para la determinación de VE en pastillas azules

	Muestras compactadas		Muestras en polvo	
	calibración	predicción	calibración	predicción
pretratamiento	SNV+2ª derivada		SNV+ 2ª derivada	
intervalo espectral (nm)	1100-1300		1100-1300	
nº de factores PLS	6		5	
rango de [VE] (% w/w)	1,33-2,08			
nº de muestras	12 dop. + 10 prod	5 dop. + 7 prod	12 dop + 10 prod	6 dop + 7 prod
Pendiente	0,97±0,04	0,9±0,1	0,98±0,03	1,09±0,09
ordenada origen	0,04±0,06	0,0±0,2	0,03±0,05	-0,0±0,1
Varianza Y explicada (%)	98,5		97,7	
SEC/SEP	0,030	0,064	0,032	0,067

En el caso de la determinación de VE en las pastillas azules, se observa, como en el caso anterior, que los resultados obtenidos para las dos presentaciones de muestras son parecidos.

Tabla 9: Características de los mejores modelos hallados para la determinación del MPA en pastillas azules

	Muestras compactadas		Muestras en polvo	
	calibración	predicción	calibración	predicción
Pretratamiento	2ª derivada + SNV		SNV+ 2ª derivada	
intervalo espectral (nm)	1100-1350,1550-1850 y 2050-2500		1100-1350,1550-1850 y 2050-2500	
nº de factores PLS	4		4	
rango de [MPA] (% w/w)	5,86-11,69			
nº de muestras	11 dop. + 9 prod	7 dop. + 7prod	12 dop + 9 prod	7 dop + 7 prod
Pendiente	0,99±0,02	1,00±0,04	0,99±0,02	1,01±0,07
ordenada origen	0,0±0,2	-0,0±0,3	0,0±0,1	-0,8±0,6
Varianza Y explicada (%)	99,5		99,8	
SEC/SEP	0,104	0,108	0,114	0,203

En el último caso, el de la determinación de MPA, API de mayor concentración en las muestras comerciales, la presentación de muestra no afecta a la calibración, pero sí a la predicción, haciendo que los resultados obtenidos con el modelo de muestras compactadas sean mejores. En este caso, los resultados obtenidos no se pueden explicar por un aumento en la sensibilidad en el modelo con muestras compactadas, pudiendo ser debido a un mayor parecido entre muestras dopadas y de producción.

Los resultados hallados muestran que, en general, se obtienen mejores resultados cuando se utilizan muestras dopadas compactadas. Además, los datos obtenidos indican que la mejora en la calibración por el uso de muestras de calibración compactadas se hace mayor en la determinación del API de mayor concentración.

5. CONCLUSIONES

- Se han desarrollado métodos cuantitativos PLS que permiten la cuantificación de principios activos en muestras farmacéuticas en bajas concentraciones, siendo validados estos resultados por muestras externas a la calibración, permitiendo la determinación de principios activos en muestras de producción intactas.
- Se han probado parámetros que permiten evaluar la similitud entre espectros alternativos al coeficiente de correlación.
- Se ha demostrado que la compactación de las muestras en el registro de espectros NIR en modo reflectancia aumenta el camino óptico efectivo y por tanto, la sensibilidad de la medida.
- Se ha demostrado que la compactación de las muestras de calibración mejora la cuantificación de analitos a baja concentración en la utilización de NIR en modo reflectancia para análisis de comprimidos farmacéuticos intactos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Handbook of Near-Infrared Analysis, 2nd edition, Marcel Dekker Inc (2001) cap. 2.
- [2] W. Herschel, Philosophical Trans. R. Soc. 90 (1800) 255-283.
- [3] K.H. Norris, J.R. Hart, Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds, Humidity Moisture Papers Intern. Symp. 1963 (1965) 19-25.
- [4] J.Y. Chen, C. Iyo, S. Kawano, F. Terada, Development of calibration with sample cell compensation for determining the fat content of unhomogenised raw milk by a simple near infrared transmittance method, J. Near Infrared Spectrosc. 7 (1999) 265-273.
- [5] N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.R. Smith, Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity testing of content of intact steroid tablets, Analyst 126 (2001) 2207-2211.
- [6] P. Williams, K. Norris, Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, American Association of Cereal Chemists (2001) cap. 1.
- [7] H.G. Hecht, Comparison of continuum models in quantitative diffuse reflectance spectrometry, Anal. Chem. 48 (1976) 1775-1779.
- [8] G. Kortum, J. Vogel, Theory of diffuse reflection of light on powdered materials, Z. Phys. Chem. 18 (1958) 110-122.
- [9] D.J. Dahm, K.D. Dahm, Representative layer theory for diffuse reflectance, Appl. Spectrosc. 53 (1999) 647-654.
- [10] M. Alcalá, Utilización de la espectroscopía NIR en el control analítico de la industria farmacéutica. Desarrollos iniciales en PAT, tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Química Analítica (2006) cap. 2.
- [11] D. Sun, Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control, 1st edition, Elsevier Inc (2009) cap. 2.
- [12] I. E. Frank, J. H. Kalivas, B. R. Kowalski, Partial Least Squares Solutions for Multicomponent Analysis, Anal. Chem. 55 (1983) 1800-1804.
- [13] P. Reed Larsen, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, and Kenneth S. Polonsky, Williams Textbook of Endocrinology, 10th edition, Elsevier Inc, (2004) cap. 1.
- [14] B. Drager, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edition, Wiley (2001) cap. 5.
- [15] B. Drager, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd edition, Wiley (2001) cap. 5.
- [16]] P. Reed Larsen, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, and Kenneth S. Polonsky, Williams Textbook of Endocrinology, 10th edition, Elsevier Inc (2004) cap. 5.
- [17] A. Segall, F. Hormaechea, M. Vitale, V. Perez, M.T. Pizzorno, Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of estradiol valerate and medroxyprogesterone acetate in a tablet formulation, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 803-808.
- [18] T. Schicksnus, C. C. Müller-Goymann, The influence of hydrotropic substances on the UV-detection of 17 β -estradiol. Paper presented at: Proc. 4th Meeting ADRITELF/APV/APGI; 2002 8-11 April; Florence, Italy.
- [19] Council of Europe; European Pharmacopoeia, 5th edition (2004).
- [20] M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy., J. Pharm. Sci. 97 (2007) 1236-1245.
- [21] M. Blanco, M.A. Romero, M. Alcalá, Strategies for constructing the calibration set for a near infrared spectroscopic quantitation method., Talanta. 64 (2004) 597-602.
- [22] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, N. Pou, Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses, Analyst. 126 (2001) 1129-1134.

[23] P. Williams, K. Norris, Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, American Association of Cereal Chemists (2001) cap. 8.

[24] S.M. Short, R.P. Cogdill, P.L.D. Wildfong, J.K. Drennen III, C.A. Anderson, A near-infrared spectroscopic investigation of relative density and crushing strength in four-component compacts., J. Pharm. Sci. 98 (2009) 1095-1109.

[25] M. Otsuka, H. Tanabe, K. Osaki, K. Otsuka, Y. Ozaki, Chemoinformetrical evaluation of dissolution property of indomethacin tablets by near-infrared spectroscopy., J. Pharm. Sci. 96 (2007) 788-801.

[26] P. Williams, K. Norris, Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, American Association of Cereal Chemists (2001) cap. 10.

7. ANEXOS

7.A. ESPECTROS UV-Vis

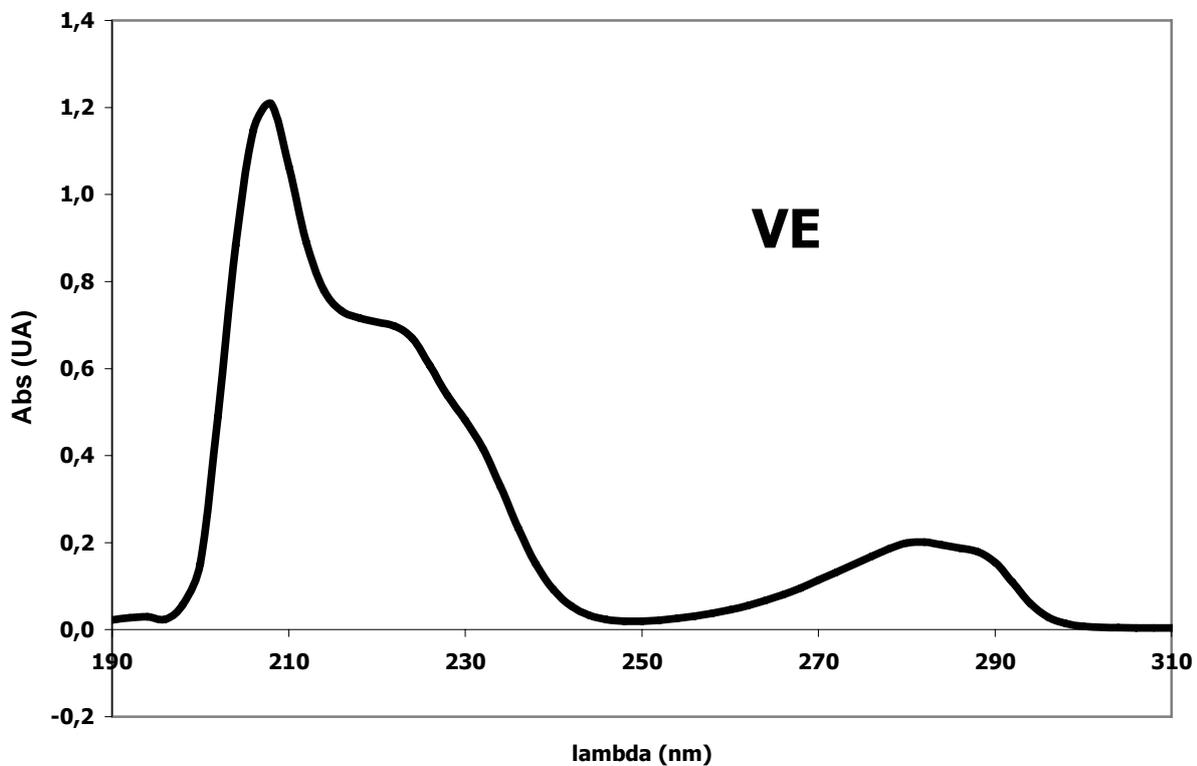
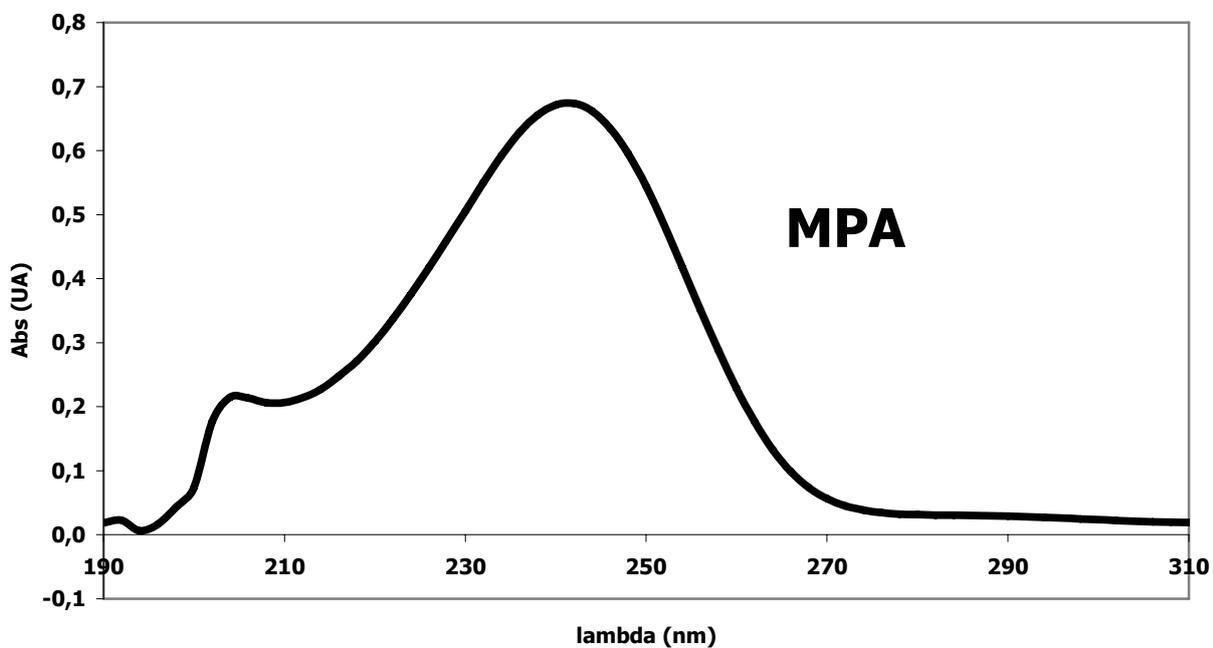
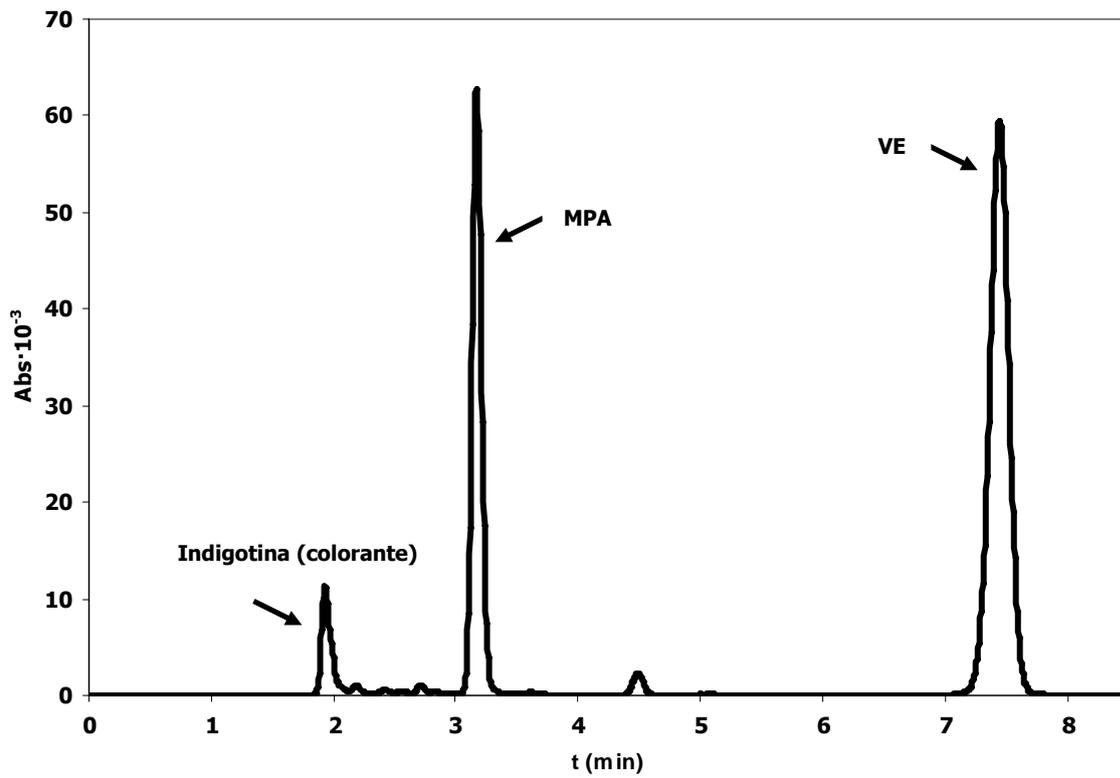
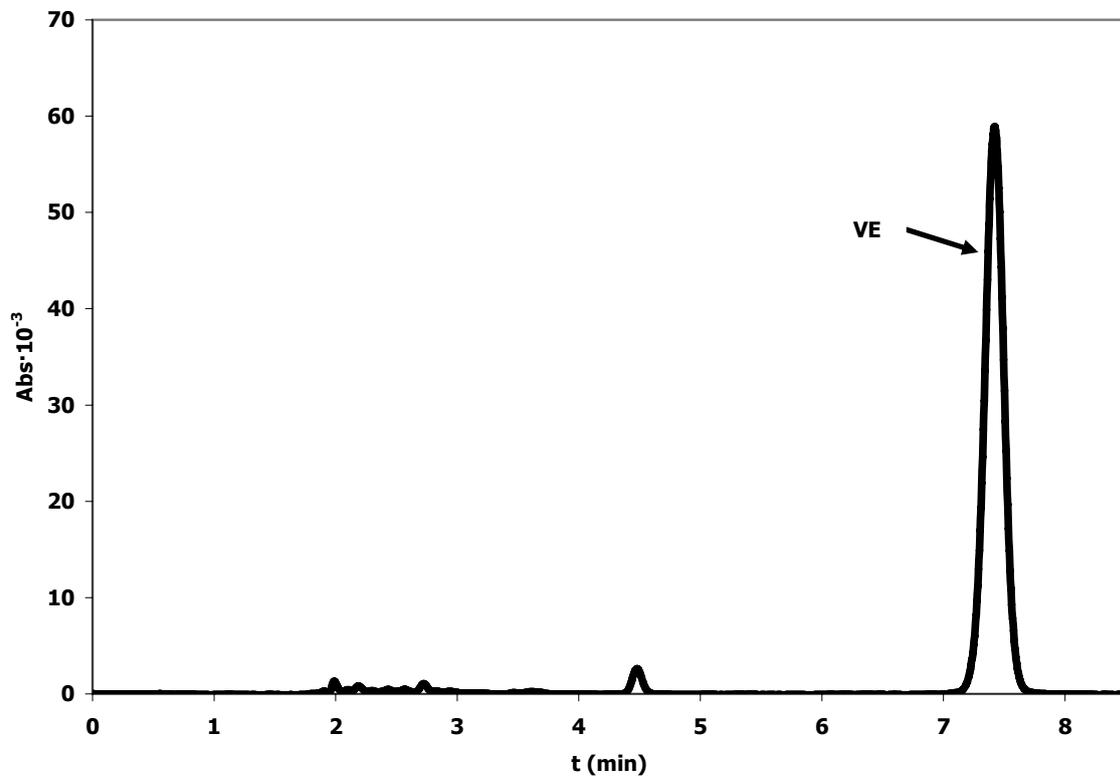


Figura A: espectros UV-Vis de a) MPA y b) VE

7.B. CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS



a)



b)

Figura B: cromatogramas de las muestras de producción; a) comprimido azul y b) comprimido blanco