



Universitat Autònoma de Barcelona

Utilización de la Espectroscopia NIR
en el Control Analítico
de la Industria Farmacéutica
Desarrollos iniciales en PAT

Tesis Doctoral



Grup de Quimiometria Aplicada
Universitat Autònoma de Barcelona

Manel Alcalà Bernàrdez

Bellaterra, 2006



Universitat Autònoma de Barcelona

UTILIZACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA NIR
EN EL CONTROL ANALÍTICO DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA
DESARROLLOS INICIALES EN PAT

Tesis Doctoral

Manel Alcalà Bernàrdez

Bellaterra, 2006



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Química

Unitat de Química Analítica

Dr. Marcelo Blanco Romia, catedrático de Química Analítica de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “**Utilización de la Espectroscopia NIR en el Control Analítico de la Industria Farmacéutica. Desarrollos iniciales en PAT**”, que constituye la Memoria presentada por Manel Alcalà Bernàrdez para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizado bajo mi dirección y reuniendo, según mi parecer, las condiciones exigidas para este tipo de trabajo.

Y para que quede constancia, firma el presente certificado en Bellaterra a 31 de mayo de 2006.

Dr. Marcelo Blanco Romia

“Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama”

Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

Estas palabras son posiblemente las más difíciles, quizás tímidas, de ser plasmadas en negro sobre blanco. Llegado a este punto, uno debe echar la vista atrás para recordar y agradecer a todas aquellas personas que han ayudado a llevar este trabajo a su punto y seguido, nunca final.

Al Profesor Marcelo Blanco por darme la oportunidad de pertenecer al *Grup de Quimiometria Aplicada* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* y enseñarme todo aquello que hoy muestro en esta memoria. El agradecimiento es extensivo a todos los compañeros, docentes y doctorandos, con los cuales he compartido esta experiencia año tras año.

Los amigos, esa familia que afortunadamente uno gana día tras día, han hecho que todos los momentos dulces nunca sean olvidados. Yenne, Wilfredo, Giselle, Gastón, Sylvia, Yovan, Javier, Pio, Alejandro y a mi Habana entera, gracias por estar ahí y hacer que me sienta agraciado de vuestra amistad, amor y compañía.

Empezamos juntos, allá por el 2001. Fue duro, codo con codo, lágrima tras lágrima y logro tras logro, pero lo hemos alcanzado. Dámarih y Gastoncito, gracias por haber sido esa parte fundamental en mi camino.

Tener a la familia cerca es algo único e impagable; ojala nunca ocurriera lo contrario. Bitiña linda, gracias por tu alegría, tranquilidad y sabiduría, contigo todo es diferente. Eloi, por hacer que el niño que llevo dentro siga vivo. Mamá y Papá, gracias por vuestros valores, apoyo, comprensión y cariño. Vuestro esfuerzo y sacrificio ha dado sus frutos, por todo ello, esta tesis es también vuestra.

A todos, de corazón,

Manel

ABSTRACT

OBJETIVOS..... 1

INTRODUCCIÓN

1 Espectroscopia NIR

1.1 Introducción 3
 1.2 Fundamentos de la radiación NIR..... 5
 1.3 Instrumentación..... 12
 1.4 Aplicaciones en la industria farmacéutica..... 17

2 Quimiometría

2.1 Introducción 21
 2.2 Etapas del proceso de modelado 22
 2.3 Análisis cualitativo..... 26
 2.4 Análisis cuantitativo..... 33
 2.5 Validación del método analítico 41

3 Tecnología analítica de procesos en la industria farmacéutica

3.1 Introducción 47
 3.2 Avances en control de calidad mediante PAT..... 47
 3.3 ¿ Por qué NIR ?..... 49
 3.4 Aplicaciones NIR durante proceso farmacéutico 50
 3.4.1 Identificación 50
 3.4.2 Determinación de humedad 51
 3.4.3 Tamaño de partícula..... 52
 3.4.4 Homogeneidad de mezclas 53
 3.4.5 Granulación húmeda 54
 3.4.6 Polimorfismo 55
 3.4.7 Compactación 57
 3.4.8 Ensayo de disolución 58
 3.4.9 Ensayo de contenido 59

METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4	Introducción	61
5	Metodología	62
5.1	Descripción y preparación de muestras.....	62
5.2	Instrumentación.....	67
5.2.1	<i>Espectroscopia NIR</i>	<i>67</i>
5.2.2	<i>Técnicas instrumentales de referencia</i>	<i>68</i>
5.3	Programas para adquisición y tratamiento quimiométrico de espectros ..	71
6	Discusión de los resultados	75
6.1	Identificación de productos farmacéuticos.....	75
6.2	Determinación de <i>tablet hardness</i>	76
6.2.1	<i>Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Mirtazapina ..</i>	<i>77</i>
6.2.2	<i>Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Zamene</i>	<i>80</i>
6.3	Ensayo de disolución	82
6.4	Determinación principios activos y excipientes.....	91
6.4.1	<i>Cuantificación de Mirtazapina en comprimidos farmacéuticos.....</i>	<i>92</i>
6.4.2	<i>Cuantificación de Deflazacort en comprimidos de Zamene</i>	<i>97</i>
6.4.3	<i>Cuantificación de cinco principios activos en Frenadol</i>	<i>100</i>
6.4.4	<i>Cuantificación de Ketoprofeno y Parabenos en Fastum Gel</i>	<i>104</i>
6.5	Transformación polimórfica del principio activo	
	Dexketoprofeno en Enantyum	109
7	Conclusiones	119

ANEXOS

- 1) Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by Near infrared Spectroscopy. A contribution to Process Analytical Technologies.
- 2) A Process Analytical Technology approach based on Near Infrared Spectroscopy: tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets.
- 3) Determination of dissolution profiles in intact pharmaceutical tablets by NIR Spectroscopy.
- 4) Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a Near Infrared Spectroscopic method.
- 5) Determination of active principle ingredient and preservatives in a hydrogel pharmaceutical preparation by Near Infrared Spectroscopy.
- 6) Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations
- 7) Use of Near-Infrared Spectroscopy for Off-Line Measurements in the Pharmaceutical Industry

ABSTRACT

The application of NIR Spectroscopy to the determination of interest parameters in the pharmaceutical industry has been studied, with the intention of proposing new, faster and effective methodologies than the conventional methods.

The studies develop a wide variety of methods that cover the determination of active principles in process samples or finished products, also physical properties of these same samples, in different matrices and concentration levels.

New NIR methods for the determination of the five active principles in a formulation, constituted by a granulated solid, have been developed, with concentrations between 6% up to 0.04%; this method demonstrates the capacity of the technique in multiple determinations and its remarkable sensitivity. Another example of the capacity of the technique constitutes the determination of active principles and the preservatives of a pharmaceutical hydrogel that presents a strong absorption of the matrix and low concentration of the preservatives. Also, methods for the determination of the active principle in intact tablets have been developed, which allows the study of content uniformity in unit doses of the preparation.

The developed methods have been validated following the guides ICH and EMEA which allow their application for the analytical quality control of production processes.

Another aspect of the study is the establishment of methods to determine physical parameters of finished products, as compaction pressure and dissolution test, which are both closely related. The NIR method allows the determination of the complete dissolution profile of a tablet from its spectrum, which provides very fast information (less than 1 second) that by the conventional method needs more than 1 hour. The determination of the compaction pressure of tablets has given rise to a new method of determination of active principles in individual tablets, using solely laboratory tablets as the calibration set, which allows obtaining simpler and robust models than NIR methods developed until the moment.

The application of new chemometric methods for the treatment of spectra (MCR-ALS) has allowed to identify polymorphic changes (from crystalline to amorphous form) that take place during the process of wet granulation, which is a frequent stage of the pharmaceutical process. This polymorphic transformation can have influence in the bioavailability of the active principle.

The memory also includes a chapter of a book, by order of the publisher, on the application of the NIR in the pharmaceutical field and that gathers the main contributions made in this field, whose interest and development are in continuous growth.

RESUMEN

Se realiza un estudio de la aplicación de la Espectroscopia NIR a la determinación de parámetros de interés en la industria farmacéutica con el objeto de proponer nuevas metodologías más rápidas y eficaces que sean alternativas reales a los métodos convencionales.

Los estudios desarrollan una amplia variedad de métodos que cubren desde la determinación de principios activos en muestras de proceso o de producto acabado, hasta propiedades físicas de estas mismas muestras en diferentes matrices y niveles de concentración.

Se han desarrollado nuevos métodos NIR para determinación de los cinco principios activos en una formulación, constituida por un sólido granulado, con concentraciones comprendidas entre el 6% hasta 0.04%; este método demuestra la capacidad de la técnica en la determinación múltiple y su notable sensibilidad. Otro ejemplo de la capacidad de la técnica lo constituye la determinación de principios activos y de los conservantes de preparado tipo gel que presenta como característica remarcable la fuerte absorción de la matriz y la baja concentración de los conservantes. De manera semejante se ha establecido métodos para la determinación del principio activo en comprimidos intactos, lo que permite el estudio de la uniformidad de contenido de las unidades de dosis de la preparación.

Los métodos desarrollados han sido validados siguiendo las guías ICH y EMEA que permiten su aplicación como métodos de calidad suficiente para el control analítico de un proceso de producción.

Otro aspecto del estudio es el establecimiento de métodos para determinar parámetros físicos de los productos acabados como son la presión de compactación y el ensayo de disolución, estrechamente relacionado con el anterior. El método NIR permite la determinación del perfil completo de disolución de un comprimido a partir de su espectro, lo que proporciona una información muy rápida (menos de 1 segundo) que por el método convencional necesita más de 1 hora. La determinación de la presión de compactación de los comprimidos ha dado lugar a un nuevo método de determinación de principios activos en comprimidos individuales a partir únicamente de muestras de laboratorio, lo que permite obtener modelos más simples y robustos que los métodos NIR desarrollados hasta el momento.

La aplicación de nuevos métodos quimiométricos de tratamiento de espectros (MCR-ALS) ha permitido conocer los cambios de forma polimórfica (de cristalina a amorfa) que se producen durante el proceso de granulación húmeda, que es una etapa frecuente del proceso de fabricación farmacéutico. Esta transformación polimórfica puede tener influencia en la biodisponibilidad del principio activo.

La memoria incluye también un capítulo de un libro por encargo del editor sobre la aplicación del NIR en el campo farmacéutico y que recoge las principales aportaciones realizadas en este campo, cuyo interés y desarrollo está en continuo crecimiento.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Una incorrecta realización del proceso farmacéutico puede tener graves consecuencias para la salud humana. Por ello, muchas entidades reguladoras velan por el cumplimiento del control de calidad de las industrias farmacéuticas.

Las etapas en la producción de un fármaco son muy diversas, por lo que la variedad de controles analíticos a realizar es elevada. Desde la entrada de materias primas hasta la obtención del producto acabado, todas y cada una de las etapas del proceso deben estar perfectamente establecidas. No cabe duda, de la gran variedad de métodos analíticos que se dan cita durante todo el proceso, por lo que la incorporación de nuevas metodologías más rápidas y sencillas, permiten mejorar la eficiencia del control del proceso.

La Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano (NIRS, *Near Infrared Spectroscopy*) presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas instrumentales, que la convierten en una herramienta idónea para satisfacer estas necesidades analíticas de un modo adecuado: ausencia de pretratamiento de muestra, nulo consumo de reactivos sin generación de residuos, fácil y rápida adquisición de resultados, entre otras.

Los principales objetivos de esta tesis son el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la industria farmacéutica, utilizando la Espectroscopia NIR y técnicas quimiométricas multivariantes. Se pretende establecer nuevas estrategias que permitan obtener modelos de calibración más simples, robustos y con mejor capacidad predictiva, para la cuantificación de principios activos y la determinación de propiedades físicas en muestras farmacéuticas. Los métodos a desarrollar deben aportar nuevas soluciones a problemas reales de la industria farmacéutica, para luego ser utilizados tanto en el control del proceso farmacéutico como en el control de calidad del producto acabado.

INTRODUCCIÓN

1 Espectroscopia NIR

1.1	Introducción	3
1.2	Fundamentos de la radiación NIR.....	5
1.3	Instrumentación.....	12
1.4	Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	17

1. Espectroscopia NIR

1.1 Introducción

El descubrimiento de la región espectral del Infrarrojo Cercano se atribuye a Sir William Herschel [1], cuando en el año 1800 examinó la radiación infrarroja a través de la medida de temperatura de los colores creados por el paso de la luz solar a través de un prisma.

Habitualmente esta región espectral se conoce como NIR, del acrónimo en inglés *Near InfraRed*. Las características espectrales de la región NIR, bandas anchas, solapadas y de baja intensidad, retardaron su utilización por los espectroscopistas de la época. No fue hasta el 1881 cuando Abney y Festing [2] documentaron los primeros espectros NIR de líquidos orgánicos en el intervalo espectral de 700 a 1200 nm. Su utilización empezó a normalizarse a mediados del siglo XX, con la aparición de los primeros equipos capaces de registrar espectros en dicha región. En 1954, Wilbur y Kaye [3] presentó los espectros de distintos productos orgánicos registrados en el intervalo de 700 a 3500 nm, donde se asignaban por primera vez las bandas de distintos grupos funcionales. A partir de ese momento surgen numerosas publicaciones que describen diversas determinaciones cuantitativas en la región NIR [4,5].

1 - Herschel, W. (1800) Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **90**, 255.

2 - Abney W. and Festing, E.R. (1881) On the Influence of the Atomic Grouping in the Molecules of Organic Bodies on Their Absorption in the Infra-Red Region of the Spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **172**, 887-918.

3 - Kaye, W. (1954) Near-infrared spectroscopy : I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochimica Acta*, **6**, 257.

4 - Mitchell, J. A., Bockman, C. D. and Jr. Lee, A. V. (1957) Determination of acetyl content of cellulose acetate by near infrared spectroscopy. *Anal. Chem.*, **29**, 499-502.

Fue sobre el 1960, cuando el grupo de investigación liderado por Karl Norris y perteneciente a la USDA (*United States Department of Agriculture*), impulsó la utilización de la técnica NIR en el estudio de matrices complejas de origen natural [6,7]. A partir de ese momento, el interés por la espectroscopia NIR aumentó considerablemente.

Los avances en el campo de la electrónica y la óptica permitieron, a partir del año 1970, la aparición de nuevos instrumentos que permitían el registro de espectros completos, con una mayor rapidez y reproducibilidad [8,9]. Otro avance clave en el desarrollo de la técnica fue en el campo de la informática; la posibilidad de utilizar ordenadores con más y mejor capacidad de cálculo, permitió obtener y almacenar una gran cantidad de información espectral, que podía ser tratada por las técnicas quimiométricas implementadas en los programas de gestión de los equipos y así poder extraer la información analítica de interés [10,11,12].

Actualmente, la Espectroscopia NIR se utiliza ampliamente en el campo agroalimentario, textil, petroquímico y farmacéutico, entre otros. Dadas sus ventajas frente a otras técnicas instrumentales, la Espectroscopia NIR se considera como técnica de relevancia en la Tecnología Analítica de Procesos de la industria farmacéutica. Su capacidad de analizar muestras de un modo no destructivo ni

5 - Birth, G.S. and Norris, K.H. (1958) An Instrument Using Light Transmittance for Nondestructive measurement of Fruit Maturity. *Food Technology*, **12**, 592.

6 - Norris, K.H. (1964) *Trans. Am. Soc. Agrico. Eng.*, **7**, 240.

7 - Ben-Gera, I. and Norris, K.H. (1968) Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Sciences*, **7**, 240.

8 - Noble, D. (1995) Illuminating near-IR. *Analytical Chemistry*, **67(23)**, 735A-40A.

9 - Henry, C.M. (1999) Near-IR gets the job done. *Analytical Chemistry*, **71(17)**, 625A-628A.

10 - Ciurczak, E.W. (2001) Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In Burns, D.A. and Ciurczak, E.W. (eds), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edn; Marcel Dekker, Inc.; New York, pp 7-9.

11 - Mark, H. (1989) Chemometrics in near-infrared spectroscopy. *Anal. Chimica Acta*, **223**, 75-93.

12 - Beebe, K.R. and Kowalski, B.R. (1987) An introduction to multivariate calibration and analysis. *Analytical Chemistry*, **59(17)**, 1007A-1010A, 1012A, 1014A-1017A.

invasivo, sin apenas tratamiento previo y permitiendo la obtención rápida de resultados analíticos, contribuyen a aumentar aún más su popularidad [13].

1.2 Fundamentos de la radiación NIR

La región del infrarrojo comprende el intervalo espectral entre 780 y 10^6 nm. Según el fenómeno espectroscópico que provoca la absorción de energía por parte de la materia, podemos dividir esta región en tres zonas: i) infrarrojo cercano 780 - 2500 nm (NIR), ii) medio 2500 - $4 \cdot 10^4$ nm (MIR) y iii) lejano $4 \cdot 10^4$ - 10^6 nm (FIR). El infrarrojo lejano (FIR) se debe a las rotaciones moleculares, mientras que el medio (MIR) proviene de las vibraciones moleculares fundamentales. El origen del infrarrojo cercano (NIR) se debe a los sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales del infrarrojo medio [14,15].

Una molécula absorbe radiación infrarroja cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de

13 - Ciurczak, E. (2006) Near-Infrared Spectroscopy: Why It Is Still the Number One Technique in PAT. *Journal of Process Analytical Technologies*, **3**(1), 19-21.

14 - Workman Jr., J.J. (1999) Review of process and non-invasive near infrared and infrared spectroscopy: 1993-1999. *Appl. Spectrosc. Reviews* **34**, 1-89.

15 - Goddu, R.F. and Delker, D.A. (1960) Spectra-Structure Correlations for Near-Infrared Region. *Anal. Chem.*, **32**, 140-141.

energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular y como consecuencia se absorbe la radiación [16].

Cuando se trata de especies homonucleares (H_2 , O_2 , N_2, \dots), el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

Los átomos en una molécula nunca se encuentran inmóviles, ni tan siquiera cerca de la temperatura de cero absoluto. Dicho movimiento puede aproximarse al de un oscilador armónico. Cuando se produce la vibración, la energía potencial cambia continuamente, acercándose a cero cuando los átomos se acercan a la posición de equilibrio y haciéndose máxima cuando la distancia entre los átomos es mínima o máxima. El movimiento de los átomos en la molécula está confinado en un pozo de potencial, caracterizado por la atracción y repulsión de los mismos. Los niveles energéticos de los átomos confinados en el pozo de potencial están cuantizados (**Figura 1.1**).

La energía potencial del enlace definido por un oscilador armónico simple viene dada por la expresión:

$$E = \frac{1}{2} k x^2 \quad (1.1)$$

siendo k la constante de fuerza del enlace y x la distancia entre átomos.

16 - Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (2001) Principios de análisis instrumental, 5ª ed., McGraw-Hill.

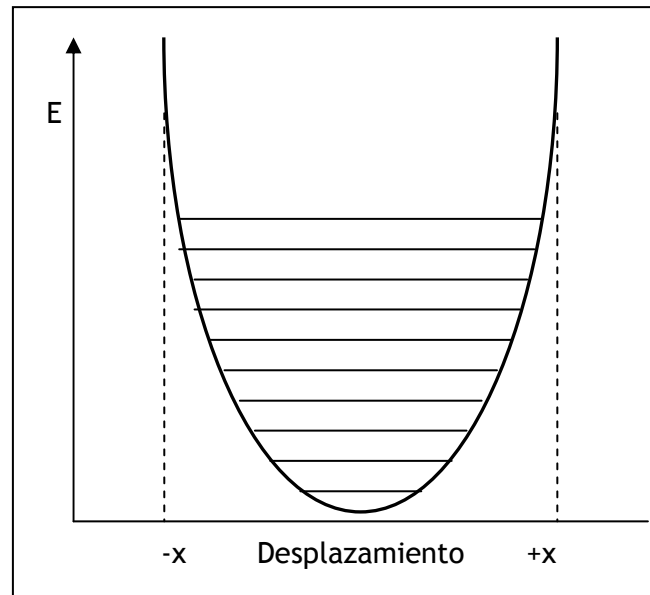


Figura 1.1. Energía Potencial en el modelo del oscilador armónico.

La frecuencia natural de vibración de un sistema constituido por dos masas unidas por un muelle perfectamente elástico viene dada por:

$$\nu = \sqrt{\frac{1}{2\pi} \left(\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2} \right)} \quad (1.2)$$

siendo ν la frecuencia, k la constante de fuerza y m_1 m_2 las masas de cada una de los átomos.

Las ecuaciones de mecánica clásica no describen completamente el comportamiento de partículas atómicas, ya que no recogen la naturaleza cuantizada de las energías vibracionales moleculares, ni de de otras energías atómicas y moleculares. La solución a la ecuación de Schrödinger para una partícula confinada en un pozo de potencial es un conjunto discreto de niveles energéticos permitidos. Para cada molécula, existen niveles discretos de energía y las únicas transiciones posibles son entre niveles energéticos consecutivos.

La energía vibracional, resolviendo ecuaciones cuánticas, se puede expresar como:

$$E_{\text{vib}} = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (1.3)$$

dónde n es el número cuántico vibracional (0,1,2,3...), h la constante de Planck y ν la frecuencia de vibración. El resultado de combinar las ecuaciones (1.2) y (1.3) proporciona la expresión de la energía vibracional de una molécula diatómica teniendo en cuenta su naturaleza cuantizada:

$$E_{\text{vib}} = \left(n + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\left(\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2} \right)} \quad (1.4)$$

Este modelo del oscilador armónico resulta incompleto para describir moléculas reales, ya que cuando dos átomos se acercan existe una repulsión coulombica entre sus núcleos y en sentido contrario del movimiento, lo que implica un aumento más rápido de la energía potencial. Por otra parte, cuando los átomos se alejan, la distancia interatómica se acerca a la distancia de rotura del enlace, con la consiguiente disminución de la energía potencial. Las molécula reales se acercan más al comportamiento de un oscilador anarmónico (**Figura 1.2**). Las curvas energéticas de los osciladores armónico y no armónico son muy similares a niveles bajos, por lo que las moléculas sólo tienen un comportamiento armónico entorno a la posición de equilibrio.

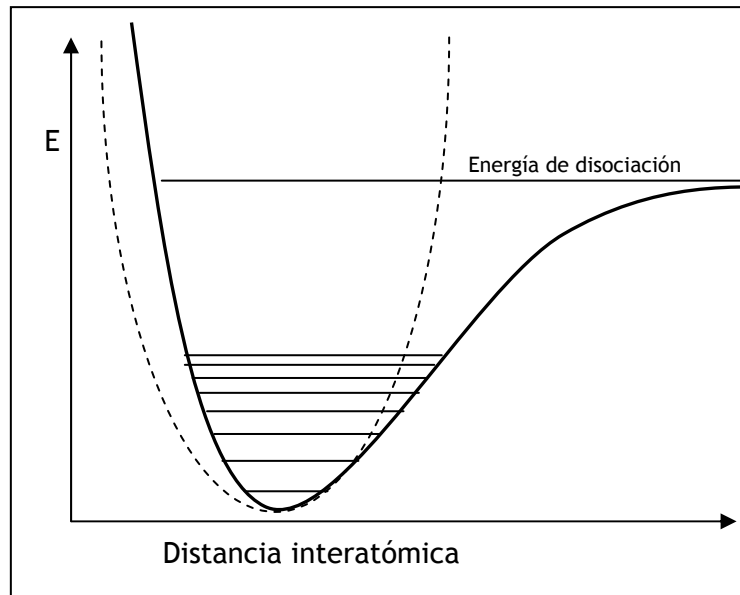


Figura 1.2. Energía Potencial en el modelo del oscilador armónico (—) y anarmónico (—).

La expresión de la energía vibracional (ecuación 1.3), corregida con términos que explican la anarmonicidad de las moléculas, se expresa como:

$$E_{\text{vib}} = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu - \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 h\nu y - \left(n + \frac{1}{2}\right)^3 h\nu y y' \dots \quad (1.5)$$

dónde n es el número cuántico vibracional (0,1,2,3...), h la constante de Planck, ν la frecuencia de vibración e y , y' ... son denominadas constantes de anarmonicidad. A medida que aumenta n , los términos pueden ser ignorados.

En el modelo anarmónico los niveles energéticos no están igualmente espaciados: a niveles de energía más altos, la energía entre niveles consecutivos es menor. Las transiciones energéticas permitidas no se observan solamente para la banda fundamental ($\Delta n = \pm 1$), sino que también se observan transiciones $\Delta n = \pm 2$, ± 3 , ..., cuyas bandas se denominan sobretonos y aparecen a mayores longitudes de onda, en la región NIR.

El origen de la absorción de las bandas en el infrarrojo cercano es el mismo que para las bandas en el infrarrojo medio. La absorción NIR se da si la energía de la radiación corresponde a la diferencia energética entre dos niveles vibracionales y se da un cambio en su momento dipolar. Sin embargo, en la zona NIR no aparecen bandas correspondientes a vibraciones fundamentales $\Delta n = \pm 1$ (MIR), sino que en esta zona aparecen las bandas denominadas sobretonos, correspondientes a transiciones energéticas en las que $\Delta n > \pm 1$. Estos sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores que las predichas como múltiplos de las frecuencias fundamentales, debido al diferente espaciado entre los niveles energéticos en el modelo anarmónico. El primer sobretono ($\Delta n = 2$) es de intensidad mayor que los siguientes. Además de estos sobretonos, en la región NIR también pueden observarse otro tipo de bandas de absorción, llamadas bandas de combinación, debidas a la interacción entre las diferentes frecuencias fundamentales de vibración de moléculas poliatómicas (sumas o restas de múltiples de cada una de las frecuencias que interacciona):

$$v_{\text{comb}} = m_1 v_1 + m_2 v_2 + m_3 v_3 \dots \quad (1.6)$$

donde m_i son números enteros y v_i las frecuencias de las transiciones que contribuyen a la banda de combinación. Las bandas de combinación más frecuentes son aquellas en que $m_1 = m_2 = 1$.

Las transiciones no fundamentales son mucho menos probables que las correspondientes a transiciones entre niveles consecutivos, por lo que las bandas NIR son de intensidad menor que las que aparecen en la zona IR, además de ser

anchas y no tan bien definidas como resultado del solapamiento de sobretonos y bandas de combinación [17].

Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos ligeros como C-H, N-H, O-H, S-H, debido a su mayor anarmonicidad. En la **Figura 1.3** se muestran las regiones NIR donde absorben los diferentes enlaces. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F o C-Cl, en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto, los primeros sobretonos también aparecen en esa región [18].

Región																				
Tercer sobretono	■			■			■			■			■							
Segundo sobretono	■						■						■				■			
Primer sobretono	■												■				■			
Combinación	■																			
Grupo funcional																				
H ₂ O	■		■		■		■			■		■		■		■				
ROH	■			■				■		■			■		■		■			
RCOOH													■							
RCOOR'													■							
ArOH	■			■								■		■		■				
RNH ₂	■	■			■				■						■	■	■			
CONH ₂													■							
ArCH	■		■		■				■			■				■				
RNHR'		■														■				
CONHR										■		■				■				
SH													■	■						
CH	■			■			■			■			■			■	■			
CHO																				
CH ₂	■		■			■		■			■			■		■	■			
CC																				
CH ₃	■			■		■			■		■		■			■	■			
Longitud de onda nm/10 ²	7.5	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5	16.5	17.5	18.5	19.5	20.5	21.5	22.5	23.5	24.5		
Número de onda cm ⁻¹ /10 ³	13.3	11.8	10.5	9.5	8.7	8.0	7.4	6.9	6.5	6.1	5.7	5.4	5.1	4.9	4.7	4.4	4.3	4.1		

Figura 1.3. Asignación de bandas en la región NIR.

17 - Ciurczak, E.W., (2001) Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In Burns, D.A. and Ciurczak, E.W. (eds), Handbook of Near-Infrared Analysis, 2nd Edn; Marcel Dekker, Inc.; New Cork, pp 9-18.

18 - Simpson, M.B. (2005) Near-Infrared Spectroscopy for Process Analytical Chemistry: Theory, Technology and Implementation. In Bakeev, K. (ed), Process Analytical Technology, Blackwell Publishing, Oxford, pp 39-41.

Una característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno, etc., por lo que un espectro NIR también incorpora información sobre las interacciones moleculares de las sustancias.

1.3 Instrumentación

El esquema básico de un espectrofotómetro NIR consiste en: fuente de radiación, sistema de selección de longitud de onda, compartimiento de muestra y detector. A continuación se describen con más detalle cada una de las diferentes partes integrantes de un instrumento NIR.

◇ *Fuente de radiación*

La fuente de radiación más utilizada es la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo, capaz de proporcionar un espectro continuo en la región de 320-2500 nm. Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los denominados LEDs (*Light Emitting Diodes*). Las lámparas halógenas requieren de un sistema de selección de longitudes de onda, sin embargo los LEDs no.

◇ *Sistema de selección de longitudes de onda*

A excepción de los instrumentos basados en LEDs como fuente de radiación, es necesario un sistema que permita la descomposición del haz de luz policromática en longitudes de onda discretas. Lograr un buen nivel de sensibilidad depende en gran medida de un correcto dispositivo de selección de longitudes de onda. Éste debe ser capaz de proporcionar una anchura de banda estrecha con respecto a la

banda de absorción que se está midiendo y a la vez, debe proporcionar una elevada intensidad en todo el rango de longitudes de onda. Los espectrofotómetros NIR, del mismo modo que los MIR, pueden clasificarse en sistemas dispersivos o no dispersivos.

Dentro de los equipos dispersivos, los sistemas de selección de longitud de onda más utilizados son los monocromadores, constituidos por un conjunto de colimadores de los haces de entrada y salida, junto con un elemento dispersante. Esta es la parte fundamental del sistema, ya que permite la descomposición del haz incidente por efecto de interacciones constructivas y destructivas. Los elementos dispersantes más utilizados son las redes de difracción.

Los equipos no dispersivos son los más ampliamente utilizados. La variedad de sistemas de selección es elevada. Existen instrumentos de filtros convencionales, filtros optoacústicos (AOTF, Acusto-Optic Aunable Filter) e instrumentos de transformada de Fourier (FT).

Los filtros convencionales utilizan un elemento semitransparente colocado entre la fuente de radiación y la muestra, el cual permite el paso de ciertas longitudes de onda. Existen filtros de dos tipos: de absorción y de interferencia. Los primeros son transparentes a determinadas longitudes de onda, mientras que los segundos (de Fabry-Perot) se basan en el fenómeno de la interferencia óptica que experimenta el haz de luz al atravesar determinados materiales con distintos grosores e índices de refracción.

Los filtros optoacústicos (AOTF) aprovechan el cambio de índice de refracción del material con el que están contruidos (TeO_2) cuando éste es

atravesado por una onda acústica y dotando al material de capacidad para difractar ciertas longitudes de onda de un haz incidente.

La selección de longitudes de onda mediante filtros se realiza interponiendo materiales específicos entre la muestra y la fuente de radiación, los cuales permiten el paso de longitudes de onda discretas de forma selectiva. Los filtros de interferencia óptica filtran las longitudes de onda según su índice de refracción y grosor. Los instrumentos NIR más ampliamente utilizados son los de Transformada de Fourier.

◇ *Compartimiento de muestra*

Los instrumentos NIR permiten registrar el espectro tanto de muestras sólidas, líquidas como gaseosas. La ausencia de pretratamiento de muestra para el registro de su espectro, permite disponer de gran cantidad de accesorios adaptables a cada situación. Existen tres tipos de registro de espectros NIR: Transmitancia, Reflectancia y Transflectancia. En la **Figura 1.4** se muestra un esquema de los tres tipos de diseño instrumental NIR. Recordar que el haz de luz que emite la fuente de radiación atraviesa el correspondiente sistema de selección de longitudes de onda.

En las medidas por Reflectancia (sólidos y semisólidos), el haz de luz es reflejado por la propia muestra y hasta llegar al detector. En modo Transmitancia (gases, líquidos, semilíquidos y sólidos), el haz de luz atraviesa la muestra desde la fuente de radiación hasta el detector. Finalmente, un caso intermedio lo ocupa las medidas por Transflectancia (líquidos y semilíquidos), donde el haz de luz atraviesa la muestra y se refleja en un reflector que está en contacto con la misma, hasta de nuevo llegar al detector.

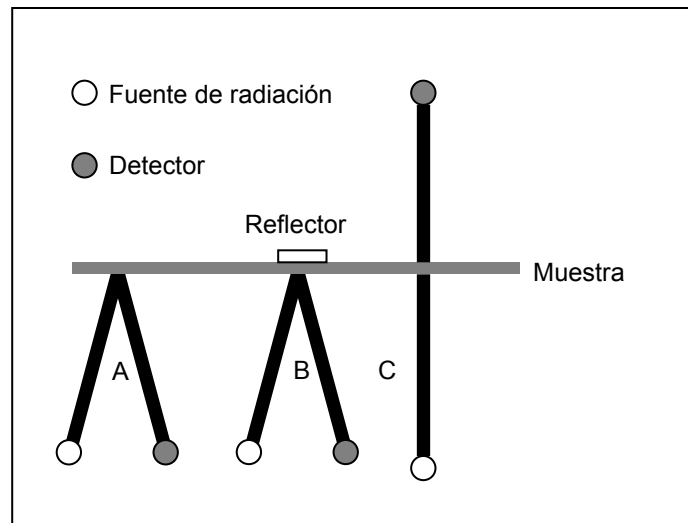


Figura 1.4. Esquema de los tres diseños de equipos NIR. A) Reflectancia, B) Transreflectancia y C) Transmitancia.

- Medidas por transmisión

La absorción de la radiación sigue la ley de Lambert-Beer. La transmitancia de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución. Ambas medidas se relacionan en la siguiente expresión:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{P_0}{P} = abc \quad (1.7)$$

donde **A** es la absorbancia de la muestra, **T** la transmitancia, **P₀** la intensidad de la radiación incidente, **P** la intensidad de la radiación transmitida, **a** la absorptividad molar, **b** el camino óptico y **c** la concentración.

Pueden producirse desviaciones del cumplimiento de esta ley debidas a causas muy diversas (reflexión y/o dispersión de la radiación, concentraciones muy elevadas, interacciones químicas de la muestra, etc.).

- Medidas por reflectancia

La reflexión de la radiación puede ser especular o difusa. La reflectancia especular descrita por las leyes de Fresnel no aporta información sobre la composición de la muestra, por lo que solo contribuye al ruido. La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión. Cuando los materiales son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación con la longitud de onda, predomina la reflectancia difusa.

Debido a la complejidad del proceso de reflectancia difusa, no existen teorías rigurosas, sino aproximaciones entre las cuales la más importante es la de Kubelka-Munk [19]. Otra expresión empleada con mucha frecuencia es una aplicación empírica de la relación entre la concentración y la reflectancia relativa, similar a la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c \quad (1.8)$$

donde **A** es la Absorbancia aparente, **R** la Reflectancia relativa

($R = R_{\text{muestra}}/R_{\text{referencia}}$), **a'** la constante de proporcionalidad y **c** la concentración.

- Medidas por transflectancia

La muestra, generalmente líquida o semilíquida, se coloca en una cubeta junto con una superficie reflectante en una de las caras. El haz de radiación incidente entra por la cara transparente de la cubeta, atraviesa la muestra y se refleja en la otra cara de la cubeta. Así retorna de nuevo atravesando la muestra y la radiación es

19 - Kubelka, P. and Munk, E. (1931) Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Z.Tech. Phys. 12, 593-601.

captada por el detector. El camino óptico resultante es el doble del espacio entre ambas caras de la cubeta. Actualmente, los sistemas de medidas por transflectancia mediante fibra óptica, permiten la adaptación de los instrumentos NIR al análisis *in-line*.

◇ **Detector**

Los detectores habituales utilizados en Espectroscopia NIR son los construidos con semiconductores como InGaAs, PbS, InAs, InSb, Si... El detector más ampliamente utilizado es el de PbS, que posee sensibilidad adecuada entre 900 y 2600 nm. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de Arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), operativo de 600 a 1900 nm [20].

1.4 Aplicaciones en la industria farmacéutica

El uso de la Espectroscopia NIR ha aumentado considerablemente en los últimos años debido, en gran parte, por las demandas de aplicaciones analíticas de la industria farmacéutica. Más aún, las últimas guías normativas han promovido encarecidamente su uso para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas. Dada su rapidez y naturaleza no destructiva, hacen de la Espectroscopia NIR una técnica enormemente versátil en una gran cantidad de aplicaciones, tanto para análisis cualitativo o cuantitativo, en control de calidad y de procesos.

El espectro NIR contiene tanto información química como física de la muestra analizada. Esto permite desarrollar métodos para el análisis cualitativo que discriminen una muestra de otra. Esta aplicación, es especialmente útil en la

20 - Workman Jr, J.J. and Burns, D.A. (2001) Commercial NIR Instrumentation. In Burns, D.A. and Ciurczak, E.W. (eds), Handbook of Near-Infrared Analysis, 2nd Edn; Marcel Dekker, Inc.; New York, pp 53-70.

identificación de materias primas. La posibilidad de dar una conformidad rápida en el mismo lugar de entrada de materias primas, permite acelerar el inicio del proceso de producción de cualquier fármaco. Las bibliotecas espectrales permiten realizar identificaciones de muestras de muy distintos tipos, así como discriminar incluso entre distintos proveedores de un mismo producto [21,22,23].

El análisis cuantitativo mediante Espectroscopia NIR constituye quizás la aplicación con mayores aportaciones. La determinación de principios activos, excipientes y solventes resumen las aplicaciones de tipo químico que han sido logradas con éxito. Dada que la contribución física de la muestra en el espectro NIR es tan importante, muchas propiedades físicas pueden ser controladas, tales como polimorfismo, tamaño de partícula, homogeneidad, dureza, entre otros [24,25,26].

La capacidad de discriminar entre distintos polimorfos de una misma especie, atribuyen a la técnica NIR de numerosas ventajas frente a otras técnicas de referencia (XRD y DSC). Esta característica permite por ejemplo diferenciar enantiómeros. A pesar de no ser la Espectroscopia NIR una técnica enantioselectiva, en muchas ocasiones los polimorfos presentan distintas formas polimórficas, a partir de las cuales es posible su identificación [27,28].

21 - Hogan, S.H. and Buckton, G. (2001) Water sorption/desorption-near IR and calorimetric study of crystalline and amorphous raffinose. *Int. J. Pharm.* **227**, 57-69.

22 - Anderson, C. (2000) *American Pharm. Rev.*, **3**(1).

23 - Blanco, M. and Romero, M.A. (2001) Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: a solution for identity confirmation, *Analyst* **126**, 2212-2217.

24 - Blanco, M., Alcalá, M. (2006) Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**(2-3), 280-286.

25 - Feng, Y-C., Hu, C-Q. (2006) Construction of universal quantitative models for determination of roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate in tablets from different manufacturers using near infrared reflectance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, In Press.

26 - Blanco, M. and Alcalá, M. (2006) Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: A contribution to process analytical technologies. *Analytica Chimica Acta*, **557**(1-2), 353-359.

27 - Patel, A.D., Luner P.E., Kemper, M.S. (2000) Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **206**(1-2), 63-74.

El concepto de Tecnología Analítica de Procesos en la industria farmacéutica y la aplicación de la Espectroscopia NIR en ella, se describe con más amplitud en el **Apartado 3** de esta memoria.

28 - Gombás, Á., Antal, I., Szabó-Révész, P., Marton, S., Erős, I. (2003) Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). *Int. J. Pharm.* **256**(1-2), 25-32.

INTRODUCCIÓN

2 Quimiometría

2.1	Introducción	21
2.2	Etapas del proceso de modelado	22
2.3	Análisis cualitativo.....	26
2.4	Análisis cuantitativo.....	33
2.5	Validación del método analítico	41

2. Quimiometría

2.1 Introducción

El incremento en el número de variables que pueden ser obtenidas con los instrumentos actuales conlleva una clara dificultad en su interpretación. Los métodos estadísticos univariantes permiten el análisis de conjuntos de datos discretos de una forma rápida y simple. Sin embargo, la habilidad de la mente humana para entender una gran cantidad de información distribuida en n-dimensiones es restringida. Un ejemplo claro de este tipo de situaciones se encuentra con la Espectroscopia NIR. Cada espectro puede estar compuesto por varios millares de variables, y si además recordamos la elevada complejidad de la señal NIR, se hace imprescindible la utilización de técnicas quimiométricas multivariantes que nos permitan interpretar y entender estos grandes conjuntos de datos.

El término quimiometría puede ser descrito como una herramienta que permite extraer la información relevante de unos datos obtenidos durante un experimento químico. Según el objetivo a alcanzar, se utilizan distintas técnicas estadísticas. La Quimiometría ha sido utilizada en esta memoria para desarrollar modelos empíricos y aplicarlos para el análisis de muestras obtenidas en procesos de la industria farmacéutica [29,30]. Existen numerosos textos y publicaciones que contienen información extensa sobre la teoría y práctica de la Quimiometría en la industria farmacéutica. Es por ello que en esta memoria únicamente se han

29 - Miller, C.E. (2005) Chemometrics in Process Analytical Chemistry. In: Bakeev, K. (ed) Process Analytical Technology. Blackwell publishing, Oxford, pp 226-227.

30 - Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S. P., Lewi, J. and Smeyers-Verbeke, S. (1997) In: Vandeginste B.G.M. and Rutan, S.C. (ed), Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier pp. 1-20.

recogido aquellos puntos más significativos que han sido utilizados para el desarrollo de los métodos propuestos.

2.2 Etapas del proceso de modelado

El proceso de desarrollo y evaluación de un modelo quimiométrico, ya sea destinado al análisis cualitativo o cuantitativo, consta de una serie de etapas básicas. De modo general, estas etapas tienen una serie de características comunes. A continuación se describen más ampliamente cada una de ellas [31].

1 - Selección del conjunto de calibración

Las muestras que van a ser utilizadas para el desarrollo del modelo deben ser representativas de toda la variabilidad que pueda darse durante el proceso, con la finalidad de obtener métodos analíticos robustos. Según el modelo que vaya a ser desarrollado, la variabilidad que las muestras deben cubrir es distinta. Así pues, las muestras a utilizar en modelos cualitativos deben recoger la variabilidad que pueda darse en el tamaño de partícula, proveedor, etc. En los modelos cuantitativos, las muestras quizás deban contener esta variabilidad además de cubrir el rango del parámetro a determinar, por ejemplo la concentración del analito.

2 - Métodos de referencia

El desarrollo de modelos cuantitativos requiere el conocimiento previo de las variables que van a ser determinadas. Para ello se utilizan los métodos de

31 - Blanco, M. and Alcalá, M. (2005) Use of Near-Infrared Spectroscopy for Off-line Measurements in the Pharmaceutical Industry. In: Bakeev, K. (ed) Process Analytical Technology. Blackwell publishing, Oxford, pp 362-391.

referencia que deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ello dependerá la calidad del modelo a desarrollar.

3 - Pretratamiento espectral

Una vez obtenidos los espectros NIR de las muestras seleccionadas, puede ser necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido y por ende acrecentar la señal correspondiente al analito de interés. No todos los pretratamientos consiguen ambos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental. Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

- Promedio de espectros: el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce el ruido espectral, ya que éste es considerado aleatorio.
- Suavizado: existen filtros que permiten minimizar el ruido espectral mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) [32] o por Transformada de Fourier [33].
- Derivadas: la baja resolución que normalmente presentan los espectros NIR puede ser mejorada derivando los espectros, lo cual permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda.

32 - Savitzky, A. and Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639.

33 - Horlick, G. (1972) Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. *Anal. Chem.* **44**, 943-947.

Los métodos de derivación más utilizados son el de Norris [34] y el de Savitzky-Golay [32], el cual incluye un suavizado previo a la derivación.

- Variable normal estándar (SNV, *Standar Normal Variate*): se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (*scattering*) producido por diferencias en el tamaño de partícula de muestras sólidas [35].
- Corrección del efecto multiplicativo de dispersión (MSC, *Multiplicative Scattering Correction*): tiene la misma utilidad que el SNV, sin embargo el pretratamiento espectral depende del conjunto de muestras al que se aplica [36].
- Corrección de señal ortogonal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*): permite eliminar toda aquella información contenida en los espectros que no está correlacionada con la propiedad a determinar. Su aplicación permite obtener modelos de calibración más simples [37].
- Análisis en Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*): Debido al gran volumen de información que puede ser obtenida por la Espectroscopia NIR, se han desarrollado métodos quimiométricos que permiten reducir este gran volumen de información para que ésta quede condensada, sin pérdidas relevantes, en un número reducido de variables. Uno de los métodos más utilizados para reducción de variables es la descomposición de los datos en

34 - Norris, K.H. and Williams, P.C. (1984) Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. *Cereal Chemistry*, **61**(2), 158-65.

35 - Barnes, R.J., Dhanoa, M.S. and Lister, S.J. (1989) Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, **43**(5), 772-7.

36 - Geladi P., McDougall, D., Martens, H. (1985) Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Appl. Spectrosc.* **39**, 491-500.

37 - Wold, S., Antti, H., Lindgren, F. and Ohman, J. (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **44**, 175-185.

componentes principales (PCA) [38]. La mayoría de las técnicas quimiométricas utilizadas en esta memoria se basan en un análisis en componentes principales previo al modelado de los datos, por lo que a continuación se explicarán los fundamentos de este tratamiento.

El PCA busca las direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras, utilizándolas como nuevos ejes de coordenadas, denominados componentes principales (PC's). Los loadings son los cosenos de los ángulos que forman los nuevos ejes con los originales y los scores son las coordenadas de los muestras en los nuevos ejes.

La matriz X (datos espectrales) se descompone en sus componentes principales,

$$X = TP^T + E \quad (2.1)$$

donde T es la matriz de scores, P la matriz de loadings y E la matriz de residuales.

Cada componente principal contiene información de diferente relevancia, así los primeros PC's describen la fuente de variación más importante de los datos. La representación completa de la matriz X implica k vectores de loadings y scores, pero como al hacer la descomposición se reduce la dimensionalidad del sistema, la matriz X resultante tiene a vectores donde $a < k$.

38 - Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S. P., Lewi, J. and Smeyers-Verbeke, S. (1998). Principal Components. In: Vandeginste B.G.M. and Rutan, S.C. (ed), Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Elsevier pp. 207-241.

La matriz X resultante sería:

$$X = T_1P_1^T + T_2P_2^T + T_3P_3^T + \dots + T_aP_a^T + E \quad (2.2)$$

Donde el subíndice es el número de componentes principales seleccionado.

4 - Selección, cálculo y evaluación del modelo quimiométrico

El cálculo del modelo quimiométrico seleccionado (cualitativo o cuantitativo) se realiza con un conjunto de muestras llamadas de calibración. Durante el desarrollo del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo (pretratamiento e intervalo espectral, umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros). Una vez obtenido el modelo, su capacidad predictiva es evaluada mediante un segundo conjunto de muestras, independiente al anterior. En caso de la obtención de resultados de predicción no satisfactorios, el modelo debe ser recalculado [39].

2.3 Análisis cualitativo

La identificación de productos farmacéuticos implicados es uno de los ensayos rutinarios necesarios para el control del proceso farmacéutico. Los Métodos de Reconocimiento de Pautas (PRM, *Pattern Recognition Methods*) son un conjunto de técnicas quimiométricas que permiten realizar análisis cualitativos de un modo rápido y simple [40].

39 - Beebe, K.R., Pell, R.J. and Seasholtz, M.B. (1998) Chemometrics: A Practical Guide, In: Beebe, K.R. (ed). John Wiley & Sons, Inc. pp. 245-339.

40 - Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S. P., Lewi, J. and Smeyers-Verbeke, S. (1998) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Ed by B.G.M. Vandeginste and S.C. Rutan. Elsevier pp. 207-241 (1998).

Los PRMs son métodos basados en la comparación de cuan similar es la muestra a analizar con otra tomada como referencia. Matemáticamente, esta comparación se realiza según los criterios de correlación o distancia. Los PRMs se pueden clasificar de un modo general según sean supervisados o no-supervisados. A continuación se describen con detalle los PRMs han sido utilizados en esta memoria.

◇ *Métodos no supervisados*

Estos métodos se caracterizan fundamentalmente por el desconocimiento de la clase a la cual pertenecen las muestras analizadas, por lo que únicamente se realiza una evaluación de las semejanzas/diferencias que hay entre los espectros de las muestras.

- Análisis en Componentes Principales (PCA)

No existe unanimidad en considerar el PCA como un método de clasificación, por el hecho de que no establece fronteras entre las diferentes clases ni aplica ningún criterio estadístico que permite discernir las clases. No obstante, es una técnica de reducción de variables que permite visualizar en un espacio de 2 ó 3 dimensiones, cuan similares o diferentes son un grupo de muestras entre si.

La interpretación de los resultados obtenidos con el PCA para una clasificación, se lleva acabo a partir de una representación de los *scores* de las muestras de un PC frente a los *scores* de otro(s) PC. Si existe una relación entre las muestras, en el gráfico de los *scores*, los puntos aparecerán agrupados; mientras que si las muestras no se asemejan entre si, los puntos aparecerán dispersos entre si [38].

- Análisis de agrupamientos (clusters)

El análisis de agrupamientos se utiliza para clasificar objetos en grupos, los cuales están caracterizados por los valores de su conjunto de variables. Es una alternativa al PCA para describir la estructura de una tabla de datos.

Existen dos formas de representar los datos, la primera es en forma de un árbol, también llamado dendograma y consiste en la elaboración de una clasificación jerárquica donde los grupos grandes se dividen otros más pequeños. Esta técnica examina la distancia entre los puntos de todas las muestras y representa esta información en un dendograma. La otra forma es la representación de los datos en una tabla que contiene diferentes agrupamientos. El agrupamiento es una partición en grupos y se denominan no jerárquicas [41].

◇ *Métodos supervisados*

Estos métodos se caracterizan fundamentalmente por conocer la clase a la cual pertenece la muestra a analizar, antes de ejecutar el propio análisis. Por ello es necesario disponer de un conjunto de espectros representativos de la clase que se desea identificar, mediante el cual realizar las comparaciones con el espectro de la muestra analizada.

En la **Figura 2.1** se muestra un esquema de clasificación general de los distintos PRMs supervisados más ampliamente utilizados [42,31].

41 - N. Bratchell. (1987) Cluster analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **6**, 105-125.

42 - Mark, H. Qualitative discriminant analysis. In Burns, D. and Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York, 2001; pp. 351-362.

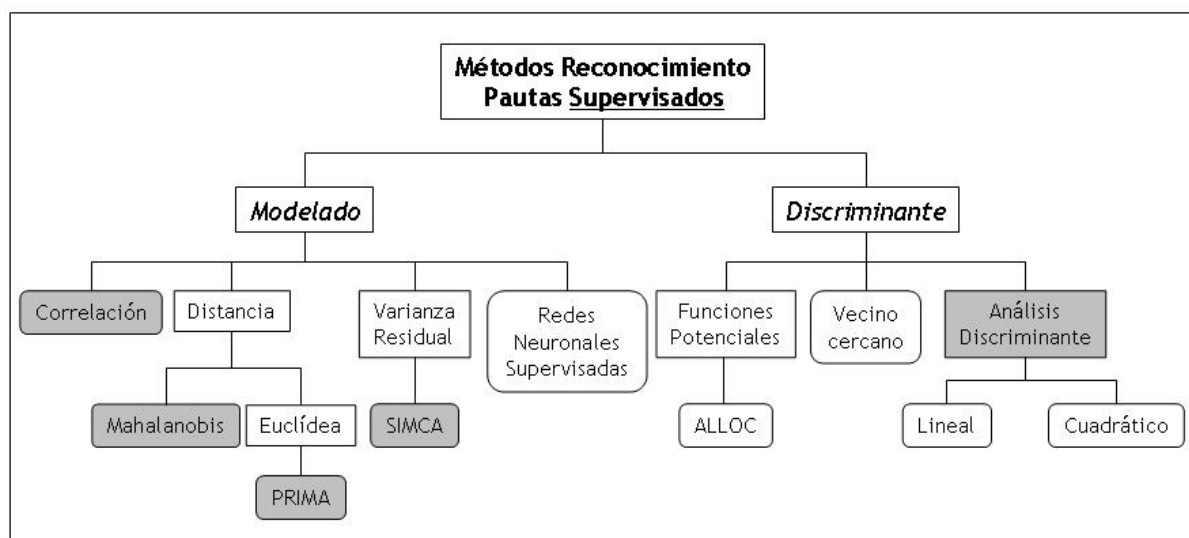


Figura 2.1. Clasificación general de Métodos de Reconocimiento por Pautas Supervisados.

- Correlación

La identificación de la muestra se realiza mediante el cálculo del coeficiente de correlación entre su espectro y el espectro promedio de la clase definida previamente. Cuanto más cercano a uno sea el coeficiente de correlación, mayor similitud hay entre la muestra y la clase. Habitualmente se fija un límite o umbral (*threshold*) de correlación, por encima del cual se determina cuando una muestra desconocida puede ser identificada como perteneciente a dicha clase [43].

- Distancia

Estas medidas se basan en el cálculo de una distancia que representa cuán diferente es una muestra de otra o bien de un punto en el espacio que represente el modelo de una clase.

43 - Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., Pezuela, C. and Russo, E. (1994) Control analysis of a pharmaceutical preparation by near-infrared reflectance spectroscopy: A comparative study of a spinning module and fibre optic probe, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 183-191.

La distancia Euclídea se basa en cálculos realizados en el espacio de las longitudes de onda. Cada clase se define como una hiperesfera, con un radio determinado. Una muestra desconocida se identificará como perteneciente a dicha clase cuando se encuentre dentro del radio de la hiperesfera.

La distancia de Mahalanobis se basa en cálculos sobre el espacio de los componentes principales. De un modo análogo, cada clase se define como una elipse obtenida a partir de un PCA. La identificación de la muestra se realiza a través de la diferencia entre el centroide de la clase con la muestra desconocida [44].

- Varianza residual

Estos métodos se basan en el cálculo de un PCA de cada uno de los conjuntos espectrales que definen cada clase, creando un modelo para cada uno de ellos. La identificación de la muestra analizada se realiza reconstruyendo su espectro mediante los modelos PCA creados; los residuales obtenidos son utilizados para calcular la probabilidad de que la muestra desconocida pertenezca o no a alguna de las clases. *SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogies)* es probablemente el más conocido de todos los métodos de varianza residual [45].

- Redes neuronales supervisadas

Una red neuronal es un método de cálculo iterativo que permite ajustar los datos experimentales a una respuesta determinada mediante algoritmos de aprendizaje.

Una de las redes más utilizadas son las *Multi-Layer Perceptron (MLPs)*. La

44 - Mark, H. (2001) Qualitative discriminant analysis. In Burns, D. and Ciurczak, E.W. (eds); Handbook of Near-Infrared Analysis, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York, pp. 351-362.

45 - Gemperline, P.J. and Webber, L.D. (1989) Raw materials testing using soft independent modeling of class analogy analysis of near infrared reflectance spectra, Anal. Chem. **61**, 138-144.

estructura de este tipo de redes consiste en una capa de entrada compuesta por tantos nodos como variables experimentales a modelar, la capa de salida consistente en la respuesta que se desee obtener y una capa oculta donde se realiza el proceso de aprendizaje. En el proceso de clasificación se han de establecer valores de salida indicativos de la pertenencia o no de un objeto a una clase [46].

- Funciones potenciales

En este método cada objeto del conjunto de entrenamiento es considerado como un punto en el espacio rodeado por un campo de potencial. La clasificación de un objeto dentro de una clase se determina mediante el potencial acumulado de la clase en la posición del objeto desconocido. El potencial acumulado se calcula, sumando los potenciales individuales de los objetos de la clase en la posición del objeto desconocido. Finalmente el objeto se clasifica dentro de la clase que da el mayor potencial acumulado [47].

- Vecino más cercano

Es una técnica de clasificación que calcula la distancia entre el objeto desconocido y cada uno de los objetos pertenecientes a las clases. Se seleccionan los k objetos más cercanos al objeto desconocido y se aplica una regla de mayoría, donde el objeto queda clasificado en el grupo donde más vecinos haya [48,49].

46 - Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. and Smeyers-Verbeke, S. (1998) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Ed by B.G.M. Vandeginste and S.C. Rutan. Elsevier pp. 207-241.

47 - Coomans, D. and Broeckaert, I. (1986) *Potential Pattern Recognition in Chemical and Medical Decision Making*, Ed by D. Coomans and I. Broeckaert. Research Studies Press Ltd.

48 - Coomans, D. and Massart, D.L. (1982). Alternative k -nearest neighbour rules in supervised pattern recognition : Part 1. k -Nearest neighbour classification by using alternative voting rules. *Anal. Chim. Acta* **136**, 15-27.

- Análisis discriminante

Los métodos de análisis discriminante están basados en el concepto de una función discriminante que divide el espacio en regiones características para cada una de las clases, creando fronteras entre cada una de ellas. Los dos métodos más conocidos son Análisis Discriminante Lineal (LDA) y Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) [50].

▫ Bibliotecas espectrales

Una de las aplicaciones más utilizada en esta memoria para el desarrollo de métodos de análisis cualitativos han sido las bibliotecas espectrales. Estas bibliotecas se clasifican como PRMs supervisadas y permiten crear clases a partir de conjuntos de espectros. La estructuración de las clases en la biblioteca está perfectamente definida, por lo que no hay lugar a confusión entre las mismas [51].

La identificación de una muestra desconocida se realiza por comparación de su espectro con cada una de las clases de la biblioteca. Los criterios que han sido utilizados para el desarrollo de las bibliotecas son: Correlación, Distancia Euclídea, Distancia de Mahalanobis y Varianza residual.

La función principal de las bibliotecas espectrales desarrolladas en esta memoria es la de identificar muestras farmacéuticas previo a la determinación de cualquier parámetro químico o físico.

49 - Coomans, D. and Massart, D.L. (1982). Alternative k -nearest neighbour rules in supervised pattern recognition : Part 2. Probabilistic classification on the basis of the k NN method modified for direct density estimation. *Anal. Chim. Acta* **138**, 153-165.

50 - Lachenbruch, P.A. (1975) Discriminant Analysis; Hafner Press; New York.

51 - Blanco, M. and Romero, M.A. (2001) NIR libraries in the pharmaceutical industry. A solution for identity confirmation. *Analyst* **126**, 2212-2217.

2.4 Análisis cuantitativo

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas. La Espectroscopia NIR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como Métodos de Calibración Multivariados. En la **Figura 2.2** se muestra una clasificación general de los mismos [52,53,54].

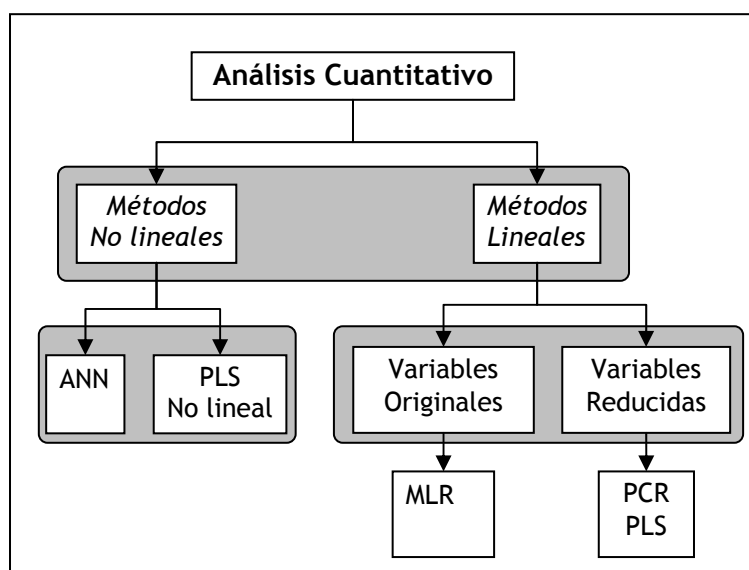


Figura 2.2 Clasificación general de los Métodos de Calibración Multivariados

En esta memoria únicamente se han utilizado Métodos de Calibración Multivariados Lineales, por lo que a continuación solo se describen sus características y no las de los métodos no-lineales.

52 - Thomas, E.V. and Haaland, D.M. (1990) Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis, *Anal. Chem.* **62**, 1091-1099.

53 - Draper, N. and Smith, H. (1981) *Applied Regression Analysis*, 2nd Edition; Wiley; New York.

54 - Martens, H. and Næs, T. (1991) *Multivariate Calibration*; Wiley; New York.

◇ *Métodos con variables originales*

Los métodos cuantitativos con variables originales, no realizan una reducción previa de los datos experimentales, sino que tras una selección de las variables espectrales se calcula la ecuación de regresión. El más utilizado es la Regresión Lineal Múltiple y a continuación se describen sus características más importantes.

- Regresión Lineal Múltiple

El método de regresión lineal múltiple (MLR, *Multiple Linear Regression*), basado en la utilización de las variables originales, calcula una relación lineal entre la señal (longitudes de onda discretas) y la propiedad a determinar mediante un ajuste por mínimos cuadrados.

En dicha regresión se asume una relación entre la absorbancia y la propiedad que es inversa a la ley de *Lambert-Beer*. La propiedad a determinar es función de la absorbancia a cada longitud de onda; la propiedad se calcula multiplicando los valores de absorbancia por unos coeficientes de proporcionalidad obtenidos durante la etapa de calibrado.

El desarrollo de modelos MLR requiere una adecuada selección de las longitudes de onda que son utilizadas para su cálculo. Dicha tarea es compleja ya que en muchas ocasiones la variación de la propiedad a determinar, no puede ser asignada a unas longitudes de onda discretas y es por ello que su uso en Espectroscopia NIR es reducido. Además, la selección de un excesivo número de longitudes de onda puede acarrear problemas de colinealidad, al existir diferentes

variables independientes altamente correlacionadas que aportan la misma información [55,56].

◇ *Métodos con reducción de variables*

En este tipo de métodos, existe una reducción de las variables antes de realizar el cálculo de regresión. El modo más habitual de reducción de variables es un cálculo basado en un Análisis en Componentes Principales (PCA), o bien en una variación de éste. A continuación se describen los métodos cuantitativos con reducción de variables más utilizados.

- Regresión en Componentes Principales (PCR)

Los métodos de reducción de variables permiten condensar la información relevante en un nuevo número de variables inferior al original. Uno de los métodos de calibración mediante reducción de variables es la Regresión en Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*). Se trata de un caso particular de Regresión Lineal Múltiple (MLR) en el cual se utilizan los *scores* obtenidos de un PCA como variables independientes.

El primer paso del PCR consiste en realizar una descomposición de la matriz X en sus componentes principales:

$$X = TP^T + E \quad (2.3)$$

Donde T es la matriz de scores, P^T la matriz transpuesta de loadings y E el residual.

55 - Honigs, D.E., Hieftje, G.M. and Hirschfeld, T. (1984) A new method for obtaining individual component spectra from those of complex mixtures, *Appl. Spectrosc.* **38**, 317-322.

56 - Cowe, I.A., McNicol, J.W. and Cuthbertson, D.C. (1985) A designed experiment for the examination of techniques used in the analysis of near-infrared spectra. Part 2: Derivation and testing of regression models, *Analyst* **110**, 1233-1240.

Una vez elegido el número de componentes principales que se considere como óptimo para describir la matriz X , ésta se puede representar por su matriz de scores T :

$$T = XP \quad (2.4)$$

Hasta aquí lo que se ha realizado es un PCA, obteniendo a partir de la matriz de datos X la matriz de scores T y la de loadings P . A continuación, la matriz de datos Y se puede calcular según la expresión:

$$Y = TB + E \quad (2.5)$$

siendo B la matriz de regresores que se halla por mínimos cuadrados conociendo los valores de Y del conjunto de calibración:

$$\hat{B} = (T^T T)^{-1} T^T Y \quad (2.6)$$

El símbolo $\hat{}$ indica valores calculados. Una vez calculados los regresores y por lo tanto establecido el modelo de calibración, se pueden realizar los cálculos para predecir un conjunto de nuevas muestras. Se calculan los scores de las muestras de predicción T^* a partir sus espectros X^* y de los loadings P calculados en la calibración:

$$T^* = X^* P \quad (2.7)$$

y se utiliza la matriz de regresores calculada también en la calibración, junto con los scores de estas muestras, para el cálculo de la propiedad a determinar en las muestras desconocidas:

$$Y = T^* \hat{B} \quad (2.8)$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos, X , pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar [57].

- Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS)

El método de regresión PLS (*Partial Least Squares*) se basa también en una reducción de variables, sin embargo, a diferencia del PCA, la descomposición de la matriz espectral se realiza simultáneamente con la matriz de la propiedad a determinarse descomponen según:

$$X = TP^T + E \quad (2.9)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (2.10)$$

donde X e Y son las matrices espectrales y de la propiedad a determinar, T y U son las matrices de *scores*, P y Q las matrices de *loadings* y E y F la matriz de residuales.

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los scores de los bloques X e Y :

$$\hat{U} = bT \quad (2.11)$$

donde b es el coeficiente de regresión para cada uno de los factores del modelo.

57 - Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S. P., Lewi, J. and Smeyers-Verbeke, S. (1998) Principal Components. In: Vandeginste, B.G.M. and Rutan, S.C. (ed). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B,. Elsevier pp. 552.

El cálculo del valor Y de una muestra desconocida se realiza utilizando la relación interna:

$$Y = T^* \hat{B} Q^T + F \quad (2.12)$$

donde T^* es la matriz de scores de la muestra analizada obtenida del modelo calculado, \hat{B} es el coeficiente de regresión de cada factor, Q^T la matriz de loadings del modelo y F el residual de la predicción.

Durante el desarrollo de modelos de calibración basados en una reducción de variables, uno de los parámetros a determinar experimentalmente es el número de factores necesario para definir el modelo. Cuanto mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluida en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo la complejidad del modelo aumenta. Es por ello que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Uno de los criterios establecidos para esta selección es la elección del número de factores que suministre el menor error de predicción [58,59]. El Error Estándar Relativo (RSE, *Relative Standar Error*) y el Error Cuadrático Medio (Root Mean Square Error) fueron utilizados para evaluar los errores de calibración y predicción de los modelo:

$$RSE (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{nir} - Y_i^{ref})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{ref})^2}} \cdot 100 \quad (2.13)$$

58 - Wold, S. (1978) Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models, *Technometrics* **20**, 397-405.

59 - Haaland, D.M. and Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.*, **60**(11), 1193-1202.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{nir}} - Y_i^{\text{ref}})^2}{n}} \quad (2.14)$$

donde n son el número de muestras, Y^{NIR} e Y^{REF} son las magnitudes de la propiedad determinadas por el método NIR y Referencia, respectivamente.

- Multivariate Curve Resolution

El Análisis en Componentes Principales es uno de los métodos de reducción de variables más ampliamente utilizado. Como se ha comentado anteriormente, la matriz espectral se descompone en el producto de unos Scores y Loadings, para cada uno de los Componentes Principales. Otro método de descomposición de matrices espectrales es la Resolución Multivariable de Curvas (MCR) [60]. La metodología MCR asume que los datos espectroscópicos se ajustan a un patrón según la ley de Beer, donde la Absorbancia de una muestra a una longitud de onda es producto de la concentración de cada analito y de su espectro en estado puro. Según esta premisa, el conjunto de datos espectrales se puede descomponer en el producto de una matriz de concentraciones por una matriz de espectros:

$$D = CS^T + E \quad (2.15)$$

donde D son los espectros, C y S son las concentraciones y los espectros de los analitos puros que constituyen la mezcla. E es la matriz de residuales, la cual no contiene la información no explicada por el producto de CS^T .

La matriz de datos D se descompone mediante la metodología de Mínimos Cuadrados Alternados (ALS, *Alternating Least Squares*). La solución de la descomposición no es única, ya que se pueden obtener un gran número de matrices

60 - Tauler, R., Smilde, A. and Kowalski, B. (1995) Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J. Chemom.* **9**(1), 31-58.

C y **S**, que multiplicadas entre sí permitan obtener la misma matriz **D**. Por ello se pueden aplicar restricciones rotacionales y de intensidad para corregir estas ambigüedades. Estas restricciones son los espectros y las concentraciones de cada analito puro de la muestra [61].

La calidad de los resultados se puede evaluar mediante comparación de los espectros y concentraciones obtenidos por MCR-ALS con los datos de referencia. La falta de ajuste (lof, *lack of fit*) y la varianza explicada de la descomposición se calcula según:

$$\text{lof} = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2}} \times 100 \quad (2.16)$$

$$\% \text{Var} = \frac{\sum_i \sum_j \hat{d}_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2} \times 100 \quad (2.17)$$

donde d_{ij} son los elementos de la matriz **D** and \hat{d}_{ij} son los mismos elementos obtenidos mediante el cálculo MCR.

La descomposición MCR-ALS puede ser utilizada para la creación de modelos cuantitativos [62,63], sin embargo, en esta memoria se ha utilizado estrictamente como herramienta para el análisis cualitativo, con el objetivo de identificar

61 - Larrechi, M.S. and Rius, F.X. (2004) Spectra and concentration profiles throughout the reaction of curing epoxy resins from near-infrared spectroscopy and multivariate curve resolution methods. *Appl. Spectrosc.* **58**, 47-53

62 - Blanco, M., Peinado, A. and Mas, J. (2006) Monitoring alcoholic fermentation by joint use of soft and hard modelling methods. *Analytica Chimica Acta* **556(2)**, 364-373.

63 - Amigo, J.M., de Juan, A., Coello, J. and Maspocho, S. (2006). A mixed hard- and soft-modelling approach for the quantitative determination of oxipurines and uric acid in human urine. *Analytica Chimica Acta*, in press.

analitos presentes en muestras farmacéuticas por comparación de su espectro obtenido por MCR-ALS con el de referencia [64].

2.5 Validación del método analítico

Los métodos de análisis utilizados en el control de calidad de productos farmacéuticos, que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben haber sido validados previamente a su uso en rutina. La validación de un método de ensayo tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para el propósito por el que ha sido diseñado. Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos. Los objetivos de una validación analítica son:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorias de calidad.
- Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo entre laboratorios.

64 - Blanco, M., Alcalá, M., González, J.M. and Torras, E. (2006) Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations. *Analytica Chimica Acta*, In press.

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método de ensayo. Existen numerosas guías para la validación de métodos analíticos [65,66,67].

Dependiendo de la naturaleza y la finalidad del método analítico los parámetros a evaluar son distintos. En la **Tabla 2.1** se muestran de forma esquemática, los parámetros de calidad que suelen utilizarse en validaciones y cuáles de ellos deben ser evaluados, dependiendo del ensayo realizado. Puesto que se ha utilizado la espectroscopia NIR, y debido a las características de esta técnica, las estrategias para la validación son distintas que para las técnicas convencionales. Por ello, además de la definición de cada parámetro, se explican las características especiales de la técnica NIR y cómo se evalúa cada parámetro para un método de análisis desarrollado mediante esta técnica.

1 - Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método para analizar el analito de interés en presencia de una matriz con el resto de componentes. Dependiendo del objetivo del método, los procedimientos necesarios para evaluar la selectividad son diferentes. ICH distingue dos categorías en la evaluación de la selectividad: para tests de identificación y para métodos cuantitativos.

65 - <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf> (2003) Note for guidance. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

66 - Broad, N., Graham, P., Hailey, P., Hardy, A., Holland, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N. and Warren, P. (2002) Pharmaceutical applications, guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry. In Chalmers, J.M. and Griffiths, P.R. (eds); Handbook of Vibrational Spectroscopy. Vol. 5; John Wiley & Sons Ltd; Chichester, UK, pp. 3590-3610.

67 - ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

Tabla 2.1 Parámetros evaluados en la validación de métodos analíticos.

Parámetro	Identificación	Ensayo del contenido	Test de impurezas	
			Cuantitativo	Límite
Selectividad (1)	+	+	+	+
Linealidad		+	+	
Rango		+	+	
Exactitud		+	+	
Precisión:				
· Repetitividad		+	+	
· Precisión Intermedia		+ (2)	+ (2)	
Límite de Detección (LD)			+ (3)	+
Límite de Cuantificación (LQ)			+	
Robustez	+	+	+	+
+ parámetro evaluado				
(1) La falta de selectividad puede ser compensada con otros métodos de análisis				
(2) No es necesaria si se evalúa la reproducibilidad				
(3) Puede ser necesaria en algunos casos				

- Identificación: es la confirmación de la identidad de la muestra en cuestión. Una correcta identificación debe ser capaz de discriminar entre dos muestras espectralmente muy parecidas.

- Métodos cuantitativos: éstos incluyen el ensayo del contenido y la determinación de impurezas. Cuando se pretende validar un método cuantitativo, es necesario también evaluar su selectividad. En espectroscopia NIR, la selectividad suele determinarse mediante la identificación del fármaco mediante una biblioteca construida a partir de muestras cuya identidad se conoce por otros métodos. Estas bibliotecas contienen los productos a analizar, junto con otros productos, componentes y placebos de los mismos, los cuales debe ser capaz de diferenciar. Con esto se garantiza que las muestras que van a ser cuantificadas, son las que han sido identificadas correctamente.

2 - Linealidad

La linealidad implica que la respuesta entre la señal obtenida y la propiedad es proporcional en todo el intervalo. En las calibraciones univariadas la linealidad se evalúa mediante una relación lineal entre la señal y la concentración. En las calibraciones multivariadas se valora la relación lineal entre el valor de referencia y el valor estimado de la propiedad. Se recomienda tener un mínimo de 5 niveles de concentración que cubran todo el rango.

3 - Intervalo

Es el rango de calibración de la propiedad a determinar. Las guías ICH aconsejan cubrir intervalos de 80-120% para el análisis cuantitativo de productos acabados y 70-130% para los tests de uniformidad de contenido (porcentajes referidos sobre la concentración nominal del analito determinado). En espectroscopia NIR el intervalo dependerá también en gran medida de la finalidad del método. En cada caso se debe evaluar que el intervalo establecido sea el adecuado.

4 - Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos por dicho método con los valores reales (obtenidos mediante pesada de un estándar) o bien con valores obtenidos por un método de referencia adecuado.

Se recomienda realizar un mínimo de 9 determinaciones, cubriendo tres niveles de concentración (3 niveles x 3 replicados). Un test de las diferencias entre los valores obtenidos y los valores reales que permita confirmar la exactitud del método.

5 - Precisión

La precisión es el error aleatorio asociado al método de análisis. Expresa la proximidad entre sí de una serie de resultados obtenidos a partir de distintas tomas de muestra de un producto perfectamente homogéneo. Puede ser calculada como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (%). Existen tres niveles de evaluación:

- Repetitividad: Es la precisión de un método analítico bajo las mismas condiciones de operación en un espacio corto de tiempo. Se evalúa con un mínimo de 9 determinaciones a 3 niveles de concentración o con un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración nominal.

- Precisión Intermedia: Expresa el grado de reproducibilidad de una serie de resultados, variando las condiciones normales de trabajo (días, operadores, etc.). Se evalúa la influencia de estos factores mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y se expresa el resultado con el coeficiente de variación global (%).

- Reproducibilidad: Generalmente implica estudios interlaboratorios, ampliando la precisión intermedia con factor adicional distintos laboratorios. Este parámetro de calidad es obligatorio para aquellos métodos que optan por el carácter de método oficial de la farmacopea.

6 - Límite de detección (LD)

El límite de detección se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no sea posible determinarla con exactitud y precisión. La determinación de este valor depende de la naturaleza del método de análisis y existen diversas aproximaciones estadísticas basadas en la

relación señal/ruido o bien a través de los parámetros de la ecuación de calibración.

7 - Límite de cuantificación (LQ)

Se define como la mínima concentración del analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Se suelen usar para su cálculo los mismos parámetros que para el límite de detección, pero con criterios ligeramente distintos.

8 - Robustez

La robustez es el parámetro que evalúa la fiabilidad del método analítico ante la influencia de cambios en las condiciones habituales de análisis. De una manera más amplia que la precisión intermedia, evalúa la susceptibilidad del método respecto pequeñas variaciones del procedimiento. En el caso de determinar que hay parámetros que afectan al método de análisis, estos deberán ser controlados y el procedimiento del método debe incluir recomendaciones para mantener bajo control estos parámetros.

INTRODUCCIÓN

3 Tecnología analítica de procesos en la industria farmacéutica

3.1	Introducción	47
3.2	Avances en control de calidad mediante PAT.....	47
3.3	¿ Por qué NIR ?.....	49
3.4	Aplicaciones NIR durante proceso farmacéutico	50
3.4.1	<i>Identificación</i>	50
3.4.2	<i>Determinación de humedad</i>	51
3.4.3	<i>Tamaño de partícula</i>	52
3.4.4	<i>Homogeneidad de mezclas</i>	53
3.4.5	<i>Granulación húmeda</i>	54
3.4.6	<i>Polimorfismo</i>	55
3.4.7	<i>Compactación</i>	57
3.4.8	<i>Ensayo de disolución</i>	58
3.4.9	<i>Ensayo de contenido</i>	59

3. Tecnología analítica de procesos en la industria farmacéutica

3.1 Introducción

Probablemente, una de los conceptos que en los últimos años se ha puesto más de actualidad en la industria farmacéutica es el de Tecnología Analítica de Procesos (PAT). Según la FDA, el concepto PAT se define como “un sistema para diseñar, analizar y controlar la fabricación mediante parámetros de calidad de las materias primas y del producto no acabado, con el objetivo de asegurar la calidad del producto final” [68]. Su aplicación engloba la Química Analítica y la Química de Procesos junto con herramientas multivariadas, para lograr un mejor conocimiento del proceso. La utilización de las PAT no es reciente, ya que durante muchos años su uso ha transcurrido por la industria química y más particularmente en la petroquímica [69,70].

3.2 Avances en control de calidad mediante PAT

El interés primordial de cualquier industria farmacéutica radica en asegurar la calidad de su producto. Para poder llegar a esta conclusión es estrictamente necesario aplicar un estricto control analítico, que permita asegurar el cumplimiento de la totalidad de parámetros evaluados.

68 - Guidance for Industry. PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance., US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation (CDER), and Research, Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), September 2004.

69 - Bakeev, K. (2003) NIR Spectroscopy as a Process Analytical Tool. Part I. *Spectroscopy* **18**(11), 32-35.

70 - Bakeev, K. (2003) NIR Spectroscopy as a Process Analytical Tool. Part II. *Spectroscopy* **19**(1), 39-42.

ISO define calidad como: “la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”. Según esta definición, cuando se utiliza la expresión “de buena calidad” se pretende remarcar la excelencia de un producto o servicio y el cumplimiento de las especificaciones acordadas previamente con el cliente y/o definidas por la autoridad competente [71].

El control del producto acabado determina su calidad definitiva y permite la comercialización del fármaco. Sin embargo, según el punto de vista PAT, nos podemos plantear la siguiente pregunta: si se realizan una serie de comprobaciones para corroborar la calidad de las materias primas y nuestra rutina de fabricación del producto está perfectamente establecida, certificada y controlada, ¿es realmente necesario certificar la calidad del producto acabado?, o quizás siendo capaces de asegurar la calidad de cada etapa del proceso completo, ¿sería suficiente para lograr el mismo objetivo? Esta es la base para la aplicación de la Tecnología Analítica de Procesos en la industria farmacéutica, poder determinar la calidad final del producto mediante el control y mejora del proceso de fabricación [69,70,72].

La utilización de las PAT en la industria farmacéutica ofrece muchas ventajas frente a los métodos tradicionales de control de calidad, ya que no es necesario esperar al producto acabado para certificar su calidad, sino que ante cualquier alarma durante la evolución del proceso, existe la posibilidad de modificación y corrección, con la consiguiente mejora en eficiencia y productividad global de la empresa. Quizás la tecnología necesaria para su aplicación puede ser

71 - ISO, Guide 25, General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories, 1990.

72 - Romañach, R., (2006) Presenting PAT to non-PAT experts, *Journal of Process Analytical Technology*, 3(1), 22-24.

compleja, tanto en su comprensión como en puesta a punto. Sin embargo, los resultados obtenidos serán un mayor conocimiento, control y una mejora de la calidad del proceso.

3.3 ¿ Por qué NIR ?

La utilización de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica es relativamente reciente. Sin embargo, hay varias razones de peso que han hecho incrementar notablemente su popularidad como técnica instrumental número uno en PAT.

Existe un gran número de excelentes técnicas espectroscópicas útiles para un analista de procesos: Infrarrojo Medio, Ultravioleta/Visible, Fluorescencia, Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopia de Masas y Raman, entre otras. Todas estas técnicas, utilizadas de un modo adecuado, permiten realizar satisfactoriamente el trabajo deseado. MIR y Raman se utilizan habitualmente para la elucidación estructural de compuestos orgánicos. UV-Vis se utiliza habitualmente en muestras líquidas y las transiciones electrónicas detectadas son limitadas. En el caso del análisis de mezclas, los espectros obtenidos no son siempre fácilmente interpretables y es por ello que su utilización en este ámbito es reducido. Las aplicaciones más conocidas de NMR son en el campo de la petroquímica y la química de polímeros. Su portabilidad reducida impide su introducción de un modo más amplio.

Las razones que hacen de la espectroscopia NIR una técnica especialmente atractiva para el control analítico en la industria farmacéutica se pueden resumir en:

- No requiere pretratamiento de muestra, lo cual permite obtener el espectro de muestras sólidas directamente.
- Es una técnica no destructiva que permite determinar múltiples parámetros a partir de la misma muestra.
- Se pueden realizar análisis no invasivos, *in-line* y *on-line* de un modo rápido y simple: control a tiempo real.
- Se obtiene información química de la muestra sin renunciar a información física.
- A partir de un único espectro de la muestras se pueden establecer calibraciones paralelas para realizar determinaciones multiparamétricas.

Los últimos avances tecnológicos de Espectroscopia NIR de Imagen Química, nos brindan la posibilidad de plantearnos nuevos desafíos que sin duda ayudaran a la obtención de más y mejor información para el control de procesos.

3.4 Aplicaciones NIR durante proceso farmacéutico

3.4.1 Identificación

La identificación mediante Espectroscopia NIR, tanto de las materias primas en la etapa inicial de un proceso farmacéutico como de los productos intermedios y

acabados, permite realizar análisis cualitativos de un modo rápido sin la necesidad de realizar un pretratamiento de la muestra.

La utilización de bibliotecas espectrales permite identificar muestras de distinto tipo o bien cualificar entre distintas clases de un mismo producto [73]. La identificación de muestras con distinta forma polimórfica puede ser llevada a cabo mediante simple inspección visual de bandas características del espectro NIR, asignables a una determinada transformación polimórfica [74]. A su vez, los distintos estados de hidratación que presentan los sólidos farmacéuticos pueden ser identificados satisfactoriamente [75].

3.4.2 Determinación de humedad

El agua muestra en su espectro NIR dos bandas muy significativas las cuales hacen del analito uno de los mejores candidatos a ser cuantificado. Una de las primeras publicaciones sobre cuantificación mediante NIR fue precisamente la determinación de humedad en productos agrícolas [76]. Su determinación en numerosas etapas del proceso farmacéutico es de gran importancia y habitualmente se utiliza el método de Karl-Fischer como referencia.

Durante distintas etapas de un proceso farmacéutico, como son la granulación o el secado, la determinación de humedad es un factor clave que permite decidir cuando pasar a la siguiente etapa. Se han desarrollado métodos para el análisis en tiempo real de procesos de granulación para la determinación del contenido de agua y tamaño medio de partícula, mediante medidas in-line, lo

73 - Blanco, M. and Romero, M.A. (2001) Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: a solution for identity confirmation, *Analyst* **126**, 2212-2217.

74 - Hogan, S.H. and Buckton, G. (2001) Water sorption/desorption-near IR and calorimetric study of crystalline and amorphous raffinose. *Int. J. Pharm.* **227**, 57-69.

75 - C. Anderson (2000) *American Pharm. Rev.*, **3**(1).

76 - Norris, K.H. and Hart, J.R. (1965) Direct Spectrophotometric Determination of Measuring Moisture in Liquids and Solids, Vol.4, A. Wexler, New York, NY, p.19.

cual permite tener un control del proceso e identificar la llegada del punto final [77]. A su vez, la determinación de agua en la etapa de secado posterior a una granulación se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de un método *in-line* [78].

La liofilización de muestras farmacéuticas para su comercialización implica la extracción de su humedad por sublimación a baja temperatura y presión. El producto liofilizado suele ser higroscópico y puede absorber humedad por el simple contacto con el ambiente. Es por ello, que este tipo de muestras se comercializa en envases perfectamente hermetizados que permiten mantener sus propiedades terapéuticas con el tiempo. El control analítico del producto liofilizado implica necesariamente un análisis no invasivo de la muestra. Se han desarrollado métodos NIR que permiten cuantificar el contenido en agua entre 0-6%. Dicho método ha sido validado y constituye una alternativa al método de referencia actualmente utilizado (valoración Kart-Fischer) [79].

3.4.3 Tamaño de partícula

El distinto tamaño de partícula de una muestra sólida influye directamente sobre el efecto de *scattering* en medidas NIR por reflectancia difusa. Este efecto produce desplazamientos de línea base que permiten la determinación del tamaño medio de partícula de muestras sólidas. Se han desarrollado métodos cuantitativos mediante la utilización de modelos de calibración MLR que tan solo utilizan dos longitudes de onda para determinar el tamaño medio de partícula en muestras farmacéuticas de

77 - Frake, P., Greenhalgh, D., Grierson, S.M., Hempenstal, J.M. and Rudd, D.R. (1997) Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infra-red spectroscopy, *Int. J. Pharm.* **151**, 75-80.

78 - Zhou, G.X. et al. (2003) Determination and differentiation of surface and bound water in drug substances by near infrared spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* **92(5)** 1058-1065.

79 - Leasure, R.M. and Gangwer, M.K. (2002) Near-infrared spectroscopy for in-process moisture determination of a potent active pharmaceutical ingredient. *Amer. Pharm. Rev.*, **5**, 103-109.

Ácido Acetilsalicílico, Cafeína, Paracetamol, Lactosa monohidratada y Celulosa microcristalina, cubriendo un rango de tamaño de partícula de 24 a 400 μm [80].

3.4.4 Homogeneidad de mezclas

Durante la fabricación de preparados farmacéuticos en forma sólida, la determinación del estado de homogeneidad de las mezclas constituye uno de los controles más importantes. Asegurar que las unidades individuales del fármaco presenten una correcta uniformidad, únicamente es posible consiguiendo una correcta distribución de todos los componentes del preparado. La mayoría de los trabajos publicados se caracteriza por realizar medidas *in-line* mediante sondas de fibra óptica, lo que permite tener un control en tiempo real del grado de homogeneidad que presenta la mezcla en fabricación.

Se han desarrollado métodos NIR que permiten identificar el tiempo necesario para una correcta homogeneidad de las mezclas, utilizando el criterio de Desviación Estándar de bloque móvil calculado a partir de espectros tomados consecutivamente. Cuando la desviación estándar es mínima y se mantiene invariable con el tiempo se puede considerar que la mezcla analizada es homogénea [81,82,83]. También el cálculo de la diferencia cuadrática media entre

80 - O'Neil, A.J., Jee, R.D. and Moffat, A.C. (1998) The application of multiple linear regression to the measurement of the median particle size of drugs and pharmaceutical excipients by near-infrared spectroscopy. *Analyst* **123**, 2297.

81 - Sekulic, S.S., Ward, H.W., Brannegan, D.R., Stanley, E.D., Evans, C.L., Sciavolino, S.T., Hailey, P.A. and Aldridge, P.K. (1996) On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **68**, 509-513.

82 - Hailey, P.A., Doherty, P., Tapsell, P., Oliver, T. and Aldridge, P.K. (1996) Automated system for the online monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part I. System development and control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 551- 559.

83 - Sekulic, S.S., Wakeman, J.,; Doherty, P. and Hailey, P.A. (1998) Automated system for the online monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy Part II. Qualitative approaches to blend evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17(8)**, 1285-1309.

espectros consecutivos a lo largo del tiempo, permite determinar el punto óptimo de homogeneidad [84].

El control de la homogeneidad de mezclas puede ser llevado a cabo tanto por un método cualitativo como cuantitativo. Se han desarrollado métodos basados en el concepto de Señal Neta del Analito (NAS, *Net Analyte Signal*). Dichos métodos han sido validados y constituyen una alternativa a los métodos HPLC actualmente utilizados [85].

3.4.5 Granulación húmeda

La etapa de granulación de muestras sólidas se realiza añadiendo un solvente a la mezcla seca, removiéndola y finalmente evaporando el solvente. Este proceso aumenta la homogeneidad de la mezcla y mejora su fluidez, facilitando sustancialmente las siguientes etapas del proceso (transporte, compactación, dispensación en dosis, etc.)

Existen diferentes técnicas de granulación que conllevan la utilización de agitadores y/o técnicas de lecho fluido, que suelen ser complejos sistemas con multitud de parámetros de control que afectan a las características del granulado. La aplicación de la Espectroscopia NIR de un modo no invasivo permite resolver muchas de las situaciones implicadas: determinación de humedad [86,87,77,88],

84 - Blanco, M., Gonzalez, R. Bertran, E. (2002) Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy *Talanta* **56**, 203-212.

85 - Skibsted, E.T.S., Boelens, H.F.M., Westerhuis, J.A., Witte, D.T. and Smilde, A.K. (2005) Simple assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near infrared reflectance probe and control charts *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(1), 26-35.

86 - Watano, S., Terashita, K., Miyamoto, K. (1990) Development and application of infrared moisture sensor to complex granulation. *Bull. Univ. Osaka. Pref., Series A*, 39:187-197.

87 - White, J., (1994) On-line moisture detection for a microwave vacuum dryer. *Pharm. Res.* **11**, 728-732.

88 - Morris, K., Stowell, J., Byrn, S., Placette, A., Davis, T., Peck, G., (2000) Accelerated fluid bed drying using NIR monitoring and phenomenological modeling. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **26**, 985-988.

tamaño de partícula [89], tamaño de gránulo y distintas características de los comprimidos [90].

Los procesos de granulación húmeda pueden inducir transformaciones polimórficas, las cuales se pueden determinar mediante Espectroscopia NIR. La transformación de un principio activo durante un proceso de granulación húmeda se ha realizado mediante un método cuantitativos que permite determinar la el porcentaje de transformación [91]. En su ámbito de aplicación, constituye el primer método en ser desarrollado, debido a la ausencia un método de referencia previo. La identificación de la forma polimórfica de un principio activo puede ser llevada a cabo mediante un método resolución de curvas (MCR), el cual permite obtener espectro del API cuando este se encuentra en una mezcla. Se observa que la mezcla en seco y/o compactación de los componentes de la mezcla no produce transformación polimórfica del API, sin embargo, una granulación húmeda produce su transformación hacia la forma amorfa [92].

3.4.6 Polimorfismo

La capacidad de una sustancia de existir como dos o más formas cristalinas que tienen ordenación y/o conformaciones distintas de las moléculas en el enrejado cristalino se conoce como polimorfismo [93]. Identificar la forma polimórfica de un compuesto farmacéutico es importante ya que pueden darse diferencias en la eficacia terapéutica entre varios polimorfos. Otras propiedades tales como:

89 - Rantanen, J., Yliruusi J. (1998) Determination of particle size in a fluidized bed granulator with a near infrared set-up. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4, 73-75.

90 - Otsuka, M. (2006) Chemoinformetrical evaluation of granule and tablet properties of pharmaceutical preparations by near-infrared spectroscopy. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 82(1-2) 109-114.

91 - Li, W., Worosila, G.D., Wang, W., Mascaro, T. (2005) Determination of polymorph conversion of an active pharmaceutical ingredient in wet granulation using NIR calibration models generated from the premix blends. *J. Pharm Sci.* 94(12), 2800-2806.

92 - Blanco, M., Alcalá, M., Gonzalez, J.M., Torras, E. (2006) NIR Spectroscopy in the study of polymorphic transformations. *Analyst*, in press.

93 - H.G. Britain (1999) Polymorphishm in Pharmaceutical Solids, Ed by H.G. Britain, Marcel Dekker Inc.

velocidad de disolución, biodisponibilidad, dureza, compactabilidad o fluidez, dependen en muchas ocasiones de la forma polimórfica del producto. Las técnicas espectroscópicas basadas en las transiciones vibracionales, rotacionales y de spin nuclear, permiten la identificación y cuantificación de las formas polimórficas.

Dado que el espectro NIR es sensible a los cambios en los enlaces de hidrógeno y al empaquetamiento de las celdas cristalinas, la Espectroscopia NIR se puede aplicar al análisis de formas polimórficas. El control de formas polimórficas se puede llevar a cabo desde un punto de vista cualitativo o cuantitativo, ya sea identificando la presencia de una forma polimórfica [94] o bien determinando su concentración [95,96,97,98].

Un caso particular de formas polimórficas lo ocupan las formas amorfas. Al carecer de forma cristalina definida no se pueden considerar polimorfos y es por ello que se definen como pseudos-polimorfos. El análisis de las interconversiones entre distintas formas polimórficas y pseudo-polimórficas ha sido logrado satisfactoriamente en numerosos productos [95,99,100].

94 - Aldridge, P., Evans, C., Ward, H., Colgan, S., Boyer, N. and Gemperline, P. (1996) Near-IR detection of polymorphism and process-related substances. *Anal. Chem.* **68**, 997-1002.

95 - Blanco, M., Valdés, D., Llorente, I., Bayod, M. (2005) Application of NIR spectroscopy in polymorphic analysis: Study of pseudo-polymorphs stability. *J. Pharm. Sci.* **94(6)**, 1336-1342.

96 - Luner, P., Majuru, S., Seyer, J., Kemper, M. (2000) Quantifying crystalline form composition in binary powder mixtures using near-infrared reflectance spectroscopy. *Pharm. Dev. Technol.* **5**, 231-246.

97 - Patel, A.D., Luner P.E., Kemper, M.S. (2000) Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **206(1-2)**, 63-74.

98 - Hogan, S.E., Buckton, G. (2001) The application of near infrared spectroscopy and dynamic vapour sorption to quantify low amorphous contents of crystalline lactose. *Pharm.Res.* **18(1)**, 112-116.

99 - Gombás, Á., Antal, I., Szabó-Révész, P., Marton, S., Erős, I. (2003) Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). *Int. J. Pharm.* **256(1-2)**, 25-32.

100 - Bai, S., Nayar, R., Carpenter, J.F., Manning, M.C. (2005) Noninvasive determination of protein conformation in the solid state using near infrared (NIR) spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **94(9)**, 2030-2038.

3.4.7 Compactación

La obtención de comprimidos farmacéuticos conlleva una etapa en la que la mezcla de excipientes y activos es compactada en un molde mediante una prensa. La composición de la mezcla, las propiedades de cada componente y la presión aplicada durante la compactación, entre otras variables, influye directamente sobre la dureza final del comprimido y sus propiedades mecánicas.

La Espectroscopia NIR permite obtener información relacionada con estas propiedades. La presión de compactación aplicada durante la obtención de comprimidos farmacéuticos tiene una relación directa con sus espectros NIR [101]. Se han desarrollado métodos para la determinación de la presión en comprimidos farmacéuticos, desarrollando modelos de calibración PLS1 calculados a partir de espectros de comprimidos preparados en el laboratorio en el rango de presión deseado [101,102].

El contenido en humedad de las mezclas utilizadas para obtener comprimidos, influye de una manera clara sobre sus propiedades físicas y mecánicas. Esta relación ha sido evaluada satisfactoriamente mediante un método NIR [103].

101 - Blanco, M., Alcalá, M., Gonzalez, J.M., Torras, E. (2006) A Process Analytical Technology Approach Based On Near Infrared Spectroscopy: Tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets. *J. Pharm Sci.* In press.

102 - Blanco, M. and Alcalá, M. (2006) Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: A contribution to process analytical technologies. *Analytica Chimica Acta*, **557(1-2)**, 353-359.

103 - Gupta, A., Peck, G.E., Miller, R.W. and Morris, K.M. (2005) Influence of ambient moisture on the compaction behavior of microcrystalline cellulose powder undergoing uni-axial compression and roller-compaction: A comparative study using near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **94(10)**, 2301-2313.

3.4.8 Ensayo de disolución

La velocidad a la que el principio activo es liberado del producto farmacéutico y pasa a estar en disolución, constituye un parámetro muy importante en control de calidad de preparados sólidos, ya que da una aproximación del comportamiento del medicamento en el cuerpo una vez consumido. Se suele realizar para comprimidos, sobres, supositorios e incluso para parches cutáneos.

La aplicación de la Espectroscopia NIR para la realización del test de disolución se puede realizar de distintos modos. Es posible realizar la determinación del porcentaje de API disuelto al cabo de un único tiempo mediante modelos de calibración PLS1 [101,104,105]. Esta estrategia permite, mediante un trabajo experimental simple, desarrollar un método que permita determinar si el porcentaje de API en disolución a un tiempo determinado cumple las especificaciones para dicha formulación.

La determinación del perfil de disolución completo se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de un método que utiliza tantos modelos de calibración PLS1, como tiempos muestre el perfil. Esta estrategia conlleva un laborioso trabajo de desarrollo de modelos de calibración [106]. Se ha propuesto también, un método cuantitativo que mediante un único modelo de calibración PLS2, permite determinar el perfil de disolución completo en comprimidos farmacéuticos. Para su

104 - T. Kuny, C. Schatz, M. Ulmschneider, S. Marrer, H. Leuenberger, "Non-destructive Dissolution Testing Correlation", *Dissolution Technologies*, 2003, February, 22-28.

105 - Donoso, M. and Ghaly, E. S. (2004) Prediction of Drug Dissolution from Tablets Using Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy as a Nondestructive Method, *Pharmaceutical Development and Technology* **9(3)**, 247-263.

106 - Freitas, M.P. et al (2005) Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**, 17-21.

desarrollo se han utilizado comprimidos preparados en el laboratorio a distintas presiones [107].

3.4.9 Ensayo de contenido

Consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si los valores obtenidos se corresponden con las especificaciones del producto.

Un gran número de publicaciones reflejan las ventajas del NIR frente a otras técnicas. La adaptabilidad de la técnica permite determinar múltiples analitos (principios activos y excipientes) y en diversos tipos de muestras (granulado, polvo, comprimidos, cápsulas, líquidos, geles,...) [101,102,108,109,110].

107 - Blanco, M. and M. Alcalá, Gonzalez, J.M. and Torras, E. (2006) Determination of Dissolution Profiles In Intact Pharmaceutical Tablets by NIR Spectroscopy. *Journal of Process Analytical Technologies*, In Press.

108 - Feng, Y-C., Hu, C-Q. (2006) Construction of universal quantitative models for determination of roxithromycin and erythromycin ethylsuccinate in tablets from different manufacturers using near infrared reflectance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, In Press.

109 - Bodson, C., Dewe, W., Hubert, Ph. and Delattre, L. (2006) Comparison of FT-NIR transmission and UV-vis spectrophotometry to follow the mixing and to assay low dose tablets containing riboflavin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, In Press.

110 - Blanco, M., Alcalá, M. (2006) Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**(2-3), 280-286.

METODOLOGÍA y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4	Introducción	61
5	Metodología	62
5.1	Descripción y preparación de muestras.....	62
5.2	Instrumentación.....	67
5.2.1	<i>Espectroscopia NIR</i>	67
5.2.2	<i>Técnicas instrumentales de referencia</i>	68
5.3	Programas para adquisición y tratamiento quimiométrico de espectros ..	71

METODOLOGÍA y DISCUSIÓN

DE LOS RESULTADOS

6 Discusión de los resultados

6.1	Identificación de productos farmacéuticos.....	75
6.2	Determinación de <i>tablet hardness</i>	76
6.2.1	<i>Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Mirtazapina</i> .77	
6.2.2	<i>Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Zamene</i>	80
6.3	Ensayo de disolución	82
6.4	Determinación principios activos y excipientes	91
6.4.1	<i>Cuantificación de Mirtazapina en comprimidos farmacéuticos</i>	92
6.4.2	<i>Cuantificación de Deflazacort en comprimidos de Zamene</i>	97
6.4.3	<i>Cuantificación de cinco principios activos en Frenadol</i>	100
6.4.4	<i>Cuantificación de Ketoprofeno y Parabenos en Fastum Gel</i>	104
6.5	Transformación polimórfica del principio activo	
	Dexketoprofeno en Enantyum	109

4. Introducción

La utilización de la Espectroscopia NIR en la industria farmacéutica permite desarrollar nuevas metodologías que simplifican enormemente los protocolos de análisis, obteniendo resultados exactos, precisos y comparables con los conseguidos por los métodos habituales. Las características de la técnica permiten analizar todo tipo de muestras con un mínimo o nulo pretratamiento, lo que agiliza considerablemente el trabajo del analista. La reducción del número de etapas previas a la medida analítica, conlleva un aumento de la robustez del método.

Los espectros NIR presentan bandas poco intensas y con un alto grado de solapamiento, lo que unido a contribuciones de tipo físico de las muestras, produce una pérdida de selectividad. Las técnicas de análisis multivariantes permiten extraer la información significativa a través de la obtención de modelos quimiométricos adecuados. Las múltiples posibilidades que ofrecen los métodos multivariantes permiten resolver una gran variedad de problemas analíticos en la industria farmacéutica.

El objetivo de esta tesis es el desarrollo de nuevas metodologías NIR que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos en muestras farmacéuticas. Los métodos desarrollados son aplicados en los procesos de producción de la industria farmacéutica, principalmente en el control de calidad del producto acabado.

Los resultados de esta memoria se han organizado en cinco partes, atendiendo al objetivo a alcanzar: i) identificación de productos farmacéuticos, ii) determinación de la presión de compactación y iii) ensayo de disolución en

comprimidos farmacéuticos, iv) determinación de principios activos y excipientes y v) estudio de las transformaciones polimórficas.

5. Metodología

Se describen las características más relevantes de la metodología empleada en el desarrollo de los nuevos métodos propuestos: los distintos tipos de muestras analizadas y las formas de preparación en el laboratorio, el registro de los espectros NIR, la obtención de la propiedad analítica de interés mediante los métodos de referencia y el procesamiento de datos.

5.1 Descripción y preparación de muestras

Las muestras farmacéuticas estudiadas presentan diferentes características físicas: sólidos granulados y en polvo, comprimidos y geles. Las muestras se extrajeron directamente de la etapa final del proceso de producción o bien fueron preparadas en el laboratorio. El rango de concentración de los principios activos y excipientes en las muestras de producción es muy estrecho y se mantiene casi invariable, ya que las características del proceso de fabricación son las apropiadas para su mantenimiento. La concentración de los analitos en muestras de producción no supera generalmente el $\pm 5\%$ respecto a la etiquetada. Como las muestras de producción no cubren el rango de la propiedad analítica de interés, es necesario preparar muestras en el laboratorio con el fin de ampliarlo.

Las muestras preparadas en el laboratorio reflejan en gran medida las características del proceso de productivo, simulando lo máximo posible a las de producción, en cuanto a forma (granulado, polvo, comprimido o gel) y composición (principio activo y excipientes). Se han utilizado dos modos de preparación de muestras farmacéuticas en el laboratorio. El primero ha consistido en mezclar cantidades conocidas del principio activo y excipientes, cubriendo el rango de concentración deseado; éstas fueron denominadas muestras sintéticas. El segundo modo de preparación de muestras en el laboratorio consistió en la adición de cantidades conocidas de principio activo y/o excipientes sobre muestras de producción; éstas fueron denominadas muestras dopadas.

Un punto clave en la correcta preparación de muestras sintéticas o dopadas es la concentración que presentan los distintos analitos en cada una de ellas. Cuando las muestras a preparar únicamente están compuestas por dos analitos, a medida que la concentración de uno aumenta, la del otro inevitablemente disminuye, de modo que existe una alta correlación entre las concentraciones de ambos. A medida que aumenta el número de analitos, aumenta también la posibilidad de encontrar pares de compuestos con elevada correlación. Esta situación debe ser evitada sobretodo cuando uno de los analitos involucrados es el que va a ser cuantificado. La aparición de estas correlaciones con el analito de interés provoca una disminución en la exactitud del método e inevitablemente su robustez también se ve mermada.

Las muestras sintéticas están constituidas por un principio activo y por placebo. El placebo es la mezcla de excipientes a concentración próxima a la nominal de cada uno en la formulación. Con el fin de minimizar las correlaciones

entre las concentraciones de principio activo con cada uno de los excipientes, se prepararon distintos placebos variando la concentración de cada excipiente $\pm 5\%$ su concentración nominal. El patrón de variación de esta concentración se fijó mediante un diseño factorial fraccional, fijando para cada excipiente tres niveles de concentración (máximo, nominal y mínimo). El diseño permite, mediante un número mínimo de muestras, distribuir las concentraciones de cada excipiente de tal modo que las correlaciones entre todos ellos sean mínimas.

La preparación de comprimidos de laboratorio se realizó compactando alícuotas de muestras sintéticas mediante una prensa y un molde cilíndrico de 11 mm de diámetro. La presión de compactación se estableció entre 74 y 887 MPa. No se aplicaron presiones menores a 74 MPa porque los comprimidos se deshacen y no se pueden manejar.

La granulación de muestras sintéticas se realizó añadiendo agua como disolvente; la mezcla húmeda es posteriormente secada manteniéndola durante el tiempo necesario a una temperatura de 50 °C y a vacío.

A continuación se detallan las características de las muestras de producción utilizadas y su preparación:

- MIRTAZAPINA. Las muestras de producción corresponden a comprimidos con Mirtazapina como principio activo ($100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y Lactosa y Almidón de maíz como excipientes mayoritarios. Las muestras preparadas en el laboratorio correspondieron a mezclas sintéticas sólidas en polvo de Mirtazapina con los excipientes. El rango de principio activo cubierto fue de 55-145 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y la concentración de los excipientes fue un $\pm 5\%$ alrededor de la nominal. Se

obtuvieron comprimidos de laboratorio compactando alícuotas de estas mezclas en un rango de presiones de 74-880 MPa.

- ZAMENE: El producto se presenta en forma de comprimidos de dos tipos que contienen Deflazacort como principio activo (tipo A: $81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, tipo B: $32 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y Lactosa, Celulosa microcristalina, Almidón de maíz y Estearato de magnesio como excipientes. Las muestras preparadas en el laboratorio son mezclas sintéticas sólidas en polvo de Deflazacort con los mismo excipientes del producto comercial, en el rango de principio activo de $20\text{-}120 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; la concentración de los excipientes cubría un rango $\pm 5\%$ respecto la nominal. Del mismo modo que en las anteriores mezclas, se obtuvieron comprimidos de laboratorio en un rango de presiones de 74-887 MPa.
- FASTUM GEL. La preparación contiene Ketoprofeno como principio activo ($25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), agua y etanol como componentes mayoritarios ($>950 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y un gelificante como minoritario. También contiene p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo como conservantes (0.8 y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Las muestras sintéticas que fueron preparadas en el laboratorio cubrían un rango del principio activo de $20\text{-}30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y para los conservantes éste fue de $0.64\text{-}0.96 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0.16\text{-}0.24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. La concentración de los excipientes cubría un rango $\pm 5\%$ respecto la nominal.
- ENANTYUM. El fármaco se comercializa en forma de comprimidos y contiene Dexketoprofeno trometamol (DKP) como principio activo a una concentración de 140 mg g^{-1} y celulosa microcristalina como excipiente mayoritario. Se prepararon mezclas sintéticas sólidas en polvo de Dexketoprofeno trometamol (principio activo) con Celulosa microcristalina. Se utilizaron dos formas

polimórficas cristalinas del principio activo (polimorfo A y B). Las muestras se prepararon por mezcla de un solo polimorfo (A o B) con celulosa. El rango de principio activo fue de 100 - 250 mg·g⁻¹. Las mezclas se sometieron a un proceso de granulación con agua como disolvente (hasta un 44% m/m) y luego se secaron en una cámara de vacío durante 24 horas a temperatura de 50 °C. El sólido granulado se molturó manualmente hasta obtener un polvo fino.

- FRENADOL: El producto farmacéutico contiene Paracetamol, Ácido Ascórbico, Dextrometorfano HBr, Cafeína, Maleato de Clorfenamina como principios activos (concentración 65, 25, 2, 1.5 y 0.4 mg·g⁻¹, respectivamente). El excipiente mayoritario es la Sacarosa (~95% m/m). Se prepararon muestras dopadas en el laboratorio cubriendo un rango de los principios activo de ±50% respecto la concentración nominal. Las concentraciones de los cinco activos en el conjunto de muestras se fijaron de tal manera que el rango de la concentración de cada activo estuviera repartido homogéneamente en todas las muestras y a su vez, que la correlación entre las concentraciones de cada par de analitos fuera mínima. Para ello, se utilizó una hoja de cálculo con la matriz de concentraciones de los cinco activos y la matriz de correlaciones de los analitos.

La falta de homogeneidad en muestras sólidas afecta negativamente al desarrollo de modelos de calibración multivariados. Esta situación es importante en la determinación de analitos a niveles de concentración bajos. Un triturado de las muestras previo al registro de los espectros NIR ayuda a mejorar la homogeneidad de las mezclas. Esta estrategia fue utilizada en las muestras dopadas de Frenadol.

5.2 Instrumentación

A continuación se describen las técnicas instrumentales utilizadas para el desarrollo de los distintos métodos.

5.2.1 Espectroscopia NIR

Los espectros NIR fueron registrados utilizando un espectrofotómetro FOSSNirsystems modelo 5000 en el intervalo de longitudes de onda entre 1100 y 2500 nm con una resolución espectral de 2 nm. Cada espectro obtenido es el promedio de 32 barridos. El espectrofotómetro incorpora un módulo *Rapid Content Analyzer* (RCA) que permite el registro de espectros NIR en modo Reflectancia y Transflectancia. Previo al registro del espectro NIR de las muestras, se registra el espectro de una referencia.

Los espectros NIR de muestras sólidas, granuladas o en polvo, se registraron por triplicado en modo **Reflectancia** utilizando una cubeta de cuarzo como contenedor. Antes de cada medida el sólido se removió con una espátula dentro de la cubeta. Los espectros NIR de comprimidos fueron obtenidos también en modo Reflectancia, registrando individualmente cada muestra intacta colocando cada comprimido directamente sobre la ventana del instrumento. La referencia utilizada fue una placa cerámica incorporada al equipo.

Los espectros NIR de muestras en forma de gel se registraron en modo **Transflectancia**, utilizando las mismas cubetas de cuarzo y con un reflector de oro diseñado para este propósito. El camino óptico que fija el reflector es de 1 mm. La referencia se registró utilizando la cubeta vacía y el mismo reflector de oro.

Diariamente, antes de comenzar el registro de los espectros de las muestras, se realiza la comprobación del correcto funcionamiento del instrumento mediante los *test* de Linealización de longitud de onda y de Ruido.

5.2.2 Técnicas instrumentales de referencia

A continuación se muestran las características más relevantes de las distintas técnicas instrumentales utilizadas como referencia.

- Espectrofotometría UV-Vis

La determinación del principio activo Mirtazapina en comprimidos farmacéuticos mediante el método de referencia se realizó con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent modelo 8452A. Disoluciones apropiadas de los comprimidos en Metanol y Fosfato Monobásico de Sodio pH 5.7 (46:54 %v/v) fueron analizadas y se obtuvieron los espectros UV-Vis en el intervalo 280-320 nm utilizando cubetas de 1 cm de camino óptico. El espectro del solvente se utilizó como blanco. La determinación del principio activo en las disoluciones de los comprimidos se realizó mediante una regresión por mínimos cuadrados del espectro en el intervalo espectral 280-320nm en 1ª derivada de una disolución estándar de principio activo. Esta disolución estándar se preparó con el mismo solvente utilizado para la determinación de los comprimidos y Mirtazapina pura a una concentración de 0.050 mg·mL⁻¹.

- Cromatografía HPLC

La determinación del principio activo Deflazacort en comprimidos de producción mediante el método de referencia se realizó con un cromatógrafo HPLC Agilent mod.1100 equipado con una columna Spherisorb C18 y un detector PDA-UV ($\lambda=242$

nm). Cantidades apropiadas de muestra se analizaron utilizando como fase móvil una mezcla de disolución acuosa de acetato amónico (0.025M) y acetonitrilo (65:35% v/v). El área de pico del analito se interpoló en una recta de calibración obtenida a partir de una disolución estándar de Deflazacort puro a una concentración de $0.150 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La determinación de los principios activos Paracetamol, Cafeína, Dextrometorfano y Clorfenamina en sólidos granulados mediante el método de referencia se realizó con un cromatógrafo HPLC Waters equipado con una columna μ -Bondapack Phenyl y un detector PDA-UV ($\lambda=290$ y 210 nm). Cantidades adecuadas del fármaco se analizaron utilizando como fase móvil una mezcla de disolución acuosa de Fosfato Monobásico de Sodio y Acetonitrilo (92:8% v/v). El área de pico de cada analito se interpoló en una recta de calibración obtenida a partir de una disolución estándar preparada con los cinco activos a una concentración de PAR ($1.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), CAF ($0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), DEX ($0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y CLO ($0.008 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), en la misma fase móvil utilizada para analizar el fármaco.

La determinación del principio activo Ketoprofeno y los conservantes p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo mediante el método de referencia se realizó con un cromatógrafo HPLC Agilent mod.1100 equipado con una columna Spherisorb S5 ODS2 y un detector PDA-UV ($\lambda=258 \text{ nm}$). Cantidades apropiadas del preparado farmacéutico se analizaron utilizando como fase móvil una mezcla de solución acuosa de hidróxido amónico/ácido fosfórico (hasta $\text{pH} = 3.00 \pm 0.05$) y acetonitrilo (60:40%v/v). El área de pico de cada analito se interpoló en una recta de calibración obtenida de disoluciones estándar.

- Valoración potenciométrica

La determinación del principio activo Ácido Ascórbico en sólidos granulados mediante el método de referencia se realizó por valoración yodométrica. El granulado se disolvió en agua y fue valorado con una disolución estándar de yodo (0.1N) con KI en exceso. Se utilizó un valorador automático Metrohm DL22 y un electrodo de referencia Ag/AgCl. El punto final de la valoración se determinó mediante la detección de triioduro libre en solución mediante un electrodo doble de platino (DM143-SC).

- Ensayo de disolución

El ensayo de disolución se realizó sobre comprimidos de Zamene analizados individualmente en un equipo PTTWS 3C Type II UPS de Pharma-Test (Hainburg, Germany). El equipo incorpora seis contenedores en los cuales se coloca cada comprimido en un cesto suspendido. El medio de disolución de cada vaso consistió en 900 mL de una solución acuosa de NaCl (0.034 M) y HCl (0.087 M) ajustando el pH hasta 1 ± 0.05 y la temperatura 37 ± 0.5 °C. Cada vaso incorpora un sistema de agitación por palas que fue ajustado a una velocidad de rotación de 50 ± 3 rpm. Cuando el cesto que contiene el comprimido se introduce en solución, se toman alíquotas de la misma cada cierto tiempo para ser analizadas mediante Espectroscopia UV-Vis. Los intervalos de tiempo y las frecuencias a las que se tomaron alíquotas fueron: entre 3 y 30 minutos cada 3 minutos, entre 35-60 cada 5 y finalmente entre 70-120 cada 10. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Agilent HP 8453 (Waldronn, Alemania) para medir el máximo de absorción a 242nm. Se utilizaron disoluciones patrón de Deflazacort (principio activo) diluyendo 6 o 30mg

(según el tipo de comprimido analizado) en 1 litro de la misma solución empleada en el test.

- Difractometría de Rayos X

La caracterización polimórfica de muestras sólidas se realizó mediante un difractómetro Philips X-Pert equipado con un tubo de Cu y un monocromador secundario de grafito a una longitud de onda de 1.5418 Å. Los difractogramas se obtuvieron en el rango 2θ entre 3 y 30°, con una amplitud de paso de 0.03° y un tiempo de radiación por paso de 2 segundos.

- Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La detección del punto de fusión en muestras sólidas se realizó mediante un instrumento DSC StareSystem Mettler Toledo. El intervalo de temperatura fue de 80 a 120°C con una rampa de 1 o 5°C/min según la muestra analizada.

5.3 Programas para adquisición y tratamiento quimiométrico de espectros

Los espectros NIR y los datos de referencia de cada muestra fueron tratados utilizando los siguientes programas informáticos:

- VISION v2.20-2.51 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, USA). Programa diseñado para el control del espectrofotómetro NIR. Permite el registro de los espectros así como su visualización, aplicando los pretratamientos espectrales más habituales. Su entorno permite diseñar protocolos de análisis, tanto cualitativos como cuantitativos, de fácil ejecución.

- UNSCRAMBLER v7.01-9.1 (Camo Process SA, Trondheim, Norway). Permite trabajar con conjuntos de datos multivariantes e incorpora los algoritmos quimiométricos de calibración más habituales. Se utilizó para aplicar los pre-tratamientos espectrales Variable Normal Estándar (SNV, *Standar Normal Variate*) y Derivadas (usando el algoritmo de Savitzky-Golay), realizar análisis y regresiones en componentes principales (PCA y PCR) y calcular regresiones por mínimos cuadrados parciales (PLS1, PLS2 y DPLS).
- MODDE v6.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Permite realizar diseños de experimentos, adecuados para la preparación de muestras de laboratorio.
- PLS-Toolbox v3.0 (Eigenvector Research, WA, USA). Programa implementado en entorno Matlab v6.5 (The Mathworks, MA, USA) que incorpora múltiples algoritmos. Se ha utilizado para la aplicación del pretratamiento Corrección Ortogonal de Señal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*) y para la resolución de curvas mediante *Multivariate Curve Resolution* (MCR).

Se desarrollaron bibliotecas espectrales para la identificación de muestras farmacéuticas de producto acabado. El programa de adquisición y gestión de espectros (Vision) fue el utilizado para este propósito. Estas bibliotecas están compuestas por carpetas de espectros que definen la clase del producto a identificar. La identificación de una muestra desconocida se realiza mediante comparación de su espectro con los de la clase establecida. Se ensayaron distintas bibliotecas utilizando los criterios de coeficiente de correlación, distancia máxima, varianza residual y distancia de Mahalanobis. La validación de las bibliotecas se realizó utilizando espectros no solo del producto a identificar sino también de los analitos puros que lo constituyen. La biblioteca debe ser capaz de identificar

correctamente muestras correspondientes a la clase definida y a la vez discriminar las muestras que no pertenezcan a esa clase.

Los métodos de análisis cuantitativos que han sido desarrollados tenían como objetivo la determinación de propiedades analíticas de interés en muestras farmacéuticas. Estas propiedades fueron concentración de principio activo y excipientes, presión de compactación y test de disolución (ambas últimas para comprimidos). Estos métodos se basan en la utilización de modelos de calibración por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS1 y PLS2).

Los métodos desarrollados, ya sean para análisis cualitativo como cuantitativo, que están siendo utilizados en la industria farmacéutica, han sido validados siguiendo las guías descritas en el **Apartado 2.5** de esta memoria.

El método de resolución de curvas *MCR (Multivariate Curve Resolution)* ha sido utilizado como herramienta quimiométrica para el análisis cualitativo, con el fin de obtener el espectro de un principio activo a partir de los espectros de las mezclas farmacéuticas en las cuales está presente. La utilización del método *MCR* se realizó sin aplicar restricciones naturales (unimodalidad y no negatividad) y con restricciones de igualdad (espectral y de concentración). La calidad de los resultados se evaluó en términos de falta de ajuste y porcentaje de varianza explicada. Los espectros resueltos por el modelo se compararon con los de referencia mediante el coeficiente de correlación.

6. Discusión de los resultados

A continuación se recogen los resultados más relevantes de los distintos métodos desarrollados.

6.1 Identificación de productos farmacéuticos

Los métodos de análisis cualitativo que han sido desarrollados en esta tesis se basan en la aplicación de bibliotecas de identificación. El objetivo es identificar muestras farmacéuticas de producto acabado antes de realizar la determinación de propiedades físicas y químicas. Esta identificación se realiza por comparación del espectro de la muestra con el conjunto espectral que define su clase. La identificación positiva de la muestra analizada es condición indispensable para la posterior determinación y por ello la aplicación de método NIR cuantitativo debe ir precedido de una identificación de la muestra a determinar. Esta estrategia permite asegurar la calidad de los resultados del método NIR.

Se han desarrollado bibliotecas de identificación para su utilización previa al análisis cuantitativo en muestras sólidas, geles y comprimidos. Las clases espectrales se han construido utilizando únicamente espectros del producto acabado a analizar. Se ha utilizado el coeficiente de correlación como criterio de identificación, el cual permite obtener bibliotecas muy simples y fáciles de construir. El valor umbral de correlación (*threshold*) se fijó de tal manera que una muestra de producto acabado se identificara correctamente y a la vez que la biblioteca fuera capaz de diferenciarla del resto de los compuestos que forman parte del preparado farmacéutico.

Las bibliotecas obtenidas han sido validadas con muestras de producto acabado no utilizadas durante su desarrollo y a su vez con cada uno de los componentes puros del producto (principio activo y excipientes). En la **Tabla 6.1** se muestra el ejemplo de los coeficientes de correlación obtenidos en la biblioteca de identificación del sólido granulado Frenadol. El límite de identificación se fijó en un valor de coeficiente de correlación de 0.98.

Tabla 6.1 Valores de identificación de la biblioteca espectral para Frenadol.

Muestra	Coefficiente de correlación
Producto acabado	0.99
Sacarosa	0.97
Paracetamol	0.11
Ácido ascórbico	-0.07
Dextrometorofano HBr	-0.01
Cafeína	0.09
Maleato de Clorfenamina	0.05
<i>Identificación positiva cuando $r > 0.98$</i>	

Tal como se observa, el producto acabado se identificó correctamente con un coeficiente de correlación superior al límite fijado, mientras que el resto de componentes puros muestra un coeficiente de correlación inferior al límite.

Esta misma estrategia de desarrollo de bibliotecas de identificación se ha utilizado como paso previo a los métodos de análisis cuantitativos. Todas las bibliotecas espectrales desarrolladas permiten identificar correctamente el producto acabado, sin mostrar confusión con el resto de componentes puros.

6.2 Determinación de *tablet hardness*

La dureza del comprimido depende en gran medida de la presión aplicada para su obtención, de la composición de la mezcla original y de las propiedades de cada componente. Estas características se reflejan en el espectro NIR de cada

comprimido. Se han desarrollado distintos métodos para la determinación de la presión de compactación de comprimidos farmacéuticos.

6.2.1 Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Mirtazapina

La presión de compactación que se aplica para preparar comprimidos farmacéuticos tiene un efecto significativo sobre sus espectros NIR. En la **Figura 6.1** se muestran los espectros NIR de un conjunto de comprimidos preparados en el laboratorio a distintas presiones (74-880 MPa), a partir de mezclas del principio activo Mirtazapina y excipientes. También se muestra el espectro de un comprimido de producción.

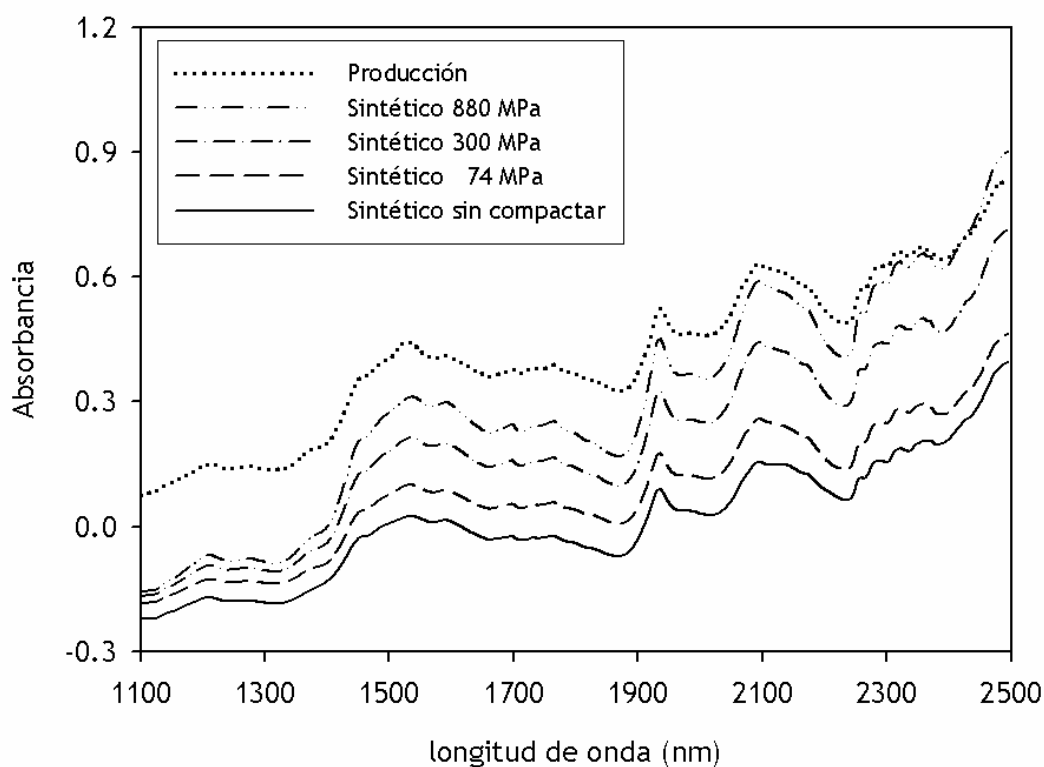


Figura 6.1 Espectros NIR de comprimidos compactados en el laboratorio a distinta presión, junto con un comprimido de producción.

Se observa como a medida que aumenta la presión aplicada en la obtención del comprimido, mayor es la Absorbancia de su espectro. El espectro del comprimido de producción aparece cercano al de laboratorio de mayor presión, sin embargo no es posible obtener ninguna conclusión más a partir de la simple visualización de los espectros.

El efecto de la presión de compactación sobre los espectros NIR de comprimidos, puede ser incluso superior al de la propia variabilidad de concentración de principio activo en dichas muestras. En la **Figura 6.2** se observa un gráfico de scores (PC2 vs. PC1) obtenido de un PCA a partir de los espectros en 2ª Derivada en el intervalo espectral completo, de comprimidos preparados a distinta presión (300-740 MPa) y concentración de principio activo (50-150% sobre concentración nominal de API).

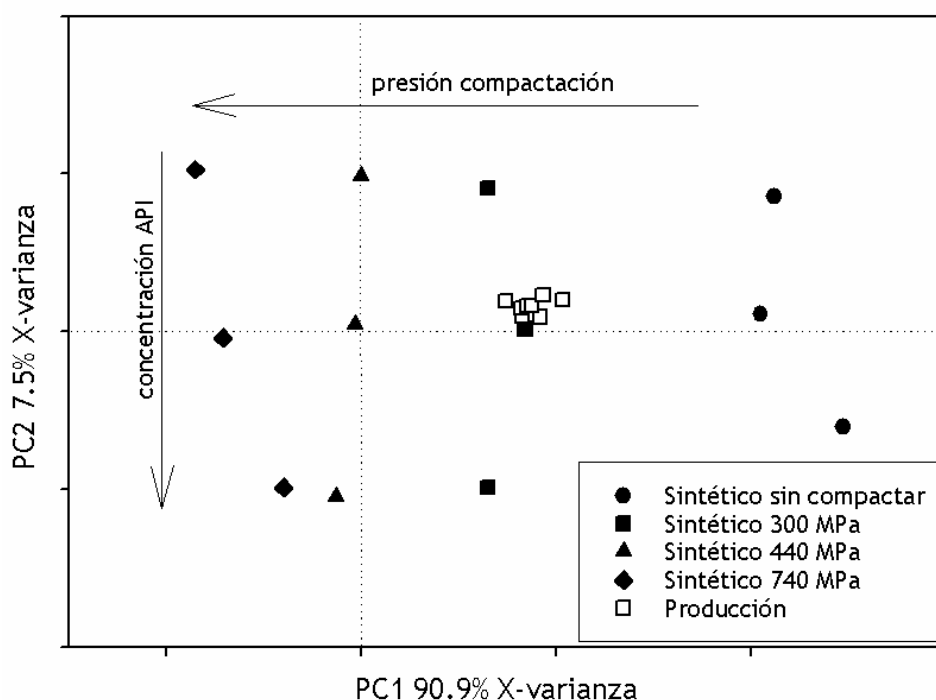


Figura 6.2 Gráfico de scores de un PCA obtenido a partir de los espectros en 2ª Derivada de comprimidos de laboratorio (preparados a distinta presión y concentración) y también comprimidos de producción.

Se observa como la mayor fuente de variabilidad (PC1 91% varianza espectral) es presión de compactación, mientras que la variabilidad de concentración ($\pm 45\%$ alrededor de la concentración nominal de API) representa tan solo un 8% de la variabilidad espectral (PC2). Se observa como las muestras de producción están bastante cercanas a los comprimidos de laboratorio compactados a 300 MPa. Con el fin de minimizar las diferencias espectrales entre comprimidos de laboratorio y de producción, la presión de compactación aplicada sobre mezclas de laboratorio debe ser muy similar a la de producción. Para determinar la presión de compactación en comprimidos de producción, se desarrollaron modelos de calibración PLS1 utilizando espectros de comprimidos preparados en el laboratorio a distintas presiones.

Se prepararon comprimidos de laboratorio que cubrían un rango de presión de 74 a 880 MPa. Se ensayaron modelos con los distintos pretratamientos espectrales (SNV y Derivadas) así como en modo Absorbancia; en todos los casos se utilizó el intervalo espectral completo, ya que no se observó ninguna banda específica asignable a la variabilidad en la presión de compactación. Únicamente el modelo en Absorbancia permitió obtener modelos de calibración simples y con una correcta capacidad predictiva. La ausencia de pretratamiento espectral en el desarrollo del modelo permite observar las mayores diferencias espectrales debidas a la presión de compactación y por ello es que el modelo en Absorbancia muestra los mejores resultados. Dicho modelo se obtuvo utilizando 3 factores PLS y sus errores de calibración y predicción fueron de 8% y 11%. La presión de compactación de los comprimidos de producción, calculada mediante el modelo de

calibración desarrollado, fue de 290 ± 9 MPa. Este resultado es congruente con la posición de estas muestras en el gráfico de scores anterior (**Figura 6.2**).

6.2.2 Determinación de la presión de compactación en comprimidos de Zamene

El producto farmacéutico Zamene contiene Deflazacort como principio activo y se comercializa en forma de dos tipos de comprimidos; los de tipo A presentan una concentración de activo de $81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y contienen 30 mg de API por comprimido, mientras que la concentración de activo en los comprimidos del tipo B es de $32 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y contienen 6 mg de API por unidad.

El efecto que tiene la presión de compactación sobre los espectros NIR de comprimidos correspondientes a mezclas del principio activo Deflazacort con excipientes, es muy similar al observado en el **Apartado 6.2.1**. Este efecto puede ser también incluso superior al de la propia variabilidad en la concentración de activo. En la **Figura 6.3** se muestra un gráfico de scores (PC2 vs. PC1) obtenido de un PCA de los espectros, en el intervalo espectral completo y 2ª derivada, de comprimidos de laboratorio compactados a distintas presiones (74-296 MPa) y concentraciones ($20\text{-}120 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) con comprimidos de producción.

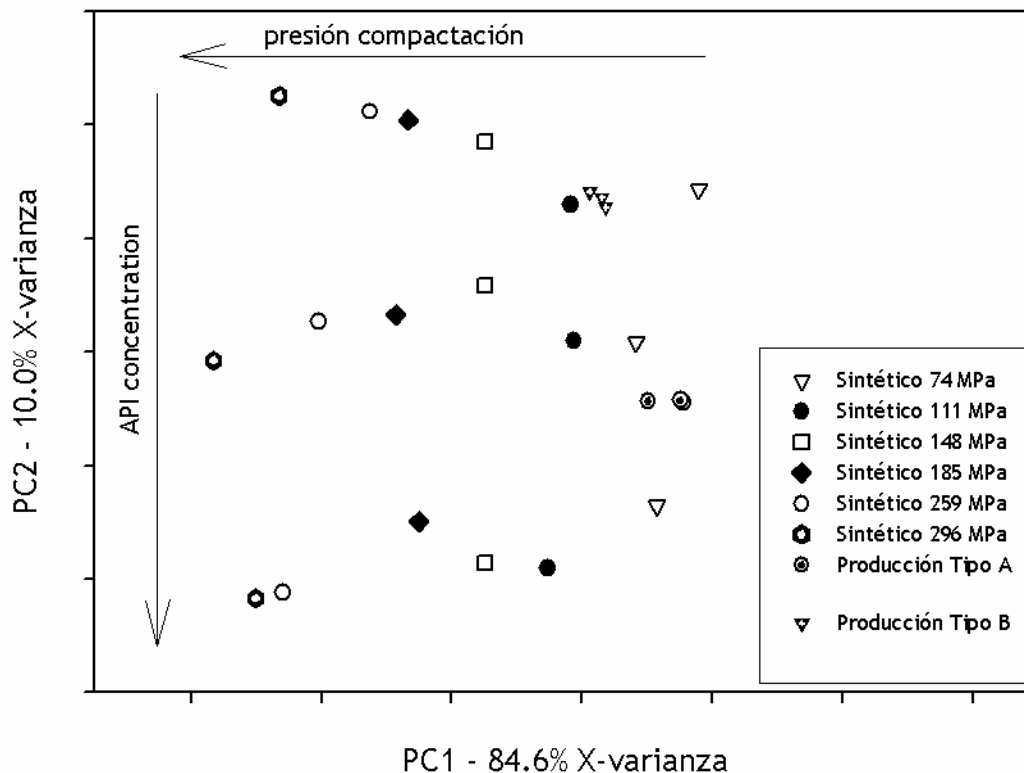


Figura 6.3 Gráfico de scores de un PCA obtenido a partir de los espectros en 2ª Derivada de comprimidos de laboratorio (preparados a distinta presión y concentración) y comprimidos de producción.

Se observa como la variabilidad espectral debida al grado de compactación de los comprimidos es mayor que la debida a la concentración de API (PC1 85% vs. PC2 10%). Los comprimidos de producción del tipo A se encuentran cerca de los de laboratorio de presión inferior (74 MPa), mientras que los del tipo B se sitúan cerca de los de 111 MPa.

Se estudió la posibilidad de determinar la presión de compactación de los comprimidos de producción mediante un modelo de calibración PLS1 utilizando espectros correspondientes a comprimidos de laboratorio preparados a distintas presiones. Se ensayaron varios modelos en el intervalo espectral completo aplicando distintos pretratamientos; la ausencia de pretratamiento dio lugar a

modelos sencillos y con una buena capacidad predictiva. El modelo seleccionado se obtuvo en modo Absorbancia con 4 factores PLS, con un error de calibración de RSEC 4% y de predicción de RSEP 5%. La predicción de la presión en muestras de producción fue de 64 ± 3 MPa y 105 ± 6 MPa, para los comprimidos de Zamene tipo A y B respectivamente. Este resultado es congruente con la posición de los clusters de muestras de producción en la **Figura 6.3**.

6.3 Ensayo de disolución

El producto farmacéutico Zamene se comercializa en forma de comprimidos y corresponde a una mezcla del principio activo Deflazacort (comprimidos tipo A: $81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, tipo B: $32 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y excipientes. Uno de los ensayos realizados antes de la liberación del producto es el ensayo de disolución, en el cual se determina la fracción de activo en solución al cabo de un determinado tiempo. La especificación de disolución para esta formulación, indica que el porcentaje de activo disuelto al cabo de 30 minutos debe ser superior al 80%.

El método de análisis actualmente utilizado se describe en el **Apartado 5.2.2**. Esta metodología implica el uso de reactivos, disolventes con la correspondiente generación de residuos. Además, la obtención del resultado analítico no es inmediata, ya que como mínimo se debe esperar los 30 minutos requeridos. Se propone el desarrollo de un método NIR para la realización de este ensayo en comprimidos intactos analizados individualmente.

La presión de compactación aplicada durante la obtención de comprimidos farmacéuticos influye de un modo claro sobre los perfiles de disolución de los

mismos. En la **Figura 6.4** se muestran los perfiles de disolución obtenidos de comprimidos preparados en el laboratorio a distintas presiones (74-296 MPa).

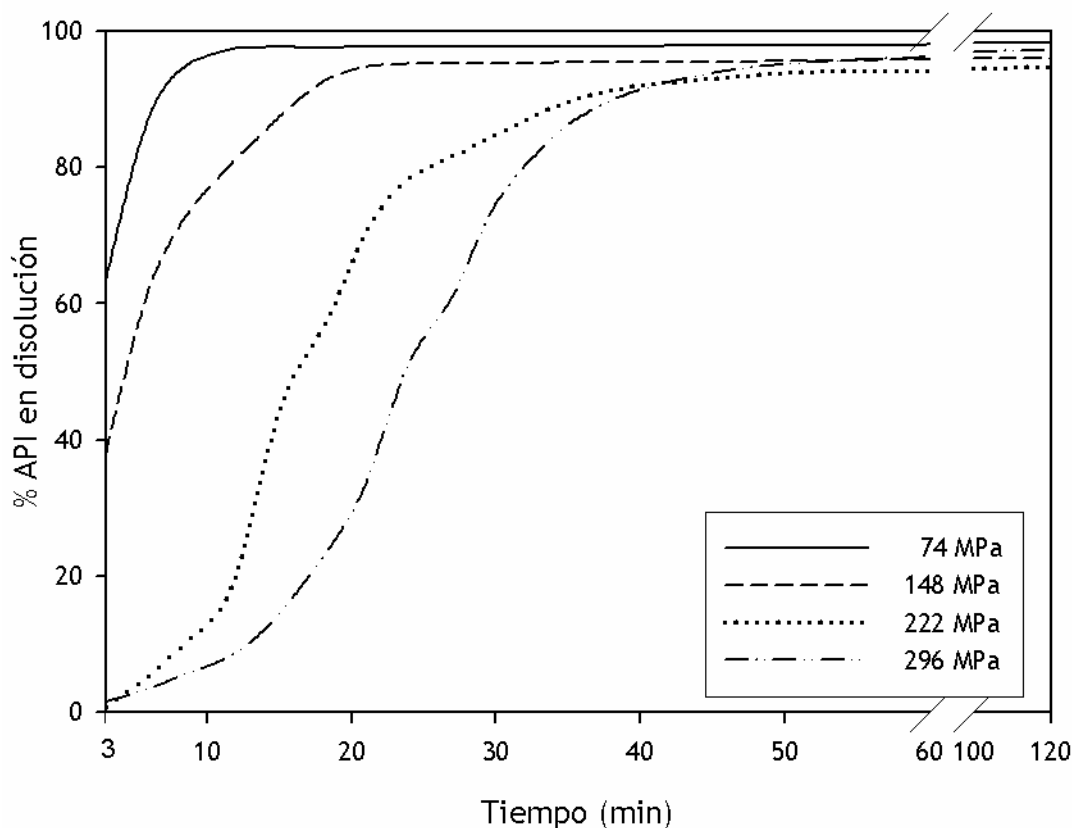


Figura 6.4 Perfiles de disolución de comprimidos sintéticos compactados a distintas presiones (74-296MPa)

Se observa como a medida que aumenta la presión de compactación, el tiempo necesario para que aumente el porcentaje de principio activo disuelto es mayor.

Tal como se ha visto en el **Apartado 6.2**, la presión de compactación aplicada en la obtención de comprimidos farmacéuticos tiene una influencia clara sobre el espectro NIR de los mismos y por ello se estudia la posibilidad de ensayar modelos empíricos que permitan encontrar una relación lineal entre el perfil de disolución y el espectro NIR de comprimidos farmacéuticos.

- *Determinación del porcentaje de API disuelto a un tiempo determinado (PLS1)*

Una manera simple de resolver esta metódica consiste en desarrollar un modelo de calibración para la determinación del porcentaje de activo disuelto a un tiempo determinado, que según los requisitos de esta formulación son 30 minutos (%API_{30min}). Se han obtenido los tests de disolución de comprimidos sintéticos compactados a distintas presiones (74-887 MPa) obteniendo como valor de referencia el porcentaje de activo disuelto a los 30 minutos. Estos comprimidos sintéticos cubrían un rango de concentración de principio activo de ±5% alrededor la concentración nominal del fármaco. El rango de porcentaje de API disuelto a 30 minutos obtenido por el método de referencia fue de 10-98%. Los espectros NIR de los comprimidos sintéticos y el valor de %API_{30min} han sido utilizados para desarrollar modelos de calibración PLS1, utilizando el intervalo espectral completo y los distintos pretratamientos espectrales. Los comprimidos de producción han sido utilizados únicamente en el conjunto de predicción y su rango de %API_{30min} en los comprimidos de producción fue de 88-95%. La **Tabla 6.2** muestra los resultados más significativos de los modelos ensayados.

Tabla 6.2 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación del %API_{30min}.

Pretratamiento espectral	CALIBRACIÓN comprimidos sintéticos (20)			PREDICCIÓN comprimidos producción					
	Factores PLS	Y- varianza Explicada %	RSEC %	Tipo A (10)			Tipo B (10)		
				Residual (% dis) promedio	SD	¹ t _{exp}	Residual (% dis) promedio	SD	¹ t _{exp}
ABS	5	99.02	4.20	1.38	2.19	1.98	0.39	2.35	0.52
1a Der	3	98.47	5.24	1.01	1.73	1.85	-1.23	2.00	1.94
2a Der	4	99.18	3.83	1.21	2.20	1.74	-6.06	2.48	7.73
SNV	3	97.86	6.20	-1.29	3.00	1.36	-9.84	3.51	8.87

¹t_{crit} (p=0.05, 9 grados de libertad) = 2.26. SD: desviación estándar

Se observa como el pretratamiento espectral en 1ª derivada permite obtener un modelo de calibración con 3 factores PLS, con una correcta capacidad predictiva tanto con comprimidos de laboratorio como de producción y con las menores desviaciones estándar de los residuales de predicción. Este modelo se caracteriza fundamentalmente por utilizar en calibración únicamente comprimidos sintéticos preparados en el de laboratorio. El principal logro de este modelo radica en la utilización únicamente de muestras sintéticas preparadas en el laboratorio como conjunto de calibración, las cuales permiten predecir correctamente comprimidos de producción.

El modelo PLS1 desarrollado permite determinar el %API_{30min} en solución a partir del espectro NIR de un comprimido de producción intacto.

- Clasificación según requisito de disolución (DPLS)

El ensayo de disolución es un requisito de mínimos a cumplir por los comprimidos analizados. Es decir, que cualquier comprimido que presente un porcentaje de activo disuelto superior al 80% a los 30 minutos cumple las especificaciones de la formulación, mientras que el comprimido que presente un porcentaje inferior a 80%, no cumpliría especificaciones. Se estudiaron modelos discriminantes (DPLS, *Discriminant PLS*) en vez de un modelo de cuantificación, ya que no es imprescindible conocer el porcentaje de disolución exacto. Se establecieron dos clases distintas de comprimidos según cumplan o no el requisito de disolución. Los comprimidos sintéticos preparados en el laboratorio se clasifican en alguna de estas dos clases. Se desarrollaron modelos discriminantes DPLS, utilizando un código binario de 1 y 0 para establecer ambas clases en los comprimidos sintéticos. Los comprimidos de producción se utilizaron únicamente en el conjunto de

predicción. Si el valor de predicción proporcionado por el modelo DPLS está por encima de 0.5 (valor central entre 1 y 0), dicha muestra cumple la especificación de disolución.

Se ensayaron modelos DPLS utilizando las mismas muestras de calibración utilizadas en el modelo PLS1 anterior, con el intervalo espectral completo y los distintos pretratamientos habituales. El modelo que mostró la mejor capacidad de discriminación se obtuvo en 2ª derivada utilizando 4 factores PLS para establecer el modelo. La clasificación de los comprimidos de producción fue correcta con unos valores de predicción para comprimidos de producción tipo A de 0.82-0.92, y para los del tipo B de 0.96-1.17.

Esta segunda estrategia mediante modelos DPLS permite clasificar correctamente los comprimidos de producción según cumplan los requisitos de disolución, utilizando únicamente comprimidos sintéticos de laboratorio en el conjunto de calibración.

- Determinación del perfil de disolución completo (PLS2)

La tercera estrategia para la realización del ensayo de disolución consistió en la determinación del perfil de disolución completo mediante modelos de calibración PLS2. Los modelos PLS2 permiten calibrar y posteriormente predecir conjuntos de variables Y, en este caso los porcentajes de activo disuelto en un rango de tiempo determinado. El método de referencia utilizado en el ensayo de disolución proporciona perfiles de disolución en el intervalo 3-120 minutos. En la **Figura 6.5** se muestran los perfiles de disolución de ambos tipos de comprimidos de producción (tipo A y B).

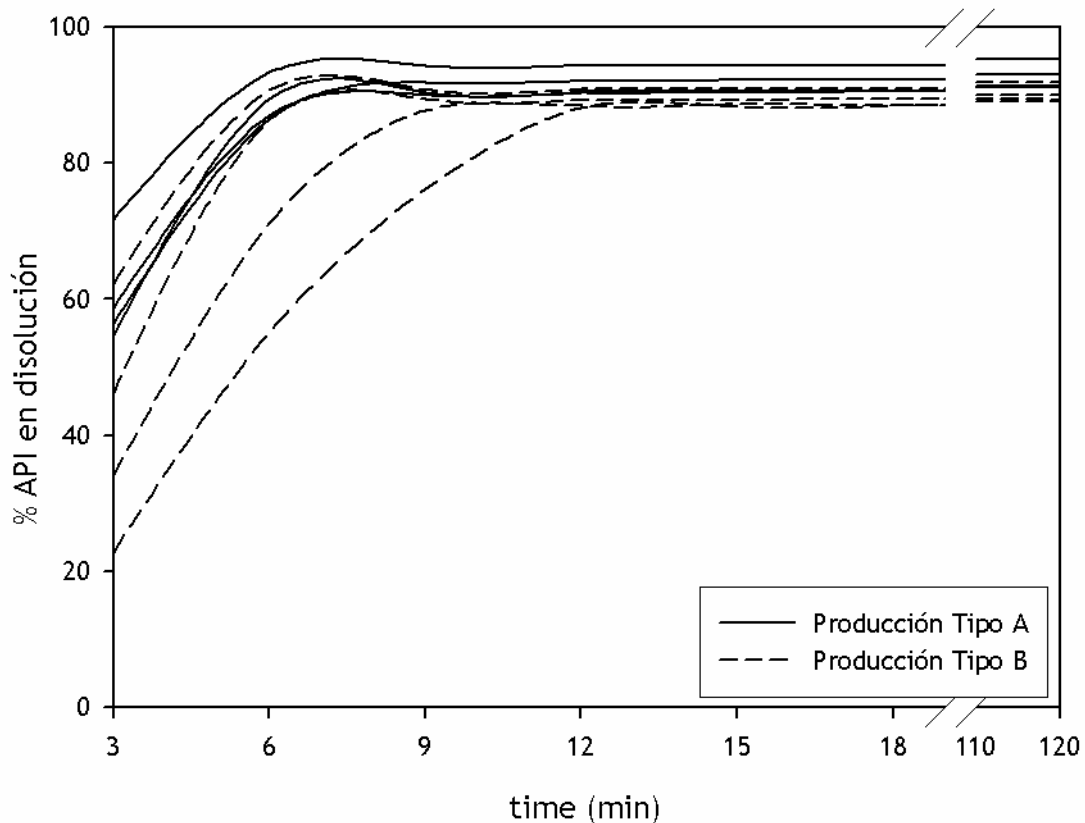


Figura 6.5 Perfiles de disolución de comprimidos de producción de Zamene (tipo A y B).

Se observa como a partir de 10 minutos, los comprimidos ya han superado el mínimo de disolución requerido para esta formulación (80%). Los comprimidos del tipo A presentan una velocidad de disolución mayor que los del tipo B. Los comprimidos de tipo A presentan una presión de compactación de 64 MPa (rango 74-52 MPa), mientras que para los del tipo B la presión es de 105 MPa (rango 140-84 MPa). Es razonable que los comprimidos del tipo A tarden menos tiempo en disolverse que los del tipo B, debido a su menor presión de compactación. Se utilizaron solamente los datos de disolución entre 3 y 12 minutos para el desarrollo de los modelos, ya que a partir de ese tiempo, el porcentaje de activo en disolución de cada perfil presenta variaciones inferiores al 1%.

Se ensayaron modelos de calibración PLS2 utilizando los espectros NIR de comprimidos de producción (tipo A o B), en el intervalo espectral completo y los distintos pretratamientos espectrales. La utilización de los %API en disolución entre 3 y 12 minutos, como valores de referencia, no permiten obtener modelos PLS2 adecuados con una correcta capacidad predictiva. Todos los modelos obtenidos requerían un elevado número de factores PLS (hasta 12). Una explicación de este hecho es que los parámetros a modelar, %API en disolución y espectros NIR, no son bilineales y el algoritmo PLS no puede modelarlos adecuadamente.

La aplicación de alguna transformación a los perfiles de disolución puede ser una solución adecuada para obtener modelos de calibración simples y con una buena capacidad predictiva. Se estudió la posibilidad de linealizar los perfiles de disolución y utilizar las variables transformadas en los nuevos modelos. Se optó por linealizar los perfiles de disolución representando el inverso del porcentaje frente al inverso del tiempo. En la **Figura 6.6** se muestran los perfiles de disolución anteriores, después de ser transformados.

Se ensayaron de nuevo los modelos PLS2 utilizando las variables transformadas. Con esta transformación se recalcularon de nuevo los nuevos modelos obtuvieron modelos PLS2 en el intervalo espectral completo y con los distintos pretratamientos habituales. La evaluación estadística de los perfiles de disolución predichos por el modelo PLS2 se realizó después de deshacer la transformación. La **Tabla 6.3** muestra los resultados más significativos de los modelos ensayados.

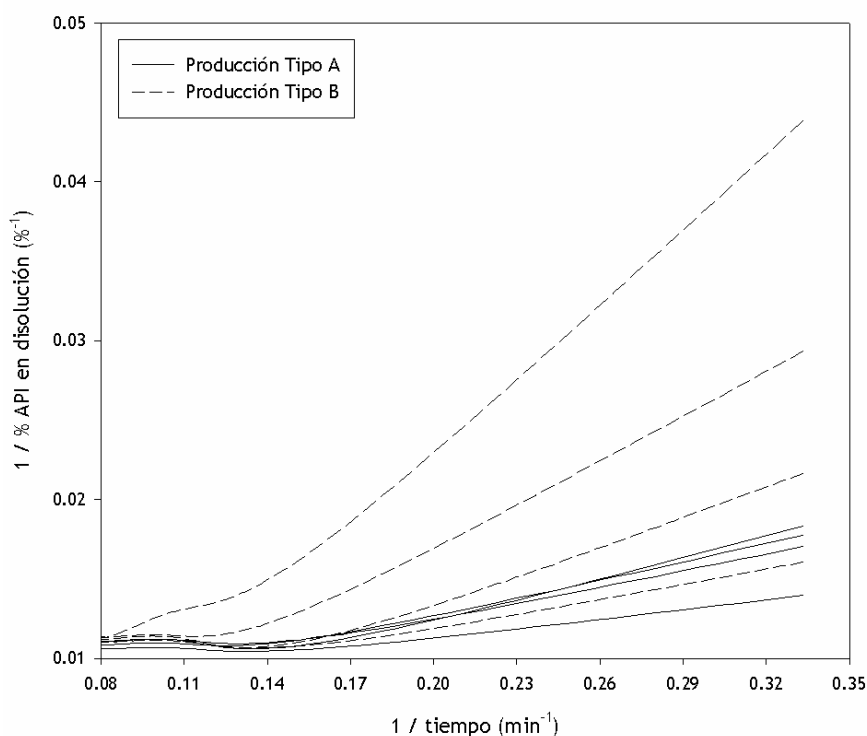


Figura 6.6 Perfiles de disolución de comprimidos de producción de Zamene (tipo A y B) transformados según $\%API^{-1}$ vs $tiempo^{-1}$.

Tabla 6.3 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS2 ensayados para la determinación del perfil de disolución en comprimidos de Zamene.

CALIBRACIÓN	PREDICCIÓN	Pretratamiento espectral	Factores PLS	RSEC%	RSEP%	Coefficiente Correlación(r)
comprimidos tipo A (8)	comprimidos tipo A (6)	ABS	4	3.2	18.6	0.334
		SNV	3	3.7	27.9	0.333
		1a Der	4	2.1	6.8	0.990
		2a Der	2	5.5	5.9	0.997
		SNV + 1a Der	4	1.9	9.3	0.978
		SNV + 2a Der	2	4.4	6.8	0.998
comprimidos tipo B (7)	comprimidos tipo B (9)	ABS	3	2.6	8.8	0.985
		SNV	3	3.0	8.1	0.989
		1a Der	2	3.0	9.9	0.983
		2a Der	2	2.8	10.0	0.982
		SNV + 1a Der	2	4.1	7.9	0.988
		SNV + 2a Der	2	4.4	7.1	0.989

Se observa como el pretratamiento en 2ª derivada y la combinación SNV+2ª derivada permite obtener modelos con 2 factores PLS, para los comprimidos de tipo A y B, respectivamente. Ambos modelos permiten predecir correctamente los

perfiles de disolución de su mismo tipo (A o B). Se observa una alta correlación entre los perfiles obtenidos por el método de referencia y el método NIR. La **Figura 6.7** muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de disolución obtenidos por el método NIR y el de Referencia de comprimidos de producción tipo B.

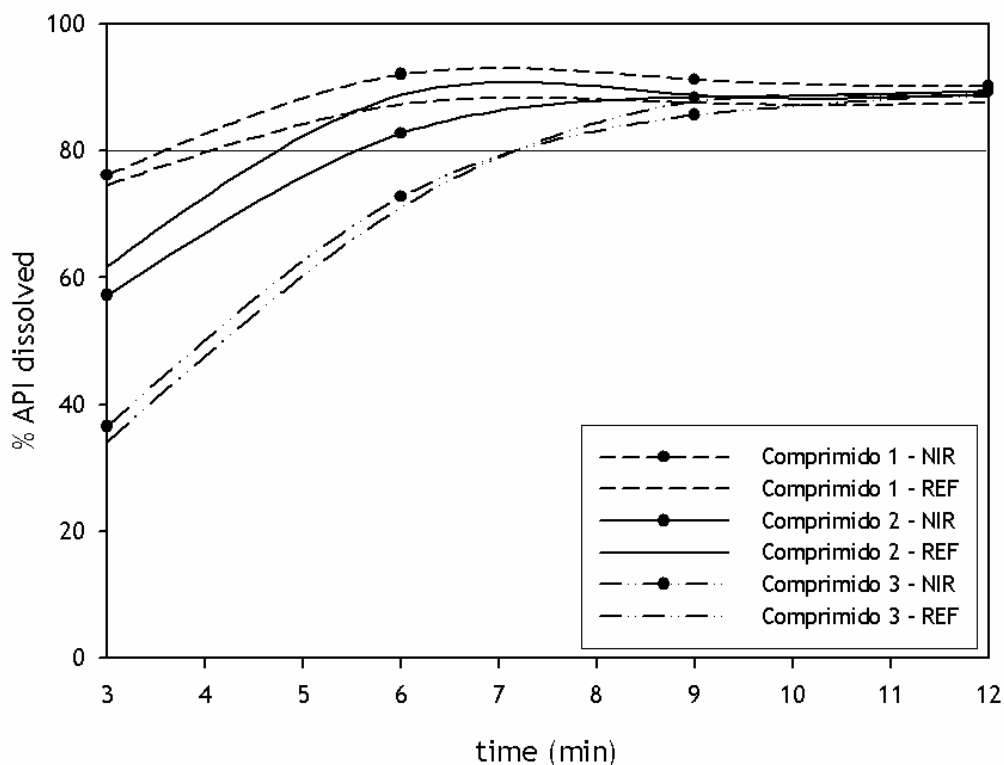


Figura 6.7 Perfiles de disolución obtenidos por el método de Referencia y por el NIR para tres comprimidos de producción de Zamene (tipo B).

La similitud de los perfiles de disolución es elevada, como también indican los coeficientes de correlación obtenidos (**Tabla 6.3**).

Los perfiles de disolución predichos mediante el modelo PLS2 pueden ser utilizados para la determinación univariante del tiempo necesario para lograr un 80% de activo en disolución. Este tiempo se obtuvo por interpolación en una regresión lineal por mínimos cuadrados de cada perfil de disolución transformado.

La **Tabla 6.4** muestra los tiempos obtenidos por el método NIR y por el de referencia, para los comprimidos del tipo A y B.

Tabla 6.4 Determinación del tiempo necesario para que el %API en disolución llegue a 80%, obtenido por interpolación en los perfiles de disolución NIR.

		TIEMPO para lograr 80% API en disolución(min)
Comprimidos Tipo A	NIR	3.3
	REF	3.6
	Diferencia	-0.3
Comprimidos Tipo B	NIR avg	6.1
	REF avg	6.2
	Diferencia	-0.1

Los comprimidos de tipo A tardan unos 3 minutos en alcanzar el porcentaje requerido, frente a los 6 minutos de los de tipo B. Este resultado es congruente con la mayor presión de compactación que presentan los comprimidos del tipo B y por ello el tiempo de disolución es mayor.

Las distintas estrategias planteadas (determinación de %API_{30min} mediante PLS1, clasificación mediante DPLS, determinación del perfil mediante PLS2 y determinación de %API_{30min} mediante PLS2) permiten realizar satisfactoriamente el ensayo de test de disolución en el preparado farmacéutico Zamene, analizando comprimidos intactos de forma individual. Tan solo es necesario obtener el espectro NIR de cada comprimido, para obtener el resultado analítico en breves minutos.

6.4 Determinación de principios activos y excipientes

Se presentan las metódicas NIR desarrolladas para la cuantificación de principios activos y excipientes en muestras farmacéuticas de producto acabado.

6.4.1 Cuantificación de Mirtazapina en comprimidos farmacéuticos

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un método para la determinación del principio activo Mirtazapina en comprimidos farmacéuticos intactos analizados individualmente. La determinación del activo en los comprimidos debe permitir realizar el test de uniformidad de contenido.

En la **Figura 6.8** se muestran los espectros NIR del principio activo, de una mezcla sintética con concentración de API igual a la nominal y una muestra de placebo. Se observa como el principio activo muestra bandas intensas que permiten su determinación. Las diferencias espectrales entre el placebo y la muestra sintética son debidas fundamentalmente a la contribución espectral del principio activo.

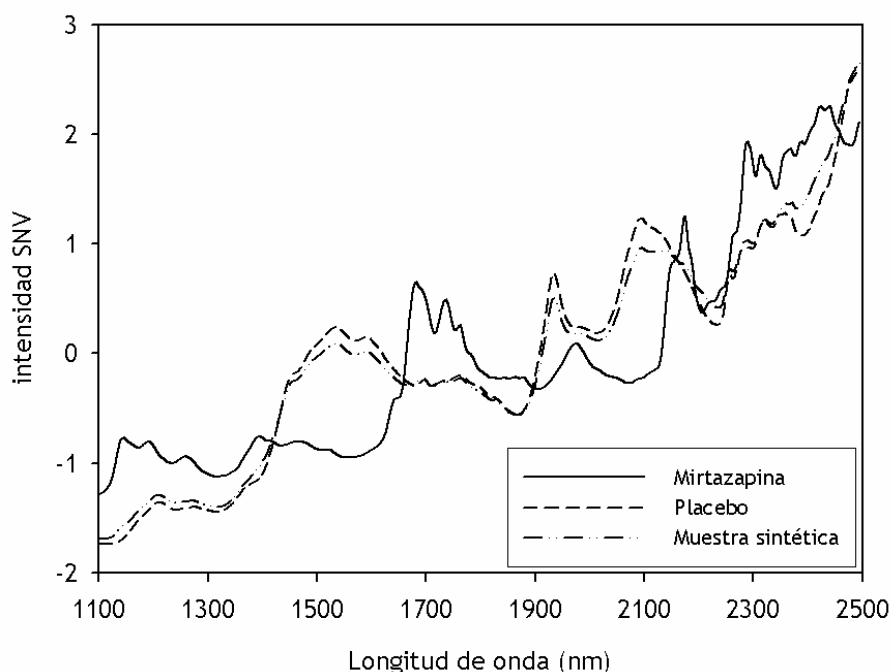


Figura 6.8 Espectros NIR en modo SNV del principio activo Mirtazapina, de una muestra sintética a la concentración nominal de API ($100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y del placebo utilizado para su preparación.

Se realizó un primer ensayo de calibración desarrollando modelos de calibración PLS1 con los espectros de las mezclas sintéticas en polvo (mezclas de principio activo y excipientes).

En la **Tabla 6.5** se muestran los resultados más significativos de los modelos de calibración desarrollados.

Tabla 6.5 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 desarrollados para la determinación de Mirtazapina en comprimidos de producción.

Muestras calibración	Pretratamiento espectral	CALIBRACIÓN			PREDICCIÓN			
		Factores PLS	Y-varianza explicada %	RSEC%	Sintéticas	Producción		
					RSEP%	RSEP%	Residuales	
						Promedio	SD	
Sintéticas en polvo	2a Der	3	99.70	1.4	1.2	10.9	-10.5	3.8
		4	99.89	0.9	0.9	6.8	2.8	6.5
		5	99.95	0.6	1.2	17.5	16.6	6.7
		6	99.98	0.4	1.3	19.0	18.1	6.9
Sintéticas en polvo + comprimidos producción	2a Der	3	98.60	2.1	1.7	2.8	-1.4	2.6
		4	99.24	1.6	1.4	1.6	0.3	1.6
		5	99.40	1.4	1.3	1.4	0.3	1.4
		6	99.57	1.2	1.4	1.5	0.4	1.5

La utilización exclusiva de muestras sintéticas en el conjunto de calibración, permite obtener modelos que únicamente son capaces de predecir correctamente muestras sintéticas y no comprimidos de producción. Este modelo se obtuvo en 2aD, con 4 factores PLS. Por ello fue necesario incluir muestras producción en el conjunto de calibración, lo cual permite corregir el error sistemático de predicción a costa de aumentar también el número de factores PLS del modelo. El modelo que mostró una mejor capacidad predictiva fue calculado en el intervalo espectral completo (1100-2500nm) en 2ª derivada, utilizando 5 factores PLS. Este modelo es adecuado para establecer un correcto método de análisis, sin embargo se planteó la posibilidad de abordar la determinación de un principio activo en comprimidos intactos de un modo distinto. Esta nueva estrategia consistió en desarrollar

modelos de calibración utilizando comprimidos sintéticos preparados en el laboratorio, por compactación de las mezclas sintéticas de principio activo y excipientes. La presión de compactación aplicada se determinó mediante el método citado en el **Apartado 6.2** y fue de 300 MPa.

Se ensayaron modelos de calibración para la determinación de principio activo en comprimidos de producción utilizando comprimidos sintéticos que cubrían una concentración de API de 55 a 145 mg·g⁻¹ y compactados a 300MPa. La concentración de API en los comprimidos de producción es de 100 mg·g⁻¹, por lo que el rango de concentración de las muestras sintéticas es suficiente. La **Tabla 6.6** muestra los resultados más significativos de los modelos desarrollados utilizando comprimidos sintéticos y de producción.

Tabla 6.6 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 desarrollados en el intervalo 1100-2500nm y 2^a Derivada para la cuantificación de Mirtazapina en comprimidos de producción, utilizando comprimidos sintéticos y de producción en el conjunto de calibración.

	CALIBRACIÓN			PREDICCIÓN			
	Factores PLS	Y-varianza explicada%	RSEC%	Sintéticas	Producción		
				RSEP%	RSEP%	residuales promedio	SD
Comprimidos sintéticos	1	98.68	3.0	3.8	18.5	-18.6	3.5
	2	99.74	1.3	1.8	10.4	-10.5	1.9
	3	99.89	0.8	1.9	6.1	-6.0	1.8
	4	99.96	0.5	2.0	6.0	-5.2	3.2
Comprimidos sintéticos + producción	1	89.46	5.8	7.3	7.6	-6.6	3.3
	2	98.18	2.1	1.6	3.8	-1.7	3.5
	3	99.02	1.6	1.5	2.3	-0.6	2.3
	4	99.50	1.3	1.6	1.8	0.4	1.8

Si comparamos el modelo desarrollado con comprimidos sintéticos con el mostrado en la **Tabla 6.5** que utilizaba muestras sintéticas en polvo, el actual necesita 2 factores PLS menos (2 frente a 4). Sin embargo aún no permite predecir

correctamente los comprimidos de producción. Al añadir comprimidos de producción al conjunto de calibración, se aumenta el número de factores PLS necesario hasta 3 lo cual permite predecir correctamente las muestras de producción, con unos errores de calibración y predicción de 1.6 y 2.3% respectivamente.

La estrategia para el desarrollo de modelos para la determinación de principio activo en comprimidos intactos analizados individualmente, mediante la utilización de comprimidos preparados en el laboratorio a una presión similar, permite obtener modelos de calibración mucho mas simples que los que utilizan muestras en polvo, obteniendo un capacidad correcta predictiva. Los modelos desarrollados con muestras compactadas necesitan menos factores PLS.

Se escogió el modelo que utiliza comprimidos sintéticos y de producción para establecer el método para la determinación del principio activo Mirtazapina en comprimidos de producción. El método propuesto fue validado siguiendo las guías descritas en el **Apartado 2.5**. Los resultados de validación se detallan en la **Tabla 6.7**. Todos los parámetros evaluados cumplen los requisitos de validación establecidos por las guías utilizadas.

El método desarrollado se utilizó para la realización del ensayo de uniformidad de contenido en comprimidos farmacéuticos de Mirtazapina. En la **Tabla 6.8** se muestran los resultados obtenidos de 8 lotes analizados.

Tabla 6.7 Resultados de la validación del método NIR para la determinación del principio activo Mirtazapina en comprimidos de producción

	Compuesto	Coef. correlación	
Selectividad	<i>Comprimidos producción</i>	0.999	
	<i>Placebo</i>	0.977	
	<i>Lactosa</i>	0.953	
	<i>Almidón de maíz</i>	0.571	
	<i>Hidroxipropilcelulosa</i>	0.278	
	<i>Mirtazapina</i>	0.190	
	<i>Estearato de magnesio</i>	0.137	
	<i>Sílice coloidal</i>	-0.134	
Identificación positiva $r > 0.99$			
	Parámetro	Resultado	
Linealidad	<i>n</i>	15	
	<i>Rango concentración (mg g⁻¹)</i>	59.2-136.8	
	<i>Ordenada origen</i>	-2.8 ± 3.6	
	<i>Pendiente</i>	1.02 ± 0.03	
	<i>r</i>	0.998	
Exactitud	<i>n</i>	39	
	<i>Promedio residuales (mg g⁻¹)</i>	-0.33	
	<i>Desviación estándar</i>	1.87	
	<i>t exp</i>	1.11	
	<i>t crit</i>	2.02	
Repetitividad	<i>Replicados</i>	6	
	<i>Promedio NIR (mg g⁻¹)</i>	100.63	
	<i>CV (%)</i>	0.42	
Precisión intermedia	<i>Días (3)</i>	<i>F exp</i>	7.68
		<i>F crit</i>	19.00
	<i>Analistas (2)</i>	<i>F exp</i>	0.13
		<i>F crit</i>	18.51
		<i>CV (%)</i>	1.17
Robustez	<i>n</i>	80	
	<i>t exp</i>	1.57	
	<i>t crit</i>	1.99	

Tabla 6.8 Uniformidad de contenido en comprimidos de Mirtazapina analizados mediante el método NIR.

Lote	Contenido nominal API por comprimido	Contenido API por comprimido mediante método NIR	RSD %
A	15 mg	15.99	1.65
B		15.41	1.42
C		15.09	1.70
A'	30 mg	31.06	1.68
B'		30.48	1.26
C'		31.03	1.26
D'		30.05	0.93
E'		29.92	0.99

Según los criterios establecidos tanto por la Farmacopea Europea como Americana, los lotes analizados cumplen el test de uniformidad de contenido, ya que ninguna de las dosis analizadas supera los límites de $\pm 15\%$ del valor etiquetado o del valor medio.

6.4.2 Cuantificación de Deflazacort en comprimidos de Zamene

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un método para la determinación del principio activo en los dos tipos de comprimidos de Zamene, desarrollando un único modelo de calibración que permita el análisis individual de cada comprimido intacto.

En la **Figura 6.9** se muestran los espectros NIR del principio activo Deflazacort, de una mezcla de laboratorio (activo y excipientes) y del placebo.

Como se puede observar, el principio activo muestra bandas significativas que permiten su determinación mediante métodos multivariados. Las diferencias entre la mezcla de laboratorio y el placebo son debidas fundamentalmente a la contribución espectral del principio activo.

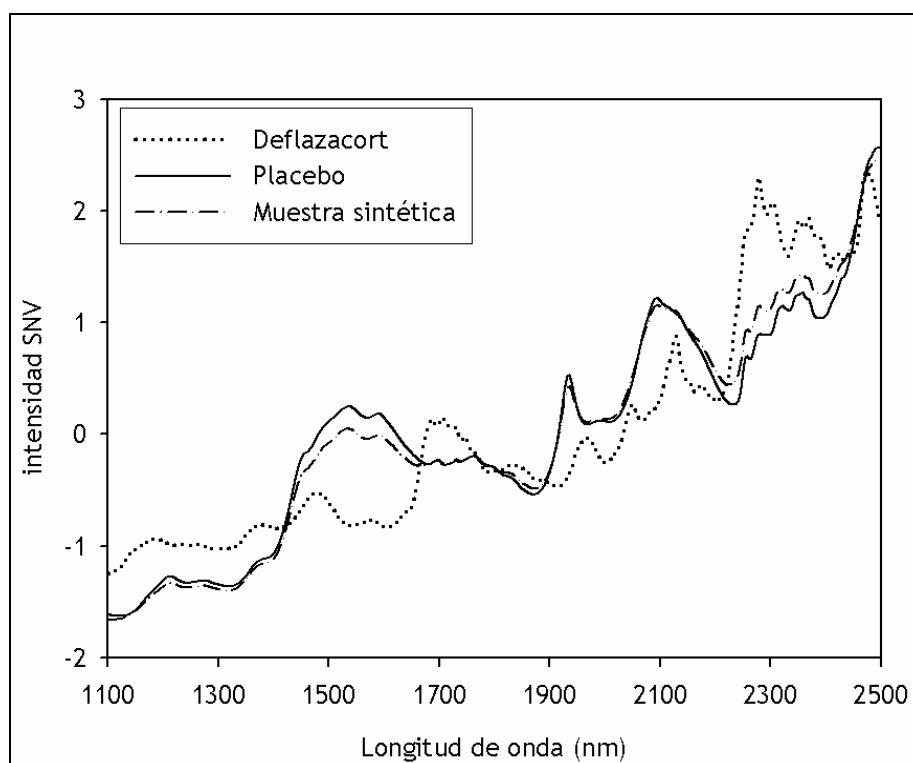


Figura 6.9 Espectros NIR en modo SNV del principio activo Deflazacort, de una muestra sintética con una concentración de API de $120 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y del placebo utilizado para su preparación.

Se planteó el desarrollo de modelos de calibración PLS utilizando una estrategia similar a la planteada para el producto farmacéutico Mirtazapina (**Apartado 6.4.1**). Con el fin de desarrollar modelos de calibración simples y robustos que permitan el análisis individual de comprimidos farmacéuticos intactos, se utilizaron mezclas de laboratorio compactadas a una determinada presión. La presión necesaria para preparar comprimidos de laboratorio se determinó mediante el método desarrollado en el **Apartado 6.2.2**. Se prepararon comprimidos sintéticos que cubrían una concentración de API de 20 a $120 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, compactados a una presión entre 74 y 111 MPa. Los comprimidos de producción, tipo A y B, presentan una concentración de API de 81 y $32 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, por lo que el rango de concentraciones cubierto por las muestras sintéticas es suficiente para desarrollar modelos de calibración adecuados. Se ensayaron

modelos de calibración para la determinación del activo en comprimidos de producción, utilizando únicamente en calibración espectros de comprimidos preparados en el laboratorio. La **Tabla 6.9** muestra los resultados más significativos de los modelos ensayados.

Tabla 6.9 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación de Deflazacort en comprimidos de producción.

	CALIBRACIÓN				PREDICCIÓN					
	Comprimidos sintéticos (18)				Comprimidos de producción					
	Pretratamiento espectral	Factores PLS	Y-varianza explicada %	RSEC %	Tipo A (20)			Tipo B (20)		
Residual (mg g ⁻¹)					¹ t _{exp}	Residual (mg g ⁻¹)		¹ t _{exp}		
				promedio		SD			promedio	SD
1 ^a Der	3	99.83	1.64	4.74	1.08	19.66	5.52	1.28	19.26	
2 ^a Der	3	99.72	2.09	-0.04	1.50	0.13	0.61	1.92	1.46	
SNV	3	99.72	2.08	23.63	1.03	102.85	17.05	0.93	80.10	
SNV+1 ^a Der	3	99.74	2.00	0.64	2.21	1.29	-0.19	0.80	1.11	
SNV+2 ^a Der	2	99.76	1.95	0.50	2.14	1.05	-4.06	0.99	18.68	

¹t_{crit} (p=0.05, 19 grados de libertad) = 2.09. SD: desviación estándar

El modelo de calibración que mostró una mejor capacidad predictiva se obtuvo en el intervalo espectral completo en 2^a derivada y utilizó 3 factores PLS. Los errores de calibración y predicción fueron de 2 y 3% respectivamente. Este modelo permite predecir correctamente tanto comprimidos sintéticos como de producción (tipo A y B). Este resultado demuestra que los comprimidos sintéticos reflejan en gran medida las características del proceso de producción, debido fundamentalmente al diseño experimental utilizado para establecer las concentraciones de todos los excipientes de la formulación y a la presión de compactación utilizada para preparar los comprimidos de laboratorio.

El método NIR desarrollado se utilizó para la realización del ensayo de uniformidad de contenido en comprimidos farmacéuticos de Zamene. En la **Tabla**

6.10 se muestran los resultados obtenidos para 4 lotes analizados (10 comprimidos por lote).

Tabla 6.10 Uniformidad de contenido en comprimidos de Zamene analizados mediante el método NIR.

Lote	Contenido API nominal por comprimido	Rango Contenido API mediante NIR (mg) ¹	Contenido API mediante NIR (mg) ¹	RSD%
A1	30mg	28.81-30.66	30.02	2.31
A2		27.27-28.98	28.61	1.86
B1	6mg	5.92-6.76	6.39	4.07
B2		6.18-6.99	6.57	4.54

¹Rango y promedio para 10 comprimidos por lote

Según los criterios establecidos tanto por la Farmacopea Europea como Americana, los lotes analizados cumplen el test de uniformidad de contenido.

6.4.3 Determinación de cinco principios activos en Frenadol

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método para la determinación simultánea de los cinco principios activos en el producto farmacéutico Frenadol. En la **Figura 6.10** se muestran los espectros NIR de cada principio activo, de la sacarosa y del producto farmacéutico. Como se puede observar, cada uno de los principios activos muestra bandas significativas, las cuales permiten su determinación mediante modelos multivariados. Las diferencias espectrales entre el preparado farmacéutico y la Sacarosa son debidas fundamentalmente a la contribución de los principios activos.

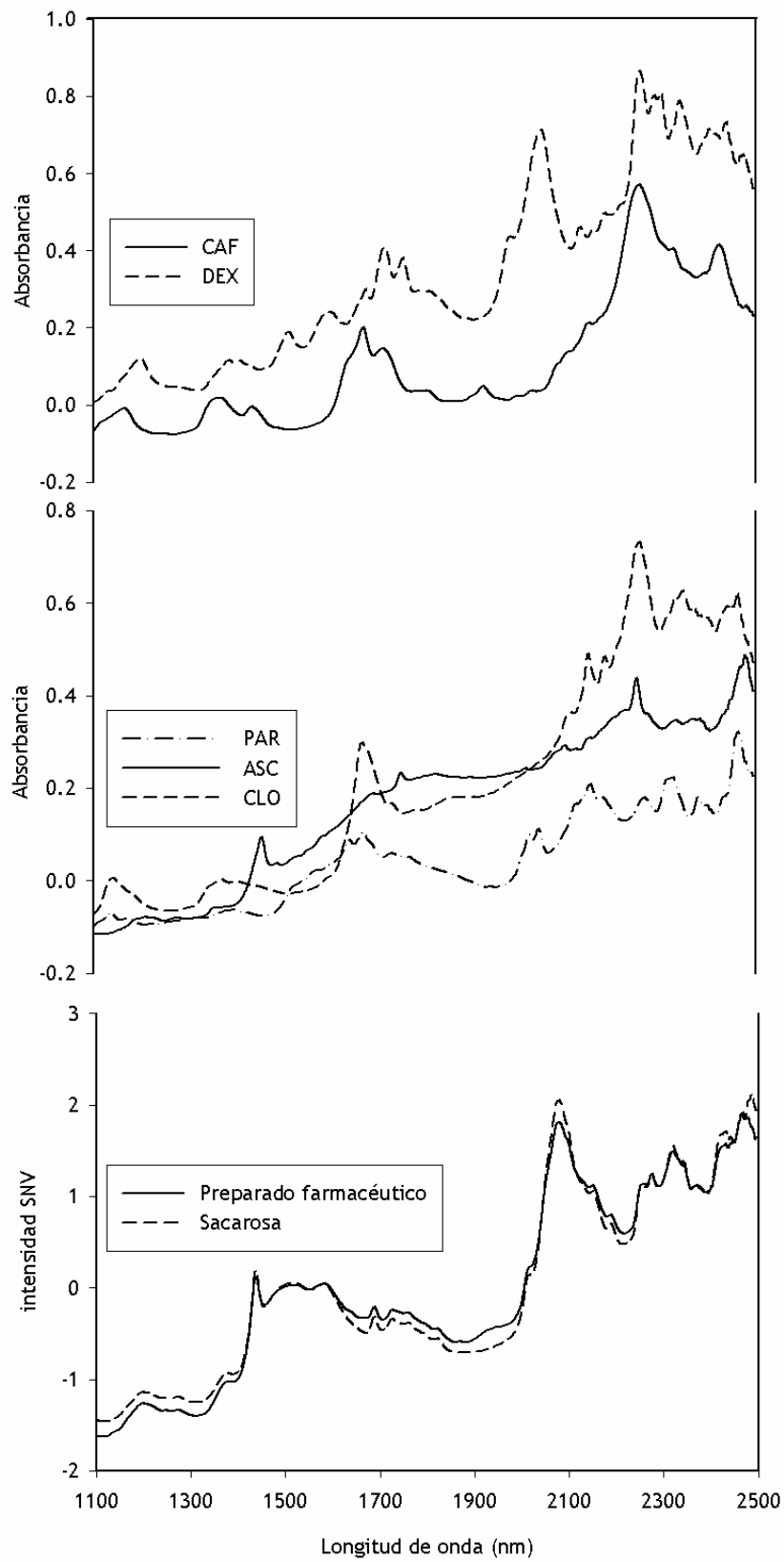


Figura 6.10 Espectros NIR en modo Absorbancia de los cinco principios activos. Espectros NIR en modo SNV del preparado farmacéutico y del excipiente mayoritario.

La determinación de los cinco analitos se realizó mediante el desarrollo de sendos modelos de calibración PLS1, utilizando un número variable de muestras dopadas y muestras de producto acabado. Las muestras dopadas cubrían como mínimo un 80-120% respecto la concentración nominal de cada principio activo. Los modelos se ensayaron en el intervalo espectral completo (1100-2500nm) y también utilizando las bandas más significativas de cada principio activo. A su vez, se probaron los distintos pretratamientos espectrales (SNV y Derivadas). Los resultados más significativos de los cinco modelos de calibración que mostraron mejor capacidad predictiva se muestran en la **Tabla 6.11**.

Tabla 6.11 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación de los cinco principios activos en Frenadol.

		<i>PAR</i>	<i>ASC</i>	<i>DEX</i>	<i>CAF</i>	<i>CLO</i>
Concentración nominal (mg g⁻¹)		65	25	2	1.5	0.4
CALIBRACIÓN						
Nº muestras	Laboratorio	37	34	20	27	28
	Producción	3	3	3	3	3
Rango (%)		73.9-137.1	67.1-150.0	79.0-126.3	64.4-127.0	64.5-149.2
Modo espectral		1a Der	2a Der	2a Der	1a Der	1a Der
Intervalo espectral (nm)		1100-2350	1100-1900	1100-2350	1100-2350	1600-2300
Nº factores PLS		4	5	5	6	10
RSEC (%)		2.7	3.6	1.7	4.3	4.2
PREDICCIÓN						
Nº muestras	Laboratorio	8	10	7	7	5
	Producción	33	33	33	33	33
Rango (%)		80.8-120.1	79.6-122.9	80.4-118.2	80.9-119.3	80.5-117.3
RSEP (%)		2.2	2.7	3.3	2.1	3.4
Bias (%)		0.6	0.0	0.3	0.3	-0.6

La inclusión de ambos tipos de muestra (laboratorio y producción) en los conjuntos de calibración es condición indispensable para la correcta predicción del producto acabado Frenadol. El número de factores PLS necesario para construir el modelo aumenta a medida que disminuye la concentración del principio activo, necesitando

hasta 10 factores para el modelo de la Clorfenamina. Este número de factores, aún siendo elevado, permite predecir correctamente la Clorfenamina en Frenadol. Los modelos de calibración poseen una mejor capacidad predictiva en muestras de producción que para muestras de laboratorio. Este hecho, junto con el distinto número de muestras de cada tipo en ambos conjuntos, conlleva en ciertos casos a la obtención de errores de predicción (RSEP) inferiores a los de calibración (RSEC).

El método para la determinación simultánea de los cinco principios activos fue validado y los resultados de la validación se muestran en la **Tabla 6.12**. Todos los parámetros evaluados cumplen exitosamente los requisitos establecidos, confirmando la calidad del método para el propósito determinado.

Tabla 6.12 Resultados de la validación del método NIR para la determinación de los cinco principios activos en comprimidos de producción.

Compuesto	Coef. correlación
Preparado farmacéutico	0.99
Sacarosa	0.97
Paracetamol	0.11
Ácido Ascórbico	-0.07
Dextrometorfano HBr	-0.01
Cafeína	0.09
Maleato de Clorfenamina	0.05
Identificación positiva	$r > 0.98$

Parámetro	Componente	PAR	ASC	DEX	CAF	CLO	
Linealidad	n	10	12	9	9	9	
	Rango						
	Concentración (%)	80.8-120.1	79.6-122.9	80.4-118.2	80.9-119.3	80.5-117.3	
	Ordenada origen	0.06 ± 15.80	1.67 ± 11.00	3.39 ± 23.80	-4.99 ± 14.80	-3.37 ± 32.44	
	Pendiente	1.00 ± 0.15	0.99 ± 0.11	0.96 ± 0.24	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.32	
	R	0.984	0.988	0.962	0.987	0.945	
Exactitud	n	10	12	9	9	9	
	Promedio Residuales (%)	-0.18	1.09	-0.14	0.26	-0.16	
	SD	2.17	2.10	3.42	2.15	3.71	
	t experimental	0.26	1.79	0.13	0.36	0.13	
	t tables	2.26	2.20	2.31	2.31	2.31	
Repetitividad	Promedio NIR	100.7	100.6	102.4	100.2	100.4	
	RSD (%)	1.8	2.4	2.2	2.6	3.0	
Precisión intermedia	Día	F exp	0.11	0.24	4.98	2.58	0.01
		F crit	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
	Analista	F exp	0.16	1.43	3.25	0.42	1.94
		F crit	18.51	18.51	18.51	18.51	18.51
	RSD (%)	1.7	2.6	2.3	2.0	3.5	
Robustez	n	25	25	25	25	25	
	t exp	1.82	1.94	1.02	0.37	0.83	
	t crit	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	

6.4.4 Determinación de Ketoprofeno y Parabenos en Fastum Gel

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método para la determinación simultánea del principio activo y los conservantes en el producto Fastum Gel.

En la **Figura 6.11** se muestran los espectros NIR de los tres analitos y del producto farmacéutico.

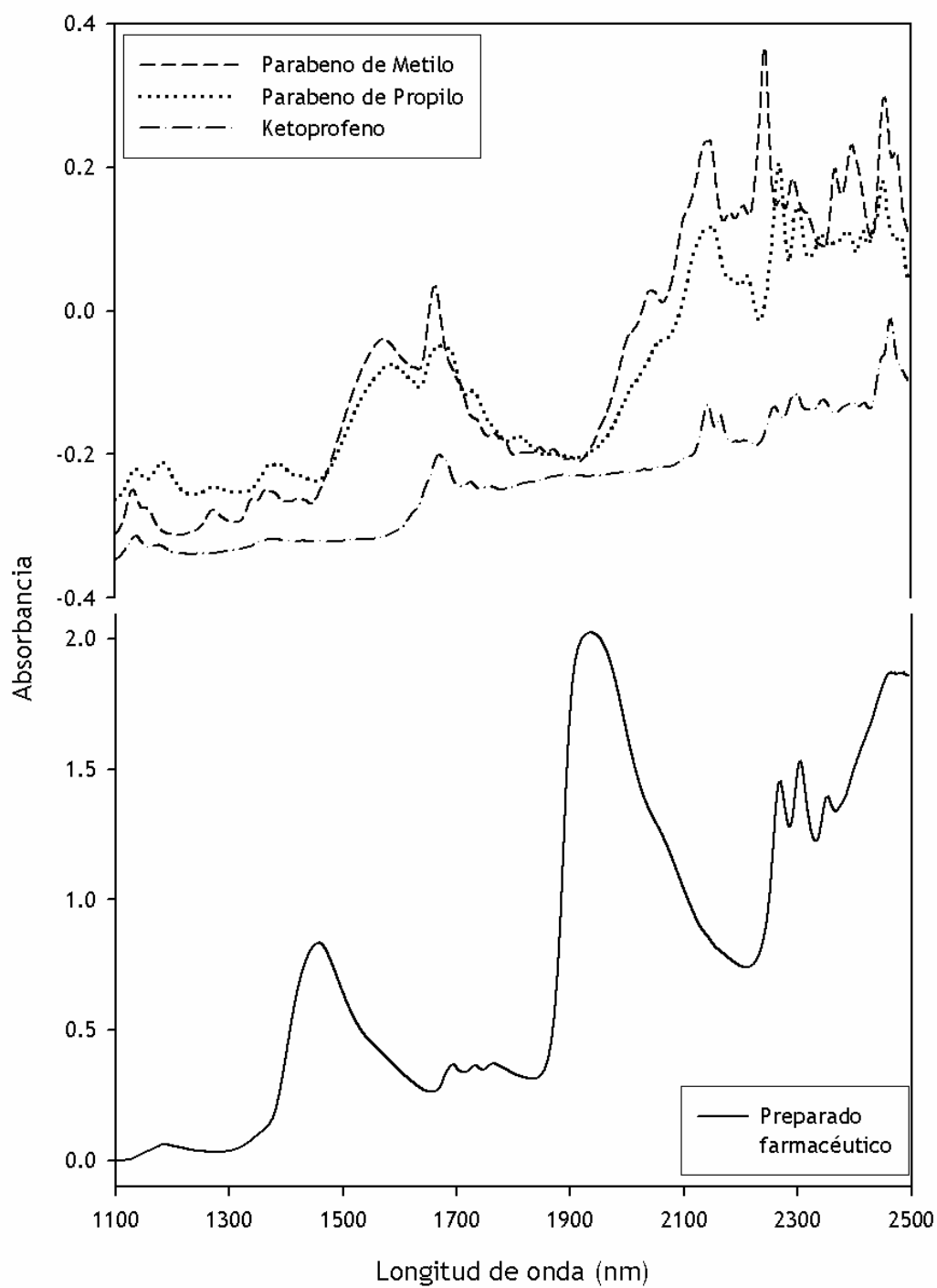


Figura 6.11 Espectros NIR en modo Absorbancia del principio activo, los dos parabenos y del preparado farmacéutico.

Se observa como el espectro del producto farmacéutico presenta dos grandes bandas, debidas fundamentalmente al alto contenido en agua. Estas bandas corresponden al 1er sobretono (1470nm) y a la banda de combinación (1910nm) del enlace OH. Además, las bandas presentes en la región de 2275nm provienen de la contribución espectral del etanol, segundo excipiente mayoritario. Los espectros del principio activo y de los conservantes muestran distintas bandas significativas, las cuales se utilizaron como guía para realizar una adecuada selección de longitudes de onda.

La determinación del principio activo y de los dos conservantes se realizó mediante el desarrollo de sendos modelos de calibración PLS1, utilizando muestras sintéticas de laboratorio y muestras de producción. El rango de concentración cubierto por las muestras sintéticas fue de 20-30 mg·g⁻¹ para el activo, 0.64-0.96 mg·g⁻¹ para el p-hidroxibenzoato de metilo y 0.16-0.24 mg·g⁻¹ para el p-hidroxibenzoato de propilo. Los primeros ensayos de calibración se realizaron utilizando el intervalo espectral completo (1100-2500nm) y el criterio de selección de longitudes de onda mediante Jack-Knife. Este algoritmo determina si la inclusión en el modelo de una determinada longitud de onda, mejora significativamente la calidad de la regresión. Paralelamente se ensayaron distintos pretratamientos espectrales (SNV y Derivadas). Los resultados obtenidos de los modelos con mejor capacidad predictiva se muestran en la **Tabla 6.13**.

Los tres modelos fueron obtenidos con el pretratamiento espectral en 2ª derivada y utilizan entre 2 y 4 factores PLS. Los intervalos espectrales utilizados fueron seleccionados según la propuesta del criterio Jack-Knife. Como se puede observar, estos intervalos se corresponden con las bandas más significativas de cada analito,

y a su vez evitan las dos bandas más importantes del excipiente mayoritario (agua). El número de muestras utilizadas en calibración es variable según el analito y fue necesaria la inclusión de muestras de producción en el modelo, con el fin de predecirlas correctamente. Los errores de predicción aumentan a medida que disminuye la concentración del analito, siendo inferiores al 5% en todos los casos.

Tabla 6.13 Figuras de mérito de los modelos de calibración PLS1 para la determinación del principio activo y conservantes en Fastum Gel.

		KET	MET	PRO
Pretratamiento espectral		2a Der	2a Der	2a Der
Rango espectral (nm)		1638 - 1664 2118 - 2204	1638 - 1678 2118 - 2220	1640 - 1700 2100 - 2200
Nº factores PLS		2	3	4
CALIBRACIÓN				
Nº muestras	Sintéticas	19	11	6
	Producción	5	9	8
Rango concentración (mg/g)		12.03 - 35.99	0.443 - 1.219	0.135 - 0.267
RSEC (%)		1.68	4.22	1.20
PREDICCIÓN				
Nº muestras	Sintéticas	13	9	7
	Producción	14	14	14
Rango concentración (mg/g)		14.50 - 36.57	0.358 - 1.066	0.156 - 0.262
RSEP (%)		2.74	4.37	4.71

El método para la identificación del producto y la posterior determinación del principio activo y los dos conservantes fue validado según las guías descritas anteriormente (**Apartado 2.5**). Los resultados de la validación se muestran en la **Tabla 6.14**.

Tabla 6.14 Resultados de la validación del método NIR para la determinación la determinación del principio activo y conservantes en Fastum Gel.

		Compuesto	Coef. correlación		
		Preparado farmacéutico	0.99		
		Ketoprofeno	0.10		
		Etanol	0.68		
		Agua	0.35		
		p-hidroxibenzoato metilo	-0.11		
		p-hidroxibenzoato propilo	0.50		
		Carbomero	-0.33		
Identificación positiva: $r > 0.98$					
Parámetro	Componente	KET	MET	PRO	
Linealidad	n	13	9	9	
	Rango concentración (mg/g)	14.50 - 36.57	0.358 - 1.066	0.156 - 0.262	
	Ordenada origen	-0.06 ± 0.89	-0.05 ± 0.08	-0.01 ± 0.04	
	Pendiente	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.09	0.96 ± 0.22	
	R	0.999	0.992	0.969	
Exactitud	n	26	19	16	
	Promedio residuales (mg/g)	-0.025	0.012	0.002	
	SD	0.585	0.028	0.009	
	t exp	0.217	1.873	0.681	
	t crit	2.060	2.101	2.131	
Repetitividad	Promedio NIR (mg/g)	25.11	0.799	1.874	
	CV (%)	1.53	2.79	5.85	
Precisión intermedia	Día	F exp	15.25	2.15	0.49
		F crit	19.00	19.00	19.00
	Analista	F exp	0.55	5.35	0.36
		F crit	18.51	18.51	18.51
	CV (%)	2.16	3.32	6.03	
Robustez	n	10	10	10	
	t exp	0.986	0.828	0.517	
	t crit	2.262	2.262	2.262	

Todos los parámetros evaluados cumplen exitosamente los requisitos establecidos, confirmando la calidad del método para el propósito determinado.

6.5 Transformación polimórfica del principio activo Dexketoprofeno en Enantyum

El producto farmacéutico Enantyum contiene Dexketoprofeno trometamol como principio activo y se comercializa en forma de comprimidos. Existen dos formas polimórficas cristalinas del principio activo Dexketoprofeno trometamol (forma A y B); la forma A es la utilizada en la fabricación del fármaco. El proceso farmacéutico se inicia con la mezcla en seco del activo con los excipientes. Una vez la mezcla es homogénea, se somete a una granulación húmeda que mejora sus propiedades mecánicas para la posterior compactación y obtención de los comprimidos. El objetivo del trabajo es identificar qué forma polimórfica está presente en el producto farmacéutico.

Se disponían las formas cristalinas A y B del principio activo puro. Ambas formas polimórficas se caracterizaron mediante Difracción de Rayos X (XRD, X-ray diffractometry) y Calorimetría de barrido diferencial (DSC, Differential Scanning Calorimetry). La **Figura 6.12** muestra los difractogramas de Rayos X de ambas formas polimórficas puras. Ambos polimorfos presentan perfiles de difracción con bandas intensas y bien definidas, las cuales confirman su estructura cristalina. La distinta posición de las bandas en ambos perfiles, permite identificarlos correctamente. El punto de fusión determinado por DSC para la forma A es de 105.7°C y de 103.1°C para la forma B.

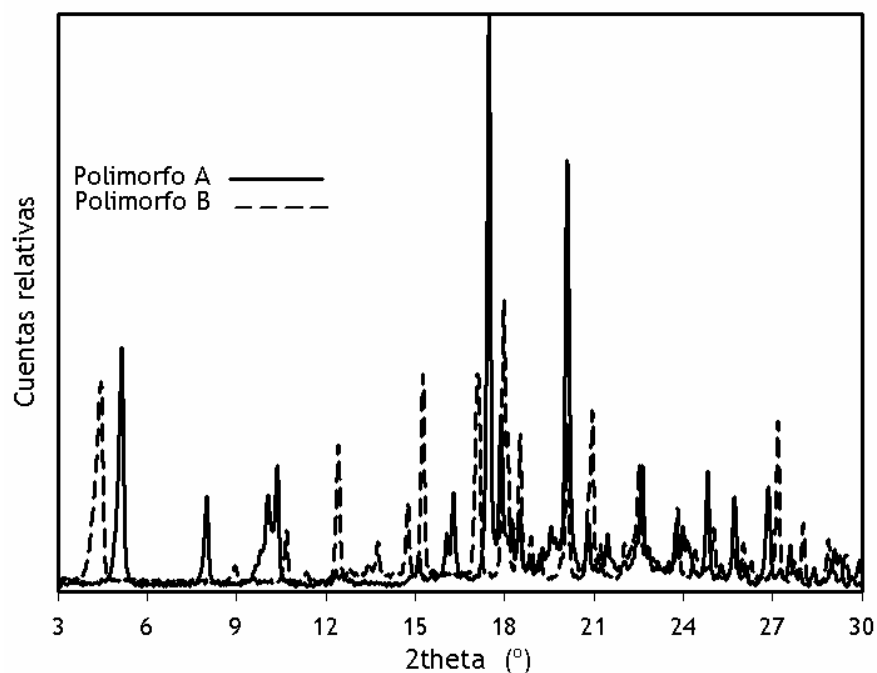


Figura 6.12 Difractogramas de Rayos X obtenido a partir de las formas polimórficas cristalinas del Dexketoprofeno trometamol (formas A y B).

Los espectros NIR de ambas formas polimórficas se muestran en la **Figura 6.13**.

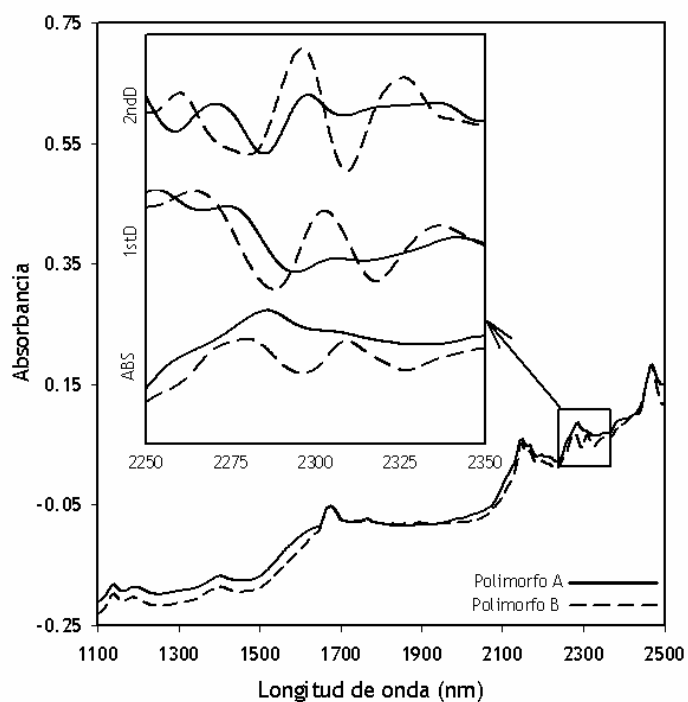


Figura 6.13 Espectros NIR en modo Absorbancia, 1ª y 2ª Derivada de ambas formas cristalinas del principio activo Dexketoprofeno trometamol (formas A y B).

Se observa que las mayores diferencias entre ambos polimorfos se encuentran en el intervalo espectral 2250-2350nm, donde la forma A presenta un único máximo de absorción alrededor de 2280nm, mientras que la forma B presenta dos. Los coeficientes de correlación entre los espectros NIR de ambos polimorfos, tanto en el intervalo espectral completo como reducido y con distintos pretratamientos se muestran en la **Tabla 6.15**.

Tabla 6.15 Coeficientes de correlación entre los espectros NIR de ambas formas cristalinas del principio activo.

	SNV	1a Der	2a Der
1100-2500nm	0.99	0.91	0.81
2250-2350nm	0.88	0.64	0.34

Los coeficientes de correlación reflejan la elevada semejanza entre ambas formas en el intervalo espectral completo, sin embargo, las diferencias se acentúan en el intervalo espectral reducido y a medida que aumenta el grado de derivación. Para el presente estudio se utilizó únicamente el intervalo espectral reducido (2250-2350nm) y el pretratamiento espectral de Derivadas (1^a y 2^a), los cuales permiten una mejor diferenciación de ambos polimorfos.

Se prepararon mezclas de principio activo (polimorfo A o B) con celulosa microcristalina en un rango de concentraciones del activo de 100-250 mg g⁻¹ y se registraron sus espectros NIR antes y después de someter las mezclas a una granulación húmeda. Los espectros NIR de estas mezclas se muestran en la **Figura 6.14**. Se observan como apenas existen diferencias espectrales apreciables debidas a la presencia de una u otra forma del principio activo. Únicamente, en el intervalo espectral ampliado (2250-2350nm) se observa que los espectros correspondientes a las mezclas sin granular presentan una ligera diferencia de intensidad sobre 2290

nm. La única diferencia entre ambas mezclas es la forma polimórfica del activo (A o B). Esta diferencia espectral es imperceptible en las mezclas granuladas. Mediante una simple inspección visual del espectro de una mezcla, no es posible identificar qué polimorfo está presente en ella.

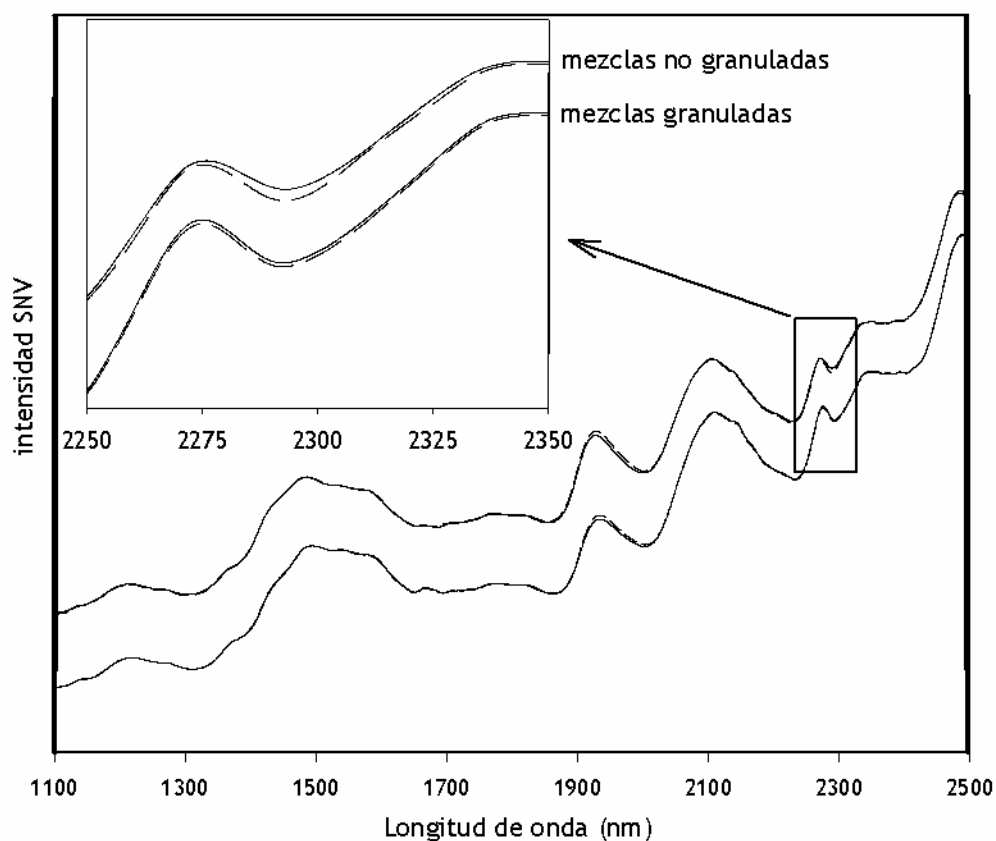


Figura 6.14 Espectros NIR en modo SNV de las mezclas de Dexketoprofeno con Celulosa microcristalina. (—) corresponde a las mezclas de celulosa con DKP-polimorfo A (- - -) corresponde a las mezclas de celulosa con DKP-polimorfo B.

Se plantea la posibilidad de identificar la forma polimórfica del DKP mediante un método de resolución de curvas MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*) que permita obtener el espectro “puro” del activo cuando éste se encuentra en mezclas. El método MCR-ALS no se utiliza para realizar un estudio cuantitativo de las mezclas. Para la obtención del espectro MCR

del activo se utilizó su concentración en las mezclas como restricción de intensidad y el espectro de la celulosa microcristalina como restricción rotacional. Es por ello que únicamente se discutirán resultados referentes a los espectros obtenidos para ambas formas polimórficas.

Se realizó el cálculo MCR-ALS utilizando el conjunto de espectros NIR correspondientes a las mezclas de polimorfo A + Celulosa y polimorfo B + Celulosa, antes y después de granular. El rango de concentración del principio activo en estas mezclas fue de 100-250 mg·g⁻¹. Los espectros obtenidos por MCR-ALS para ambos polimorfos se compararon mediante el coeficiente de correlación con los espectros NIR de las formas cristalinas puras. La **Tabla 6.16** muestra los resultados para este conjunto de muestras.

Tabla 6.16 Coeficientes de correlación entre los espectros NIR y los MCR para ambas formas polimórficas del principio activo.

		1aDer	2aDer
Mezclas no granuladas	A^1_{MCR} / A_{ref}	0.93	0.92
	B^1_{MCR} / B_{ref}	0.99	0.99
	A^1_{MCR} / B^1_{MCR}	0.48	0.20
Mezclas granuladas	A^1_{MCR} / A_{ref}	0.81	0.26
	B^1_{MCR} / B_{ref}	0.80	0.66
	A^1_{MCR} / B^1_{MCR}	0.99	0.99

Superíndice 1 indica que el espectro MCR se ha obtenido de las mezclas de celulosa con Dexketoprofeno (forma A y B)

Se observa cómo en las mezclas no granuladas el espectro obtenido por MCR para el polimorfo A tiene una alta similitud con su correspondiente espectro NIR. Lo mismo ocurre con la forma B, cuyos espectros NIR y MCR son muy similares (correlación~0.99). Un resultado muy similar se obtiene para la forma B. Se deduce

que en mezclas sin granular las formas cristalinas mantienen su estructura cristalina.

Al evaluar los resultados obtenidos de las mezclas granuladas se obtiene que los espectros obtenidos mediante MCR para ambos polimorfos, tienen una baja similitud con sus correspondientes espectros NIR y además ambos espectros MCR tienen una elevada similitud espectral. Se deduce que en mezclas granuladas, ambas formas polimórficas han evolucionado a una misma forma, cuyo espectro es distinto a las formas cristalinas originales.

Estas mezclas de DKP con Celulosa fueron analizadas mediante Difracción de Rayos X. Los difractogramas obtenidos se muestran en la **Figura 6.15**.

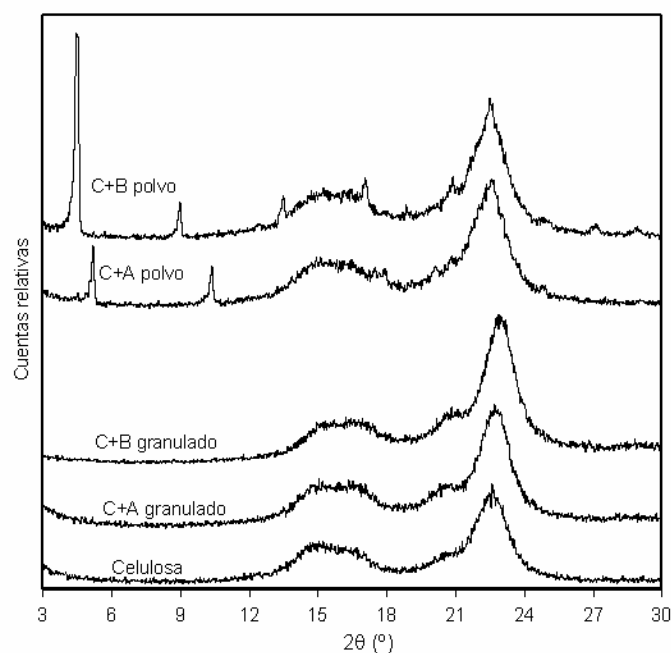


Figura 6.15 Difractogramas de RX de las mezclas de DKP con celulosa, antes y después de someterlas a granulación húmeda.

Los dos perfiles superiores de la **Figura 6.15** muestran los difractogramas de las mezclas sin granular. Se observa un perfil muy similar al de la celulosa pura (perfil inferior) y es posible apreciar las bandas correspondientes a los polimorfos

cristalinos puros (**Figura 6.12**). Se concluye que la mezcla sin granular de celulosa con cualquiera de los dos polimorfos cristalinos no induce a transformación polimórfica. Los puntos de fusión de las mezclas obtenidos mediante Differential Scanning Calorimetry (DSC) fueron de 105.0°C (polimorfo A + celulosa) y 103.1°C (polimorfo B + celulosa). Estas temperaturas de fusión son muy similares a las de los polimorfos puros. Los difractogramas correspondientes a las mezclas granuladas (en la **Figura 6.15**, centrales) carecen de bandas significativas de ambos polimorfos cristalinos y sus puntos de fusión no fueron detectados mediante DSC. Se deduce que al someter las mezclas a granulación húmeda, el principio activo sufre una transformación polimórfica a una forma que carece de bandas de difracción y punto de fusión detectable. Las formas pseudopolimórficas amorfas se caracterizan por la ausencia de bandas de difracción significativas. Además, los puntos de fusión exactos y precisos son característicos únicamente de formas cristalinas. Posiblemente, tras la granulación húmeda de estas mezclas, ambos polimorfos cristalinos (A y B) y se han transformado a la forma amorfa del Dexketoprofeno.

El mismo procedimiento realizado sobre mezclas de celulosa con polimorfo A o B se repitió, utilizando muestras correspondientes a comprimidos de composición más compleja, preparados por compactación directa de polimorfo A o B con Lactosa como excipiente mayoritario y otros preparados por granulación húmeda de polimorfo A o B con Celulosa microcristalina como excipiente mayoritario. El rango de concentraciones del activo en estas muestras fue de $140 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ($\pm 5\%$). Se registró el espectro NIR de cada uno de estos comprimidos y con ellos se obtuvieron los espectros MCR del principio activo. Los espectros del principio activo obtenidos mediante MCR-ALS se compararon de nuevo con los polimorfos cristalinos puros

mediante el coeficiente de correlación. La **Tabla 6.17** muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6.17 Coeficientes de correlación entre los espectros NIR y los MCR para ambas formas polimórficas del principio activo.

		1aDer	2aDer
Comprimidos compactación directa	A^2_{MCR} / A_{ref}	0.99	0.97
	B^2_{MCR} / B_{ref}	0.96	0.99
	A^2_{MCR} / B^2_{MCR}	0.55	0.20
Comprimidos granulación húmeda	A^2_{MCR} / A_{ref}	0.83	0.27
	B^2_{MCR} / B_{ref}	0.82	0.65
	A^2_{MCR} / B^2_{MCR}	0.98	0.97

Superíndice 2 indica que el espectro MCR se ha obtenido de los comprimidos de producción

Se observa como la forma cristalina del principio activo (A o B) mantiene su estructura en comprimidos preparados por compactación directa sin granulación. Los coeficientes de correlación entre los espectros NIR y MCR son elevados ($r > 0.98$), lo cual demuestra que las formas cristalinas del principio activo no han sufrido transformación polimórfica. Sin embargo, en los comprimidos granulados los espectros MCR de ambas formas presentan una correlación elevada ($r > 0.97$), lo cual demuestra que las formas cristalinas han sufrido una transformación polimórfica hacia una misma forma. Mediante Difracción de Rayos X y DSC se obtienen conclusiones muy similares a las obtenidas a partir de las mezclas de celulosa y DKP: se observan picos significativos de cada forma cristalina en comprimidos compactados los cuales desaparecen en los comprimidos granulados. Los puntos de fusión en los comprimidos compactados son muy similares a los de las formas cristalinas puras, y éstos no son detectados en los comprimidos granulados.

Se concluye, por lo tanto, que muy probablemente las dos formas cristalinas del principio activo sufren también una amorfización en comprimidos preparados por granulación húmeda. La compactación directa no produce transformación polimórfica. La **Figura 6.16** muestra los espectros de la forma amorfa obtenidos por MCR-ALS.

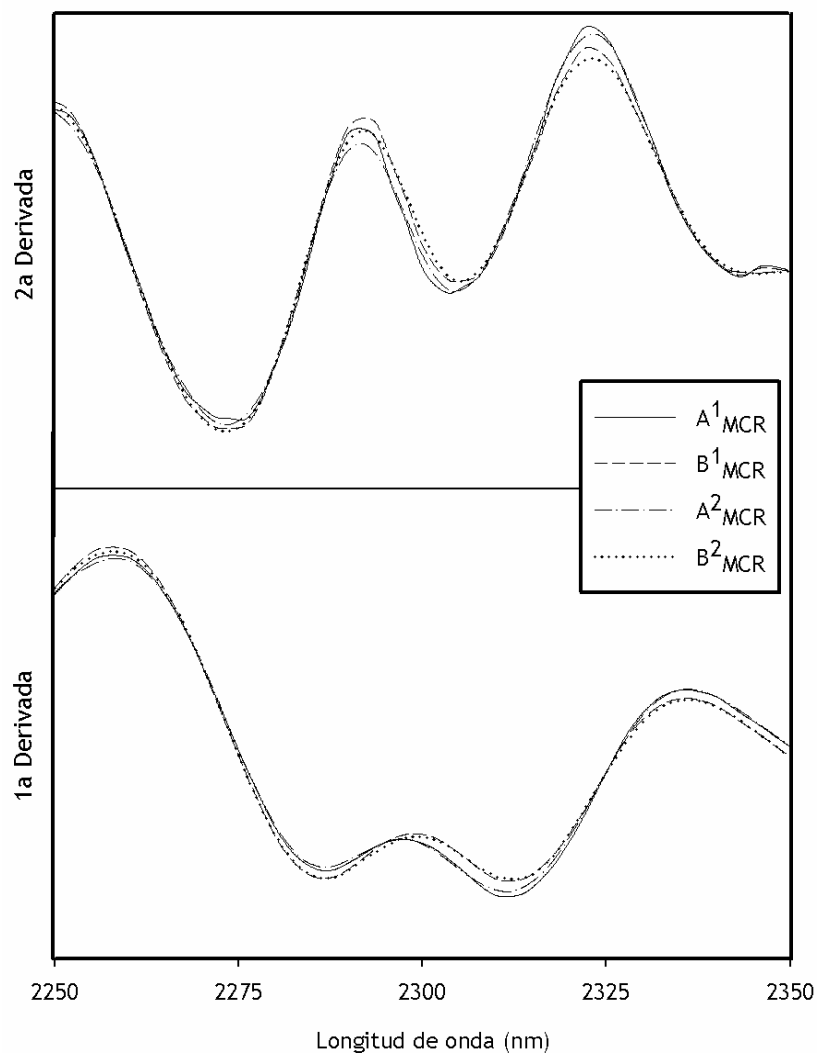


Figura 6.16 Espectros MCR del principio activo Dexketoprofeno trometamol después de someter a las muestras a granulación húmeda. Superíndice 1 o 2 corresponde con el espectro MCR obtenido de mezclas de celulosa + DKP o de comprimidos de producción, respectivamente.

Se observa cómo el espectro MCR de la forma amorfa es muy similar, independiente de la forma cristalina originalmente utilizada o de la muestra de la cual ha sido obtenida.

El método de resolución de curvas MCR-ALS permite obtener el espectro “puro” del principio activo Dexketoprofeno Trometamol, a partir del espectro NIR de mezclas con excipientes. La comparación del espectro MCR con el espectro NIR permite identificarlo y concluir si ha sufrido o no transformación polimórfica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se han propuesto nuevas estrategias para el desarrollo de métodos de análisis en la industria farmacéutica, aplicando la Espectroscopia NIR y técnicas quimiométricas multivariantes. Del conjunto de metodologías propuestas en esta memoria se extraen las siguientes conclusiones:

- Se han determinado simultáneamente principios activos en distintos preparados farmacéuticos, en forma de sólidos granulados, comprimidos intactos y geles:

- Se demuestra la capacidad de la Espectroscopia NIR en la determinación de analitos minoritarios (~0.02%), incluso cuando éstos se encuentran en muestras sólidas con baja homogeneidad o muestras acuosas altamente absorbentes.
- Un correcto planteamiento, diseño y preparación de las muestras de calibración permite obtener métodos analíticos más exactos y robustos. La aplicación de diseños experimentales adecuados disminuye las correlaciones indeseadas entre el analito y el resto de componentes, lo que da lugar a modelos con mejor capacidad predictiva.
- Se demuestra la capacidad de analizar muestras del proceso de producción farmacéutico mediante modelos de calibración desarrollados únicamente con muestras preparadas en el laboratorio. Los modelos obtenidos son más simples (requieren menos factores) y tienen mejor capacidad predictiva que los obtenidos mediante estrategias habituales (incorporando muestras de producción en el conjunto de calibración).

CONCLUSIONES

- La presión de compactación tiene un efecto significativo en los espectros NIR de comprimidos farmacéuticos:

- Se ha determinado la presión en comprimidos de producción, a partir de modelos de calibración contruidos con muestras de laboratorio compactadas a distintas presiones.
- Disponer de comprimidos de laboratorio compactados a una presión similar a la del proceso de producción, permite construir modelos más simples para la determinación de principios activos en comprimidos de producción intactos, sin añadir espectros de muestras de producción al conjunto de calibración.
- Este resultado permite denominar a la Espectroscopia NIR como una técnica instrumental absoluta. El modelo de calibración se construye únicamente con muestras preparadas en el laboratorio por pesada de los componentes, sin necesidad de utilizar un método de referencia.
- La presión de compactación influye también sobre las características de disolución de comprimidos farmacéuticos y más concretamente en su perfil de disolución. Cuando menor es la presión de compactación del comprimido, más rápidamente se libera el activo para pasar en disolución.
- Se han desarrollado estrategias, de clasificación y de calibración, para la realización del ensayo de disolución en comprimidos farmacéuticos intactos, utilizando espectros de comprimidos preparados en el laboratorio a distintas presiones. Los resultados obtenidos avalan la utilidad del nuevo método desarrollado.

CONCLUSIONES

- Se ha determinado el porcentaje de principio activo en disolución a un determinado tiempo de ensayo de disolución en comprimidos de producción, mediante el desarrollo de modelos de calibración PLS1. Dado que el test de disolución es un requisito de mínimos, también se han desarrollado modelos de clasificación (DPLS) que permiten discriminar si un comprimido farmacéutico cumple el mínimo de porcentaje de activo disuelto a ese tiempo.
- El perfil de disolución de comprimidos de producción, puede determinarse mediante modelos de calibración PLS2. Para su construcción, se han transformado los perfiles de disolución a sus inversos ($1/\%API$ vs $1/\text{tiempo}$).
- Los nuevos métodos NIR desarrollados para la determinación de parámetros relacionados con el ensayo de disolución, pueden sustituir a los métodos tradicionales y el resultado se obtiene en segundos.
- Se ha aplicado la Espectroscopia NIR al estudio de polimorfismo de una especialidad farmacéutica:
 - Se han caracterizado dos formas polimórficas cristalinas de un mismo principio activo a partir de sus espectros NIR, ya que presentan distintas bandas significativas en sus espectros. Estas diferencias espectrales son también detectables cuando el activo se encuentra mezclado con excipientes en un preparado farmacéutico.
 - Se ha demostrado como la etapa de granulación húmeda del proceso farmacéutico produce una transformación polimórfica de ambas formas

CONCLUSIONES

cristalinas hacia la pseudoforma amorfa. Si bien, no se dispone de la forma amorfa en estado puro para su identificación mediante Espectroscopia NIR, los resultados obtenidos por XRD y DSC indican que ambas formas cristalinas han evolucionado a una forma amorfa.

- Los cambios producidos por la transformación polimórfica, que se detectan en los espectros NIR de las muestras, pueden afectar y deben tomarse en consideración para el desarrollo de métodos cuantitativos de muestras farmacéuticas que han experimentado un proceso de granulación húmeda.

Las metodologías desarrolladas en esta memoria han aportado soluciones a situaciones reales y se utilizan satisfactoriamente como herramienta para el control de calidad rutinario en la industria farmacéutica.

Se demuestra la capacidad de la Espectroscopia NIR para su utilización como técnica en la Tecnología Analítica de Procesos de la industria farmacéutica.

Fruto de la experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación, se nos propuso la posibilidad de redactar el capítulo de un libro titulado *Process Analytical Technology* y editado por *Blackwell Publishing*, con el fin de recoger las más recientes aportaciones científicas en la utilización de la Espectroscopia NIR al análisis *off-line* en la industria farmacéutica. En el libro también se muestran las aportaciones más significativas en la utilización de técnicas espectroscópicas como herramientas PAT para el diseño de estrategias de análisis en la industria química en general y farmacéutica en particular.

ANEXOS

- 1) Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by Near infrared Spectroscopy. A contribution to Process Analytical Technologies.
- 2) A Process Analytical Technology approach based on Near Infrared Spectroscopy: tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets.
- 3) Determination of dissolution profiles in intact pharmaceutical tablets by NIR Spectroscopy.
- 4) Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a Near Infrared Spectroscopic method.
- 5) Determination of active principle ingredient and preservatives in a hydrogel pharmaceutical preparation by Near Infrared Spectroscopy.
- 6) Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations
- 7) Use of Near-Infrared Spectroscopy for Off-Line Measurements in the Pharmaceutical Industry

ANEXO 1

**CONTENT UNIFORMITY AND TABLET HARDNESS TESTING
OF INTACT PHARMACEUTICAL TABLETS BY NEAR
INFRARED SPECTROSCOPY.
A CONTRIBUTION TO PROCESS ANALYTICAL
TECHNOLOGIES**

Marcelo Blanco and Manel Alcalà

Analytica Chimica Acta **557** (2006) 353-359

Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy

A contribution to process analytical technologies

Marcelo Blanco*, Manel Alcalá

Analytical Chemistry Unit, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 25 July 2005; received in revised form 28 September 2005; accepted 29 September 2005
Available online 9 November 2005

Abstract

The use of process analytical technologies by the pharmaceutical industry is a response to its growing need for improved productivity in order to face the increasing competition in this field. In this work, we explored the use of near infrared spectroscopy (NIRS) for the determination of physical (tablet hardness) and chemical parameters (active principle and content uniformity) in intact individual pharmaceutical tablets. Quantization was done by using a Partial Least Squares 1 (PLS1) calibration model constructed from laboratory calibration samples that were prepared by mixing the active principle and excipients, and pressing the mixture into tablets. The compaction pressure to be applied to the powder was previously determined by using another PLS1 model that allows calculating it from production tablets. The NIRS method used to quantify the active principle is simpler as the calibration set encompasses the variability sources present in production samples; also, it allows individual tablets to be analysed. The proposed method was validated in accordance with the International Conference on Harmonization (ICH) and The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) guidelines, and found to be fit for its intended purpose.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Content uniformity; Active principle ingredient; Tablet hardness; Rapid intact analysis; Process analytical technologies; Near infrared spectroscopy

1. Introduction

Implementing process analytical technologies (PAT) in the pharmaceutical industry requires the development of new analytical methodologies that can be readily adapted to existing industrial processes, allows the different steps of the process to be monitored and provides accurate analytical results in a simple, expeditious manner [1]. Near infrared spectroscopy (NIRS) is one of the instrumental analytical techniques most closely meeting these requirements. Its analytical power has been clearly demonstrated in a number of successful qualitative and quantitative applications [2–5].

Obtaining quality analytical results in this context relies heavily on constructing appropriate calibration models. One essential step in this process is the preparation and/or selection of the

samples to be included in the calibration set. Usually, production samples do not span the whole concentration range needed to develop a robust model amenable to validation. This shortcoming has so far been circumvented in three different ways [6]. One involves preparing samples in a pilot plant mimicking the production process on a small scale from production batches spanning appropriate concentration ranges of the different sample components. This approach is rather complex and often unfeasible owing to the infrastructural requirements and high costs involved. This methodology is used in the development of models from transmission measurements from intact tablets [7].

The second approach involves overdosing or underdosing production samples with the active principle ingredient (API) or a placebo, respectively, in order to expand the API concentration range. However, the high correlation between samples that ensues can give rise to spurious results in applying the models to samples differing in the excipient concentrations [8].

The third approach involves preparing laboratory samples by mixing the active principle and excipients in appropriate

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5811712; fax: +34 93 5812379.

E-mail addresses: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco),
manel.alcala@uab.es (M. Alcalá).

proportions spanning the desired concentration range for each component [9,10]. This allows robust models to be obtained provided an experimental sample preparation design reducing correlation between components is used. This approach and the previous one are readily applicable to powder and liquid samples.

These approaches allow sources of variability in the concentrations of the different components to be incorporated into the calibration process. However, the resulting model still fails in predicting production samples as it excludes the variability sources inherent in the manufacturing process. Expanding the calibration set with production samples allows new production samples to be more accurately predicted at the expense of increased complexity in the model, which usually requires a greater number of factors.

One other approach to developing simple, robust models involves preparing laboratory samples mimicking production samples. Samples in tablet form are best analysed by using models suited to this particular sample type; calibration samples are therefore prepared by pressing mixtures of appropriate composition in the laboratory. The pressure used to obtain the tablets influences their NIR spectra, which has been used by some authors [11–13] to determine tablet hardness. By calculating the pressure applied to obtain production tablets, one can prepare laboratory tablets using a similar pressure. In this way, spectral differences in compaction between laboratory and production tablets can be minimized and simpler calibration models for determining APIs obtained.

In this work, we developed and validated a quantitative method for determining the active principle in commercial tablets with no sample pretreatment. Calibration samples were prepared in the laboratory by pressing a mixture of the active principle and excipients at a pressure that was previously determined by using a compaction pressure model.

2. Experimental

2.1. Apparatus

NIR spectra were recorded in the reflectance mode on a Model 5000 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD) equipped with a Rapid Content Analyzer (RCA) module and governed via the software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems.

The UV spectra used with the reference method were recorded on an Agilent HP 8452A diode array spectrophotometer (Waldbronn, Germany), using the instrument's bundled software (HP 89530 MS-DOS UV-Vis). Absorbance spectra were obtained by using quartz cells of 1 cm path length.

Laboratory samples were compacted in a cylindrical die with a cross-sectional area of 132.7 mm² on a Perkin-Elmer 15.011 press.

2.2. Samples

The pharmaceutical preparation studied contained Mirtazapine at 100 mg g⁻¹ concentration as active principle; lactose

(660 mg g⁻¹) and maize starch (200 mg g⁻¹) as major excipients; and hydroxypropylcellulose, silica and magnesium stearate (40 mg g⁻¹ in combination) as minor excipients.

The tablets are commercially available in two different absolute API contents per dose (15 and 30 mg), the two tablet forms differing in shape and size. Uncoated tablets of both types from 20 different production batches were used.

In addition, 34 laboratory samples were prepared from mixtures of the analyte and a placebo spanning the API concentration range of 55–145 mg g⁻¹. Such a range corresponded to the nominal content $\pm 45\%$ and was wide enough to allow validation of the proposed model. The placebo was a mixture of lactose and starch in proportions $\pm 5\%$ (w/w) around that in the formulation, which allowed potential correlation between the samples used to construct the models to be reduced.

Laboratory tablets were prepared by pressing aliquots of each powder laboratory sample at a variable pressure (applied force/tablet cross-sectional area ratio) over the range of 74–880 MPa.

2.3. UV reference spectra

The UV spectrophotometric procedure used as reference to determine the API in production tablets was as follows: each tablet were weighted, dissolved in 80 mL of a 46:54 methanol/dihydrogen phosphate buffer at pH 5.7, sonicated for 15 min and diluted to 100 mL with the same solvent. An aliquot of 5 mL was then diluted to 50 mL with the solvent and the resulting solution used to obtain an UV spectrum over the wavelength range of 190–350 nm, using a blank consisting solely of solvent. A least-square fit over the range of 280–320 nm was used to quantify the samples from their first-derivative spectra, using that for the API as the sole standard. The API concentration in each tablet, in milligrams of API per gram of tablet (mg g⁻¹), was used as reference datum.

2.4. NIR spectra

The NIR reflectance spectra for the two faces of each tablet were directly recorded over the range of 1100–2498 nm with a resolution of 2 nm from intact samples. Each spectrum was the average of 32 scans. A reference spectrum was previously obtained by using the ceramic plate supplied with the spectrophotometer.

2.5. NIR data processing

The chemometric software used was Unscrambler v. 9.1. First- and second-derivative spectra were obtained by using the Savitzky–Golay algorithm with an 11-point moving window and a second-order polynomial. Partial Least Squares 1 (PLS1) calibration models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The quality of the models was assessed in terms of the relative standard errors of calibration (RSEC (%))

and prediction (RSEP (%)), defined as:

$$\text{RSE}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{pred}} - Y_i^{\text{ref}})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{ref}})^2}} \times 100 \quad (1)$$

where n is the number of samples used, Y^{ref} the concentration provided by the reference method and Y^{pred} that estimated by the NIR method.

The number of PLS factors required to define the model was chosen from the minimum of a plot of RSEP versus number of factors.

3. Results and discussion

Calibration models were constructed from the spectra for laboratory samples that were obtained by mixing the pure components of the pharmaceutical preparation. A set of laboratory powder samples was prepared by mixing variable amounts of the active principle and various placebos that spanned an analyte concentration range of $100 \pm 45 \text{ mg g}^{-1}$.

Fig. 1 shows the NIR spectra for the active principle (Mirtazapine), a laboratory powder sample containing an API concentration of 100 mg g^{-1} and a placebo sample. As can be seen, there were substantial differences between the spectrum for the analyte and those for the placebo and the laboratory sample with the nominal API content; the differences between the latter two, however, were insubstantial.

The calibration model was developed assaying various sample sets, wavelength ranges and spectral pretreatments. The prediction samples included laboratory and production samples.

The overall laboratory powder set, which consisted of 34 samples, was split into two subsets for calibration and prediction that consisted of 17 samples each. The calibration samples were chosen from a scatter plot (PC1 versus PC scores) that was in turn obtained by Principal Component Analysis of the second-derivative spectra over the wavelength range of 1100–2498 nm; the samples were chosen in such a way as to encompass as much

spectral and API concentration variability as possible. All other samples were included in the prediction set.

As can be seen from Fig. 1, the API shows various wavelength ranges clearly different with respect to the placebo (viz. 1600–1800, 1950–2000 and 2150–2200 nm). One strategy for the development of the calibration model concerns in using these wavelength ranges instead of the complete one (1100–2500 nm). This approach was checked obtaining calibration models with poor predictive ability. The model constructed from laboratory powder calibration samples alone was obtained from second-derivative spectra over the whole wavelength range. The characteristics of the model are summarized in Table 1. The model was constructed using 4 PLS factors, which resulted in the lowest error of prediction for the laboratory samples; applying a greater number of factors raised the variance accounted for by the concentration values (matrix Y) of the model, and also the error of prediction, which suggests that the model was overfitted. The predictions for production tablets were subject to substantial bias with all models. This was a result of the calibration method including the variability in the API concentration, but not that in the manufacturing of production tablets.

This shortcoming is usually circumvented by including some production samples in the calibration set. To this end, the model was redone after adding the spectra for 19 production samples to the calibration set. The results thus obtained with a second-derivative model are also shown in Table 1. The best model was obtained with five factors, which resulted in the lowest error of prediction (RSEP) for the laboratory powder samples. The predictions of production tablets were accurate and exhibited no systematic errors. On the other hand, using six factors rather than five resulted in overfitting. Clearly, including the spectra for production tablets in the calibration set suppressed the systematic error previously made in predicting this type of sample, albeit at the expense of using a more complex model. All models were found to contain at least 99% of the variance explained by Y .

The models constructed from spectra for both laboratory powder samples and production samples required an increased number of PLS as the first factors explained the spectral differences between the two types of sample. This was confirmed by using models consisting of spectra from which the first PC factor was excluded; the resulting models used 4 PLS factors and exhibited a predictive ability similar to that of the previous five-factor model, which confirms that the first factor contained the information corresponding to the effect of the compaction pressure. However, this methodology is inappropriate for models to be used in industrial control laboratories.

An identical effect was observed in the models constructed following application of the orthogonal signal correction (OSC) pretreatment. They also comprised four factors and exhibited a similar predictive ability. The results they provided are shown in Table 1.

The primary difference between laboratory powder samples and production tablets was essentially the result of the latter being pressed. One way of avoiding such a difference is by preparing the laboratory samples as similarly as possible to the production tablets. Laboratory powder samples were pressed in

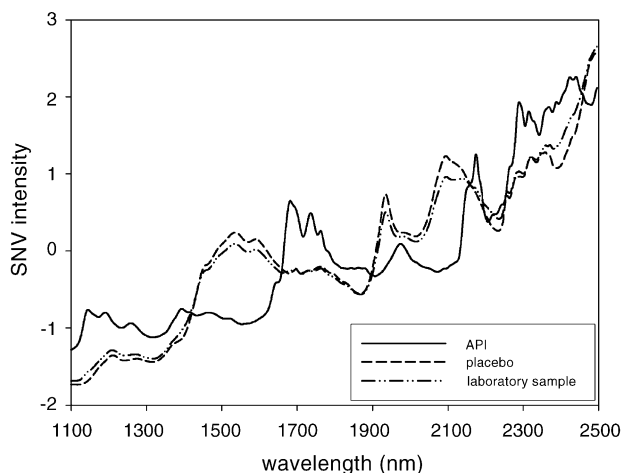


Fig. 1. NIR spectra for the active principle ingredient (API, Mirtazapine), placebo and laboratory powder sample.

Table 1
Statistics for the multivariate models developed with laboratory powder samples and production tablets

Calibration samples	Spectral pretreatment	Calibration			Prediction				
		PLS factors	Y-explained variance (%)	RSEC (%)	Laboratory	Production		Residuals	
					RSEP (%)	RSEP (%)	RSEP (%)	Average	S.D.
Laboratory powder	2ndD	3	99.70	1.4	1.2	10.9	-10.5	3.8	
		4	99.89	0.9	0.9	6.8	2.8	6.5	
		5	99.95	0.6	1.2	17.5	16.6	6.7	
		6	99.98	0.4	1.3	19.0	18.1	6.9	
Laboratory powder & production tablets	2ndD	3	98.60	2.1	1.7	2.8	-1.4	2.6	
		4	99.24	1.6	1.4	1.6	0.3	1.6	
		5	99.40	1.4	1.3	1.4	0.3	1.4	
		6	99.57	1.2	1.4	1.5	0.4	1.5	
		2ndD + 1st PC subtraction	3	99.19	1.6	1.4	2.1	-0.7	2.1
			4	99.42	1.4	1.3	1.6	-0.5	1.6
	5		99.57	1.2	1.3	1.8	-0.6	1.8	
	OSC1 + 2ndD	6	99.73	0.9	1.0	2.1	-0.7	2.0	
		3	99.00	1.8	1.6	2.5	-1.1	2.3	
		4	99.32	1.5	1.3	1.8	-0.6	1.7	
			5	99.46	1.3	1.3	1.6	-0.1	1.6
			6	99.59	1.2	1.5	1.4	-0.1	1.5

Comparison between different spectral pretreatment over the whole spectral range (1100–2498 nm).

order to obtain laboratory tablets that were subsequently used as a calibration set.

The pressure used to obtain tablets has a strong influence on the NIR spectra for the samples. Fig. 2 shows the spectra for laboratory samples of identical composition but compacted at different pressures and a production tablet. As can be seen, the baseline displacement of the spectra from laboratory samples is directly related with the tableting compaction pressure, which produces an increasing in the general absorbance of each tablet. However, no specific band or peak is solely assignable to the tablet hardness. Also, the spectrum of the production tablet seems not following any rule according to the compaction pressure, due to its different baseline displacement. Fig. 3 shows scores (PC1 and PC2) scatter plot obtained from the second-derivative spectra for laboratory (powder and tablets) and production sam-

ples (tablets). The laboratory tablets were compacted at pressures over the range of 300–740 MPa and contained the analyte at concentrations over the range of $100 \pm 45 \text{ mg g}^{-1}$. On the other hand, the production tablets spanned a shorter concentration range, $100 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}$, and the compaction pressure is unknown. As can be seen in Fig. 3, the spectral sequence for the samples was dependent on the degree of compaction regarding the first PC—which accounted for 91% of the variance in X—and on the analyte concentration in relation to the second PC—which accounted for 8% of the variance in X. The body of spectra for the production tablets was close to that for the laboratory samples pressed at 300 MPa, with a concentration near 100 mg g^{-1} . Spectral variability was a result more of the degree of compaction (PC1) than of the analyte concentration (PC2).

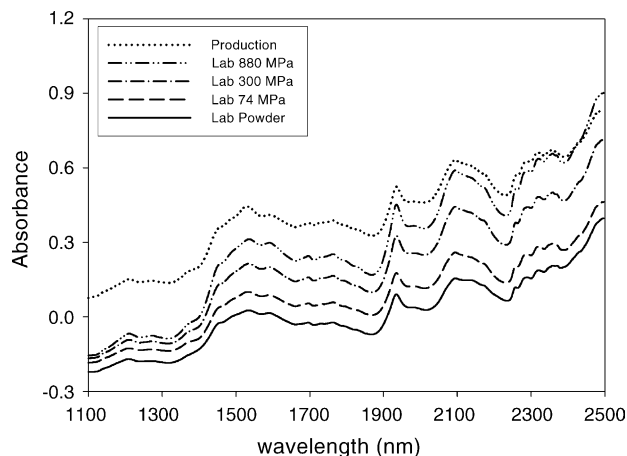


Fig. 2. NIR spectra for a production tablet and laboratory samples (powder and tablets pressed at different levels).

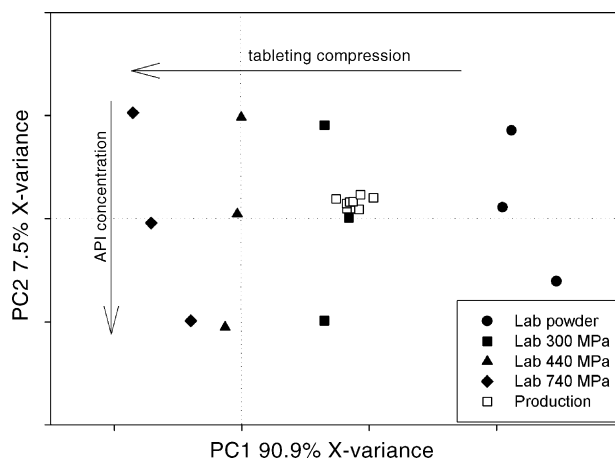


Fig. 3. Scatter plot from second derivative 1100–2498 nm spectra of production tablets and laboratory samples (powder and tablets pressed at different levels).

Table 2
Figures of merit for the PLS calibration model for the determination of compaction pressure

	Samples	Range (MPa)	Correlation	Slope	Intercept
Calibration	10	148–813	0.984	0.97 ± 0.14	14.3 ± 71.0
Prediction	8	148–739	0.962	1.04 ± 0.29	-19.6 ± 140.6

As revealed by a scatter plot for the scores of a principal component analysis (plots not shown), the previous differences remained after application of the usual pretreatments (derivation, SNV).

The effect of compaction on the sample spectra prompted us to prepare new laboratory tablets at a pressure similar to that used in the production process in order to minimize spectral differences resulting from differences in this parameter. In order to estimate the pressure at which the production samples were compacted, we constructed PLS calibration models from the spectra for laboratory tablets that were compacted at variable pressures. The body of available spectra was split into two sets in accordance with the above-described criteria (viz. 10 samples for calibration and 8 for prediction). The pressure and analyte concentration ranges thus spanned (viz. 70–880 MPa and 90–110 mg g⁻¹) were wide enough to encompass the usual variability in the production process. The model exhibiting the highest predictive ability was that constructed by using 3 PLS factors and absorbance spectra over the whole wavelength range (1100–2498 nm). The RSEC and RSEP thus obtained were 8 and 11%, respectively. Table 2 shows the most relevant results for the calibration model. A joint 95% confidence region test for slope and intercept was evaluated revealing that can accept simultaneously that the slope to be 1 and the intercept to be 0 (calibration and prediction). The model was selected to predict the compaction pressure of production tablets, obtaining an average result of 290 ± 9 MPa. This is consistent with the position of production tablets in Fig. 3 near the samples compacted at 300 MPa.

Thirty-four laboratory powder samples were pressed at 300 MPa and used them to recalculate the calibration models in order to determine the API concentration from the NIR spectra for the laboratory tablets compacted at such a pressure

instead of those for the laboratory powder samples. Table 3 shows the most salient parameters for the ensuing models. The model obtained from laboratory tablets alone was constructed by using 2 PLS factors and second-derivative spectra over the whole wavelength range. Such a model was found to accurately predict the API concentration in the laboratory samples; however, it was subjected to a systematic error in the prediction of production tablets, even though the average and standard deviation of the residuals were significantly smaller than those for the previous models. Using a greater number of factors resulted in overfitting of the model and failed to completely suppress the predictive bias for the production samples. This model had slightly better statistical figures of merit than that constructed from laboratory powder samples; also, it used fewer factors and accounted for higher proportion of the variance in *Y*. The use of a calibration set consisting of laboratory tablets reduced the complexity of the model in relation to those obtained from powder samples.

The model was refined by expanding the calibration set with production tablets spectra. The redone model only required three factors to accurately predict the concentration in both types of sample. The statistical figures of merit of Table 3 were very similar to those obtained with the model constructed from laboratory powder samples and production tablets, albeit with the advantage that it used two fewer factors.

Based on the results, the use of laboratory tablets in the calibration sets simplifies the model while preserving the predictive ability of models constructed from laboratory powder samples. It is advisable to include the spectra for some production tablets in the calibration set in both cases as laboratory samples do not encompass the whole potential variability in the production process. This avoids systematic errors in predicting production tablets.

Table 3
Statistics for the multivariate models developed with laboratory and production tablets samples

Calibration samples	Calibration			Prediction				
	PLS factors	<i>Y</i> -explained variance (%)	RSEC (%)	Laboratory	Production		Residuals	
				RSEP (%)	RSEP (%)	Average	S.D.	
Laboratory tablets	1	98.68	3.0	3.8	18.5	-18.6	3.5	
	2	99.74	1.3	1.8	10.4	-10.5	1.9	
	3	99.89	0.8	1.9	6.1	-6.0	1.8	
	4	99.96	0.5	2.0	6.0	-5.2	3.2	
Laboratory & production tablets	1	89.46	5.8	7.3	7.6	-6.6	3.3	
	2	98.18	2.1	1.6	3.8	-1.7	3.5	
	3	99.02	1.6	1.5	2.3	-0.6	2.3	
	4	99.50	1.3	1.6	1.8	0.4	1.8	

Pretreatment: second derivative over the whole spectral range (1100–2498nm).

3.1. Validation of the NIR method for the determination of the API

The proposed NIR method was validated for use in the routine analysis of individual production tablets by using the model obtained from the spectra for a calibration set including laboratory powder samples and production tablets. Validation was based on the guidelines of the International Conference on Harmonisation (ICH) [14] and the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) [15], and included selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness.

The selectivity of the method was established by identifying the samples prior to quantifying the analyte. Analysis routines involve identifying a drug sample before its components can be quantified. Identification was based on a library containing 80 second-derivative spectra over the wavelength range of 1100–2498 nm for the pharmaceutical preparation that were obtained from 20 different production batches. The identification criterion used was the correlation coefficient, with a threshold of 0.98. All production samples were positively identified and every pure component in the formulation was accurately discriminated at an identification level above the threshold. Table 4 shows the identification values provided by the library.

The proposed method was found to meet all the requirements in the two validation guidelines (ICH and EMA), which confirms its suitability for use as a routine analytical method in the pharmaceutical industry. Table 4 shows the most salient results for the other validation parameters.

3.2. Content uniformity testing

The proposed NIR method affords the determination of the API concentration (mg g^{-1}) in individual tablets while preserving their integrity.

Production tablets from three batches with a nominal API content of 15 mg and another three with a content of 30 mg were selected. A total of 10 tablets per batch were simultaneously analysed by using the proposed (NIR) and reference (UV) methods. A *t*-test on the residuals of the API concentration (mg g^{-1}) revealed that the concentrations provided by the two methods were not significantly different at the 95% level ($n = 80$, $t_{\text{exp}} = 1.57$, $t_{\text{tab}} = 1.99$).

The absolute API content (mg) of each individual tablet, was obtained by multiplying the calculated concentration by the tablet weight.

Table 5 shows the absolute API average contents in the tablets. The results for the 10 tablets analysed from each batch were within the limits established by both the European Pharmacopoeia ($\pm 15\%$ around the nominal content) and the US Pharmacopoeia ($\pm 15\%$ the manufacturer's label claim). As can be seen, the relative standard deviation (R.S.D. (%)) for the average of each batch was below the level required by the US Pharmacopoeia (6%).

These results confirm that the proposed method is an effective alternative to the existing UV reference method for determining

Table 4
Validation parameters for the API quantitation with the proposed NIR method

	Compound	Coefficient correlation
Selectivity	Pharmaceutical tablets	0.999
	Placebo	0.977
	Lactose	0.953
	Corn starch	0.571
	Hydroxypropyl cellulose	0.278
	Mirtazapine	0.190
	Magnesium stearate	0.137
	Coloidal silica	-0.134
	Parameter	Result
Linearity	<i>n</i>	15
	Concentration range (mg g^{-1})	59.2–136.8
	Intercept	-2.8 ± 3.6
	Slope	1.02 ± 0.03
	<i>R</i>	0.998
Accuracy	<i>n</i>	39
	Average difference (mg g^{-1})	-0.33
	S.D.	1.87
	t_{exp}	1.11
	t_{crit}	2.02
Repeatability	Replicates	6
	Mean NIR (mg g^{-1})	100.63
	CV (%)	0.42
Intermediate precision	Days (3)	
	F_{exp}	7.68
	F_{crit}	19.00
	Analysts (2)	
	F_{exp}	0.13
	F_{crit}	18.51
	CV (%)	1.17
Robustness	<i>n</i>	80
	t_{exp}	1.57
	t_{crit}	1.99

content uniformity in Mirtazapine formulations consisting of single doses of 15 or 30 mg. The principal advantage of the NIR method is its expeditiousness; in fact, analysing a tablet takes a mere 50 s as opposed to 30 min in the reference method. Also, the need for no sample pretreatment avoids reagent consumption and waste generation.

Table 5
Uniformity of content test for intact tablets

Batch	API nominal content per tablet	API content average for 10 tablets ^a	R.S.D. (%)
A	15 mg	15.99	1.65
B		15.41	1.42
C		15.09	1.70
A'	30 mg	31.06	1.68
B'		30.48	1.26
C'		31.03	1.26
D'		30.05	0.93
E'		29.92	0.99

^a NIR content of API (mg per tablet).

4. Conclusions

The compaction pressure has a marked influence on the spectrum for a tablet and constitutes the primary source of variability among samples. Such a pressure can be estimated by using a PLS model constructed from spectra for laboratory made tablets.

Two NIR spectrophotometric methods have been developed for the analysis of intact tablets by using a calibration set consisting of the spectra for laboratory powder samples and laboratory tablets that was expanded with others for production tablets. The latter model (viz. that obtained from laboratory compacted tablets) was less complex and exhibited a better predictive ability.

The proposed NIR method allows the active principle content in individual production tablets to be determined with no sample pretreatment. The method was validated in accordance with the ICH and EMEA guidelines, and found to be an effective alternative to the existing UV reference method.

The ease with which analyses can be performed and the expeditiousness with which results can be obtained make NIR spectroscopy a suitable choice for implementing process analytical technologies.

Acknowledgments

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project BQU2003-04247. Also, we wish to thank Laboratorios Menarini (Badalona, Spain) for kindly supplying samples.

References

- [1] J. Workman Jr., M. Koch, D.J. Veltkamp, *Anal. Chem.* 75 (12) (2003) 2859–2876.
- [2] R.P. Cogdill, C.A. Anderson, J.K. Drennen, *Spectroscopy* 19 (12) (2004) 104–109.
- [3] J. Parris, C. Airiau, R. Escott, J. Rydzak, R. Crocombe, *Spectroscopy* 20 (2) (2005), 34, 36, 38, 40, 42.
- [4] B. Swarbrick, B. Grouta, J. Noss, *J. Near Infrared Spectrosc.* 13 (2005) 1–8.
- [5] Y. Roggo, C. Roeseler, M. Ulmschneider, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (4) (2004) 777–786.
- [6] M. Blanco, M. Alcalá, in: K. Bakeev (Ed.), *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing Oxford, UK, 2005, pp. 362–391.
- [7] N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.R. Smith, *Analyst* 126 (2001) 2207–2211.
- [8] C.A. Erson, R.P. Cogdill, J.K. Drennen, *NIR News* 16 (3) (2005).
- [9] Y. Chen, S.S. Thosar, R.A. Forbess, M.S. Kemper, R.L. Rubinovitz, A.J. Shukla, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (7) (2001) 623–631.
- [10] M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. Gonzalez, D. Serrano, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 139–148.
- [11] M. Donoso, D.O. Kildsig, E.S. Ghaly, *Pharm. Dev. Tech.* 8 (4) (2003) 357–366.
- [12] K.M. Morisseau, C.T. Rhodes, *Pharm. Res.* 14 (1) (1997) 108–111.
- [13] J. Guo, G.W. Skinner, W.W. Harcum, J.P. Malone, L.G. Weyer, *Drug Dev Ind. Pharm.* 25 (12) (1999) 1267–1270.
- [14] ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996 (<http://www.ich.org/ich5q.html>).
- [15] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, February 2003, Note for Guidance, EMEA/CVMP/961/01, CPMP/QWP/3309/01 (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf>).

ANEXO 2

A PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY APPROACH BASED ON NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: TABLET HARDNESS, CONTENT UNIFORMITY AND DISSOLUTION TEST MEASUREMENTS OF INTACT TABLETS

Marcelo Blanco, Manel Alcalà, Josep M. González and Ester Torras

Journal of Pharmaceutical Science (2006)

Aceptado para su publicación

A PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY APPROACH BASED ON NEAR INFRARED SPECTROSCOPY: tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets

Marcelo Blanco¹, Manel Alcalá¹, Josep M. González² and Ester Torras²

¹ Analytical Chemistry Unit, Chemistry Department, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.
marcel.blanco@uab.es, manel.acala@uab.es

² Laboratorios Menarini, S.A., c/ Alfons XII, 587, E-08918 Badalona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Near infrared spectroscopy (NIRS) is a non-destructive analytical technique that enables simultaneous measurements of chemical composition (*viz.* the content in active pharmaceutical ingredient, API) and various physical properties (*viz.* tablet hardness and dissolution profile) in pharmaceutical tablets. In this work, *Partial Least Squares* (PLS) calibration models and *Discriminant Partial Least Squares* (DPLS) classification models were constructed by using calibration sets consisting of laboratory samples alone. The laboratory samples were mixtures of the API and excipients that were pressed into tablets. API content, tablet hardness and dissolution measurements of intact tablets were made by using three different calibration models that are fast –results can be obtained within a few seconds–, simple and robust –they involve minimal analyst intervention–, and clean –they use no toxic reagent and produce no toxic waste. Based on the results, the proposed NIR method is an effective alternative to current reference methods for the intended purpose. The advantages provided by NIR spectroscopy in this context confirm its potential for inclusion in Process Analytical Technologies in the pharmaceutical industry.

Keywords: Near infrared spectroscopy, pharmaceuticals, intact tablets, partial least squares, discriminant partial least squares, content uniformity, compaction, dissolution, Process Analytical Technology.

INTRODUCTION

Pharmaceutical quality controls involve a large number of analytical tasks many of which are time-consuming or require following labour-intensive protocols including sample preparation, data collection and processing procedures. The implementation of Process Analytical Technologies with a view to ensuring overall production process control entails the use of analytical techniques capable of providing accurate results in a simple and rapid manner. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) meets such requirements, as clearly reflected in its large number of uses in the pharmaceutical industry [1-4]. In fact, the flexibility of the NIRS technique affords the analysis of virtually any type of sample with minimal analyst intervention.

Properly controlling the production of pharmaceutical drugs entails determining the active pharmaceutical ingredient (API) and some physical properties of the end-product. The API is usually determined by HPLC, which is a destructive technique, produces waste and takes a long time to deliver the results. Also, determining physical properties of pharmaceuticals entails using various techniques all of which are typically labour-intensive and time-consuming. By contrast, the NIRS technique affords the simultaneous determination of chemical and physical properties in a single unit dose in a rapid, clean, non-destructive manner [5].

Determining physical and chemical parameters by NIRS requires using multivariate calibration models. The models are constructed from samples including all variability sources in the process concerned. Very often, specimens of the end-product span too short a range of the parameter to be determined—whether a chemical species or a physical property—, so the model must be expanded with laboratory samples of appropriate composition in order to ensure adequate accuracy, precision and robustness [6,7].

In this work, we developed a novel approach involving the use of laboratory samples encompassing the same variability sources as the production samples in order to develop more simple and robust methods than those provided by the above-described methodology. Active principles and various physical properties of pharmaceutical tablets are determined by using

laboratory tablets prepared by mixing the API with its excipients and pressing them into tablets [8,9].

The dissolution profile of a tablet depends not only on the dissolution conditions, but also on its composition, surface and hardness, among other factors [10,11]. One other aim of this work was to develop calibration models for determining the percentage of API dissolved at a given time by using tablets pressed at variable pressures and spanning a wide enough range of dissolution profiles. This NIRS determination was previously conducted by Martins *et al.*[12], who constructed calibration models under variable dissolution conditions (pH) in order to obtain a calibration range wide enough to allow the construction of accurate models. The NIRS analysis will be achieved on intact tablets without any pretreatment, such as dissolution.

Both aims were addressed by using laboratory tablets alone. Such samples, which should span a wide enough API concentration range, were pressed at pressures similar to those used for production tablets and analysed on an individual basis by NIRS. For this purpose, calibration and classification models will be developed using Partial Least Squares (PLS) and Discriminant Partial Least Squares (DPLS) algorithms, respectively.

EXPERIMENTAL

Apparatus

NIR spectra were recorded in the reflectance mode on a Model 5000 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Springs, MD) that was equipped with a Rapid Content Analyzer (RCA) module and governed via the software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems.

Laboratory samples were compacted in a cylindrical die with a cross-sectional area of 132.7 mm^2 on a Perkin Elmer 15.011 press.

Samples

The pharmaceutical preparation studied is commercially available in two different forms containing 30 mg (type A) and 6 mg (type B), respectively, of API (Deflazacort) per unit dose.

The API label concentration in each type of tablet is 81 and 32 mg g⁻¹, respectively. The preparation contains lactose (> 800 mg g⁻¹) as major excipient, and microcrystalline cellulose, corn starch and magnesium stearate as minor excipients.

A total of 36 laboratory samples were prepared by weighing on an analytical balance appropriate amounts of the API and various placebos to in order obtain an API concentration in the range of 20-120 mg g⁻¹. Correlation between placebos' components was avoided by using a factor fractional design consisting of 4 factors at 3 different concentration levels (*viz.* $N = 3^{4-2} = 9$ placebos) that spanned $\pm 5\%$ of the extreme concentrations of each component. Table 1 shows the three excipient concentration levels used. Aliquots of each mixture were pressed at 74-887 Mpa in a range that spanned the values of API concentration and pressure of the production tablets.

API determination reference method

Deflazacort (API) in production tablets was determined, after appropriate dilutions, in an HPLC Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a Spherisorb ODS-2 column thermostated at 40°C (C-18, 12.5 cm length, 4.6 mm ID, 5.0µm particle size) and a PDA UV detector ($\lambda=242\text{nm}$). Mobile phase is a mixture of ammonium acetate solution in water (0.025M) and acetonitrile (65:35 %v/v). The peak area is interpolated in a calibration line obtained from standard solutions.

Dissolution test reference method

Individual tablets were subjected to dissolution testing by using a PTTWS 3C Type II UPS dissolution apparatus from Pharma-Test (Hainburg, Germany) at a rotation speed of 50 ± 3 rpm. The dissolution medium consisted of 900 ml of purified water containing 0.034 M NaCl and 0.087 M HCl at pH 1 ± 0.05 at 37 ± 0.5 °C. Aliquots of the resulting solution were automatically withdrawn, filtered and assayed by UV spectroscopy at $\lambda=242\text{nm}$ on a model HP 8463

instrument from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The percentage of API dissolved from each tablet was measured at different times (*viz.* 3-30 min, each 3 min, 35-60 min, each 5 min, and 70-120 min, each 10 min), using a single API solution as reference standard.

NIR spectra

NIR reflectance spectra for the two faces of each tablet were directly recorded over the range 1100-2500 nm with a resolution of 2 nm and averaged into one. Each individual spectrum was the average of 32 scans. A reference spectrum was previously recorded with a ceramic plate.

NIR data processing

NIR spectral data were processed by using the chemometric software Unscrambler v9.2. First- and second-derivative (1stD and 2ndD) spectra were obtained by using the Savitzky-Golay algorithm with an 11-point moving window and a second-order polynomial. Standard Normal Variate (SNV) was also used as spectral pretreatment. Partial Least Squares (PLS) and Discriminant Partial Least Squares (DPLS) models were constructed by cross-validation, using the leave-one-method. The quality of the models was assessed in terms of relative standard errors (%RSE).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the NIR spectra for the API, placebo and a laboratory sample consisting of placebo plus API (concentration 120 mg g⁻¹). As can be seen, the spectra for the placebo and laboratory sample were markedly different, largely as a result of the spectral contribution of the API.

Models for determining APIs in tablets can be constructed from calibration samples consisting of mixtures of the API and excipients in powder form spanning the required

concentration ranges. Such models usually require the inclusion of spectra from production tablets in the calibration set in order to ensure an adequate predictive ability in the calibration model—albeit at the expense of an increased complexity. The use of laboratory tablets pressed at a similar pressure as the production samples, however, allows more simple calibration models to be constructed [5]. The pressure used to compact tablets strongly influences their NIR spectra. In order to ensure the obtainment of simple models, laboratory tablets must be pressed at a pressure similar to that applied to production tablets. Figure 2 compares the NIR absorbance spectra for laboratory tablets obtained at variable pressures with two spectra for production tablets. As can be seen, the spectra for the laboratory tablets appear in increasing order of compaction; on the other hand, the spectrum for the type A production tablet falls near those for the laboratory tables compressed at low pressures, whereas that for the type B production tablet falls apart from them. Although the difference is markedly reduced by the SNV pretreatment, the magnified view in Fig. 3 reveals that it is not completely suppressed and that the spectra follow the same sequence as the compaction pressure.

The effect of the compaction pressure on the NIR spectra can even exceed that of the variation of the API concentration in these samples. Thus, the laboratory tablets spanned a compaction pressure range of 74-296 MPa and an API concentration range of 20-120 mg g⁻¹. Figure 4 shows the scores of a PCA on the second-derivative spectra for a sample set including laboratory and production tablets. As can be seen, the greatest source of variability in the spectra was the compaction pressure. Thus, the spectra for the laboratory samples appear in increasing order of compaction pressure (first PC, 85% X-variance) and API content (second PC, 10% X-variance). The type A production samples fall near the 74 MPa laboratory samples, whereas the type B production samples fall near the 111 MPa laboratory samples.

In order to determine the pressure applied to the production tablets, we developed PLS calibration models using only laboratory tablets pressed at 74-296 MPa and containing 20-120 mg⁻¹ API. The absence of significant differences in the whole spectrum (1100-2500 nm) due to

pressure differences required the use of some pretreatment (SNV or derivation). The best model was found to be that using the whole absorbance range with 4 PLS factors, which provided RSEC = 4% and RSEP = 5%. The compaction pressure for the production tablets as calculated with such a model was 64 ± 3 MPa for type A tablets (range 52-74 MPa) and 105 ± 6 MPa for type B tablets (range 84-140 MPa).

The calculated compaction pressure for production tablets was used to prepare a set of laboratory tablets spanning the compaction pressure to a range of 74-111 MPa. No pressures below 74 MPa could be used as the resulting tablets were rather fragile and impossible to handle. The calibration models for the API determination in production tablets were developed with these laboratory tablets, which encompassed wide enough ranges of compaction pressure and API concentration. The models were tested using two different wavelength ranges, 1100-2500 and 1650-2500 nm (*viz.* those where the API absorbs maximally) and various spectral pretreatments (*viz.* SNV, derivation and a combination of both). Production tablets were only included in the prediction set. The model with the best predictive ability was that involving the 1100-2500 nm range. Table 2 shows the figures of merit of the models; as can be seen, calibration differences among them were all small. All spectral pretreatments led to normal calibration parameters (*viz.* small numbers of PLS factors, low RSEC values and high *Y*-explained variance). However, the 2ndD and SNV+1stD models were the only ones exhibiting and adequate predictive ability, simultaneously for both types of production tablets. The prediction residuals for both types of production tablets were not significant ($t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$). We thus chose to adopt the 2stD model because it provided the lowest errors of prediction, with a residual standard deviation lower than 2. The lineal regression of API determination from NIR method *versus* Reference method were: $[\text{NIR}] = (1.00 \pm 0.03) \cdot [\text{REF}] + (0.21 \pm 2.23)$ and $[\text{NIR}] = (1.00 \pm 0.04) \cdot [\text{REF}] + (0.33 \pm 3.36)$, for calibration and prediction sets respectively. The API determination results in individual tablets using the NIR method were not significantly different from those obtained by the reference method, as can be seen from the confidence intervals

($p=0.05$); the slope and intercept of the lineal regressions were not significantly different from 1 and 0, respectively.

The API concentration (mg g^{-1}) of each individual tablet was obtained from the NIR calibration model. Two batches of each tablet type, A and B, have been analyzed. The API average concentration obtained by the NIR method from ten tablets of the same batch was not significantly different from the $\pm 5\%$ HPLC determination for these batches (Table 3). So, the API determination of ten tablets using the NIR method can be used to obtain the potency of each batch. The absolute API content (mg) of each individual tablet was obtained by multiplying the NIR calculated concentration of each tablet by its weight. Table 3 shows the average API content obtained from 4 different batches (2 per tablet type). The results for the 10 tablets from each batch were within the limits established by both the European Pharmacopoeia ($\pm 15\%$ around the nominal content) and the US Pharmacopoeia ($\pm 15\%$ around the manufacturer's label claim). As can be seen, the relative standard deviation (%RSD) for the average of each batch was below the level required by the US Pharmacopoeia (6%). These results confirm that the proposed method is an effective alternative to the current HPLC reference method for determining content uniformity in pharmaceutical tablets containing 30 or 6 mg of Deflazacort.

The compaction pressure applied to the tablets also influenced their dissolution profile. Figure 5 shows the dissolution profiles (API percent of dissolution *versus* time) for laboratory tablets pressed at 74, 222 and 517 MPa, as well as for production tablets of both types. As can be seen, the tablet pressed at the lowest pressure was more rapidly dissolved than that pressed at the highest pressure. This led us to determine the percent of API dissolved at a specific time by using PLS models based on the NIR spectra for laboratory tablets pressed at variable pressures. Thus, we determined the dissolution profile for production and laboratory tablets at times from 3 to 120 min; the laboratory tablets were pressed at 74-887 MPa and contained API concentrations of 81 or 32 mg g^{-1} ($\pm 5\%$). The reference value used to construct the PLS

calibration models was the percent of API dissolved at 30 min –time by which production tablets should have been dissolved by at least 80%. The laboratory tablets spanned the percent dissolution range 10-98% at 30 min, which encompassed the whole range for the production tablets (88-95%). We checked various PLS models with different pretreatments and spectral ranges in order to determine the percent dissolution of production tablets by using NIR spectra for laboratory tablets alone. The prediction set included production tablets of both types. Table 4 shows the figures of merit of the models. As can be seen, the 2ndD and SNV models exhibited normal calibration parameters, but provided unacceptable predictions for the type B production tablets ($t_{\text{exp}} > t_{\text{crit}}$). On the other hand, the absorbance and first derivative models provided accurate predictions for both types of production tablets ($t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$). We thus adopted the 1stD model for subsequent testing as it used the smaller number of PLS factors (3 *versus* 5). The lineal regression from NIR results *versus* Reference results were: $[\text{NIR}] = (0.98 \pm 0.08) \cdot [\text{REF}] + (1.01 \pm 5.61)$ and $[\text{NIR}] = (0.94 \pm 0.13) \cdot [\text{REF}] + (4.67 \pm 8.38)$, for calibration and prediction sets respectively. The NIR results for the determination of the percent of API dissolved at 30 min in individual tablets were not significantly different from those obtained by the reference method. The slope and intercept of the lineal regressions were not significantly different from 1 and 0, respectively.

The specification for dissolution test in this formulation is just a requirement of minimums, due to the percentage of API in solution after 30 minutes should be greater than 80%. For this reason we plantain the use of a discriminant model instead a quantification model for classifying if a tablet meets or not this dissolution requisite. A variant of the PLS algorithm called Discriminant Partial Least Squares (DPLS) allows one to classify samples according to whether they meet the specifications of a dissolution test. The samples used to construct our DPLS model were of two types, namely: (a) those meeting the specification for the studied formulation (*viz.* a degree of dissolution exceeding 80% at 30 min) and (b) those not meeting such a requirement. The DPLS models used a binary code (1 or 0) to classify samples in the two

groups. The samples used to develop the DPLS models were the same laboratory tablets employed to construct the PLS model for determining the percent of API dissolved. The spectral range used was the whole spectrum, which was subjected to the usual pretreatments. Production tablets (types A and B) were only used in the prediction set. Based on the results provided by the reference method, all production tablets met the specifications for this formulation (*viz.* a degree of dissolution exceeding 80% at 30 min), so the value predicted by the DPLS model should be near-unity. We set a prediction threshold of 0.5 for classifying samples. The ABS models provided accurate predictions for type A samples, however, they failed to accurately predict type B samples. On the other hand, all SNV and derivative methods successfully predicted the results for the production tablets. The 2stD model, which was constructed with 4 PLS factors, was that providing the best results in this respect; thus, it gave prediction values of 0.82-0.92 for type A tablets and 0.96-1.17 for type B tablets (best classification values are near to 1). This DPLS model therefore allows one to ascertain whether production tablets meet the dissolution specifications.

CONCLUSIONS

In this work, we accurately determined the API content and percent of dissolution at a time of pharmaceutical tablets by using NIR spectroscopy in combination with multivariate calibration and classification models constructed from laboratory tablets alone.

The pressure used to compact the tablets was found to have a pronounced effect on their NIR spectra. Simple calibration models were used to determine the compaction pressure of production samples by using laboratory samples consisting of pressed mixtures of the API and excipients. By using tablets obtained at a compaction pressure similar to that of the production tablets, we developed models for determining the API content in intact tablets that were subsequently used in content uniformity determinations with results not significantly different from those provided by the reference (HPLC) method.

PLS and DPLS models were used to determine compliance with the dissolution specifications, the results being comparable to those obtained with the reference method.

The proposed NIR method allows to perform both analytical tests (API determination and dissolution test) in the same unit dose in few seconds, due to it is not destructive.

The proposed model for determining the API in pharmaceutical tablets requires no production samples; in fact, it only uses laboratory samples obtained by mixing the ingredients in appropriate amounts and pressing them. No reference method need be used as the procedure incorporates all variability sources of the production samples. Consequently, NIR spectroscopy can be considered as an absolute method of analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project BQU2003-04247.

REFERENCES

- [1] – Colon J, Peroza C, Caraballo W, Conde C, Li T, Morris KR, Romañach RJ. 2005. On Line Non-Destructive Determination of Drug Content in Moving Tablets Using Near Infrared Spectroscopy. *J Proc Anal Tech* 2(5):8-15.
- [2] – Rodrigues L, Marques JL, Cardoso JP, Menezes JC. 2005. From lab to plant: a scale-independent NIR calibration to monitor an ionic exchange column. *Chem and Intel Lab Syst* 75:101– 108.
- [3] – Roggo Y, Jent N, Edmond A, Chalus P, Ulmschneider M. 2005. Characterizing process effects on pharmaceutical solid forms using near-infrared spectroscopy and infrared imaging. *Eur J Pharm and Bio* 61:100–110.
- [4] – Freitas MP, Sabadin A, Silva LM, Giannotti FM, do Couto DA, Tonhi E, Medeiros RS, Coco GL, Russo VFT, Martins JA. 2005. Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method. *J Pharm and Biomed Anal* 39:17–21.
- [5] – Blanco M, Alcalá M. 2006. Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy A contribution to process analytical

technologies. *Anal Chim Acta* 557:353–359

[6] – Blanco M, Alcalá M. 2006. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. *Eur J of Pharm Sci* 27(2-3):280-286.

[7] – Chalus P, Roggo Y, Walter S, Ulmschneider M. 2005. Near - infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets. *Talanta* 66(5):1294-1302.

[8] – Gupta A, Peck GE, Miller RW, Morris KR. 2005. Real-time near - infrared monitoring of content uniformity, moisture content, compact density, tensile strength, and Young's modulus of roller compacted powder blends. *J Pharm Sci* 94(7):1589-1597.

[9] – Donoso M, Ghaly ES. 2005. Prediction of tablets disintegration times using near - infrared diffuse reflectance spectroscopy as a nondestructive method. *Pharm Dev and Tech* 10(2):211-217.

[10] – Reynolds T. 2002. Investigation of the effect of tablet surface Area/Volume on drug release on Hydroxypropylmethylcellulose controlled-release matrix tablets. *Drug Dev and Indus Pharm* 28(4): 457-466.

[11] – Mitchell SA, Reynolds, TD, Dasbach, TP. 2003. A compaction process to enhance dissolution of poorly water-soluble drugs using hydroxypropyl methyl cellulose. *Int J Pharm* 250(1):3-11.

[12] – Martins J. 2005. Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method. *J Pharm and Biomed Anal* 39:17–21.

Table 1. Excipients concentration levels used for the design of the laboratory placebos.

Concentration levels (%wt)	Lactose	Cellulose	Starch	Stearate
Upper	96.66	8.80	5.87	0.59
Central	88.93	6.50	4.33	0.57
Lower	81.20	4.19	2.79	0.56

Table 2. Figures of merit for API determination. Calibration models on 1100-2500nm spectral range. Number of samples used in each set are detailed between parenthesis. The best results are marked in bold.

CALIBRATION				PREDICTION					
laboratory tablets (18)				production tablets					
Spectral pretreatment	PLS factors	Y-explained variance %	RSEC %	Type A (20)			Type B (20)		
				Residual (mg g ⁻¹)		¹ t _{exp}	Residual (mg g ⁻¹)		¹ t _{exp}
				avg ²	SD ²		avg ²	SD ²	
1st Der	3	99.83	1.64	4.74	1.08	19.66	5.52	1.28	19.26
2nd Der	3	99.72	2.09	-0.04	1.50	0.13	0.61	1.92	1.46
SNV	3	99.72	2.08	23.63	1.03	102.85	17.05	0.93	80.10
SNV+1st Der	3	99.74	2.00	0.64	2.21	1.29	-0.19	0.80	1.11
SNV+2nd Der	2	99.76	1.95	0.50	2.14	1.05	-4.06	0.99	18.68

¹t_{crit} (p=0.05, 19 degrees of freedom) is 2.09. ²avg: average, SD: standard deviation

Table 3. Content uniformity for pharmaceutical tablets.

Batch	API concentration HPLC	API concentration ¹ NIR	API nominal content per tablet	API content range ²	API content ³	RSD%
A1	79.52	80.40	30mg	28.81-30.66	30.02	2.31
A2	78.32	77.35		27.27-28.98	28.61	1.86
B1	33.39	33.56	6mg	5.92-6.76	6.39	4.07
B2	33.39	34.44		6.18-6.99	6.57	4.54

¹NIR average for 10 tablets (mg g⁻¹)

^{2,3}NIR range and average for 10 tablets (mg per tablet)

Table 4. Figures of merit for the dissolution test. Calibration models on 1100-2500nm spectral range. Number of samples used in each set are detailed between parenthesis. The best results are marked in bold.

CALIBRATION				PREDICTION					
laboratory tablets (20)				production tablets					
Spectral pretreatment	PLS factors	Y-explained variance %	RSEC %	Type A (10)			Type B (10)		
				Residual (% dis)		¹ t _{exp}	Residual (% dis)		¹ t _{exp}
				avg ²	SD ²		avg ²	SD ²	
ABS	5	99.02	4.20	1.38	2.19	1.98	0.39	2.35	0.52
1st Der	3	98.47	5.24	1.01	1.73	1.85	-1.23	2.00	1.94
2nd Der	4	99.18	3.83	1.21	2.20	1.74	-6.06	2.48	7.73
SNV	3	97.86	6.20	-1.29	3.00	1.36	-9.84	3.51	8.87

¹t_{crit} (p=0.05, 9 degrees of freedom) is 2.26. ²avg: average, SD: standard deviation

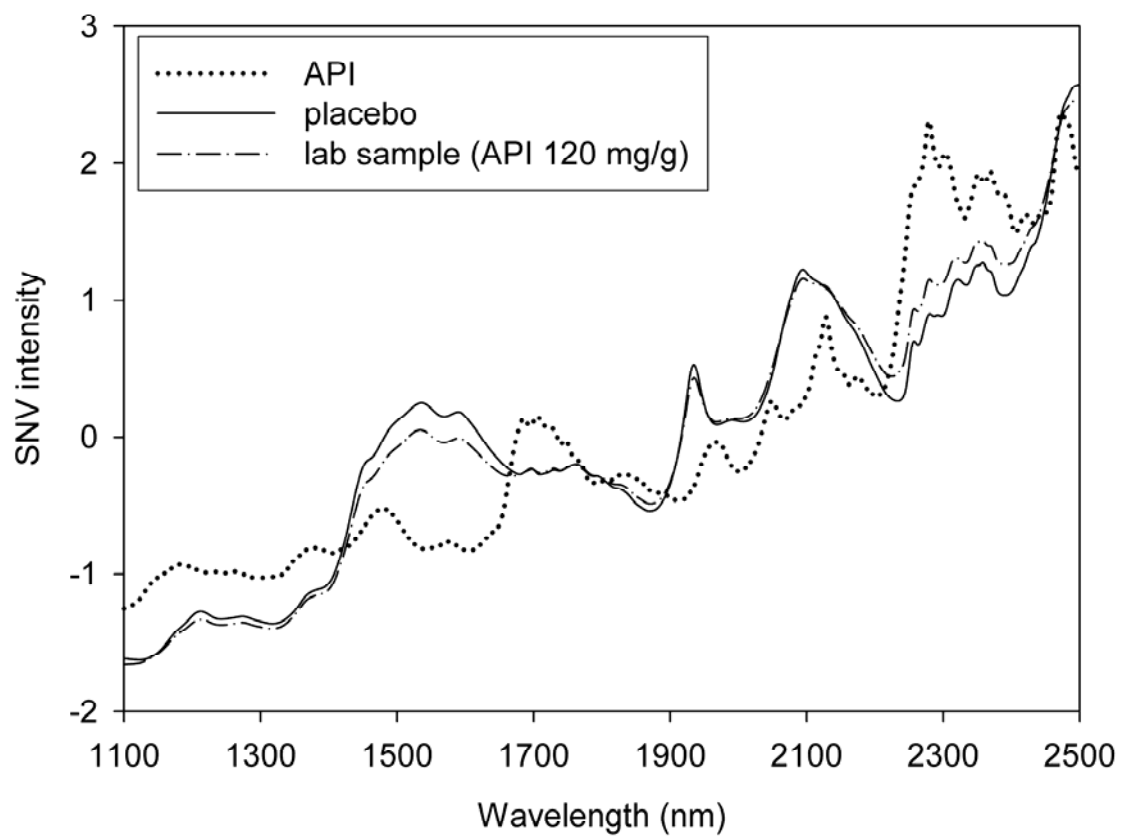


Figure 1. NIR SNV spectra for the active principle ingredient (API), the placebo and a laboratory sample (API + placebo).

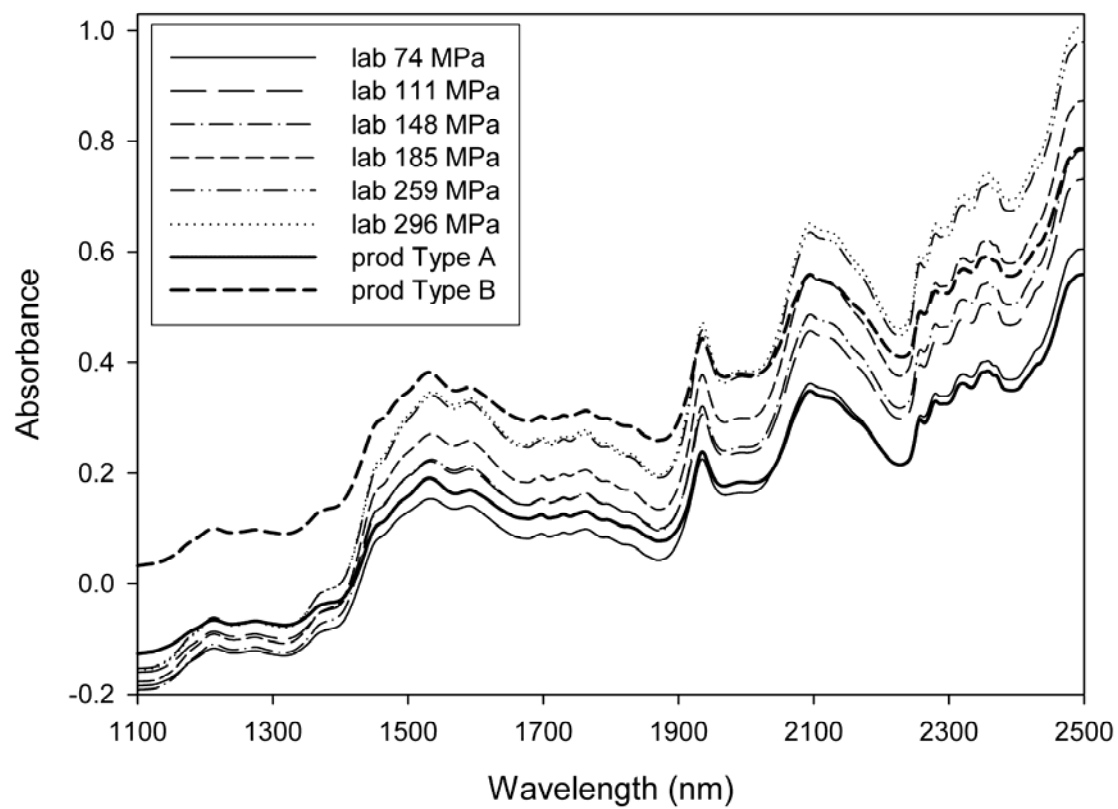


Figure 2. NIR absorbance spectra for laboratory tablets (different compression and same API concentration) and for production tablets (type A and B).

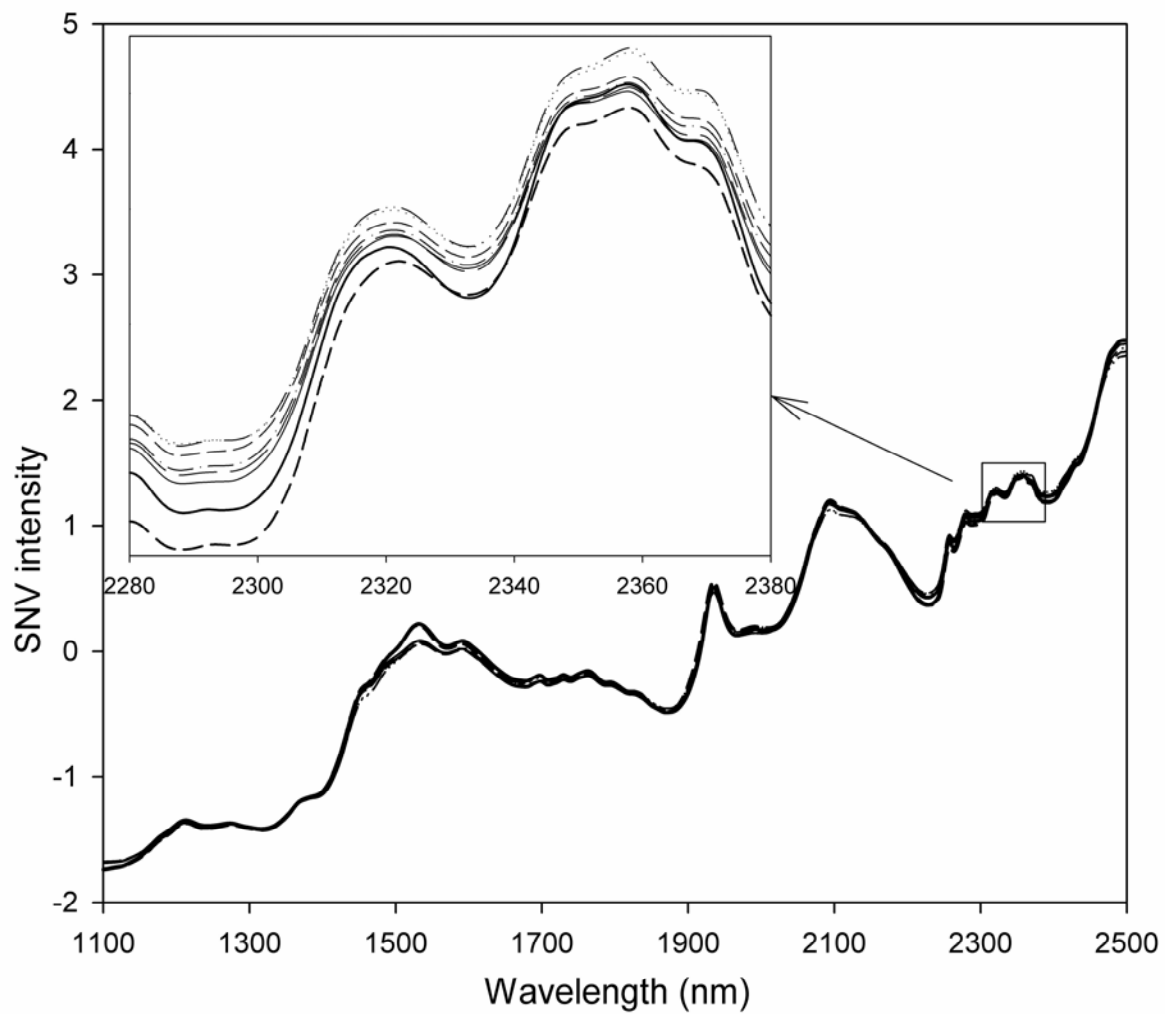


Figure 3. NIR SNV spectra for laboratory tablets (different compression and same API concentration) and for production tablets (type A and B). Enlarge of spectral range 2280-2380nm. Legend not included (same as Figure 2).

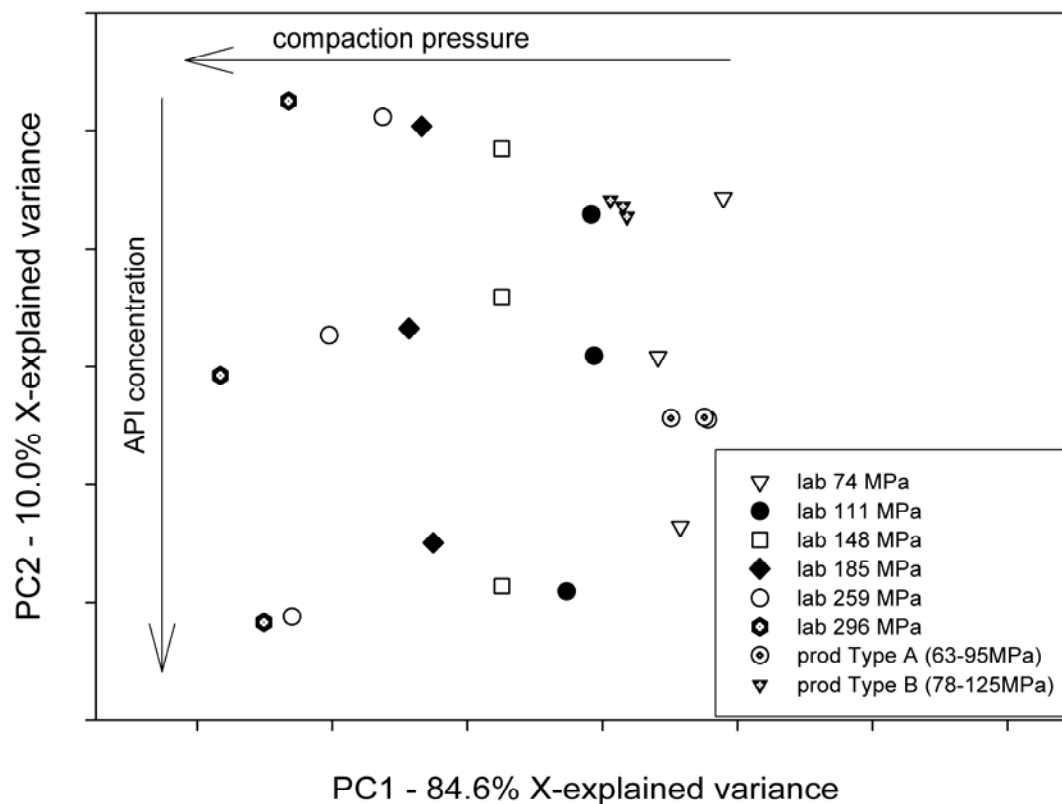


Figure 4. Score plot for a PCA obtained from 2nd Der spectra for laboratory tablets (different compaction also API concentration) and production tablets (type A and B).

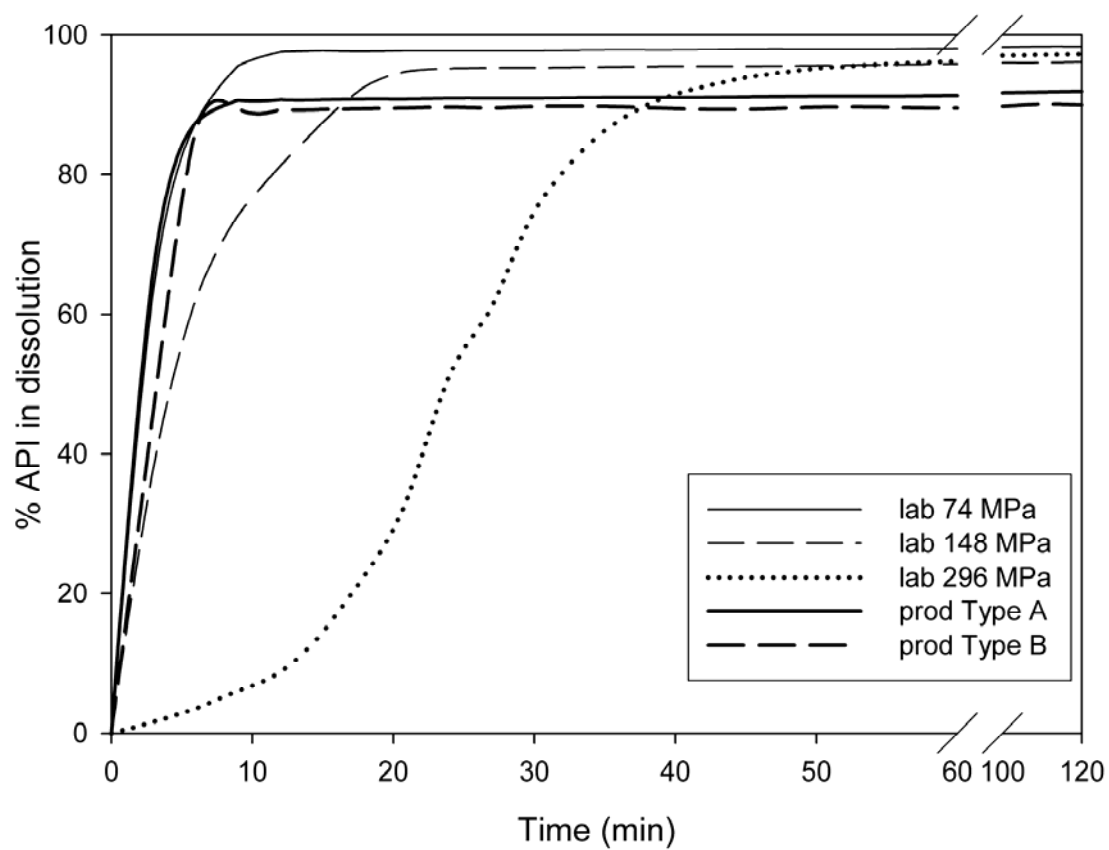


Figure 5. Dissolution profiles for laboratory tablets (different compaction) and production tablets (type A and B).

ANEXO 3

DETERMINATION OF DISSOLUTION PROFILES IN INTACT PHARMACEUTICAL TABLETS BY NIR SPECTROSCOPY

Marcelo Blanco, Manel Alcalà, Josep M. González and Ester Torras

Journal of Process Analytical Technology(2006)

Aceptado para su publicación

DETERMINATION OF DISSOLUTION PROFILES IN INTACT PHARMACEUTICAL TABLETS BY NIR SPECTROSCOPY

Marcelo Blanco,¹ Manel Alcalá,¹ Josep M. González² and Ester Torras²

¹ Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Chemistry, Analytical Chemistry Unit, E-08193 Bellaterra, Spain

² Laboratorios Menarini S.A., c/ Alfons XII 587, E-08918 Badalona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

A novel application of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) involving the determination of dissolution profiles in pharmaceutical tablets is proposed. The determination is based on the application of Partial Least-Squares 2 (PLS2) multivariate calibration models to NIR spectra for individual tablets. A procedure for transforming the original data with a view to constructing simple, robust PLS2 models was developed. The proposed NIR method provides accurate predictions; thus, the coefficients of correlation between the dissolution profiles obtained with it and a reference method exceeded 0.99 in all cases, and calibration and prediction errors fell within acceptable ranges (6-7%). The method allows the entire dissolution profile of pharmaceutical tablets to be determined in a simple, clean, expeditious manner without the need to use any reagents or solvents, or the production of any waste.

KEYWORDS: Near Infrared Spectroscopy, pharmaceutical tablets, dissolution testing, intact tablets, partial least squares, process analytical chemistry.

INTRODUCTION

The pharmaceutical industry has lately promoted the development and implementation of new analytical methodologies allowing the simple, expeditious obtainment of results with a view to facilitating process control and formulation analyses. Near Infrared Spectroscopy is an especially advantageous technique in this context as it affords multi-determinations with little or no human intervention. This has fostered its use for such chemical purposes as the determination of active principles (APIs) [1–4], the identification of raw materials [5] and the determination of solvents [6] and moisture [6], and also for the determination of physical characteristics such as polymorphism [8,9], mixture homogeneity [10,11] or particle size [12]. These applications usually require no sample treatment or the use of any reagents; also, they reduce analysis times and afford the monitoring of various stages of the pharmaceutical process.

Dissolution testing (*viz.* the examination of the process by which a solid substance enters the solvent to form a solution) is a commonplace analytical determination in pharmaceutical tablets. Dissolution tests are used to determine the fraction of API that is dissolved as a function of time and can best be described as a qualitative tool for extracting useful information about the bioavailability of a drug product [13].

The kinetics of dissolution is widely documented and has been formulated in terms of various equations. However, the dissolution process has not yet been fully elucidated. Equation (1), originally derived by Noyes-Whitney and subsequently expanded by other authors, is one of the most widely used to describe dissolution:

$$dW/dt = K (C_s - C) \qquad K = A \cdot D \cdot l^{-1} \qquad (1)$$

dW/dt being the amount of API dissolved at time t , C_s the saturation concentration, C the concentration in solution at time t and K a constant which is directly proportional to the coefficient of dissolution (D) and contact area (A) of the solute with the solvent, and indirectly proportional to the thickness of the solvent diffusion layer (l).

Dissolution tests are typically conducted by following a procedure widely documented in USP monographs [14]. The procedure involves the use of large amounts of solvents and reagents, and hence the production of abundant waste. Also, obtaining the analytical results for slow-release pharmaceutical drugs is a time-consuming process.

The dissolution rate of pharmaceutical tablets is influenced by various factors including the compaction pressure applied during the manufacturing process [1], the dissolution time increasing with increasing compaction.

The NIRS technique has been used in various ways to determine dissolution-related parameters. Thus, Kuny *et al.* [15] used a single Partial Least Squares 1 (PLS1) calibration model to determine the percentage of API dissolved at a single analysis time ($\%API_{20min}$). Ghally *et al.* [16] and Martins *et al.* [17] determined $\%API$ by using as many PLS1 calibration models as times were used to make measurements during the dissolution test. This approach involves labour-intensive computations required to construct a usually large number of PLS1 models.

Methods allowing the rapid extraction of information about the dissolution profile of a substance can be highly useful with a view to efficiently controlling production processes by adjusting the operation of the tablet pressing machine to the requirements established in the manufacturing protocol in the course of the process. Such methods can therefore be highly practical and efficient PAT tools.

In this work, we used NIR spectroscopy to determine the entire dissolution profile of pharmaceutical tablets that were analysed on an individual basis by using a single PLS2 calibration model which allows the simultaneous prediction of the whole set of variables Y (*viz.* the percentages of API dissolved throughout the dissolution profile).

EXPERIMENTAL

Samples

The pharmaceutical preparation studied is commercially available in two different forms containing 30 (type A) and 6 (type B) mg, respectively, of API (Deflazacort) per unit dose. The API concentration in the two types of tablet was found to be 81 and 32 mg·g⁻¹ (±5%), respectively. The formulation additionally contains lactose as the major excipient (>800 mg·g⁻¹), and microcrystalline cellulose, corn starch and magnesium stearate as minor excipients. A total of 44 tablets (22 of each type) were used.

NIR spectra

Near infrared spectra were recorded in the reflectance mode on a Model 5000 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD) equipped with a Rapid Content Analyzer (RCA) module and governed via the Software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems.

The NIR reflectance spectra for the two faces of each tablet were directly recorded over the wavelength range 1100-2500 at a resolution of 2 nm. Each spectrum was the average of 32 scans and the individual spectra for the two faces of each tablet were averaged into a single one. A reference spectrum was previously obtained from a ceramic plate.

Dissolution testing reference method

Individual tablets were subjected to dissolution tests by using a PTTWS 3C Type II UPS dissolution apparatus from Pharma-Test (Hainburg, Germany) at a rotation speed of 50 ± 3 rpm. The dissolution medium consisted of 900 ml of purified water containing 0.034 M NaCl and 0.087 M HCl at pH 1 ± 0.05 at 37 ± 0.5 °C. Aliquots of the resulting solution were automatically withdrawn, filtered and assayed by UV spectroscopy at $\lambda = 242$ nm on a model HP 8453 instrument from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The proportion of API dissolved from each tablet at different times (*viz.* 3-30 min at 3-min intervals, 35-60 min at 5-min intervals, and 70-120 min at 10-min intervals) was determined by using a single API solution as reference standard.

Data processing

Data were processed by using the chemometric software Unscrambler v. 9.2 from CAMO (Trondheim, Norway). First- and second-derivative spectra were obtained by using the Savitzky-Golay algorithm with an 11-point moving window and a second-order polynomial. Data were also subjected to the Standard Normal Variate (SNV) spectral treatment. NIR spectra and the concentration values obtained from the experimental dissolution profile were used to construct

Partial Least Squares 2 (PLS2) calibration models by cross-validation, using the leave-one-out method. The relative errors of calibration and prediction (RSEC and RSEP) were used to assess model quality and predictive ability. The dissolution profiles obtained with the NIR models were also compared with those of the reference models via the correlation coefficient (r). The number of PLS factors used to construct each model coincided with that leading to the lowest possible RSEP.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the NIR spectra for the two types of tablets (A and B). The absorbance spectra exhibited a markedly shifted baseline that differed between the two types of sample and can be ascribed to the disparate compaction pressure used to produce the tablets; the absorbance increasing with increase in applied pressure [1]. These spectral differences were substantially reduced upon application of the SNV treatment (see Fig. 1).

The second-derivative spectra for both types of sample were subjected to Principal Component Analysis (PCA). Each point in the scatter plot of Fig. 2 represents the compaction pressure of an individual sample as determined in MPa by using a calibration model specially designed for this purpose [18]. As can be seen, the highest spectral variability was that in the API concentration (first PC, 83% variance), which split samples into two groups (*viz.* tablets of the A and B type). The second greatest source of variability was the compaction pressure (second PC, 11% variance), which discriminated samples according to such pressure.

Figure 3 shows the dissolution profiles for laboratory-made tablets prepared at variable compaction pressures from 74 to 296 MPa. The profiles clearly expose the effect of the compaction pressure on the dissolution rate.

Figure 4 shows the dissolution profiles for commercial tablets, which exhibit two distinct regions, namely: an initial region where the proportion of dissolved API increases very rapidly and a final region where such a proportion virtually levels off after some time. The differences between the dissolution profiles for each type of sample can be ascribed to the disparate compaction pressures used to obtain the tablets. Thus, the maximum and minimum compaction pressure used to prepare type A tablets were 74 and 52 MPa (mean 64 MPa), respectively, while those for type B tablets were 140 and 84 MPa (mean 105 MPa), respectively. These values were obtained by using a previously reported calibration model for predicting compaction pressures [18].

Type B tablets were more slowly dissolved than type A tablets. This is consistent with the increased compaction pressure used to obtain the former. Both types of samples exhibited a very similar degree of dissolution, which amounted to *ca.* 90% after 12 min. The PLS2 calibration models were developed from the percent dissolved API measurements made at 3-12 min as they varied by less than 1% beyond the latter time.

The initial PLS2 calibration tests were based on the original percent dissolution values provided by the reference method. The body of samples was split into a calibration set and a prediction set. The samples in the calibration set were chosen from a scatter plot (PC2 vs PC1) of the scores obtained in a Principal Component Analysis (PCA) of the second derivative of whole spectra. Various types of models were assayed that were constructed from 8 type A tablets and 7 type B tablets, the remaining samples being employed to validate the models.

The PLS2 models were obtained for the entire spectral range, using various treatments (ABS, SNV, derivation and SNV-derivation) with the experimental dissolution profiles provided by the reference method as the variables to be modelled. The models thus obtained required a large number of PLS factors (up to 11) and provided very high calibration and prediction errors (over 50%). Also, none of the models allowed the dissolution profiles of the prediction samples to be

accurately predicted. This can be ascribed as the parameters to be modelled are not bilinear and PLS2 methodology is unable to model them accurately.

The variables therefore required some transformation for easier modelling. We chose to use the reciprocal of the proportion of API dissolved as a function of the reciprocal time for this purpose. Figure 5 shows the dissolution profiles of Fig. 4 upon transformation. As can be seen, the transformed profiles were more linear.

The transformed data for each type of tablet were used to construct PLS2 models by applying various spectral treatments (ABS, SNV, derivation and combinations thereof) to the whole spectral range. The quality of the models, in terms of RSEC, RSEP and correlation coefficients, was assessed by reversing the transformation. Table 1 shows the figures of merit of the calibration models and their predictive ability. The best models are boldfaced. Note that only 2 PLS factors need be used to construct effective models. These two calibration approaches based on a single type of tablet (A or B) only afford accurate predictions for either type. By way of example, Fig. 6 shows the dissolution profiles for 3 type B tablets as obtained using the reference and NIR methods. As can be seen, the two are very similar, as confirmed by the high correlation coefficients obtained.

The dissolution requirement for this type of tablet is a minimum dissolved API concentration of 80% after 30 min. As can be seen, the profiles surpassed such a minimum after only 7 min. Based on the previous results, the proposed NIR method allows the correct conduct of dissolution tests.

The construction of a model based on both types of tablets was assayed. The model, however, required an increased number of PLS factors and exhibited poorer predictive ability, so it was discarded.

The dissolution profiles predicted by the PLS2 models (individual approaches) were also used to quantify the time at which a 80% API concentration in solution was reached. Such a time was determined by least-squares interpolation in a linear regression of each transformed dissolution profile. Table 2 lists the times obtained for type A and B tablets with the NIR and reference method. As can be seen, type A tablets required 3-4 min and type B tablets about 6 min. Based on the results, the compaction pressure clearly influences the dissolution profile of the tablets; also, type B tablets, which were obtained at a higher pressure than type A tablets, took a longer time to reach the same proportion of API in solution.

CONCLUSIONS

NIR spectroscopy allows the rapid, clean determination of the dissolution profile of pharmaceutical tablets. PLS2 methodology allows diverse variables to be calibrated and predicted by using a single model and spectra for the tablets alone. Transformation of the original variables of a dissolution test into their reciprocals ($1/\%$ vs $1/t$) facilitated the obtainment of PLS2 models of increased simplicity and predictive ability. The dissolution profiles obtained with the proposed NIR method exhibited a high correlation with those provided by the reference method (a coefficient of 0.997 for A tablets and 0.989 for B tablets). The PLS2 models additionally allow the time needed to dissolve the API to a given extent to be determined. Finally, the proposed method reduces analytical times and costs, and, unlike the reference method, avoids the production of waste.

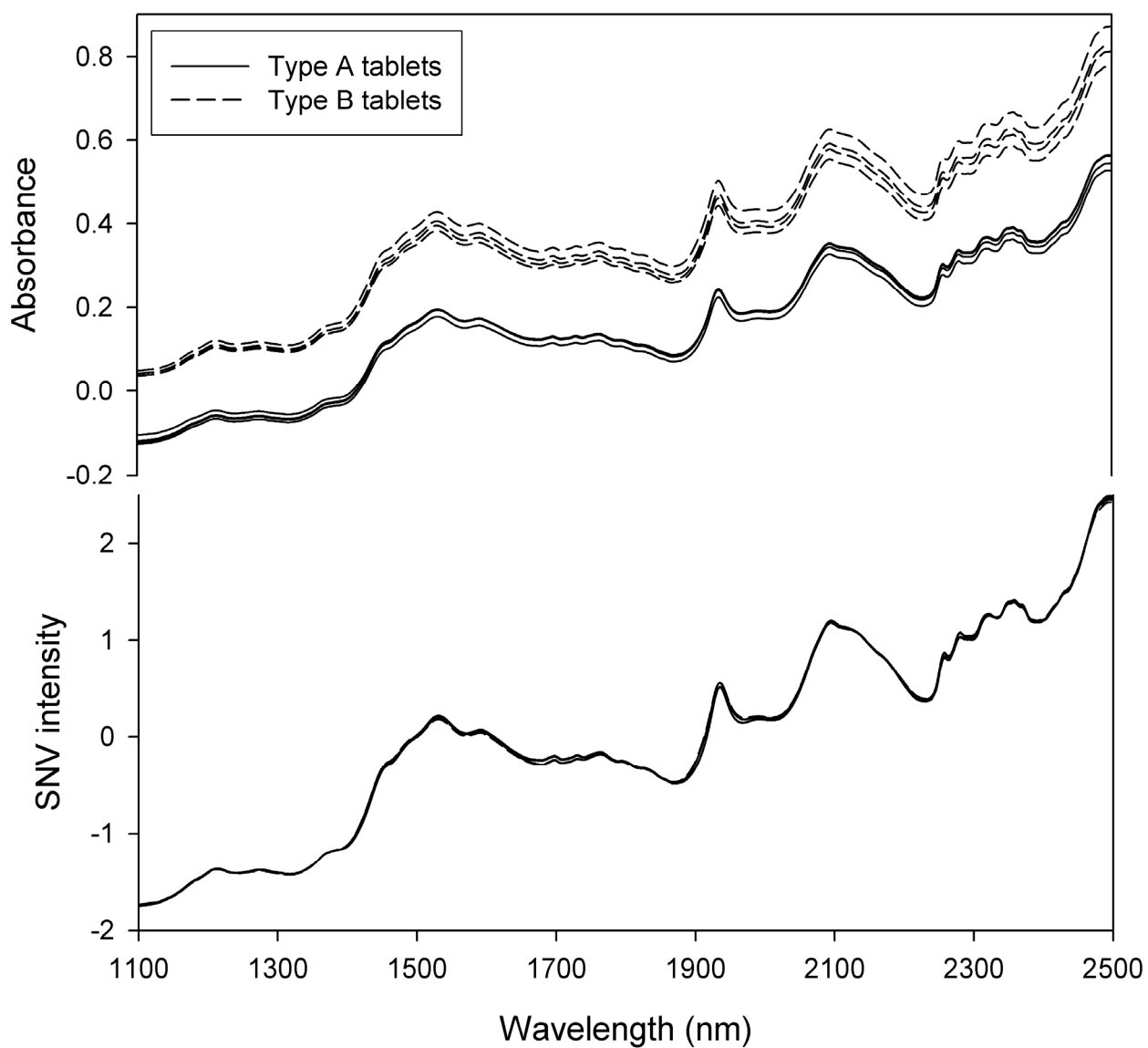


Figure 1. Absorbance (upper position) and SNV (lower position) NIR spectra for both types of tablets (A and B).

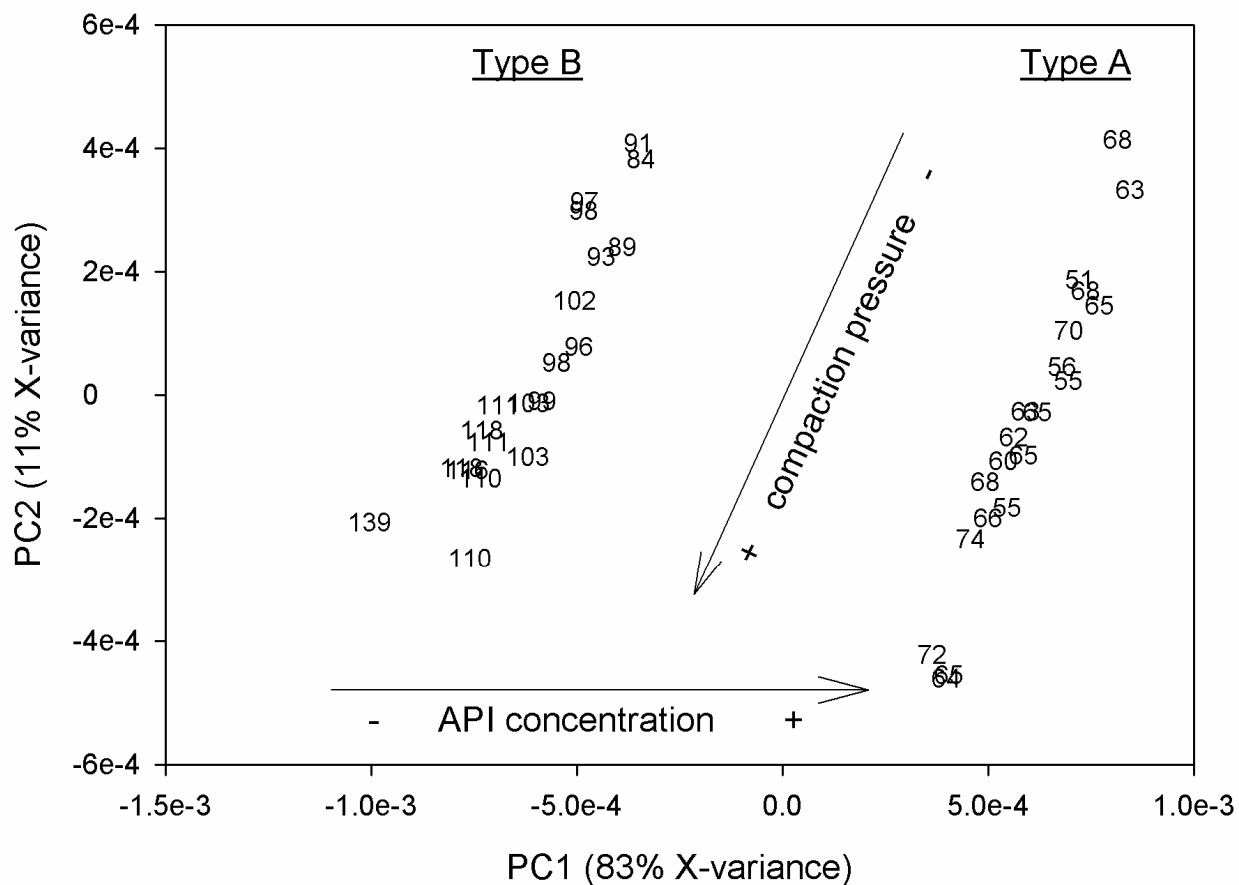


Figure 2. Score plot obtained by a Principal Component Analysis (PC2 vs PC1) from 2nd Derivative spectra of both types of tablets (A and B). Samples are represented by its compaction pressure value (MPa).

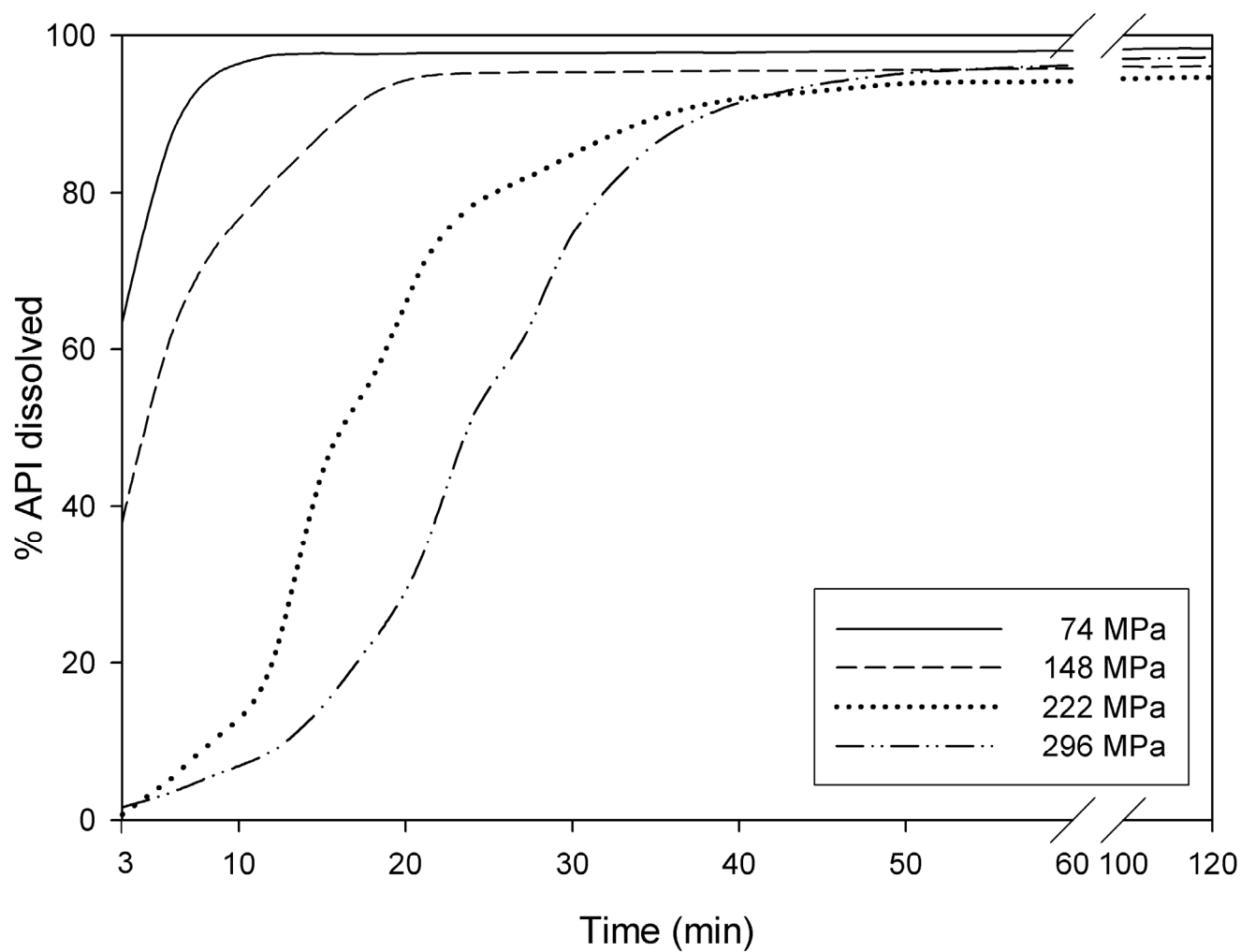


Figure 3. Dissolution profiles for laboratory tablets obtained by the reference method. Tablets compacted at different compaction pressures.

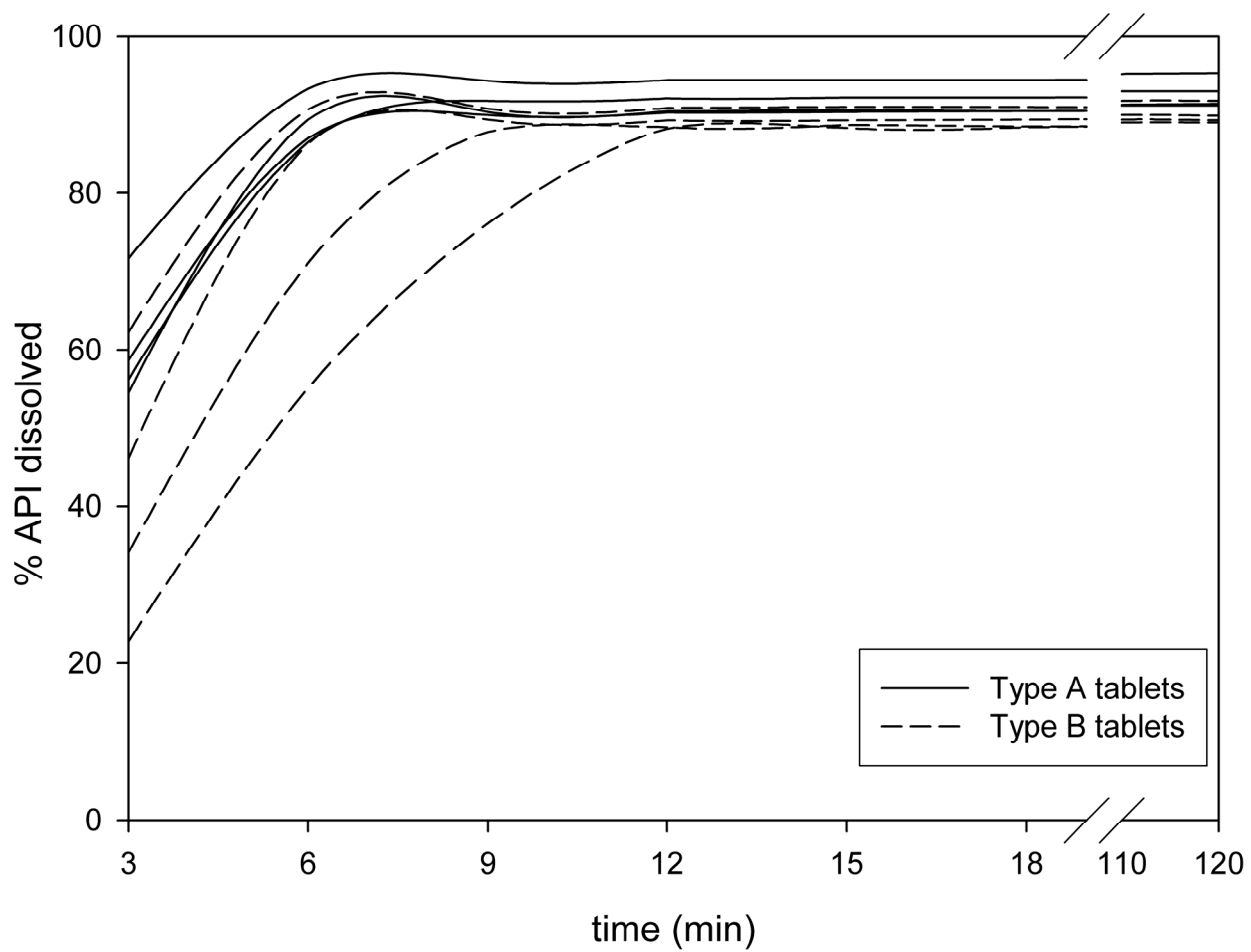


Figure 4. Dissolution profiles for both types of production tablets (A and B) obtained by the reference method.

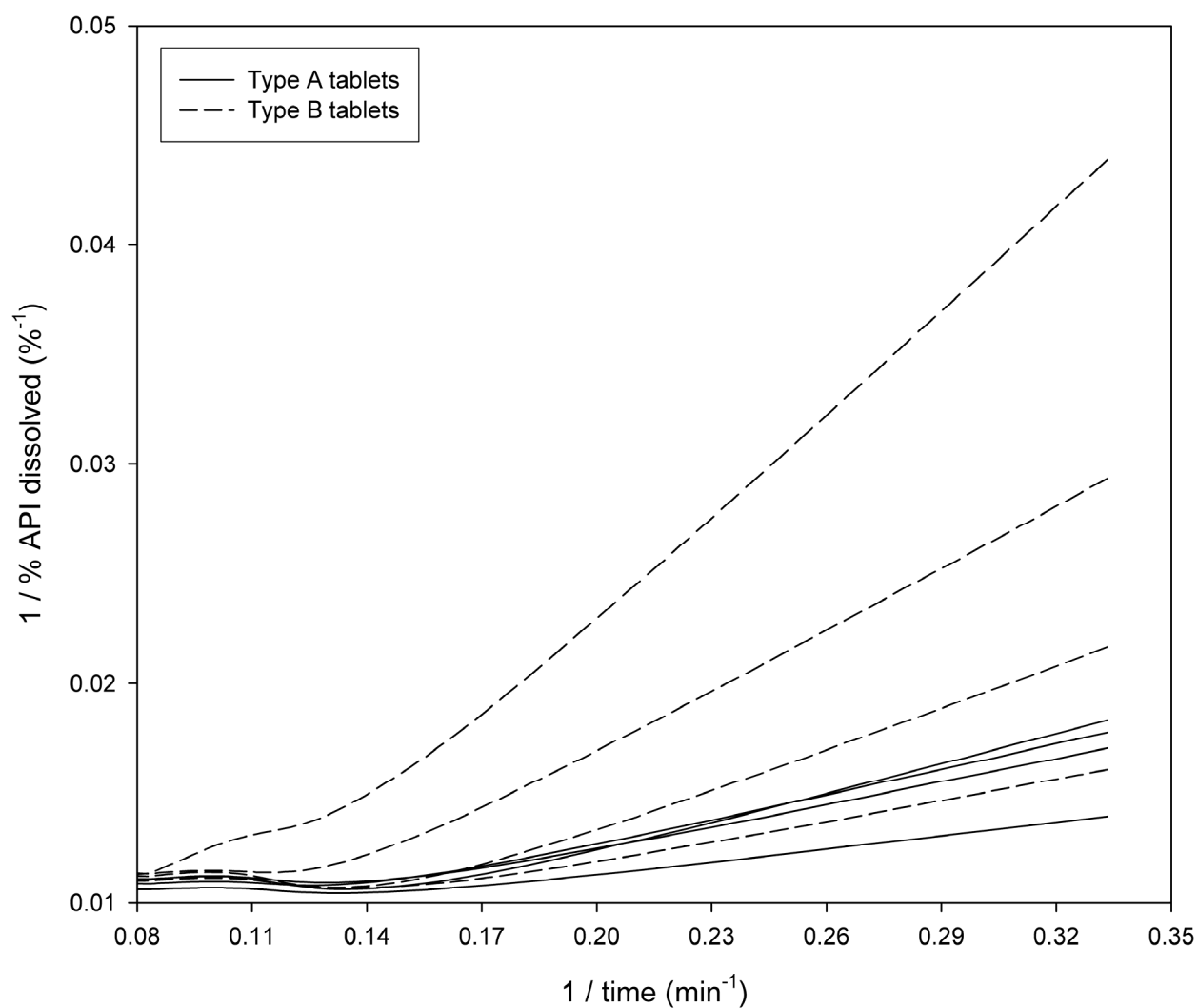


Figure 5. Linearization of the dissolution profiles for both types of production tablets (A and B).

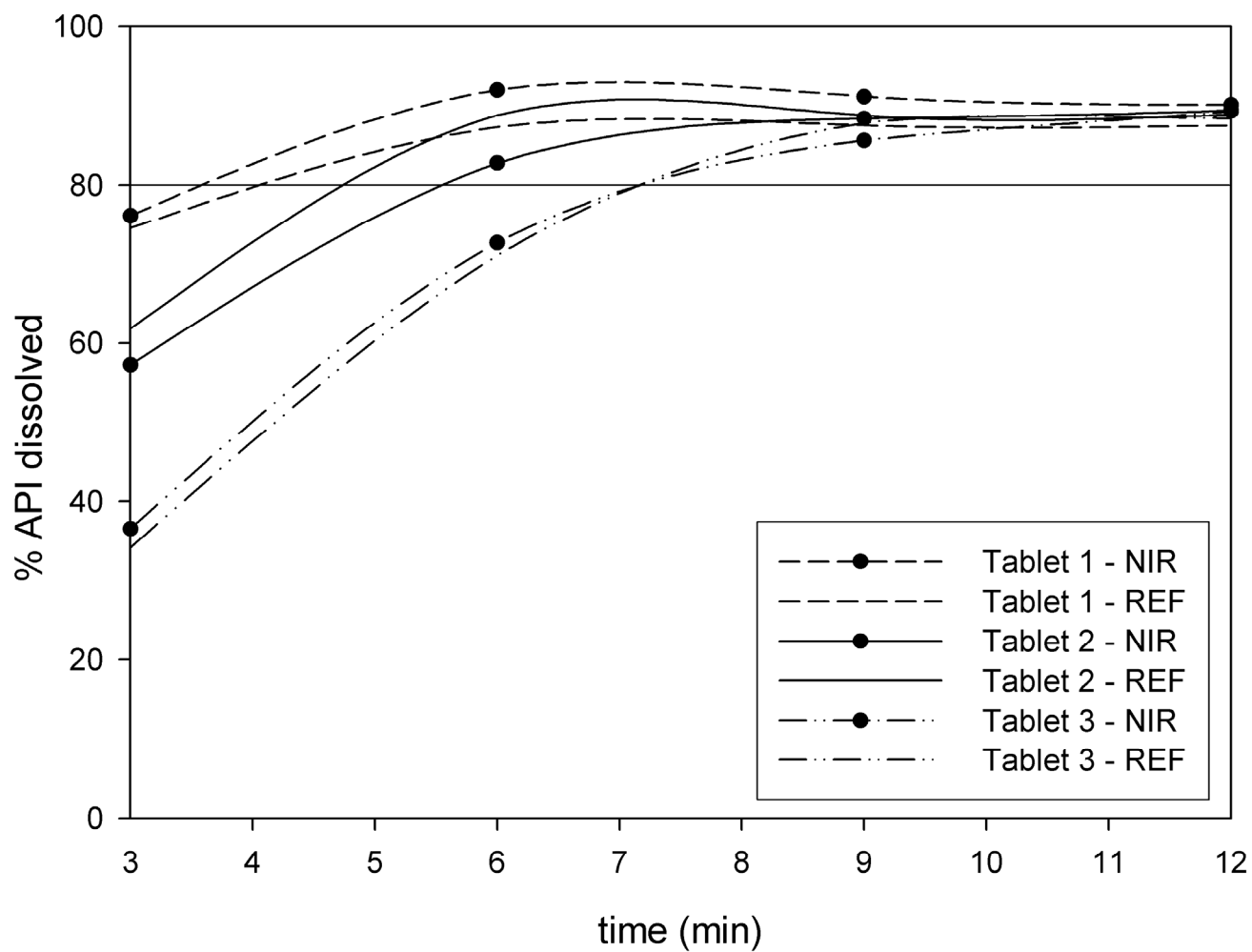


Figure 6. Dissolution profiles obtained by the NIR and reference methods, for three tablets of type B. The minimum requisite of dissolution is marked with an horizontal line at 80%.

Table 1. Figures of merit from the PLS2 calibration models.

CALIBRATION	PREDICTION	Spectral pretreatment	PLS factors	RSEC%	RSEP%	Correlation Coefficient (r)
type A (8) ¹	type A (6)	ABS	4	3.2	18.6	0.334
		SNV	3	3.7	27.9	0.333
		1 st D	4	2.1	6.8	0.990
		2nd D	2	5.5	5.9	0.997
		SNV + 1 st D	4	1.9	9.3	0.978
		SNV + 2 nd D	2	4.4	6.8	0.998
type B (7)	type B (9)	ABS	3	2.6	8.8	0.985
		SNV	3	3.0	8.1	0.989
		1 st D	2	3.0	9.9	0.983
		2 nd D	2	2.8	10.0	0.982
		SNV + 1 st D	2	4.1	7.9	0.988
		SNV + 2nd D	2	4.4	7.1	0.989

¹Number of samples in each set.

Table 2. Determination of the time to reach an 80% API dissolved, using the NIR and the reference method.

		TIME to 80% API dissolved (min)
Type A tablets	NIR avg	3.3
	REF avg	3.6
	Residual avg	-0.4
Type B tablets	NIR avg	6.1
	REF avg	6.2
	Residual avg	-0.1

- [1] - M. Blanco and M. Alcalá, "Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: A contribution to process analytical technologies", *Analytica Chimica Acta*, 2006, 557(1-2), 353-359.
- [2] – P. Chalus, Y. Roggo, S. Walter, M. Ulmschneider, F. H. Michel, "Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets", *Talanta*, 2005, 66(5), 1294-1302.
- [3] – J. Colon, C. Peroza, W. Caraballo, C. Conde, T. Li, K. R. Morris and R. J. Romanach, "On Line Non-Destructive Determination of Drug Content in Moving Tablets Using Near Infrared Spectroscopy", *Journal of Process Analytical Technology*, 2005, 2(5), 8-14.
- [4] – Y. Wang, "NIR: Practical Implementation in Tablet Content Uniformity Measurement", *Journal of Process Analytical Technology*, 2005, 2(5), 16-21.
- [5] – K. A. Bakeev and B. Kurtyka, "Sources of measurement variability and their effect on the transfer of near infrared spectral libraries", *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2005, 13, 339–348.
- [6] – J. Parris, C. Airiau, R. Escott, J. Rydzak, R. Crocombe, "Monitoring API drying operations with NIR", *Spectroscopy*, 2005, 20(2), 34, 36, 38, 40, 42.
- [7] – A. Stokvold, K. Dyrstad, F. Libnau, "Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 28(5), 867-873.
- [8] – W. Li, G.D. Worosila, W. Wang, T. Mascaro, "Determination of polymorph conversion of an active pharmaceutical ingredient in wet granulation using NIR calibration models generated from the premix blends", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 94(12), 2800-2806.
- [9] - M. Blanco, D. Valdés, I. Llorente, M.S. Bayod, "Application of NIR Spectroscopy in Polymorphic Analysis: Study of Pseudo-Polymorphs Stability", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 94(6), 1336-1342.

- [10] – N. Duong, P. Arratia, F. Muzzio, A. Lange, J. Timmermans, S. Reynolds, “A homogeneity study using NIR spectroscopy: Tracking magnesium stearate in bohle bin-blender”, *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2003), 29(6), 679-687.
- [11] - M. Popo, S. Romero-Torres, C. Conde, R. J. Romanach, “Blend uniformity analysis using stream sampling and near infrared spectroscopy”, *AAPS PharmSciTech*, 2002, 3(3), No pp. given.
- [12] – M. Otsuka, “Comparative particle size determination of phenacetin bulk powder by using Kubelka-Munk theory and principal component regression analysis based on near-infrared spectroscopy”, *Powder Technology*, 2004, 141(3), 244-250.
- [13] - U.V. Banakar, “Introduction, Historical Highlights, and the Need for Dissolution Testing”, in: U.V. Banakar, *Pharmaceutical dissolution testing*, Dekker, New York, 1991, pp. 1-4.
- [14] - U.V. Banakar, “Appendix: USP/NF Dissolution Test”, in: U.V. Banakar, *Pharmaceutical dissolution testing*, Dekker, New York, 1991, pp. 423-427.
- [15] – T. Kuny, C. Schatz, M. Ulmschneider, S. Marrer, H. Leuenberger, “Non-destructive Dissolution Testing Correlation”, *Dissolution Technologies*, 2003, February, 22-28.
- [16] - M. Donoso, E. S. Ghaly, “Prediction of Drug Dissolution from Tablets Using Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy as a Nondestructive Method”, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2004, 9(3), 247–263.
- [17] – M.P. Freitas, A. Sabadin, L.M. Silva, F.M. Giannotti, D. Couto, E. Tonhi, R.S. Medeiros, G.L. Coco, V.F.T. Russo, J.A. Martins, “Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 39, 17–21.
- [18] – M. Blanco, M. Alcalá, J.M. González and E. Torras, “A Process Analytical Technology Approach Based On Near Infrared Spectroscopy: tablet hardness, content uniformity and

dissolution test measurements of intact tablets”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, accepted for publication, under printing proofs.

ANEXO 4

SIMULTANEOUS QUANTITATION OF FIVE ACTIVE PRINCIPLES IN A PHARMACEUTICAL PREPARATION: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEAR INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD

Marcelo Blanco and Manel Alcalà

European Journal of Pharmaceutical Sciences **27** (2006) 280-286

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method

M. Blanco*, M. Alcalá

Department of Chemistry, Analytical Chemistry Unity, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2005

Received in revised form 21 September 2005

Accepted 27 October 2005

Keywords:

Analytical quality control
Near infrared spectroscopy
Simultaneous determination
Method validation

ABSTRACT

A near infrared spectroscopic method for the simultaneous determination of the active principles paracetamol, ascorbic acid, dextrometorphan hydrobromide, caffeine and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation was developed. The five active principles are quantified using a partial least-squares regression method (PLS1). The proposed method is applicable over a wide analyte concentration range (0.04–6.50 wt.%), so it requires careful selection of the calibration set. Also, there is the difficulty of ensuring thorough homogenization of the product. The method was validated in accordance with the ICH standard and the EMEA validation guidelines for NIR spectroscopy by determining its selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness. Based on the results, it is an effective alternative to existing choices (HPLC and redox titrimetry) for the same purpose.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Quality control analyses in the pharmaceutical industry involve the determination of multiple parameters for both raw materials and end products. The analytical technique most frequently used in quality control analyses of pharmaceutical products is high-performance liquid chromatography (HPLC) (Frahnert et al., 2003; Quaglia et al., 2005); however, the HPLC technique is expensive, labour-intensive and time-consuming, and produces chemical waste. This has aroused interest in the development of simple, reliable alternative methods providing accurate, precise results with an increased throughput and less human intervention (Blanco et al., 1998; Laasonen et al., 2003).

Near infrared spectroscopy (NIRS) meets many such requirements, so it has grown substantially in use as a quality

control technique in the pharmaceutical industry. In fact, the NIRS technique provides a number of attractive advantages, namely:

- It allows direct recording of spectra for solid (Ramirez et al., 2001) and liquid forms (Webster et al., 2003) with little or no sample pre-treatment.
- It allows chemical and physical information about samples (e.g. viscosity, moisture content, polymorphism) to be derived from spectra (Buckton et al., 1998).
- It affords multiparameter determinations from a single spectrum (Sun et al., 2001).
- It can be used with various spectral recording modules compatible with virtually any type of working site and operating procedure (Anon, 2005).

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.

E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

On the other hand, the NIR spectroscopy has two major disadvantages, namely:

- NIR spectra exhibit strong band overlap, which requires the use of multivariate chemometric techniques in both qualitative and quantitative analytical applications (Blanco and Villarroya, 2002).
- The low sensitivity of the technique restricts its scope to major components and a few minor components at most.

The use of multicomponent analytical methods in general and NIR spectroscopy in particular can substantially improve the analytical control of production processes by shortening analysis times and improving quality as a result. While the vast majority of pharmaceutical preparations contain a single active principle, some include two or more at concentrations frequently spanning wide concentration ranges. The joint determination of all the active principles in a multicomponent formulation is made especially difficult by the frequent fact that some species are present at concentrations near the determination limit of the technique.

In this work, we developed a NIR spectroscopic method for the simultaneous determination of five active principles present in a drug for alleviating influenza symptoms. The new method, is intended to replace the current choice, which uses the HPLC technique for four of the analytes Thomas et al., 1994 and iodometric titration for the fifth. The existing method therefore uses substantial amounts of reagents and solvents, and produces polluting waste; also, the analytical procedure is time-consuming – it requires considerable sample pre-treatment – and entails recalibration on a daily basis. The proposed alternative is a fast and efficient NIR spectroscopic method that allows the pharmaceutical preparation to be characterized and its five active principles simultaneously quantified. The method was validated for use in routine analysis in accordance with the guidelines of the *International Conference on Harmonization* (ICH) (Anon, 1996), the *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) (Anon, 2003) for NIR spectroscopy and Pharmaceutical Analytical Sciences Group (Broad et al., 2002).

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and software

NIR spectra were recorded on a NIRSystems 5000 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD) equipped with a Rapid Content Analyzer (RCA) module and governed using the software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems.

Samples were ground in an IKA mill (Staufen, Germany).

Data were chemometrically processed using Unscrambler 7.8 from CAMO (Trondheim, Norway).

2.2. Samples

The samples used for calibration and validation were of two different origins, viz. production samples and laboratory samples.

Table 1 – Example of sample's concentrations with the coefficient of correlation between pairs of analytes

Sample number	Concentration values (%)				
	PAR	ASC	CAF	DEX	CLO
1	109.4	99.1	97.3	123.4	99.9
2	79.5	80.5	114.4	102.3	90.6
3	85.1	105.1	80.9	84.1	81.3
4	122.8	97.8	121.7	96.1	111.5
5	93.5	94.5	105.4	116.4	123.4
6	105.8	121.8	106.0	104.6	79.3
Coefficient of correlation					
PAR	1.00				
ASC	0.39	1.00			
CAF	0.41	−0.33	1.00		
DEX	0.23	−0.13	0.19	1.00	
CLO	0.32	−0.44	0.43	0.47	1.00

2.2.1. Production samples

The pharmaceutical preparation studied is presented as granules in single-dose bags. It contains, as label content values, 6.50 wt.% paracetamol (PAR) as analgesic, 2.50 wt.% ascorbic acid (ASC) as antioxidant, 0.20 wt.% dextromethorphan HBr monohydrate (DEX) as antitussive, 0.15 wt.% caffeine (CAF) as stimulant and 0.04 wt.% chlorpheniramine maleate (CLO) as antihistamine, in addition to sucrose as the major excipient and flavoring and coloring agents.

The production samples used were obtained from 30 different batches and these samples were used to collect the usual variability of the pharmaceutical preparation. For each one, a total of 10 single-dose units (100 g) were selected for grinding in a mill for 15 s in order to ensure complete homogeneity and minimize irreproducibility in spectra and analytical results for solid samples.

The concentrations of the active principles were also determined using the reference method (Thomas et al., 1994) and expressed as percentages relative to their nominal concentrations.

2.2.2. Laboratory samples

The production samples used spanned a very narrow concentration range ($\pm 5\%$ around the nominal value for each active principle) that was clearly inadequate for proper calibration. In order to expand such a narrow range to at least $\pm 20\%$ around the nominal concentration of each analyte, some production samples were doped with excipients and active principles ingredients (APIs). The concentration of the APIs was reduced adding small amounts of excipients, and the addition of different quantities of APIs allowed increasing each concentration. This underdosing/overdosing procedure was performed attending to minimize correlation between the concentrations of the active principles, avoiding spurious correlations among constituents. This strategy was performed by means of a sample concentration matrix, calculating the cross-correlation between the five analytes as their individual concentrations were increased or decreased. Concentrations were changed in such a way that the correlation coefficient between pairs of compounds would never exceed 0.5. Table 1 shows an example of matrix design for six laboratory samples.

The same table contains the coefficient of correlation between pairs of analytes. Once the laboratory sample concentration matrix was constructed, samples were prepared in amounts of ca. 15 g each. The new mixtures were homogenized in the mill for 15 s prior to analysis.

2.3. Reference method

The analytes PAR, DEX, CAF and CLO were determined by using an HPLC instrument from Waters equipped with a μ -Bondapak Phenyl column thermostated with a TCM/CHM oven, and a PDA UV detector, all from Waters (Milford, MS). The chromatograph was governed via the software Millennium 32, also from Waters. The procedure is described in detail in a paper by Frahnert et al. (Thomas et al., 1994).

The other analyte, ASC, was determined by iodometric titration with potentiometric detection of the end-point, using a Titroprocessor and an Ag/AgCl electrode from Metrohm (Herisau, Switzerland).

The reference concentration data is expressed as the % of the label claim of each analyte.

2.4. NIR spectra

Samples were previously ground and the resulting fine powder placed in the cell of the reflectance module to record triplicate spectra over the wavelength range 1100–2498 nm, using 32 scans per spectrum and turning over the mass after each measurement. The average spectrum from each triplicate recording was processed chemometrically to identify and quantify the active principles in the pharmaceutical preparation. A reference spectrum was recorded for a ceramic plate prior to measuring each sample. On a periodic basis, the equipment was checked by using a set of standards certified by the National Institute of Standards and Technology (NIST) spanning the reflectance range 2–99%.

Fig. 1 shows the spectra for the five individual active principles, the pharmaceutical preparation and the major excipient.

2.5. Data processing

The spectral pretreatments tested with a view to constructing the calibration models included the first and second derivative, and the standard normal variate (SNV). First and second spectral derivatives were obtained by applying the Savitzky–Golay algorithm to 11 moving window points and a second-order polynomial.

The pharmaceutical preparation was identified by comparison against a spectral library, using the correlation coefficient as discriminating criterion. Sample spectra were compared with the average spectrum defining each class; if the resulting correlation coefficient exceeded the preset threshold, then the sample in question was deemed positive.

The models used to determine the pharmaceutical components were constructed by partial least-squares regression (PLS1), using the leave-one-one method for cross-validation. The number of PLS factors used was that resulting in a minimum in the plot of variance accounted for against number of factors.

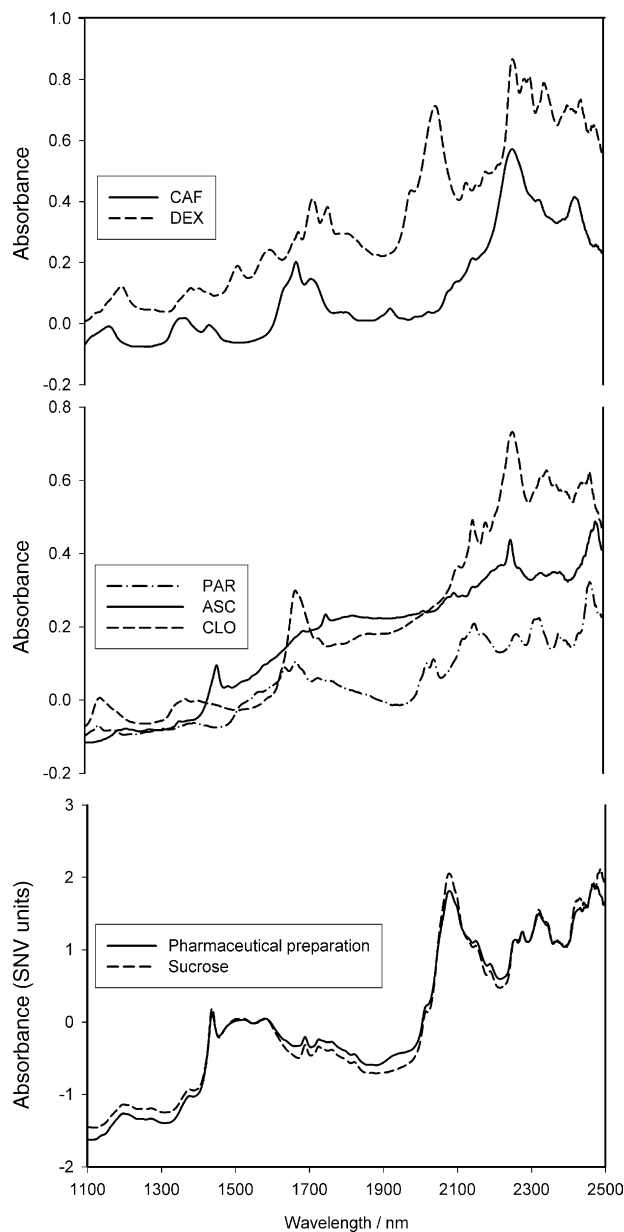


Fig. 1 – NIR spectra for the pharmaceutical, its five active principles and the sucrose.

Calibration and prediction quality were assessed in terms of the relative standard error:

$$\text{RSE (\%)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{pred}} - Y_i^{\text{ref}})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{\text{ref}})^2}} \times 100 \quad (1)$$

where n denotes the number of samples, Y^{ref} the concentration provided by the reference method and Y^{pred} that obtained with the NIR method.

3. Results and discussion

Calibration models were constructed by using both production and laboratory samples. The former encompassed the usual

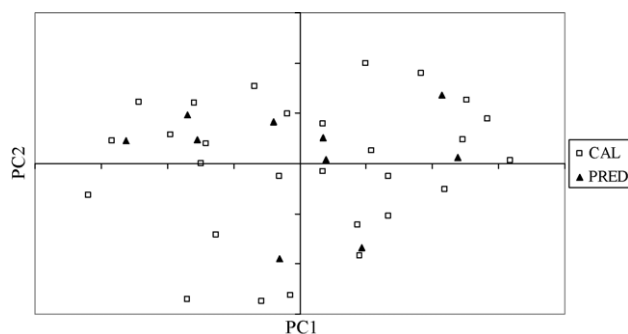


Fig. 2 – PCA scatter plot with the selected calibration and prediction sets.

variability in the pharmaceutical preparation from the production process (viz. differences between batches, granulation and dryness) and the latter the concentration range required to obtain accurate validation models. Samples from 30 different production batches and 60 laboratory made samples were used for this purpose. The sample set was split into two subsets, namely: a calibration set that was used to construct the model and a validation set that was employed to estimate its predictive ability. The samples for the calibration and prediction sets were chosen from the scatter plot of PC2 versus PC1 scores – the variance accounted for by the first two factors was 79.9% and 12.4%, respectively – obtained by PCA of the first-derivative spectra for the whole sample set. The selection of the CAL/PRED sample sets for the development of PAR model is shown in Fig. 2. The calibration set encompassed the maximum spectral variability observed in the scores plot and the whole concentration range for each analyte. The number of samples of each type used with each model varied depending on the individual concentrations of the analytes in the samples and on the need to span the concentration range for each. This strategy was followed for the rest of APIs.

The spectrum for the pharmaceutical preparation was highly similar to that for the major excipient; this is con-

sistent with the low concentrations of the active principles. Fig. 1 shows the spectral differences between the pharmaceutical and excipient; as can be seen, the active principles contributed little to the spectral signal. The strongest bands were a tone combination at ca. 2100 nm and the first overtone, at ca. 1450 nm, for the O–H group in the major excipient.

Each calibration model was constructed using the sample set selected via a PCA scatter plot. The development of a model consisted in check different spectral pretreatments, as well as its combination with different spectral ranges. Both the whole spectral range and specific spectral regions containing strong bands for the five analytes, and the SNV and first- and second-derivative spectral treatments, were tested with a view to constructing the calibration models. Once the calibration model was defined, its predictive ability was tested using the sample set not used during its development. The calibration models used were chosen in terms of predictive ability as reflected in their calibration and prediction errors (%RSE). Table 2 summarizes the features of the five models selected.

The low concentrations of some analytes made it difficult to construct their models; this was particularly so with CLO. Also, the poor homogeneity of some laboratory samples and the low concentrations of the active principles in them led to their detection as outliers in constructing the models; such samples were therefore excluded from the calibration set.

The number of PLS factors used to construct each quantitation model increased with decreasing analyte concentration; thus, the CLO model required 10 factors. The predictive ability of the models is clearly reflected in the predicted results for doped and production samples (see Table 2): the RSEC and RSEP values never exceeded the acceptance threshold (5%).

3.1. Validation

New analytical methods must be validated prior to use by the pharmaceutical industry. The proposed NIR method was validated in accordance with the ICH, EMEA and PASG guide-

Table 2 – Figures of merit of the models for the determination of the five active principles

	PAR	ASC	DEX	CAF	CLO
Label content values (wt.%)	6.50	2.50	0.20	0.15	0.04
Spectral mode	First derivative	Second derivative	Second derivative	First derivative	First derivative
Spectral range (nm)	1100–2350	1100–1900	1100–2350	1100–2350	1600–2300
No PLS factors	4	5	5	6	10
Calibration set					
No of samples					
Laboratory	37	34	20	27	28
Production	3	3	3	3	3
Concentration range (%)	73.9–137.1	67.1–150.0	79.0–126.3	64.4–127.0	64.5–149.2
RSEC (%)	2.7	3.6	1.7	4.3	4.2
Prediction set					
No of samples					
Laboratory	8	10	7	7	5
Production	33	33	33	33	33
Concentration range (%)	80.8–120.1	79.6–122.9	80.4–118.2	80.9–119.3	80.5–117.3
RSEP (%)	2.2	2.7	3.3	2.1	3.4
Bias (%)	0.6	0.0	0.3	0.3	–0.6

lines by assessing its selectivity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) and robustness. The characteristics of this method dispensed with the need to determine its limits of detection and quantitation.

3.1.1. Selectivity

In contradistinction to other analytical techniques, this concept is applied to a NIR method in a different way; selectivity requirements have been studied and solved in the NIR specific guidelines (Broad et al., 2002). The selectivity of a NIR method is established by the use of spectral libraries which allow the identification of the pharmaceutical preparation as a combination of APIs and excipients, not to the analyte separated.

The spectral library was developed containing the spectra for samples from 15 production samples. This amount of samples contained the normal variability of the productive process. The correlation coefficient was used as identification criterion, the second-derivative as spectral pretreatment and the wavelength range 1100–2200 nm as spectral region of interest.

The threshold for positive identification of the pharmaceutical preparation was set at 0.98, which allowed the pharmaceutical preparation to be identified as such and distinguished from the other components (both the active principles and the excipients). The selectivity of the library was assessed with external samples not used in its development. All the production samples studied were positively identified. Also, the active principles and excipients were correctly discriminated with identification values below the threshold. Table 3 shows the quality of the identification and the differenti-

Table 3 – Identification of the pharmaceutical preparation and its components

Compound	Coefficient correlation
Pharmaceutical preparation	0.99
Sucrose	0.97
Paracetamol	0.11
Ascorbic acid	−0.07
Dextrometorphan HBr	−0.01
Caffeine	0.09
Clorpheniramine maleate	0.05
Threshold 0.98 (positive identification: Id results > 0.98).	

ation between other analytes, and the coefficient of correlation values provided by the library. The analysis routine established excludes the quantitation of negatively identified samples.

3.1.2. Linearity and range

Linearity is usually assessed from a signal versus concentration plot. Because multivariate calibration methods do not allow this type of plot to be obtained, we used a NIR value versus reference value plot instead. The method would be linear if the NIR method provided the same results as the reference method for a sample set spanning the preset concentration range. This would be the case if the regression of the line for the NIR versus reference plot had – or statistically contained – a unity slope and a zero intercept. Linearity was evaluated simultaneously with the range it encompassed; the samples

Table 4 – Results obtained in the validation of the models

Parameter	Component	PAR	ASC	DEX	CAF	GLO	
Linearity	Label content values (wt.%)	6.50	2.50	0.20	0.15	0.04	
	<i>n</i>	10	12	9	9	9	
	Concentration range (%)	80.8–120.1	79.6–122.9	80.4–118.2	80.9–119.3	80.5–117.3	
	Intercept	0.06 ± 15.80	1.67 ± 11.00	3.39 ± 23.80	−4.99 ± 14.80	−3.37 ± 32.44	
	Slope	1.00 ± 0.15	0.99 ± 0.11	0.96 ± 0.24	1.05 ± 0.15	1.03 ± 0.32	
Accuracy	<i>R</i>	0.984	0.988	0.962	0.987	0.945	
	<i>n</i>	10	12	9	9	9	
	Average difference (%)	−0.18	1.09	−0.14	0.26	−0.16	
	S.D.	2.17	2.10	3.42	2.15	3.71	
	<i>t</i> Experimental	0.26	1.79	0.13	0.36	0.13	
Repeatability	<i>t</i> Tables	2.26	2.20	2.31	2.31	2.31	
	Mean NIR (%)	100.7	100.6	102.4	100.2	100.4	
	RSD (%)	1.8	2.4	2.2	2.6	3.0	
	Intermediate precision	Day					
		<i>F</i> experimental	0.11	0.24	4.98	2.58	0.01
<i>F</i> tables		19.00	19.00	19.00	19.00	19.00	
Analyst							
<i>F</i> experimental		0.16	1.43	3.25	0.42	1.94	
Robustness	<i>F</i> tables	18.51	18.51	18.51	18.51	18.51	
	RSD (%)	1.7	2.6	2.3	2.0	3.5	
	<i>n</i>	25	25	25	25	25	
	<i>t</i> Experimental	1.82	1.94	1.02	0.37	0.83	
	<i>t</i> Tables	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	

used were confirmed to span a range at least 80–120% around the nominal concentration of each analyte.

Linearity was assessed by analysing at least nine samples at a minimum of five different concentration levels spanning a range of $\pm 20\%$ around the nominal value for the five active principles. The slope and intercept of the regression line contained the values 1 and 0, respectively, at the 95% confidence level, so they met the criteria for evaluating linearity over the concentration ranges examined with the five quantitation models. Table 4 shows the linearity results and linear range obtained.

3.1.3. Accuracy

The accuracy of the proposed method was taken to be the closeness of agreement between the reference and NIR values and assessed on samples spanning a range $\pm 20\%$ around the nominal value for each active principle. To this end, the results obtained with the NIR method were compared with those provided by the reference method via a *t*-test for residuals. The test confirmed the absence of significant differences between the two methods with the five quantitation models; in fact, t_{exp} was less than t_{tab} (at the 95% level) for the five analytes. Table 4 shows the accuracy results.

3.1.4. Precision

3.1.4.1. *Repeatability*. The repeatability of the proposed method was assessed by having the same analyst apply it to the same production sample six times on the same day. Table 4 shows the coefficients of variation thus obtained. The highest relative standard deviation (RSD%) was that for CLO, 3%, and but still lower than the widely accepted 5% for this type of determination.

3.1.4.2. *Intermediate precision*. This parameter was determined by having two analysts analyse the same production sample on three different days. A two-way (analyst and day) ANOVA revealed that neither was significant – at the 95% level – for any of the quantitation models used. Table 4 shows the results. Again, the highest RSD was that for CLO (3.5%).

3.1.5. Robustness

The robustness of the proposed method was evaluated from the results provided by the NIR and reference methods for 25 production samples analysed over a period of 1 year. During that time, the sample preparation procedure was subject to the typical variability in laboratory conditions (temperature, moisture, measuring procedure, sample powdering, instrument aging). Table 4 shows the results of a *t*-test for differences. As can be seen, there were no significant differences between the proposed and reference methods: all t_{exp} values were smaller than their t_{tab} counterparts at the 95% confidence level.

4. Conclusions

A NIR method was developed that allows a pharmaceutical preparation to be identified and its five active principles accurately, precisely, expeditiously determined with minimal sample treatment.

Because the concentrations of the five active principles span a wide range, the calibration model must be constructed by using an experimental sample preparation design minimizing correlation between components of the samples.

NIR spectroscopy provides major advantages over conventional methods – HPLC plus titration in this case – including simplified analytical procedures, the need for no reagents and the production of no polluting waste. This results in substantial money and time savings. The only sample pre-treatment required is grinding to ensure correct proper homogeneity.

The proposed method was validated in accordance with the ICH and EMEA guidelines and found to be an effective alternative to existing choices.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project BQU2003-04247.

REFERENCES

- ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. <http://www.ich.org/ich5q.html>.
 Note for guidance. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. February 2003. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf>.
<http://www.foss.es>.
 Blanco, M., Villarroya, I., 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC* 21, 240–250.
 Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., De la Pezuela, C., 1998. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst* 123, 135R–150R.
 Broad, N., Graham, P., Hailey, P., Hardy, A., Holland, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N., Warren, P., 2002. Pharmaceutical applications, guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry. In: Chalmers, J.M., Griffiths, P.R. (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, vol. 5. Wiley, Chichester, UK, pp. 3590–3610.
 Buckton, G., Yonemochi, E., Hammond, J., Moffat, A., 1998. The use of near infra-red spectroscopy to detect changes in the form of amorphous and crystalline lactose. *Int. J. Pharm.* 168 (2), 231–241.
 Frahnert, C., Rao, M.L., Grasmader, K., 2003. Analysis of 18 antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *J. Chromatogr. B* 794, 35–47.
 Laasonen, M., Harmia-Pulkkinen, T., Simard, C., Räsänen, M., Vuorela, H., 2003. Development and validation of a near-infrared method for the quantitation of caffeine in intact single tablets. *Anal. Chem.* 75, 754–760.
 Quaglia, M.G., Donati, E., Fanali, S., Bossu, E., Montinaro, A., Buiarelli, F., 2005. Analysis of diltiazem and its related substances by HPLC and HPLC/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (4), 695–701.
 Ramirez, J.L., Bellamy, M.K., Romanach, R.J., 2001. A novel method for analyzing thick tablets by near infrared spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2 (article 11).
 Sun, S., Du, D., Zhou, Q., Leung, H.W., Yeung, H.W., 2001. Quantitative analysis of rutin and ascorbic acid in

- compound rutin tablets by near-infrared spectroscopy. *Anal. Sci.* 17 (Suppl.), 455-458.
- Thomas, B.R., Fang, X.G., Shen, P., Ghodbane, S., 1994. Mixed ion pair liquid chromatography method for the simultaneous assay of ascorbic acid, caffeine, chlorpheniramine maleate, dextromethorphan hydrobromide hydrate and paracetamol in Frenadol sachets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 85-90.
- Webster, G.K., Farrand, D.A., Johnson, E., Litchman, M.A., Broad, N., Maris, S., 2003. Use of near-infrared spectrometry for quantitative determinations of selamectin and moisture in topical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 21-32.

ANEXO 5

DETERMINATION OF ACTIVE PRINCIPLE INGREDIENT AND PRESERVATIVES IN A HYDROGEL PHARMACEUTICAL PREPARATION BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

Marcelo Blanco and Manel Alcalà

En preparación

Determination of Active principle ingredient and preservatives in a hydrogel pharmaceutical preparation by near infrared spectroscopy

M. Blanco* and M. Alcalà

Department of Chemistry, Analytical Chemistry Unit, Faculty of Science, Autonomous University of Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

* Corresponding author. Tel. and fax: +34 93 581 1367; E-mail: marcel.blanco@uab.es

ABSTRACT

Se ha desarrollado y validado un método NIR para la determinación simultánea del principio activo Ketoprofeno y los conservantes p-hidroxibenzoato de metilo y de propilo en un preparado farmacéutico en forma de gel. La cuantificación de los tres analitos se realiza mediante modelos de calibración Partial Least Squares. La identificación previa de la muestra se realiza mediante una biblioteca espectral. El método desarrollado es una clara alternativa al método HPLC actualmente utilizado, debido a la disminución en tiempo y coste por análisis.

KEYWORDS: Near Infrared Spectroscopy, pharmaceutical preparation, active principle ingredient, preservative, PLS, validation.

INTRODUCCIÓN

La determinación multiparamétrica ocupa un lugar preferencial en la industria farmacéutica. Los requisitos que debe cumplir necesariamente un determinado preparado farmacéutico antes de su liberación al mercado, pueden ser múltiples y de distinto tipo. La no conformidad de cualquiera de estos requisitos impide la comercialización de los lotes analizados y repercute negativamente en la productividad de la empresa. Es por ello que la tendencia actual consiste en certificar la calidad del proceso de producción en todas sus etapas, para así asegurar la calidad final de producto acabado y no al revés. Este objetivo es la base de las *Process Analytical Technologies*.

Muchos preparados farmacéuticos contienen, además del principio activo, conservantes cuya función es preservar alguno de los componentes de la formulación ante una posible descomposición. Uno de los conservantes utilizados en formulaciones farmacéuticas son los Parabenos. Corresponden a ésteres del ácido para-hidroxibenzoico con metanol, etanol o propanol. Su principal ventaja es que, al no tener grupos fácilmente ionizables, su comportamiento es prácticamente independiente del pH en un rango muy amplio. Los parabenos son conservantes efectivos frente a mohos y levaduras, y bastante menos frente a bacterias. Su actividad conservante aumenta con la longitud de la cadena, disminuyendo a la vez la solubilidad, aunque su efecto concreto depende del tipo de microorganismo. Comparativamente, el metil parabeno es más eficaz contra mohos, mientras que el propil parabeno lo es contra levaduras [1]. La introducción en el organismo de elevadas dosis de parabenos puede ser perjudicial y es por ello que su concentración en los preparados farmacéuticos debe ser baja.

¹ <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/conservantes.html>

En muchas ocasiones, los métodos utilizados en el control analítico de productos farmacéuticos conllevan procedimientos largos y tediosos, e implican la utilización de reactivos y disolventes. La obtención del resultado analítico puede no ser inmediata, lo cual impide poder tomar decisiones rápidas para el control del proceso. La Espectroscopia NIR ha sido utilizada con éxito previamente en el desarrollo de métodos analíticos rápidos, exactos y precisos para la industria farmacéutica. La adaptabilidad de la técnica y del procedimiento de cálculo que hay tras de ella, permite resolver casi cualquier analítica industrial. Prácticamente no es necesario un pretratamiento de la muestra, con lo que el resultado analítico se consigue en breves segundos con un mínimo esfuerzo por parte del analista.

Se plantea la posibilidad de desarrollar un método NIR para determinar simultáneamente el principio activo y dos conservantes presentes en un preparado farmacéutico en forma de gel. La concentración del activo en la formulación es relativamente alta, mientras que los conservantes se encuentran a muy baja concentración. Se ensayaron modelos de calibración multivariable *Partial Least Squares* (PLS) para la cuantificación de los analitos.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Muestras

El gel analizado contiene Ketoprofeno como principio activo (KET, 25 mg·g⁻¹), p-hidroxibenzoato de metilo (MET, 0.8 mg·g⁻¹) y propilo (PRO, 0.2 mg·g⁻¹) como conservantes, agua y etanol como excipientes mayoritarios (> 950 mg·g⁻¹). Se disponían 30 muestras correspondientes a 10 lotes de producción distintos.

El rango de concentraciones de cada analito en las muestras de producción solamente un ±5% alrededor del valor nominal. Este rango no es suficiente para desarrollar modelos de calibración adecuados. Por ello, se prepararon 33 muestras sintéticas en el laboratorio para ampliar hasta un ±20% la concentración nominal de Ketoprofeno y conservantes. La distribución de las concentraciones de los 3 analitos en estas muestras se estableció tratando de reducir la correlación de las concentraciones entre pares de analitos.

Espectros NIR

Los espectros NIR fueron registrados en modo transreflectancia con un espectrofotómetro NIRSystems 5000 de la marca FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD, USA) equipado con un módulo Rapid Content Analyzer (RCA). Los espectros NIR se registraron colocando unos 5 gramos de muestra en una cubeta de cuarzo, encima de la cual se deposita el reflector de oro fijando un camino óptico de 0.5mm. Antes de analizar cada muestra, se registró una referencia sin colocar muestra en la cubeta. Cada espectro NIR fue obtenido por triplicado removiendo el gel entre cada medida. El intervalo espectral fue 1100-2498 nm con una resolución de 2 nm, realizando 32 scans por espectro. El espectro promedio de cada muestra ha sido el utilizado en todos los cálculos.

Método referencia HPLC

La determinación del principio activo Ketoprofeno y los conservantes p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo mediante el método de referencia se realizó con un cromatógrafo HPLC Agilent equipado con una columna Spherisorb S5 ODS2 y un detector PDA-UV ($\lambda=258$ nm). Cantidades apropiadas de muestra se analizaron utilizando como fase móvil una mezcla de tampón y acetonitrilo (60:40%v/v). El área de pico de cada analito se interpoló en una recta de calibración obtenida de disoluciones estándar.

Procesamiento de datos

The chemometric software used was Unscrambler v. 9.1. First- and second-derivative spectra were obtained by using the Savitzky–Golay algorithm with an 11-point moving window and a second-order polynomial. Partial Least Squares 1 (PLS1) calibration models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The quality of the models was assessed in terms of the relative standard errors of calibration (%RSEC) and prediction (%RSEP). The number of PLS factors required to define the model was chosen from the minimum of a plot of RSEP vs. number of factors.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros NIR del preparado farmacéutico, principio activo y sus conservantes se muestran en la figura 1. El espectro del preparado farmacéutico se caracteriza por poseer dos bandas anchas e intensas a 1470 y 1910 nm, correspondientes al primer sobretono y a la banda de combinación del enlace OH. El agua es el excipiente mayoritario y se encuentra a una concentración del 54% m/m y es por ello que sus bandas más características sean las predominantes en el espectro del preparado farmacéutico, tal como se puede comprobar de su espectro. Se observan otras bandas en la zona de 2300 nm correspondientes a la presencia de Etanol (42% m/m). Las bandas más significativas del principio activo y conservantes (parte superior figura 1) se encuentran entre 1500-1800 nm y también entre 2000-2500 nm. Nótese

la elevada similitud espectral de los dos conservantes, entendible ya que ambos se diferencian únicamente por un enlace de etileno.

Dada la baja concentración a la que se encuentran los conservantes y su elevada semejanza espectral, el desarrollo de los modelos de calibración para su cuantificación requiere un preciso trabajo de diseño y selección de muestras, pretratamiento espectral y selección del intervalo de longitudes de onda. Es por ello que durante la etapa de preparación de las muestras de laboratorio, que cubren el rango de concentraciones deseado, se minimizó la correlación de concentraciones entre pares de analitos. La selección de los conjuntos de muestras para calibración y predicción, necesarios para el desarrollo del modelo de calibración para cada analito (KET, MET y PRO), se hizo mediante un gráfico de scores (PC2 vs PC1) de un Análisis en Componentes Principales (PCA) de los espectros en 2ª derivada en el intervalo espectral completo (1100-2500nm) correspondientes a las muestras preparadas en el laboratorio. El criterio para realizar esta selección consistió en recoger tanto la máxima variabilidad espectral como cubrir el rango de concentraciones completo. Para cada analito se crearon dos conjuntos de muestras y su uso durante el desarrollo de los modelos fue independiente, es decir, las muestras de predicción no fueron utilizadas para el desarrollo de los modelos sino para evaluar la capacidad predictiva de los mismos.

Los primeros modelos ensayos se realizaron para la cuantificación del activo utilizando únicamente muestras sintéticas de laboratorio en el conjunto de calibración. Se obtuvieron modelos utilizando los distintos pretratamientos espectrales habituales (SNV y Derivadas). Dada la elevada concentración a la que se encuentra el activo, no fue difícil encontrar un modelo de calibración con cualquiera de los pretratamientos espectrales, así como con el intervalo espectral completo o reducido (únicamente bandas más significativas del activo). Cualquiera de los modelos ensayados poseía una correcta capacidad predictiva en muestras sintéticas utilizando tan solo hasta un único factor PLS, mostrando unos errores de predicción

inferiores al 2%. Sin embargo, la predicción de muestras de producción con estos modelos no fue satisfactoria, y en todos los casos se observó un error sistemático, debido principalmente a que estos modelos no incluyen la variabilidad debida al proceso de producción. Si observamos la figura 2, se muestra un gráfico de scores de un PCA de los espectros en 2ª derivada del intervalo espectral 1600-1800 y 2100-2300nm de dos conjuntos de muestras (laboratorio y producción). Las muestras de laboratorio cubren el rango de completo concentraciones del activo (12-36 mg·g⁻¹), mientras que la concentración de las de producción es de 24 mg·g⁻¹. Se observa como ambos conjuntos están claramente separados y es la mayor fuente de variabilidad espectral (PC1 - 91%). Las muestras se ordenan según su concentración de activo a lo largo del 2º PC (6%). Esta diferencia espectral entre ambos tipos de muestra es la razón principal por la cual los modelos de calibración construidos con muestras sintéticas no predicen correctamente muestras de producción. Los resultados obtenidos para los modelos de los conservantes, utilizando solo muestras de laboratorio en calibración, fueron muy similares y se obtuvieron errores sistemáticos en la predicción de muestras de producción. Es necesario por lo tanto incluir muestras de ambos tipos en los conjuntos de calibración para los tres analitos (KET, MET y PRO).

Una correcta selección de los intervalos espectrales permite obtener modelos de calibración más simples (menor número de factores PLS) con mejor capacidad predictiva (más robustos). Se utilizó el criterio de Jack-Knife para encontrar qué intervalos espectrales son los más apropiados para construir los modelos. Los resultados más significativos de los modelos ensayados para la determinación de los tres analitos se muestran en la Tabla 1. El pretratamiento espectral que mejores resultados ofreció fue la 2ª derivada en todos los casos. El criterio de Jack-Knifing sugirió la utilización de los intervalos espectrales citados en la tabla. Si comparamos estos intervalos con los espectros de los analitos puros de la Figura 1, observamos como la selección espectral coincide con las bandas más significativas de los tres

analitos. El número de factores PLS necesario para establecer el modelo aumenta a medida que disminuye la concentración del analito, necesitando hasta 4 factores para el PRO. El número de muestras de laboratorio y producción es variable según el modelo ensayado. Los errores de predicción son inferiores al 5%.

Validación del método

El método NIR propuesto para la determinación simultánea del principio activo Ketoprofeno (KET), p-hidroxibenzoato de metilo (MET) y p-hidroxibenzoato de propilo (PRO) ha sido validado utilizando las guías ICH y EMEA, evaluando la selectividad, linealidad, exactitud, precisión (repetitividad y precisión intermedia) y robustez.

Selectividad

La selectividad del método se establece mediante una identificación de la muestra previo a la cuantificación de los analitos. Dicha identificación se realiza mediante la utilización de una biblioteca espectral que contiene 22 espectros del preparado procedentes de 7 lotes de producción. Se utilizó el coeficiente de correlación como criterio de identificación, la segunda derivada como pretratamiento espectral en el intervalo espectral completo (1100 – 2498 nm). El *threshold* se estableció en 0.85, el cual permite identificar correctamente el preparado farmacéutico sin ambigüedades.

La selectividad de la biblioteca fue evaluada analizando muestras externas a su construcción. Todas las muestras de producción analizadas fueron identificadas positivamente. Cualquiera de los componentes puros del preparado son correctamente discriminados con valores de identificación inferiores al *threshold*. La Tabla 2 muestra los valores de identificación obtenidos. La rutina de análisis establecida implica que una muestra identificada negativamente no puede ser cuantificada.

Linealidad y Rango

La validación del parámetro de linealidad en métodos de calibración multivariados no puede ser llevada a cabo mediante un gráfico de Señal *vs.* Concentración. Es necesario realizar una representación de los valores NIR obtenidos por el nuevo método frente a los valores de la metodología de Referencia (HPLC). El parámetro de linealidad se cumple si el método NIR propuesto aporta resultados estadísticamente iguales a los del método de referencia para un conjunto de muestras que cubran el rango de concentraciones seleccionado. La regresión de los valores obtenidos por espectroscopia NIR *vs.* Valores de Referencia debe tener pendiente unidad e intercepto cero, o estadísticamente contenerlos. A la vez se evalúa el rango, certificando que las muestras analizadas cubren como mínimo el 80-120% respecto la concentración nominal de cada analito.

La linealidad fue evaluada analizando un mínimo de 9 muestras en al menos 5 niveles de concentración distintos, que cubrían el $\pm 20\%$ del valor nominal para los 3 analitos. La pendiente y la ordenada en el origen de la regresión lineal no son significativamente distintos de 1 y 0 (95 % de significación), cumpliéndose los criterios establecidos para evaluar la linealidad en el rango de concentraciones estudiado de los tres modelos de cuantificación. La Tabla 3 muestra los resultados de linealidad y rango obtenidos.

Exactitud

La exactitud del método se puede expresar como *the closeness of agreement between the Reference and NIR values*. La exactitud fue evaluada mediante muestras que cubrían el $\pm 20\%$ del valor nominal para los tres analitos. Se compararon los resultados obtenidos por el método NIR con los valores de referencia mediante un test-t de los residuales. Se confirma que no existen diferencias significativas entre los dos métodos en ninguno de los tres modelos de

cuantificación, siendo los valores de t_{exp} inferiores a las t_{tab} (95 % de significación) para los tres analitos. La Tabla 3 muestra los resultados de exactitud obtenidos.

Precisión

-Repetibilidad

La repetibilidad del método fue evaluada analizando seis veces una misma muestra de producción por el mismo analista en el mismo día. En la Tabla 3 se muestran los CV (%) obtenidos, inferiores a 5.9%.

-Precisión intermedia

Este parámetro fue evaluado analizando una muestra de producción por dos analistas durante tres días. Un ANOVA de dos factores (analista y día) revela que ningún factor es significativo en ninguno de los modelos de cuantificación (95% de significación). La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

Se observa como la precisión del método disminuye a medida que lo hace la concentración del analito, llegando a obtener un 6% de CV en el PRO. Dada la baja concentración de los analitos MET y PRO, sus valores de CV% son aceptables.

Robustez

Se ha evaluado la robustez a partir de los resultados obtenidos de 25 lotes de producción analizados durante un año, y comparándolos con el método de referencia. Durante éste período de tiempo, el proceso de preparación de la muestra ha experimentado las variaciones normales de un laboratorio (temperatura, humedad, modo de medida, pulverización de la muestra, envejecimiento del instrumento, etc). En la Tabla 3 se muestra un test-t de las

diferencias. Se confirma que no existen diferencias significativas entre los dos métodos, siendo todas las t_{exp} inferiores a las t_{tab} (a un 95% de significación).

Los resultados obtenidos de la validación del método propuesto confirman su calidad para el propósito establecido.

CONCLUSIONES

El desarrollo de modelos de calibración correctos requiere que todas las etapas involucradas se ejecuten adecuadamente. Cuando el propósito de los modelos es la cuantificación simultánea de varios analitos, que se encuentran en muy baja concentración, el trabajo debe ser aún más preciso. Las muestras que se han preparado en el laboratorio, que conforman los modelos de calibración desarrollados, han sido preparadas tratando de minimizar las correlaciones de concentración entre pares de analitos. La variabilidad debida al proceso de producción debe ser introducida en los conjuntos de calibración. De ese modo, la predicción de muestras de producción es correcta y no se observan errores sistemáticos. La selección de un correcto intervalo espectral es un punto clave en el desarrollo de los modelos cuando los analitos a cuantificar tienen una elevada similitud espectral. El método desarrollado permite la determinación simultánea del principio activo y los conservantes presentes en la formulación farmacéutica analizada. El método NIR ha sido validado utilizando las guías ICH y EMEA.

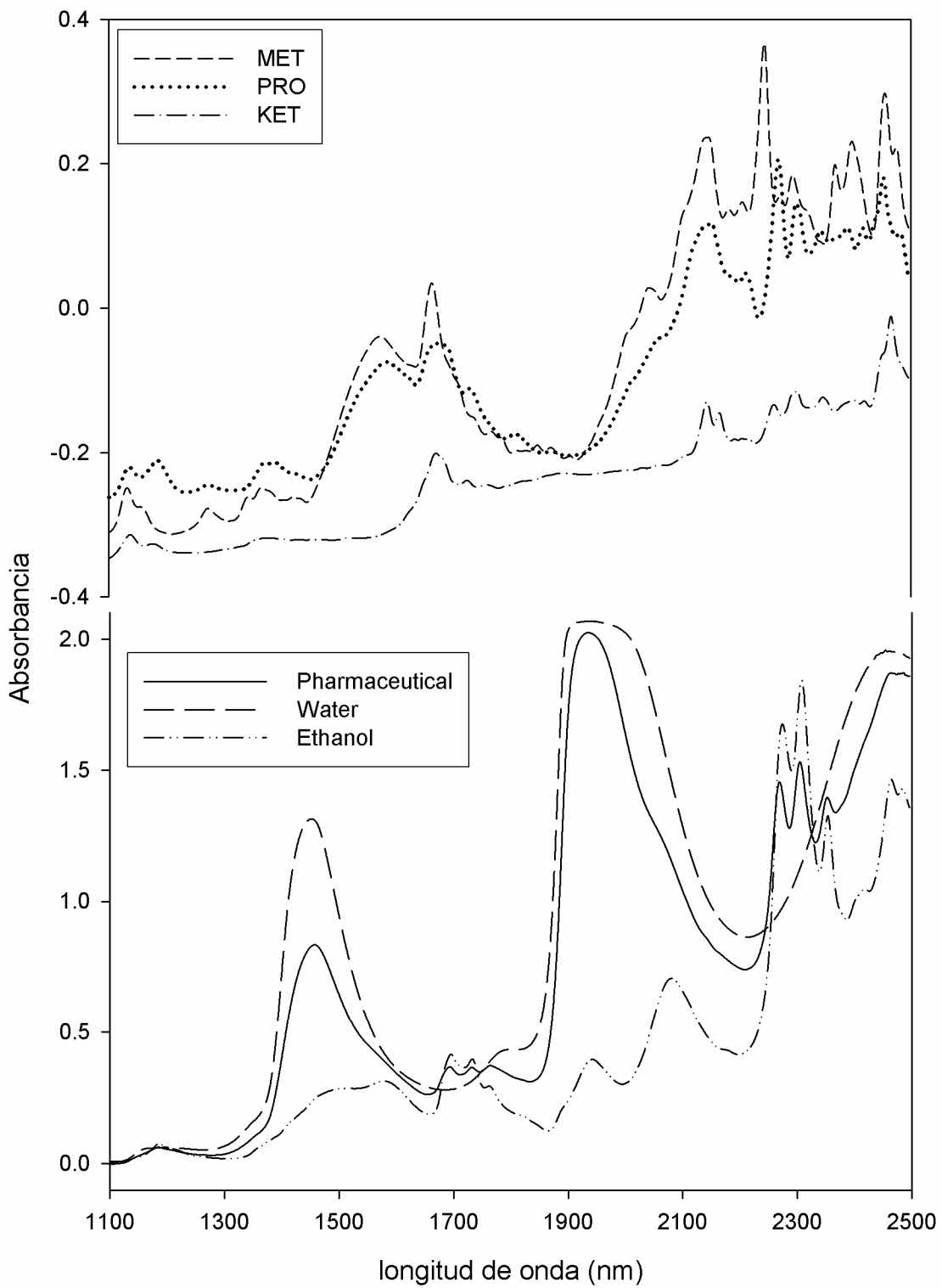


Figura 1. Espectros NIR en modo Absorbancia del principio activo, los conservantes, agua, etanol y del preparado farmacéutico.

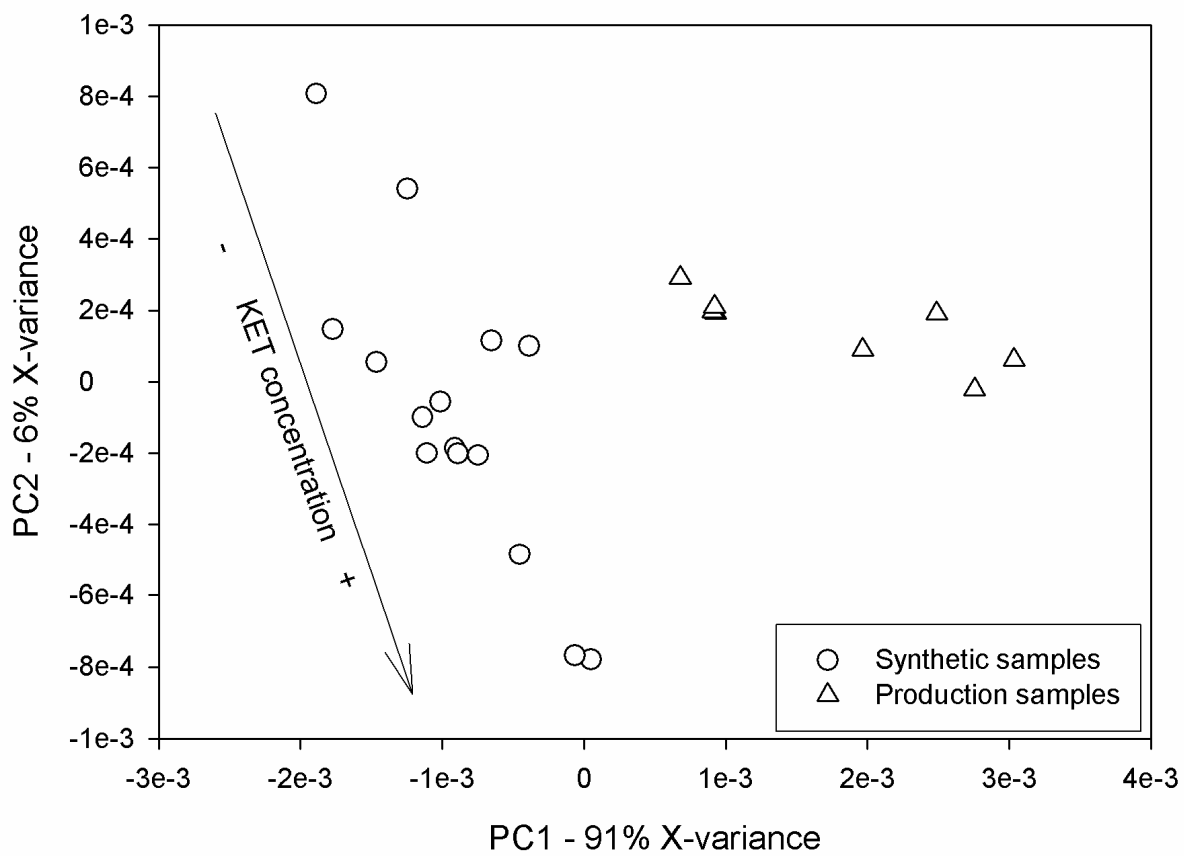


Figure 2. PCA score plot from 2nd Derivative NIR spectra of synthetic and production samples.

Tabla 1. Características de los modelos de calibración para la cuantificación del principio activo (KET, Ketoprofeno) y los conservantes (MET, p-hidroxibenzoato de metilo y PRO, p-hidroxibenzoato de propilo).

	KET	MET	PRO	
Modo espectral	2a Der	2a Der	2a Der	
Intervalo espectral (nm)	1638 – 1664 2118 – 2204	1638 – 1678 2118 – 2220	1640 – 1700 2100 – 2200	
Nº factores PLS	2	3	4	
CALIBRACIÓN				
Nº muestras	Laboratorio	19	11	6
	Producción	5	9	8
Rango concentración (mg/g)	12.03 – 35.99	0.443 – 1.219	0.135 – 0.267	
RSEC (%)	1.68	4.22	1.20	
PREDICCIÓN				
Nº muestras	Laboratorio	13	9	7
	Producción	14	14	14
Rango concentración (mg/g)		0.358 – 1.066	0.156 – 0.262	
RSEP (%)	2.74	4.37	4.71	

Tabla 2. Identificación del preparado farmacéutico y de sus componentes.

Compuesto	Coef. Correlación (r)
Preparado farmacéutico	0.99
Ketoprofeno	0.10
p-hidroxibenzoato de propilo	0.50
p-hidroxibenzoato de metilo	-0.11
Etanol	0.68
Agua	0.35
Carbomero	-0.33

Threshold 0.85 (identificación positiva $r > 0.85$)

Tabla 3. Resultados de la validación del método propuesto.

Parámetro	Componente	KET	MET	PRO	
Linealidad	n	13	9	9	
	Rango concentración (mg/g)	14.50 – 36.57	0.358 – 1.066	0.156 – 0.262	
	Ordenada origin	-0.06 ± 0.89	-0.05 ± 0.08	-0.01 ± 0.04	
	Pendiente	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.09	0.96 ± 0.22	
	R	0.999	0.992	0.969	
Exactitud	n	26	19	16	
	Promedio diferencias (mg/g)	-0.025	0.012	0.002	
	SD	0.585	0.028	0.009	
	<i>t</i> experimental	0.217	1.873	0.681	
	<i>t</i> crítica	2.060	2.101	2.131	
Repetibilidad	Promedio NIR (mg/g)	25.11	0.799	1.874	
	CV (%)	1.53	2.79	5.85	
Precisión intermedia	Día	<i>F</i> experimental	15.25	2.15	0.49
		<i>F</i> crítica	19.00	19.00	19.00
	Analista	<i>F</i> experimental	0.55	5.35	0.36
		<i>F</i> crítica	18.51	18.51	18.51
	CV (%)	2.16	3.32	6.03	
Robustez	n	10	10	10	
	<i>t</i> experimental	0.986	0.828	0.517	
	<i>t</i> crítica	2.262	2.262	2.262	

ANEXO 6

NEAR INFRARED SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF POLYMORPHIC TRANSFORMATIONS

Marcelo Blanco, Manel Alcalà, Josep M. González and Ester Torras

Analytica Chimica Acta **567** (2006) 262-268

Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations

Marcel Blanco^{a,*}, Manel Alcalá^a, Josep M. González^b, Ester Torras^b

^a Department of Chemistry, Analytical Chemistry Unity, Faculty of Sciences, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Laboratorios Menarini S.A., c/ Alfons XII, 587, E-08918 Badalona, Barcelona, Spain

Received 14 December 2005; received in revised form 6 March 2006; accepted 9 March 2006

Available online 16 March 2006

Abstract

The potential of near infrared (NIR) spectroscopy for the characterization of polymorphs in the active principle of a commercial formulation prior to and after the manufacturing process was assessed. Polymorphism in active principles is extremely significant to the pharmaceutical industry. Polymorphic changes during the production of commercial pharmaceutical formulations can alter some properties of the resulting end-products. Multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR–ALS) methodology was used to obtain the “pure” NIR spectrum for the active principle without the need to pretreat samples. This methodology exposed the polymorphic transformation of Dexketoprofen Trometamol (DKP) in both laboratory and production samples obtained by wet granulation. No polymorphic transformation, however, was observed in samples obtained by direct compaction. These results were confirmed using X-ray powder diffractometry (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) measurements. Pure crystalline polymorphs of DKP were available in the laboratory but amorphous form was not, nevertheless the developed methodology allows the identification of amorphous and crystal forms in spite of the lack of pure DKP.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Near-infrared spectroscopy; X-ray powder diffractometry; Differential scanning calorimetry; Drugs; Polymorphism; Granulation; MCR–ALS

1. Introduction

Polymorphism is the ability of a substance to exist as two or more crystalline phases that have different arrangements of the molecules in the crystal lattice [1]. Polymorphs can be characterized by comparing specific physico-chemical properties such as melting point or spectrum with those for a standard. However, if the analyte is in a mixture and the technique employed is not selective enough, its direct identification can be complicated. The instrumental techniques most widely used to characterize polymorphs include differential scanning calorimetry (DSC) [2–5], X-ray powder diffraction (XRD) [2–4,6], IR [3], Raman [2,7] and solid-state nuclear magnetic resonance [5] spectroscopies. Some determinations require the joint use of several techniques, which increases costs and analysis times.

Near infrared (NIR) spectroscopy is one of the most salient instrumental techniques that is being increasingly used in combination with, or as replacements for, classical techniques for the monitoring of production processes (Process Analytical Tech-

nologies, PAT) [8]. The simplicity to record the spectra for solid samples without any or minimum pretreatment make it an user friendly technique. The NIR spectrum contains not only chemical, but also physical information, so it can be used to characterize polymorphs [9]. NIR spectroscopy has been used successfully on the characterization of polymorphs from active principle ingredients (APIs) [10,11], demonstrating its capacity in this field.

Amorphous form is a special case of polymorphism, which is characterized for the absence of regular crystal structure. This form can be called pseudo-polymorph because these are not truthful polymorphs. Many compounds of pharmaceutical interest present different polymorphic forms; also, some mechanical, physical and chemical properties of drugs depend on the particular polymorph they contain [12]. Some of the treatments applied to drug ingredients during the production process can induce polymorphic changes and alter the pharmacological properties of the end-product as a result. Two such treatments are granulation and compaction. Granulation improves flow and blend homogeneity, thereby facilitating the high-speed pressing of tablets and ensuring uniform distribution of the drug. Wet granulation, which involves the use of a solvent, can easily induce mutual conversion between polymorphs. Although

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1367; fax: +34 93 581 1367.

E-mail addresses: marcel.blanco@uab.es, iqan8@blues.uab.es (M. Blanco).

the compaction process is assumed to cause no such conversion – excipients are usually softer and thus easier to deform than crystalline drug substances – this is no universal rule [13].

In fact, the NIR spectrum for a mixture of several analytes is the combination of their individual spectral contributions plus their mutual interactions. The typically extensive overlap of NIR bands requires the use of chemometric treatments in order to extract the information of interest. Various chemometric methodologies of the pattern recognition (e.g. SIMCA, Cluster Analysis) and multivariate calibration (e.g. PCR, PLS, ANN) have increasingly been applied to NIR spectroscopic data with a view to obtaining valuable information in a simple and fast manner. Specifically, multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR–ALS) algorithms [14] have been used to monitor production processes without the need of any additional information as they allow one to directly obtain the spectral and concentration profiles for each individual component. By using additional information of both the spectral and concentration types, one can obtain the “pure” spectrum for each mixture component from spectra of the mixture [15].

In this work, NIR spectroscopy has been used to study the API’s polymorphic transformation after compaction or wet granulation step during an industrial drug manufacturing process. To this end, the “pure” NIR spectra for the API present in a pharmaceutical preparation are obtained by the application of the MCR–ALS algorithm. The comparison with reference spectra and the use of classical techniques as DSC and XRD, have been used to identify which polymorphic form is obtained. Davis et al. [3] advance the determination of different glycine polymorphs in simple laboratory-made samples.

1.1. Background on the MCR–ALS algorithm

Multivariate curve resolution (MCR) methodology assumes spectroscopic data to fit a linear pattern conforming to Beer’s law and represented by the following equation:

$$D = CS^T + E$$

where D ($I \times J$) is the experimental data matrix, the rows of which represent spectra in a time sequence; each element d_{ij} in D is the absorbance at wavelength j for the sample withdrawn at time i ; C ($I \times N$) contains the concentration profiles for the absorbing species involved; each element c_{in} in it represents the concentration of analyte n in the sample at time i ; S^T ($N \times J$) contains the spectra for the absorbing species involved; each element s_{nj} in it corresponds to the absorbance of analyte n at wavelength j ; E ($I \times J$) is the residual matrix, which contains all information not explained by C and S^T and is included in D . Matrix D is resolved by using alternating least squares (ALS) methodology. The solution is not unique; in fact, a variety of C and S matrices exist that can be multiplied to obtain D . This is a result of rotational or intensity ambiguity [14]. Correcting these two types of ambiguity entails imposing some constraints, and using both spectral and concentration information about the analytes.

The quality of the results can be assessed in two ways, namely: (a) by comparing the MCR spectra for each species

with a reference standard via their correlation coefficient, r , or (b) from the lack of fit (lof) and explained variance (%Var) for the MCR calculation:

$$\text{lof} = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2}} \times 100, \quad \% \text{Var} = \frac{\sum_i \sum_j \hat{d}_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2} \times 100$$

where d_{ij} are the elements in the original D matrix and \hat{d}_{ij} those in the D matrix obtained from the MCR calculations.

2. Experimental

2.1. Materials

Two crystalline polymorphs (A and B) of the active principle benzeneacetic acid, 3-benzoyl- α -methyl-, (*S*)-, compd. with 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (1:1) (Dexketoprofen Trometamol, DKP) (Fig. 1), microcrystalline cellulose and lactose, all chemically pure. All products were supplied by Laboratorios Menarini SA, Badalona, Spain.

Amorphous pure form of DKP was not commercially available and its preparation was not feasible in the laboratory.

Lactose is used as a filler-binder in the production of tablets by the direct compression method, due to the key property that it is inherently compactable.

Microcrystalline cellulose is usually used as pharmaceutical excipient in processes of wet granulation because improves the tableting characteristics.

2.2. Sample preparation

Each sample contains only one DKP polymorph (A or B) with its respective excipients and was of one of the following three types:

- Laboratory powder samples consisting of a binary mixture of microcrystalline cellulose and DKP spanning the DKP concentration range 10–25% (w/w). Appropriate aliquots of each were subjected to wet granulation. This process was performed stirring manually the powder mixture with water (44% of the total mass). Each wet mixture was dried in a VACIOTEM thermostated vacuum stove (P-Selecta, Abrera, Spain), during 24 h at 50 °C. The granulated solid obtained was ground carefully till fine dust.
- Tablets obtained by direct compaction of a mixture of the active principle and excipients (lactose mainly). The DKP concentration range covered was 14 (± 0.7)% (w/w). The

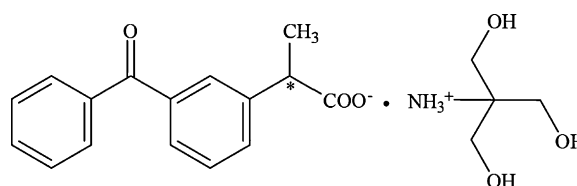


Fig. 1. Dexketoprofen Trometamol molecular structure.

Table 1
Characteristics of the samples used

Sample type	Number of samples	DKP polymorph	DKP concentration range (wt.%)	Placebo
Non-granulated mixtures	4	A	10.0–25.2	Cellulose
	4	B		
Granulated mixtures	4	A		
	4	B		
Compacted tablets	4	A	13.5–14.7	Lactose mainly + excipients
	4	B		
Granulated tablets	4	A	13.3–14.4	Cellulose mainly + excipients
	4	B		

tablets were manufactured at a pilot plant by using a cylindrical cast and a pressure of ca. 550 MPa.

- (c) Tablets obtained by wet granulation of a mixture of the active principle and excipients (microcrystalline cellulose mainly), with a similar DKP concentration range as the previous ones. The resulting granules were compacted similarly as in (b). The tablets containing polymorph A were samples of the commercial product, whereas those containing polymorph B were laboratory-made samples prepared by using a granulation procedure similar to the industrial process.

Table 1 shows the most salient characteristics of these samples.

2.3. NIRS analysis

NIR spectra were recorded on a Model 5000 spectrophotometer from FOSS NIRSystems (Silver Spring, MD) equipped with a rapid content analyzer (RCA) module and governed via the software Vision 2.51, also from FOSS NIRSystems. The NIR spectra for the two sides of each cylindrical tablet were directly recorded from intact samples. The spectra for the powder samples were obtained in triplicate by placing the powder in a quartz cuvette and turning it over between measurements. The spectral range recorded was 1100–2498 nm and resolution 2 nm. Each spectrum was scanned 32 times. All calculations were based on the average spectrum for each sample. A reference spectrum was previously obtained by using the ceramic plate supplied with the spectrophotometer.

2.4. NIR data processing

Experimental data were processed by using the multivariate curve resolution algorithm in PLS Toolbox (Eigenvector Research, Inc., WA) as implemented in the MATLAB environment. The MCR–ALS algorithm affords a high flexibility as it allows one to select specific constraints with a view to finding the best possible solutions. No natural (i.e. negativity, closure or unimodality) constraints were applied, but only equality constraints (viz. the analyte concentrations in the samples and the spectra for the major excipients). MCR–ALS was used to obtain the “pure” spectra of an analyte present in pharmaceutical mixtures.

This algorithm has been applied on raw spectra and also after different pretreatments: standard normal variate (SNV) and Savitzky-Golay derivatives (1stD and 2ndD) performed with 11 points of window width and second order polynomial. Obtained MCR spectra were range-normalized to compare them with the reference spectra.

2.5. XRD and DSC analysis

X-ray diffraction patterns were recorded on a Philips X-Pert spectrometer furnished with a Cu tube and a graphite secondary monochromator to obtain a monochromatic wavelength at 1.5418 Å. Patterns were obtained by scanning the 2θ range from 3° to 30° , using a step size of 0.03° and a step time of 2 s.

Thermograms were obtained by using a DSC STARE System from Mettler Toledo over the temperature range 80–120 °C. The temperature ramp used was 1 or 5 °C/min, depending on the particular sample.

3. Results and discussion

The NIR spectra for the two DKP polymorphs in pure form are very similar throughout the whole spectral range (1100–2500 nm), with the exception of the range 2250–2350 nm, where polymorph A exhibits a single peak whereas polymorph B shows two (see Fig. 2). Both polymorphs spectra were compared by the correlation coefficient. Table 2 shows the correlation between both over the whole and reduced spectral range, as well as after application of the different spectral pretreatments. As can be seen, the correlation coefficient was substantially lower over the range 2250–2530 nm and decreased with increasing spectral derivative order through increased discrimination of the two polymorphs. The comparison with the spectra of amorphous DKP pure form was not possible due to the reasons mentioned in Section 2. All MCR calculations were done using the derivative spectral mode on the reduced wavelength range due to the major spectral differences encountered between both polymorphs. Standard normal variate (SNV) pretreatment is commonly used to minimize the scattering effects of spectra from solid samples. However, SNV pretreatment do not help to differentiate between both polymorphs spectra, so its used was discarded.

Figs. 3 and 4 show the spectra of binary mixtures (cellulose + DKP) and tablets, respectively. As can be seen from Fig. 3,

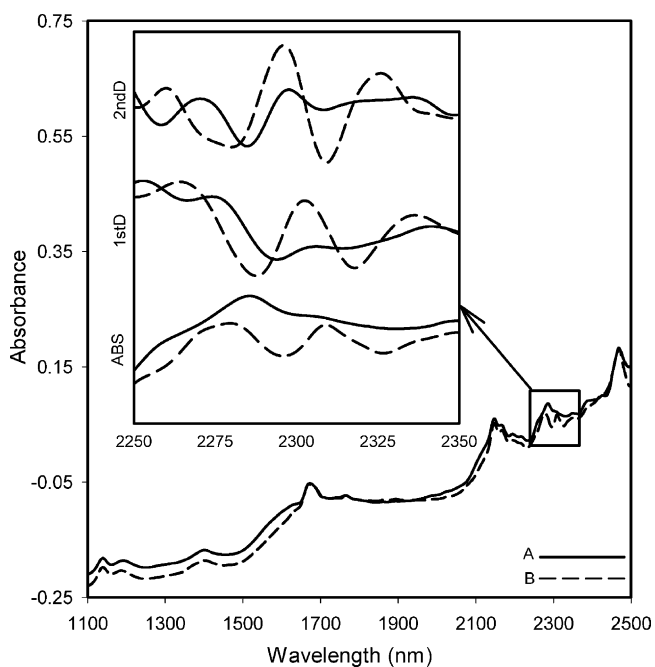


Fig. 2. Absorbance mode NIR spectra for both pure polymorphs (A and B) of Dextketoprofen Trometamol (DKP). Enlarged area in absorbance, 1st and 2nd derivative mode.

Table 2
Correlation coefficients between pure polymorphs (A and B) of Dextketoprofen Trometamol (DKP), on different pretreatment and spectral range

	SNV	1stD	2ndD
1100–2498 nm	0.99	0.91	0.81
2250–2350 nm	0.88	0.64	0.34

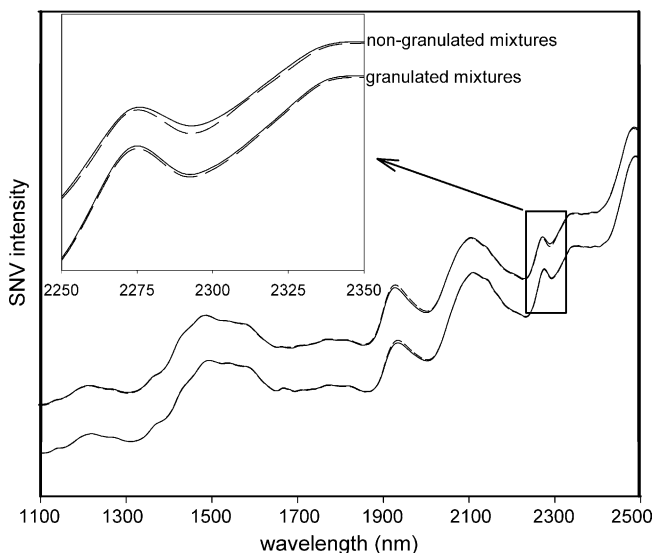


Fig. 3. NIR spectra from binary mixtures (cellulose + DKP), before and after the granulation process (spectra have been displaced for better clarity). Solid lines (—) correspond to mixtures of cellulose and DKP polymorph A. Long dash lines (---) correspond to mixtures of cellulose and DKP polymorph B. The wavelength range where DKP exhibit the most salient spectral differences has been enlarged.

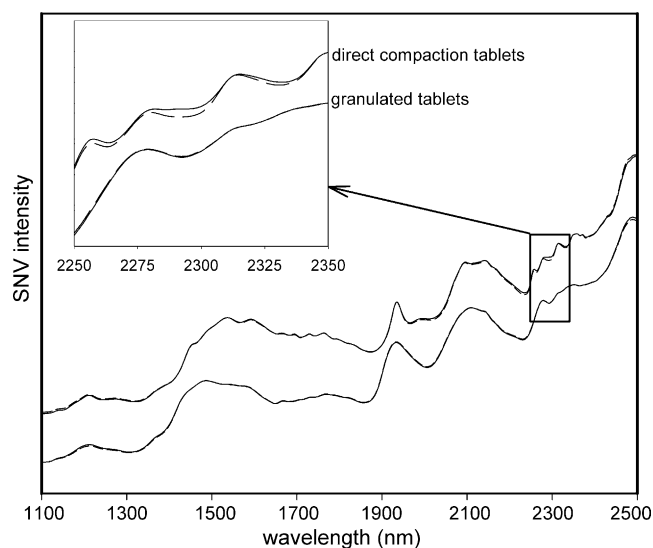


Fig. 4. NIR spectra from tablets obtained by direct compaction or by granulation (spectra have been displaced for better clarity). Solid lines (—) correspond to tablets containing DKP polymorph A. Long dash lines (---) correspond to tablets containing DKP polymorph B. The wavelength range where DKP exhibit the most salient spectral differences has been enlarged.

the spectra of non-granulated mixtures exhibit very low differences at 2300 nm, due to the presence of a different DKP polymorph in the mixture (A or B); these differences are invaluable from the spectra of granulated mixtures. In the same way, the spectra of Fig. 4 exhibit similar results: tablets obtained from direct compaction process show slight differences at 2300 nm, but the tablets obtained by a wet granulation process do not present these differences.

Initially, we used the ALS algorithm to obtain the pure spectra for the DKP polymorphs of interest in samples containing only cellulose–polymorph A or cellulose–polymorph B. The data matrix was composed by spectra of non-granulated mixtures (eight samples). The use of one constraint (cellulose spectrum or analytes concentrations) resulted in poor fitting (the explained variance was less than 96% and the lack of fit greater than 3%). The joint use of both constraints resulted in %Var and lof values above 99% and below 0.01%, respectively. The calculated spectral profiles for DKP in the non-granulated and wet-granulated samples were compared with the spectra for the pure components. Table 3 shows the coefficients of correlation between the

Table 3
Correlation coefficients between MCR and reference spectra of DKP for binary samples (non-granulated and granulated), on 1st and 2nd derivative in 2250–2350 nm spectral range

		1stD	2ndD
Non-granulated mixtures	A_{MCR}^1/A_{ref}	0.93	0.92
	B_{MCR}^1/B_{ref}	0.99	0.99
	A_{MCR}^1/B_{MCR}^1	0.48	0.20
Granulated mixtures	A_{MCR}^1/A_{ref}	0.81	0.26
	B_{MCR}^1/B_{ref}	0.80	0.66
	A_{MCR}^1/B_{MCR}^1	0.99	0.99

Superscript 1 denotes MCR spectra obtained from binary samples.

MCR spectra for both polymorphs and the reference spectra (i.e. A_{MCR}^1/A_{ref} and B_{MCR}^1/B_{ref} , where superscript 1 denotes that the MCR spectrum was obtained from binary samples). The MCR spectra for both polymorphs in the non-granulated samples were very similar to the reference spectra; their high correlation confirms that the ALS algorithm provides an accurate means for detecting potential spectral changes during the drug production process. The low spectral correlation between both MCR spectra (A_{MCR}^1/B_{MCR}^1) obtained from the powder samples are quite similar with those showed on Table 3 from the pure polymorphs.

The procedure was repeated with aliquots of the same mixtures processed by wet granulation. Two data matrix were used separately containing the first one: the spectra of granulated mixtures with polymorph A (four samples), and the second one: the granulated mixtures with polymorph B (four samples). Table 3 shows the coefficients of correlation for the two polymorphs. As can be seen, the A_{MCR}^1/A_{ref} and B_{MCR}^1/B_{ref} correlations were rather low; therefore, the spectra for the two polymorphs were rather different from the reference spectra, which suggest that the active principle undergoes some polymorphic transformation upon wet granulation of the sample. Note the high correlation between the MCR spectra after the wet granulation for the polymorphs (A_{MCR}^1 and B_{MCR}^1); this indicates that both evolved to the same species, whether the original sample contained A or B.

The XRD patterns obtained from those non-granulated and wet-granulated samples revealed that both polymorphs maintain their crystal structure in non-granulated samples, meanwhile in the wet-granulated samples were no signals assignable to a crystal structure. Both pure polymorphs can be readily identified and characterized from their respective patterns (see Fig. 5). Also, the patterns for the non-granulated samples containing cellulose + DKP 15% (w/w) exhibit the major peaks in the XRD spectrum for each polymorph (see Fig. 6). On the other hand, identifying the two polymorphs in the granulated mixtures from their XRD patterns is impossible as these exhibit none of the characteristic signals of each polymorph. The limit of detection of XRD is rather below the DKP concentration levels which it is present. So, the absence of significant peaks in the X-ray patterns

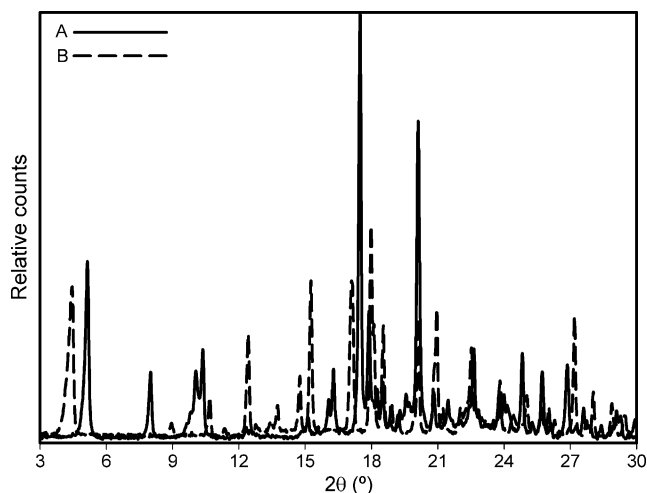


Fig. 5. XRD spectra for both pure polymorphs (A and B) of DKP.

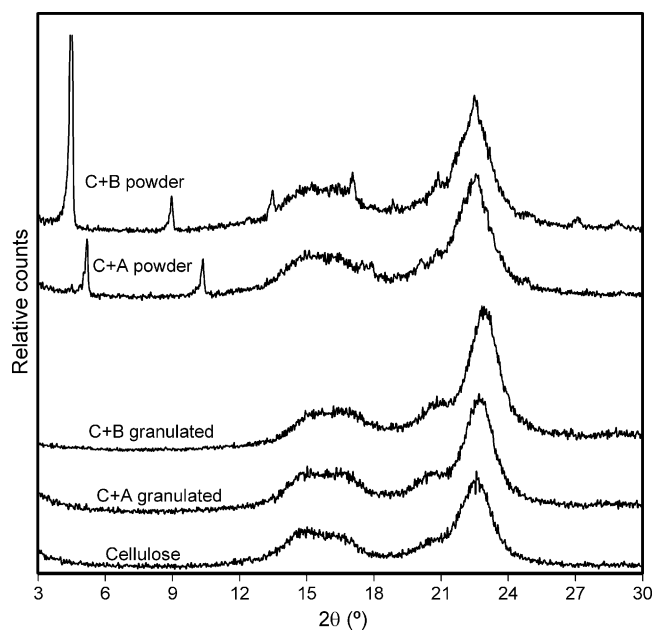


Fig. 6. XRD spectra for pure cellulose (C) and binary samples (C + DKP polymorph A and C + DKP polymorph B). Binary samples powder and granulated.

for the granulated samples induces us to think that the form, to which both crystalline polymorphs of DKP have evolved, is the amorphous one.

In order to confirm the previous results in more complex samples, a second set of spectra for DKP in tablets obtained by direct compaction of the individual components (viz. four samples containing polymorph A and as many containing B) were used. The data matrix was composed by spectra of non-granulated mixtures (eight samples), compacted tablets (eight). Following the same strategy used previously, the joint use of both constraints (placebo spectrum and analytes concentrations) helped to obtain better results of MCR spectra. The percentage of explained variance and lack of fit resulted in values above 99% and below 0.01%, respectively. As can be seen from Table 4, the A_{MCR}^2/A_{ref} and B_{MCR}^2/B_{ref} correlations were higher than 0.96, so neither polymorph evolved to the other (superscript 2 denotes that the MCR spectrum was obtained from the tablets).

A third set comprising the spectra for tablets obtained by wet granulation (four containing polymorph A and other four containing B) was examined. Two data matrix were used sepa-

Table 4
Correlation coefficients between MCR and reference spectra of DKP for tablets (compacted and granulated), on 1st and 2nd derivative in 2250–2350 nm spectral range

		1stD	2ndD
Compacted tablets	A_{MCR}^2/A_{ref}	0.99	0.97
	B_{MCR}^2/B_{ref}	0.96	0.99
	A_{MCR}^2/B_{MCR}^2	0.55	0.20
Granulated tablets	A_{MCR}^2/A_{ref}	0.83	0.27
	B_{MCR}^2/B_{ref}	0.82	0.65
	A_{MCR}^2/B_{MCR}^2	0.98	0.97

Superscript 2 denotes MCR spectra obtained from tablets.

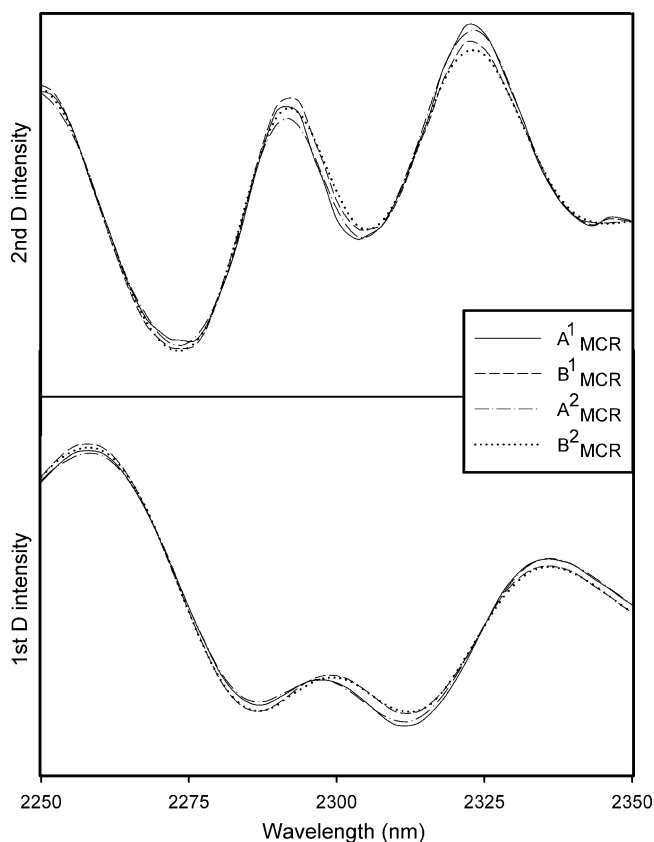


Fig. 7. MCR spectra for the DKP amorphous form obtained from binary samples and tablets (both granulated). Superscript 1 or 2 denotes MCR spectra obtained from binary samples or tablets, respectively.

rately containing the first one: the spectra of granulated mixtures with polymorph A (four samples), granulated tablets of polymorph A (four samples), and the second one the same amount but prepared with polymorph B. As can be seen from Table 4, the A_{MCR}^2/A_{ref} and B_{MCR}^2/B_{ref} correlations were low, so the MCR spectra for both polymorphs were scarcely similar to the reference spectra. As with the wet-granulated cellulose–DKP samples, both polymorphs underwent polymorphic transformation. The correlation coefficients between A_{MCR}^2 and B_{MCR}^2 were high (0.98 with first-derivative and 0.97 with second-derivative spectra). This suggests that both evolved also to the same species. Fig. 7 shows the MCR spectra for both polymorphs in the wet-granulated samples (calculated for binary mixtures and tablets). As can be seen, the MCR spectra were very similar irrespective of the particular DKP polymorph and type of sample. The XRD spectra were consistent with the MCR spectra, and so was the ensuing conclusion: the two polymorphs preserve their crystal structure in directly compacted tablets, but not in wet-granulated samples, where both evolve to the amorphous form.

A parallel differential scanning calorimetry (DSC) study was also conducted. Table 5 shows the most salient peaks in the DSC thermograms and their widths. The melting point of both pure polymorphs can be accurately determined as they give sharp, well-defined peaks. Polymorph A has a higher melting point than B and their melting points in compacted and non-granulated samples are virtually identical with those for the pure com-

Table 5
Melting points obtained by differential scanning calorimetry (DSC)

	Sample type	Peak (°C)	Peak width (°C)
Polymorph A	Pure ¹	105.7	1.3
	Non-granulated mixtures ¹	105.0	1.5
	Compacted tablets ⁵	100.1	9.8
	Granulated mixtures ¹	nd	–
	Granulated tablets ¹	nd	–
Polymorph B	Pure ¹	103.1	1.3
	Non-granulated mixtures ¹	103.1	1.3
	Compacted tablets ⁵	97.8	10.5
	Granulated mixtures ¹	nd	–
	Granulated tablets ¹	nd	–

Superscript: warm rate 1 or 5 °C per min, nd: not detected.

pounds, which suggest that the active principle retains its crystal structure. The wet-granulated samples (mixtures and tablets) exhibited no endothermic peaks, however. The melting point of a solid pertains to its crystalline forms only [16]. This suggests that both DKP polymorphs evolve to an amorphous form irrespective of the initial crystalline form present. The DSC thermograms of compacted tablets were obtained using a different warm rate (5 °C/min instead of 1 °C/min), which causes wider peaks and slightly displaced maximums (see Table 5).

Based on the results for the three types of samples studied, neither polymorph undergoes polymorphic transformation upon mixing and/or compaction. On the other hand, wet granulation of the active principle – whether as polymorph A or B – with microcrystalline cellulose using water as solvent causes the transformation of both polymorphs into the same species (the amorphous form as revealed by XRD and DSC data). In order to confirm the presence of only one DKP form, the MCR process was repeated using an extended matrix with the spectra of wet-granulated mixtures of polymorph A-excipients plus polymorph B-excipients, avoiding the distinction of polymorph A or B. The DKP spectra obtained by MCR was compared with the spectra of DKP pure crystalline forms and only one DKP_{MCR} spectrum was obtained. The correlation coefficients between DKP_{MCR} and A_{REF} obtained were 0.83 and 0.28 (1st and 2nd derivative, respectively) and the correlation coefficients between DKP_{MCR} and B_{REF} were 0.81 and 0.64 (1st and 2nd derivative). In all cases lack of fit was below 0.01%. As can be seen, the DKP_{MCR} spectra are clearly different from the DKP crystalline forms. These results were in agreement with the previous supposition, that only one DKP form is present in granulated samples.

4. Conclusions

The application of multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR–ALS) methodology to the NIR spectra for drug mixtures allows the spectrum for the active principle Dexketoprofen Trometamol (DKP) to be obtained from that for a mixture containing it without the need of a laboratory sample preparation. This allows DKP to be correctly identified and its specific polymorph characterized even if no pure DKP form is available. Some operations of the drug manufacturing process such as direct compaction or wet granulation can induce a

polymorphic transformation in DKP. Thus, when only DKP in either form A or B is mixed and compacted with the excipients of the pharmaceutical formulation, the active principle retains its crystal structure without undergoing polymorphic transformation. However, granulation with microcrystalline cellulose as excipient in an aqueous medium causes both DKP polymorphs to evolve to the amorphous form irrespective of the initial crystalline form present. The results obtained by XRD and DSC revealed this resultant form to be the amorphous pseudo-polymorph.

Acknowledgment

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project BQU2003-04247.

References

- [1] D.J.W. Grant, Theory and origin of polymorphism, in: H.G. Brittain (Ed.), *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, Dekker, New York, 1999, pp. 1–33.
- [2] M.E. Auer, U.J. Griesser, J. Sawatzki, *J. Mol. Struct.* 661/662 (2003) 307–317.
- [3] T.D. Davis, G.E. Peck, J.G. Stowell, K.R. Morris, S.R. Byrn, *Pharm. Res.* 21 (2004) 860–865.
- [4] B. Albertinia, C. Cavallaria, N. Passerinia, M.L. Gonzalez-Rodriguez, L. Rodriguez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 479–487.
- [5] J.F. Remenar, R. Wenslow, D. Ostovic, A. Peresykin, *Pharm. Res.* 21 (2004) 185–188.
- [6] S. Airaksinen, M. Karjalainen, E. Räsänen, J. Rantanen, J. Yliruusi, *Int. J. Pharm.* 276 (2004) 129–141.
- [7] A.C. Williams, V.B. Cooper, L. Thomas, L.J. Griffith, C.R. Petts, S.W. Booth, *Int. J. Pharm.* 275 (2004) 29–39.
- [8] J. Workman Jr., M. Koch, D.J. Veltkamp, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2859–2876.
- [9] J. Rantanen, H. Wikstroem, R. Turner, L.S. Taylor, *Anal. Chem.* 77 (2005) 556–563.
- [10] M. Blanco, D. Valdés, M. Bayod, F. Fernandez-Martí, I. Llorente, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 221–227.
- [11] M. Blanco, D. Valdés, I. Llorente, M. Bayod, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 1336–1342.
- [12] A.S. Raw, M.S. Furness, D.S. Gill, R.C. Adams, F.O. Holcombe, L.X. Yu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (1999) 397–414.
- [13] H.G. Brittain, E.F. Fieser, Effects of pharmaceutical proceedings on drug polymorphs and solvates, in: H.G. Brittain (Ed.), *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, Dekker, New York, 1999, pp. 331–361.
- [14] R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1) (1995) 31–58.
- [15] M.S. Larrechi, F.X. Rius, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 47–53.
- [16] H.G. Brittain, Application of the phase rule to the characterization of polymorphic systems, in: H.G. Brittain (Ed.), *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, Dekker, New York, 1999, pp. 36–70.

ANEXO 7

CHAPTER 10: USE OF NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY FOR OFF-LINE MEASUREMENTS IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Marcelo Blanco and Manel Alcalà

In: K. Bakeev (Ed.) Process Analytical Technology

Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2005, pp 362-391.

Chapter 10

Use of Near-Infrared Spectroscopy for Off-Line Measurements in the Pharmaceutical Industry

Marcelo Blanco and Manel Alcalá

10.1 Introduction

Drug manufacturing is an industrial activity comprehensively regulated by both national institutions (pharmacopoeias, FDA, drug regulatory agencies) and international bodies (ICH, EMEA). Applicable regulations require strict control of not only raw materials, but also production processes. Such control is currently performed mainly by using chromatographic techniques. While chromatography is suitable for most of the analytical processes involved, it has some disadvantages including sluggishness, the need for careful sample preparation and the production of waste with a potential environmental impact, all of which have promoted a search for alternative techniques avoiding or minimizing these problems. Spectroscopic techniques are highly suitable candidates in this respect.

Molecular spectroscopic techniques have been widely used in pharmaceutical analysis for both qualitative (identification of chemical species) and quantitative purposes (determination of concentration of species in pharmaceutical preparations). In many cases, they constitute effective alternatives to chromatographic techniques as they provide results of comparable quality in a more simple and expeditious manner. The differential sensitivity and selectivity of spectroscopic techniques have so far dictated their specific uses. While UV-Vis spectroscopy has typically been used for quantitative analysis by virtue of its high sensitivity, infrared (IR) spectrometry has been employed mainly for the identification of chemical compounds on account of its high selectivity. The development and consolidation of spectroscopic techniques have been strongly influenced by additional factors such as the ease of sample preparation and the reproducibility of measurements, which have often dictated their use in quality control analyses of both raw materials and finished products.

Spectra differ markedly in appearance depending on the particular technique. UV-Vis and near-infrared (NIR) spectra typically consist of a few broad bands that make unambiguous identification difficult. By contrast, IR and Raman spectra contain a number of sharp bands at well-defined positions that facilitate the identification of specific compounds. Recent improvements in sensitivity and reproducibility of spectroscopic equipment have substantially expanded the scope of these techniques. The introduction of

Fourier transform in IR spectrometry (FTIR) has facilitated the development of spectral libraries of a high value for the identification of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients. The ability of some techniques (e.g. IR, NIR and Raman spectroscopies) to provide spectra for undissolved solid samples has considerably expedited analyses and facilitated the determination of additional physical properties such as average particle size, polymorphism, etc. IR and Raman spectra also provide structural information that allows not only the identification of characteristic functional groups facilitating the establishment of chemical structures, but also the unequivocal identification of some compounds. NIR spectra can be obtained without sample preparation and due to this fact NIR has become one of the most promising spectroscopic tools for process monitoring and manufacturing control in the pharmaceutical industry. Also, NIR chemical imaging has enabled the identification of critical properties of both raw materials and finished products.

For the above-described reasons, molecular spectroscopic techniques have become the most common choices for pharmaceutical analysis in addition to chromatography. The latter, however, are being gradually superseded by the former in some industrial pharmaceutical processes. Recent technological advances have led to the development of more reliable and robust equipment. The ubiquity of computers has enabled the implementation of highly powerful chemometric methods. All this has brought about radical, widespread changes in the way pharmaceutical analyses are conducted.

Chemometric techniques have gained enormous significance in the treatment of spectral information by virtue of their ability to process the vast amount of data produced by modern instruments over short periods of time with a view to extracting the information of interest they contain and improving the quality of the results. In some cases, the operator is unacquainted with the chemometric techniques (spectral smoothing, baseline drift correction) embedded in the software used by the instrument; in others, the chemometric tools involved are inherent in the application of the spectroscopic technique concerned (e.g. in NIR spectroscopy) and thus indispensable to obtaining meaningful results.

Because NIR spectroscopy has played the most prominent role in this context, the discussion that follows mainly revolves around it. However, the most salient contributions of other spectroscopic techniques (viz. UV-vis, IR and Raman spectroscopies) are also commented on.

10.1.1 Operational procedures

The procedures used to record NIR spectra for samples are much less labor-intensive than those involved in other spectroscopic analytical techniques. NIR spectral information can be obtained from transmission, reflectance and transmittance measurements; this allows the measurement process to be adapted to the physical characteristics of the sample and expedites analyses by avoiding the need for sample preparation.

One major difference between NIR spectroscopy and other spectroscopic techniques is its ability to provide spectra for untreated or minimally treated samples. As a result, the instrumentation is adjusted to the characteristics of the samples rather than the opposite.

The absorbance of a liquid or solution can be readily measured by using quartz or sapphire cuvettes and fibre-optic probes of variable pathlengths. The most suitable solvents for this purpose are those not containing O—H, N—H and C—H groups that exhibit little or no absorption in this spectral region.

The NIR spectrum for a solid sample can be obtained by using various types of devices. The most frequent choices when the sample is in powder or grain form are reflectance cuvettes with a transparent window material (e.g. quartz or glass) and fibre-optic probes. The latter considerably facilitate recording of spectra; however, light losses resulting from transport along the fibre result in increased signal noise at higher wavelengths. The spectra for samples in tablet form require no pretreatment such as powdering, sieving or homogenization and can be recorded by using three different types of equipment, namely:

- (1) Reflectance cuvettes for tablets, which provide spectra subject to strong scattering arising from dead spaces between tablets placed in the cuvette.
- (2) Devices for recording reflectance spectra for individual tablets.
- (3) Instruments that allow transmission spectra for individual tablets to be recorded.

It should be noted that the type of standard to be used for reflectance measurements remains a subject of debate. According to American Society for Testing and Materials (ASTM), the perfect standard for this purpose is a material absorbing no light at any wavelength and reflecting light at an angle identical with the incidence angle. Teflon is the material that fulfills these conditions best. Because no single material meets these requirements, the standards used in this context should be stable, homogeneous, non-transparent, non-fluorescent materials of high, fairly constant relative reflectance. Springsteen and Ricker¹ discussed the merits and pitfalls of materials such as barium sulphate, magnesium oxide, and Teflon and ceramic plates as standards for reflectance measurements. Some manufacturers supply National Institute of Standards and Technology (NIST)-validated reference standards for standardizing spectroscopic equipment.²

10.1.2 Instrument qualification

Ensuring that the instrument to be used performs correctly is the first step in developing an instrumental methodology. The European Pharmacopoeia³ and the Guidelines of the Pharmaceutical Analytical Sciences Group (PASG)⁴ recommend that NIR instruments be qualified as per the manufacturer's instructions, which should include at least the following:

- (a) Checking for wavelength accuracy by using one or more suitable wavelength standards exhibiting characteristic maxima at the wavelengths of interest.
- (b) Checking for wavelength repeatability by using one or more suitable standards (e.g. polystyrene or rare-earth oxides). The repeatability of measurements should be consistent with the spectrophotometer specification.

- (c) Checking for repeatability in the response by using one or more suitable standards (e.g. reflective thermoplastic resins doped with carbon black). The standard deviation of the maximum response should be consistent with the spectrophotometer specification.
- (d) Checking for photometric linearity by the use of a set of transmittance or reflectance standards (e.g. Spectralon, carbon black).
- (e) Checking for the absence of photometric noise by using a suitable reflectance standard (e.g. white reflective ceramic tiles or reflective thermoplastic resins, that is Teflon). The reflectance standard should be scanned in accordance with the recommendations of the spectrophotometer's manufacturer and peak-to-peak photometric noise at a given calculated wavelength. The amount of photometric noise should be consistent with the spectrophotometer specification.

However, two different instruments will inevitably exhibit small spectral differences that can be reduced by applying standardization corrections based on appropriate references or standards. Reference standardization uses NIST traceable photometric standards (80% reflectance) to measure the absolute reflectance of the ceramic tile reference at each wavelength. When a sample is then compared to the ceramic reference, because the absolute absorbance of the reference at each wavelength is known, the absolute absorbance of the sample can be accurately measured – no negative absorbance values are possible. Master standardization uses a sample of similar spectral pattern to that of the products being analyzed to be scanned first on the Master instrument and then on the Host instrument. A standardization file is then created for the Host instrument. When a sample is scanned in the Host instrument, the spectrum is adjusted using the standardization file to cause it to more closely resemble that measured on the Master. This is a 'cloning' algorithm. The above-described corrections allow calibration models to be readily transferred between instruments.

10.2 Qualitative analysis

Identifying pharmaceuticals, whether APIs or excipients used to manufacture products, and the end products themselves is among the routine tests needed to control pharmaceutical manufacturing processes. Pharmacopoeias have compiled a wide range of analytical methods for the identification of pharmaceutical APIs and usually several tests for a product are recommended. The process can be labor-intensive and time-consuming with these conventional methods. This has raised the need for alternative, faster methods also ensuring reliable identification. Of the four spectroscopic techniques reviewed in this book, IR and Raman spectroscopy are suitable for the unequivocal identification of pharmaceuticals as their spectra are compound-specific: no two compounds other than pairs of enantiomers or oligomers possess the same IR spectrum. However, IR spectrometry is confronted with some practical constraints such as the need to pretreat the sample. The introduction of substantial instrumental improvements and the spread of attenuated total reflectance (ATR) and IR microscopy techniques have considerably expanded the scope of IR spectroscopy in the pharmaceutical field. Raman spectroscopy,

which has been developed and incorporated by the pharmaceutical industry somewhat more recently, is similar to IR spectroscopy. Some of its more interesting and recent applications are the identification of impurities and adulterants.⁵ On the other hand, UV-Vis spectra are too uncharacteristic to allow the identification of specific compounds.

Near-infrared spectroscopy, which is subject to none of the previous shortcomings, has been used to monitor all the steps in the drug manufacturing process including chemical synthesis, analysis of raw materials, process intermediates (following blending, grinding, drying, tableting) and preparations, and finally in quality control. The quality attributes studied using this technique include identity (authentication), characterization of polymorphs and measurement of mixture uniformity in finished products. Also, chemical composition can be determined without losing any physical information (e.g. particle size, density, hardness), which can be very useful in characterizing some products. The construction of spectral libraries avoids the need to develop a specific method for each individual product and enables its identification in a simple, direct, expeditious, economic manner. The whole process can be automated, computer-controlled and conducted by unskilled operators.

10.2.1 Foundation of identification (authentication)

NIR spectral bands are usually broad and strongly overlapped. This precludes the direct identification of compounds by matching spectra to an individual spectrum in a library, which is the usual procedure in IR spectroscopy. Rather, NIR identification relies on Pattern Recognition Methods (PRMs). Essentially, the identification process involves two steps, namely: (1) recording a series of spectra for the product in order to construct a 'spectral library'; and (2) recording the sample spectrum and comparing it to those in the previously compiled library on the basis of mathematical criteria for parametrizing spectral similarity. If the similarity level exceeds a preset threshold, then the spectra are considered to be identical and the sample is identified with the corresponding product in the library. A wide variety of PRM techniques exist for use in specific fields. Figure 10.1 classifies the most commonly used PRMs.

Many PRMs are based on similarity measurements. Similarity here is taken to be the extent to which an object (a spectrum) is identical with another; very frequently, similarity is expressed in terms of correlation⁶ or distance.⁷ Depending on whether the objects are known to belong to specific classes, PRMs are called 'supervised' or 'unsupervised'. Unsupervised methods search for clustering in an N-dimensional space without knowing the class to which a sample belongs. Cluster analysis,⁸ minimal spanning tree (MST)⁹ and unsupervised (Kohonen) neural networks¹⁰ are among the most common unsupervised PRMs.

Supervised methods rely on some prior training of the system with objects known to belong to the class they define. Such methods can be of the discriminant or modeling types.¹¹ Discriminant methods split the pattern space into as many regions as the classes encompassed by the training set and establish bounds that are shared by the spaces. These methods always classify an unknown sample as a specific class. The most common discriminant methods include discriminant analysis (DA),¹² the k-nearest neighbor

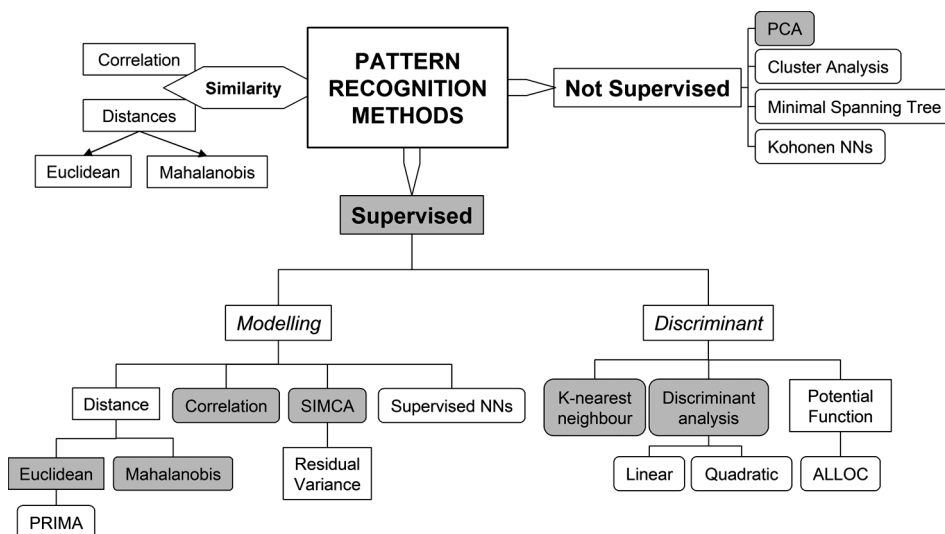


Figure 10.1 Pattern Recognition Methods classification used in pharmaceutical identification. The dark grey blocks refer the techniques more commonly used.

(KNN)^{13,14} and potential function methods (PFMs).^{15,16} Modeling methods establish volumes in the pattern space with different bounds for each class. The bounds can be based on correlation coefficients, distances (e.g. the Euclidean distance in the Pattern Recognition by Independent Multicategory Analysis methods [PRIMA]¹⁷ or the Mahalanobis distance in the Unequal [UNEQ] method¹⁸), the residual variance^{19,20} or supervised artificial neural networks (e.g. in the Multi-layer Perceptron²¹).

Not every PRM is suitable for constructing spectral identification libraries. These are usually compiled by using supervised modeling methods, and unknown samples are identified with those classes they resemble most.

10.2.2 Construction of NIR libraries

An NIR identification library should encompass all the raw materials used by the manufacturer in order to be able to identify all possible substances and avoid or minimize errors. The method to be used should allow the unequivocal identification of each compound present in the library and the exclusion of those not present. It should also be able to distinguish between very similar compounds used in different applications (e.g. products with different particle sizes, polymorphs, products in different grades or from different suppliers).

Figure 10.2 schematizes the use of spectral information for constructing multivariate calibration models. The pretreatment of the sample spectrum and variable selection processes involve constructing both identification libraries and calibration models for quantifying APIs; however, the samples and spectra should suit the specific aim in each case.

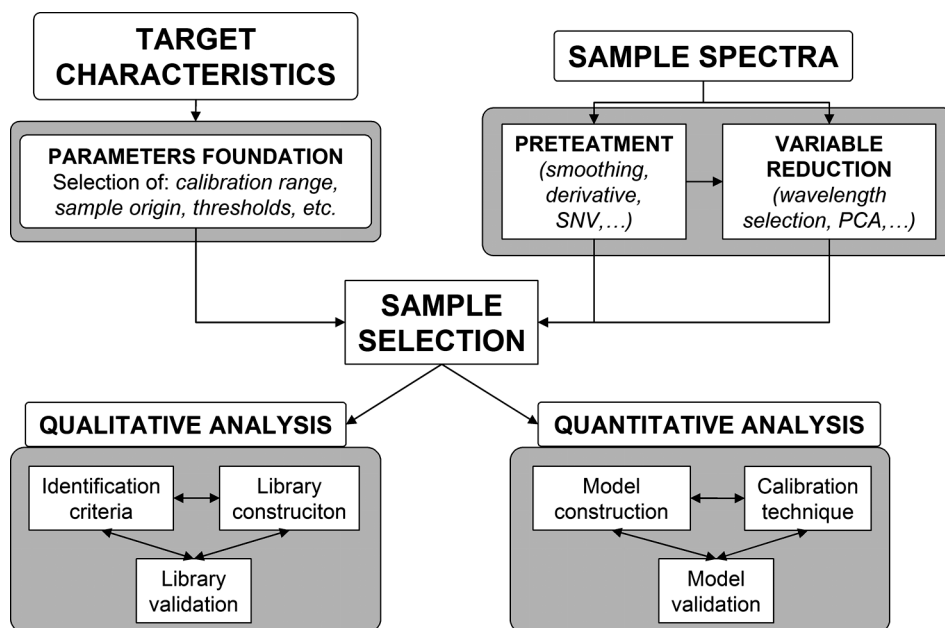


Figure 10.2 Schema for constructing multivariate models.

The correlation coefficient (in wavelength space) is especially suitable for constructing the general library as it has the advantage that it is independent of library size, uses only a few spectra to define each product and is not sensitive to slight instrumental oscillations. This parameter allows the library to be developed and validated more expeditiously than others. Correlation libraries can also be expanded with new products or additional spectra for an existing product in order to incorporate new sources of variability in an expeditious manner.

One of the crucial factors to ensure adequate selectivity in constructing a spectral library is the choice of an appropriate threshold. Such a threshold is the lowest value (for correlation) required to unequivocally assign a given spectrum to a specific class. Too low a threshold can lead to ambiguities between substances with similar spectra, whereas too high a threshold can result in spectra belonging to the same class being incorrectly classified. Choosing an appropriate threshold entails examining the spectra included in the library in an iterative manner. The threshold is successively changed until that resulting in the smallest number of identification errors and ambiguities is reached. In some cases, the threshold thus selected may not distinguish some compounds whose spectra are too similar. This problem can be overcome by identifying the compounds concerned in two steps, using a general library in the first and a smaller one (a subset of the general set with a higher discriminating power) in the second. This methodology has been termed 'cascading identification' as it involves identifying the unknown sample against the general library and, if the result is inconclusive, using a sub-library for qualification.

This procedure can consist of different stages and in each one a sub-library is constructed. The first one enables the identification of the product within an ample library, a second defines a characteristic that produces an important variability in the spectra (e.g. particle size) and a third defines a smaller spectral variability (difference in the content of impurities, origin of manufacture, etc.).

Once the general library has been constructed, those products requiring the second identification step are pinpointed and the most suitable method for constructing each sub-library required is chosen. Sub-libraries can be constructed using various algorithms including the Mahalanobis distance or the residual variance. The two are complementary,²² so which is better for the intended purpose should be determined on an individual basis.

The procedure to be followed to construct the library (Figure 10.2) involves five steps, namely:

- (1) Recording the NIR spectra for a set of samples of known identity, either certified by the supplier or confirmed using alternative identification tests.
- (2) *Choosing spectra.* For each substance, the spectra used to construct the calibration set should be from various batches so that physico-chemical variability can be effectively incorporated. Not every spectrum recorded should be used to construct the library as some should be set aside for its validation.
- (3) *Constructing the library.* First, one must choose the pattern recognition method to be used (e.g. correlation, wavelength distance, Mahalanobis distance, residual variance, etc.), the choice being dictated by the specific purpose of the library. Then, one must choose construction parameters such as the math pretreatment (SNV, derivatives), wavelength range and threshold to be used. When a method involving a preliminary variable reduction procedure, such as principal component analysis (PCA) is used, one must also decide upon the values for other parameters such as the number of latent variables, the proportion of variance accounted for, etc. The next step involves validating the library internally in order to check for incorrectly labelled spectra – spectra yielding identification errors or unidentified (or ambiguously identified) substances. Based on the validation results, one must determine if some change in the threshold, spectral range, pretreatment, etc., must be introduced. This is an iterative process that must be repeated until the developer obtains the desired specificity level. Ambiguous identifications should be resolved by developing appropriate sub-libraries.
- (4) *Constructing sub-cascading libraries.* Each sub-library should include all mutually related substances, which will have very similar spectra and may result in ambiguous identification with the general library. An adequate number of representative spectra should be included in the sub-libraries in order to ensure accurate description of each class. The number of spectra used should exceed that of spectra required to define an individual class in the general library. Once spectra have been chosen, the process is similar to that followed to construct the general library: an appropriate PRM is selected – the residual variance and the Mahalanobis distance are especially suitable here – the characteristics of the library (viz. threshold, spectral range and pretreatment, proportion of variance accounted for or number of PCs, etc.) are established and calculations performed. Based on the results, the procedure is repeated until all compounds can be unequivocally distinguished.

- (5) *External validation.* The general library and its sub-libraries must be validated by checking that external spectra (for the validation step) are correctly, unambiguously identified. Likewise, samples not present in the library should not be identified with any of the compounds it contains.

10.2.3 Identification of raw materials and pharmaceutical preparations

Control analyses rely on the use of appropriate procedures or measurements allowing the identity of the materials involved in each step of the manufacturing process from receipt of raw materials to delivery of the finished products to be assured. NIR spectroscopy is an advantageous alternative to wet chemical methods and instrumental techniques such as IR, Raman and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies.

The earliest reported studies on the identification of substances by NIR focused on structural characterization, in the vein of many studies in the mid-IR region. However, it is usually difficult to identify a substance from the mere visual inspection of its NIR spectrum; rather, a pattern recognition method must be applied to a body of spectra (a library) for this purpose. The reliability of the results obtained in the qualitative analysis of a product depends on whether the library is constructed from appropriate spectra. For each product encompassed by the library, one should ensure that the spectra include all potential sources of variability associated with their recording and their manufacturing process. The former should be incorporated by including spectra for the same sample recorded by different operators on different days, and the latter by including spectra from different production batches. How many spectra are to be included in order to construct a 'proper' library is difficult to tell a priori. For a product manufactured in a highly reproducible manner, the manufacturing variability can usually be encompassed by samples from 5–10 batches and 20–40 spectra. On the other hand, if the manufacturing procedure is scarcely reproducible, the number of batches and spectra can easily double.

One other important consideration in constructing a library is checking that all spectra are correct. This can be done by visual inspection of the spectra and outlier detection tools. For various reasons (e.g. an inadequately filled cuvette, large temperature fluctuations), spectra may differ from others due to factors other than natural variability. Any such spectra should be excluded from the library. Spectral libraries are used for two different purposes, namely: identification (of chemical structure) and qualification (of chemical and physical attributes).

10.2.3.1 Identification

This involves the confirmation of a certain chemical entity from its spectrum by matching against the components of a spectral library using an appropriate measure of similarity such as the correlation coefficient,^{6,23} also known as the spectral match value (SMV). SMV is the cosine of the angle formed by the vectors of the spectrum for the sample and the average spectrum for each product included in the library.

In theory, if the product spectrum coincides with one in the library, then its correlation coefficient should be unity. However, the random noise associated with all spectral measurements precludes an exact match. This parameter has the advantage that it is independent of the size of the library and of oscillations in concentration, so it enables correct identifications with libraries consisting of a small number of spectra. However, it has a relatively low discriminating power, which may require the use of near-unity thresholds in order to distinguish very similar products. It can also result in ambiguous identification of batches of the same substance with different physical characteristics (e.g. samples of the same product with different grain sizes can have very similar correlation coefficients and be confused) or different substances with high chemical similarity. In these cases, cascading libraries, as previously discussed, can be used.

10.2.3.2 Qualification

NIR spectroscopy not only advantageously replaces other techniques for identification purposes, but also goes one step further in qualitative analysis with its qualification capabilities. The pharmaceutical industry must assure correct dosing and manufacturing of stable products. This entails strictly controlling the raw materials and each of the steps involved in their processing by determining parameters such as potency, moisture, density, viscosity or particle size in order to identify and correct any deviations in the manufacturing process in a timely fashion. Such controls can be achieved by quantifying the different parameters required using appropriate analytical methods or by comparing the NIR spectrum of the sample with a body of spectra of the samples meeting the required specifications and encompassing all possible sources of manufacturing variability. The latter choice is known as 'qualification,' which can be defined as the fulfillment of the product specifications. If the parameter values for a given sample do not fall within the normal variability ranges, then the sample is subjected to thorough analyses. The qualification process can be considered the second stage of an identification process in cascade. Similarity in this context is expressed as a distance. Distance-based methods are subject to two main shortcomings. They use a large number of correlated spectral wavelengths, which increases the distance without providing additional information. They also use more samples than do correlation methods. The Euclidian distance in the wavelength space and the Mahalanobis distance – which corrects correlation between spectra – in principal component space are the two most widely used choices.

Distance-based methods possess a superior discriminating power and allow highly similar compounds (e.g. substances with different particle sizes or purity grades, products from different manufacturers) to be distinguished. One other choice for classification purposes is the residual variance, which is a variant of Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA).

Table 10.1 lists selected references to the identification of pharmaceutical raw materials. As can be seen, a variety of techniques have been used, which fall short of the discriminating power of the previous ones and have not yet been included by manufacturers in their equipment software. This makes them inconvenient to implement.

Table 10.1 Applications of NIR spectroscopy to API and excipient identification

Analyte	Pattern recognition method	Remarks	References
Oxytetracycline	PCA and SIMCA	Sample identity determination before multivariate quantitation	24
Pharmaceuticals	PCA and visual classification	Drug authenticity assurance, counterfeiting control	25
Excipients	PCA and cluster analysis	Transferability between different spectrometers	26
Raw materials	Mahalanobis distance and residual variance	Classification models development	21
Metronidazole	Hierarchical and stepwise classification, stepwise discriminant analysis and PCA	Assure the quality of the drug	27
Excipients	Polar qualification system	Sample identification and qualification	28
Raw materials	Correlation coefficient, Mahalanobis distance, residual variance	Libraries and sub-libraries	29
Corn starch	Correlation coefficient and distance	Spectral library as quality control system	30
Herbal medicines	Wavelength distance, residual variance, Mahalanobis distance and SIMCA	PRMs comparison	31
Acetaminophen	Maximum distance in wavelength space	Identification of tablets brand	32
Excipients	SIMCA	Classification models development	33
Pharmaceuticals	Correlation coefficient, wavelength distance, polar coordinates, gravity center, scanning probability windows	PRMs comparison	34

10.2.4 Determination of homogeneity

Ensuring homogeneous mixing of the components (APIs and excipients) of a pharmaceutical preparation is a crucial prerequisite for obtaining proper solid dosages (tablets and capsules). Pharmaceutical manufacturers invest much time, labor and material resources in this process. Blending is intended to ensure uniform distribution of all components in the end products,³⁵ so that each dose will contain the correct amount of the active.

As a rule, controlling the blending process entails stopping the blender, collecting samples at preset points within it – usually by hand or by using a sample thief – and analysing them by liquid chromatography (HPLC) or UV-Vis spectroscopy.³⁶ Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) enables the analysis of complex matrices without the need to manipulate samples. This results in substantially decreased analysis time relative to wet chemical methods. The large number of qualitative and quantitative uses

of NIRS reported in recent years testify to its high efficiency. Many such uses have focused on the determination of APIs in pharmaceutical preparations^{37,38} or physical parameters of samples.^{39,40} Others have enabled the identification and characterization of raw materials^{41,42} or even the monitoring of product degradation.⁴³ There are, however, comparatively few references to the validation of blending processes,⁴⁴⁻⁴⁶ all of which have involved a search for objective criteria to determine how long blending should be continued. In fact, the visual inspection of spectra recorded during the blending process usually helps, but may not allow one to precisely identify the time when the mixture becomes uniform. The need to arrange these objective criteria continues to be reflected in current studies in this context.

Some of the procedures used to assess mixture uniformity (e.g. the visual inspection of spectra) are subjective. Those based on mathematical parameters are objective. However, most require spectral information from homogeneous samples, so criteria can be established only after the process is finished.

The qualification concept was used by Wargo and Drennen⁴⁵ to verify the homogeneity of solid mixtures. Qualitative analytical algorithms based on Bootstrap Error-adjusted Single-sample Technique (BEST) proved sensitive to variations in sample homogeneity. Plugge and Van der Vlies converted NIR spectra into polar coordinates and used them to calculate the Mahalanobis distance⁴⁷ in order to identify non-homogeneous samples.

Hailey *et al.*⁴⁸ and Sekulic *et al.*⁴⁹ developed systems for monitoring the homogenization of solid mixtures based on measurements made with a fibre-optic probe fitted to the mixer. The most salient advantage of these systems is that they allow one to identify the end point of the homogenization process non-invasively in real time. In both cases, mixture homogeneity was determined by plotting the standard deviation for several replicates against the homogenization time. Cuesta⁴⁶ conducted a similar study using samples withdrawn from the blender. Sekulic⁵⁰ explored various parameters of the blending process and applied various spectral pretreatments including detrending, SNV and the second spectral derivative in conjunction with various criteria (running block standard deviation, dissimilarity and PCA) to identify the end point of the process.

Blanco⁵¹ proposed the use of the mean square difference between two consecutive spectra plotted against the blending time in order to identify the time that mixture homogeneity was reached.

10.2.5 Characterization of polymorphs

The significance of polymorphism in the pharmaceutical industry lies in the fact that polymorphs can exhibit differential solubility, dissolution rate, chemical reactivity, melting point, chemical stability or bioavailability, among others. Such differences can have considerable impact on their effectiveness. Usually, only one polymorph is stable at a given temperature, the others being metastable and evolving to the stable phase with time. Regulatory authorities have established the need to control the polymorph selected for pharmaceutical use in each case and to ensure its integrity during formulation and

storage. Polymorphs are usually identified, characterized and determined using X-ray diffraction (the reference method), IR, solid-state NMR or Raman spectroscopy. NIR spectroscopy^{52,53} is an effective alternative as polymorphs usually differ in their NIR spectra because the vibrations of their atoms are influenced by the differential ordering in their crystal lattices (especially by the presence of hydrogen bonds). NIR spectroscopy enables the fast, reproducible recording of spectra without the need to pretreat or alter the sample in any way, thereby preventing polymorph interconversion. This makes NIR spectroscopy especially attractive for this purpose. NIR can be used to rapidly identify the different polymorphs. Applicable references include the discrimination of polymorphs by use of pattern recognition methods,⁵⁴ the on-line monitoring of polymorph conversions in reactors,⁵⁵ the monitoring of such conversions in active drug ingredients using multiple linear regression (MLR)⁵⁶ and the qualitative monitoring of polymorph conversion as a function of ambient moisture.⁵⁷ Polymorphs can be characterized in an expeditious, convenient manner by using the above-described spectral libraries; the spectral differences involved are almost always large enough to use the correlation coefficient as the discriminating criterion. By using sub-libraries one can define classes to the level of distinguishing pure polymorphs from contaminated forms containing relatively small amounts of other polymorphs.²⁹

Some chiral compounds exhibit a different crystal structure for each pure enantiomer and their mixture; the difference can be used to distinguish them. Again, the use of cascading libraries allows pure compounds to be distinguished from compounds contaminated with relatively small amounts of the other chiral forms.

10.3 Quantitative analysis

Properly controlling the different steps of the production process requires knowledge of the API concentration throughout the process (from the raw materials to the end product). The characteristics of the NIR spectrum require the use of multivariate calibration techniques in order to establish a quantitative relationship between the spectrum and the chemical (composition) and/or physical parameters (particle size, viscosity and density).

Calibration is the process by which a mathematical model relating the response of the analytical instrument (a spectrophotometer in this case) to specific quantities of the samples is constructed. This can be done by using algorithms (usually based on least squares regression) capable of establishing an appropriate mathematical relation such as single absorbance vs concentration (univariate calibration) or spectra vs concentration (multivariate calibration).

The calibration methods most frequently used to relate the property to be measured to the analytical signals acquired in NIR spectroscopy are MLR,^{59,60} principal component regression (PCR)⁶¹ and partial least-squares regression (PLSR).⁶¹ Most of the earliest quantitative applications of NIR spectroscopy were based on MLR because spectra were then recorded on filter instruments, which afforded measurements at a relatively small number of discrete wavelengths only. However, applications involving PCR and PLSR

have become more widely used since the availability of commercial instruments allowing the whole NIR region to be scanned.

Essentially, the procedure for quantitation using multivariate calibration involves the following steps: (a) selecting a representative sample set; (b) acquiring the spectra; (c) obtaining the reference values; (d) mathematically processing the spectra; (e) selecting the model that relates the property to be determined and the signals and (f) validating the model. Each step is described in detail below,⁶² with special emphasis on the problems specific to NIR analyses of pharmaceuticals.

10.3.1 Selection of samples

The starting point for any calibration is collecting a set of representative samples encompassing all possible sources of variability for the manufacturing process and spanning a wide-enough range of values of the target parameter. These requirements are easily met for liquid samples, but not quite so for solid samples (e.g. grain, tablet or pill forms).

The NIR spectrum depends not only on the chemical composition of the sample, but also on some physical properties such as the size, form, particle distribution and degree of compression of the sample. This is useful in some cases as it enables the spectroscopic determination of some physical parameters of the sample. However, physical differences can lead to multiplicative effects in the spectrum, which, together with other additive effects such as baseline shift or chemical absorption, can complicate calibration models and detract from the quality of the results of quantitative analyses if not properly accounted for.

These effects can be modeled by ensuring that the calibration set encompasses all possible sources of variability in the samples, which in turn can be ensured by using samples from an adequate number of production batches.⁶³

Different production batches of the same pharmaceutical preparation can have very similar concentrations of API ($\pm 5\%$ around the nominal value) and excipients close to the nominal value. It is difficult to arrange a set of production samples of the target product spanning the concentration range required to obtain a calibration model that will allow the pharmacopoeial recommendations to be met and different-enough values ($\pm 20\%$ around the nominal one) of potency, content uniformity, etc., accommodated. This can be accomplished by using various types of samples, namely:

- (a) *Pilot plant samples.* A pilot plant mimicking the actual production plant is used to obtain a set of samples with physical properties similar to those of the production process and containing API at concentrations spanning the required range. This procedure is rather labor-intensive and not always affordable. However, it is the only one that ensures the incorporation of all sources of production variability into the calibration set. As such, it is usually employed to construct models for the analysis of solid samples.
- (b) *Overdosed and underdosed production samples.* Properly powdered production samples are supplied with known amounts of the API (overdosing) or a mixture of the

excipients (underdosing) in order to obtain the desired range of API concentrations. The amounts of API or excipients added are usually small, so the ensuing changes in the physical properties of the samples are also small and their matrix can be assumed to be essentially identical with that of the production samples. This is an effective, less labor-intensive method than the previous one and allows the required API concentration range to be uniformly spanned.

- (c) *Laboratory samples.* These are prepared by weighing known amounts of the API and each excipient, and blending them to homogeneity. This procedure has some advantages. It is less laborious and expensive than the previous two; also, the required sample concentrations are easily obtained. However, laboratory-made samples can differ from actual production samples in some physical characteristics as a result of the differences between the two preparation procedures. This can lead to errors in predicting production samples. This shortcoming, however, can be circumvented by including an adequate number of production samples in the calibration set. This procedure has proved effective in work conducted by the authors' research group for determination of the content of active ingredient in some pharmaceutical preparations.^{64,65} In some cases, however, the spectral differences between laboratory-made and production samples are so large that the ensuing models are rather complex and scarcely robust.

The body of samples selected is split into two subsets, namely the calibration set and the validation set. The former is used to construct the calibration model and the latter to assess its predictive capacity. A number of procedures for selecting the samples to be included in each subset have been reported. Most have been applied to situations of uncontrolled variability spanning much wider ranges than those typically encountered in the pharmaceutical field. One especially effective procedure is that involving the selection of as many samples as required to span the desired calibration range and encompassing the whole possible spectral variability (i.e. the contribution of physical properties). The choice relies on a plot of PCA scores obtained from all the samples.

Too small a calibration set may result in some source of variability in the product being excluded and hence in spurious results in analysing new samples. According to some authors, the optimum number of samples to be included depends on their complexity, the concentration range to be spanned and the particular calibration methods used.^{66,67} Thus, when the aim is to quantify using 1–4 PLS factors and the samples exhibit relatively small differences in their physical and chemical properties, a calibration set comprising a minimum of 15–20 samples will be more than adequate.

10.3.2 *Determination of reference values*

In order to construct a calibration model, the values of the parameters to be determined must be obtained by using a reference method. The optimum choice of reference method will be that providing the highest possible accuracy and precision. The quality of the results obtained with a multivariate calibration model can never exceed that of the method used to obtain the reference values, so the choice should be carefully made as

the quality of the model will affect every subsequent prediction. The averaging of random errors inherent in regression methods can help construct models with a higher precision than the reference method.

10.3.3 Acquisition of spectra

The spectra for the samples in the above-described set are typically recorded on the same equipment that will subsequently be used for the measurement of the unknown samples. Such spectra will include the variability in the instrument. The essential prerequisites for constructing the calibration model are that the spectrum should contain the information required to predict the property of interest and that the contribution of such a property to the spectrum should be much greater than that of the noise it may contain. Some authors recommend recording the spectra for the calibration samples in a more careful manner than those for the other samples in order to minimize their noise (e.g. by strictly controlling the environmental conditions, averaging an increased number of scans, recording spectra on different days) on the assumption that a better model will result in better predictions – even if the latter spectra are noisier.

The spectra will contain information about the physical properties of the samples that do not contribute to determining ingredient concentrations. Models can be simplified by subjecting the spectra to effective mathematical pretreatments in order to cancel or reduce such contributions. The spectral pretreatments most frequently used for this purpose are smoothing derivatives, multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV), which can be implemented via algorithms included in the software bundled with many instruments. Choosing an appropriate pretreatment and the way it is applied are important as not all are equally effective in removing or reducing unwanted contributions. For example, spectral derivatives increase signal/noise ratio, so derivative spectra are frequently smoothed with a suitable algorithm such as that of Savitsky and Golay.

10.3.4 Construction of the calibration model

Although many calibration models use the whole spectrum, using a selected range of wavelengths can facilitate the construction of more simple, accurate and hence robust models. The selection can be made with the aid of various algorithms, the most straightforward and intuitive of which is probably that based on the range where the analyte exhibits its strongest response and hence its greatest contribution to the spectral signal for the sample.

The choice of the calibration method is dictated by the nature of the sample, the number of components to be simultaneously determined, the a priori knowledge about the system studied and available data on it. The most salient features of the different types of calibration methods are described below.

Multiple linear regression is the usual choice with filter instruments and is also used with those that record whole spectra. It is an effective calibration approach when the

analytical signal is linearly related to the concentration, spectral noise is low and the analyte does not interact with other sample components. In addition, the MLR technique affords modeling some linear relations as it assumes modeling errors to arise from concentrations. However, it can only be used at a small number of wavelengths, which, if incorrectly selected, may result in overfitting (i.e. in the modeling of noise or random errors). Also, if spectral data are highly collinear, then the precision of the results will suffer appreciably with the use of multiple collinear wavelengths. A detailed description of available procedures for determining how many and which wavelengths should be used can be found elsewhere.^{61,68,69}

Whole-spectrum methodologies (viz. PCR and PLSR) have the advantage that they use every single wavelength in a recorded spectrum with no prior selection. Also, they allow the simultaneous determination of several components in the same sample and avoid the problems arising from collinearity among spectral data and noise-related variability. One important decision regarding calibration is the choice of the number of factors to be used in order to avoid overfitting (viz. modeling noise) and the ensuing sizeable errors in the prediction of unknown samples.

Non-linearity in NIR signals is ascribed to non-linear detector responses that result in curved signal–concentration plots, as well as to physical and/or chemical factors giving rise to shifts and width changes in spectral bands.^{70,71} In some cases, slight non-linearity can be corrected by including an additional factor in the PLS model; strong non-linearity, however, requires the use of a non-linear calibration methodology such as ‘Neural networks’,^{72–76} ‘Locally weighted regression’,^{77,78} ‘Projection pursuit regression’,^{79,80} or quadratic versions of the PCR and PLSR algorithms.^{81,82}

10.3.5 Validation of the model

NIR models are validated in order to ensure quality in the analytical results obtained in applying the method developed to samples independent of those used in the calibration process. Although constructing the model involves the use of validation techniques that allow some basic characteristics of the model to be established, a set of samples not employed in the calibration process is required for prediction in order to confirm the goodness of the model. Such samples can be selected from the initial set, and should possess the same properties as those in the calibration set. The quality of the results is assessed in terms of parameters such as the relative standard error of prediction (RSEP) or the root mean square error of prediction (RMSEP).

10.3.6 Prediction of new samples

Once its goodness has been checked, the model can be used to predict production samples. This entails applying it to new samples that are assumed to be similar in nature to those employed to construct the model. This, however, is not always the case as uncontrolled changes in the process can alter the spectra of the samples and lead to

spurious values for the target parameter. Instrument-control software typically includes statistical methods for identifying outliers and excluding them prior to quantitation; the use of sample identification and qualification techniques prior to the quantitation solves this problem. One other important consideration is that the model retains its quality characteristics when interpolating, that is when the values to be predicted fall within the concentration range spanned by the calibration curve. In fact, extrapolation is unacceptable in routine analyses.

10.4 Method validation

Every analytical method should be validated in order to ensure that it is clearly and completely understood. This is accomplished by applying appropriate methodologies to determine properly selected parameters. The methodology usually employed to validate analytical methods has been designed for univariate techniques (e.g. HPLC, UV-Vis spectrophotometry). Its adaptation to NIR spectroscopy is made difficult by the multivariate nature of calibration. Recently, EMEA,⁸³ the Pharmaceutical Analytical Sciences Group,⁴ ICH⁸⁴ and pharmacopoeias have issued guidelines for their specific application to the validation of NIR methods. The quality parameters recommended for the determination of major compounds include specificity, linearity, range, accuracy, repeatability, intermediate precision and robustness. Other parameters such as the detection limit, quantitation limit and reproducibility are unnecessary. In a review, Moffat⁸⁵ described and critically compared the characteristics of different validation parameters. The special features of NIR warrant some comment. The greatest difference lies in specificity. As noted earlier, NIR spectrometry is unselective, so it does not necessarily allow the presence of a given analyte in a pharmaceutical preparation to be uniquely identified. The application of a quantitative method to a spectrum can yield spurious results if the samples examined are different from those used to construct the model. Probably the only reliable approach to the demonstration of specificity is the use of both identification and quantitation tests; a pharmaceutical preparation passing the identification test will be of the same type as those used for calibration and hence fit for application of the model. This makes a substantial difference to the methodology used to validate methods based on other techniques.

10.5 Matching models

Constructing a multivariate model is a time-consuming task that involves various operations including the preparation of a sizeable number of samples, recording their spectra, and developing and validating the calibration equation. Obtaining an appropriate calibration model therefore involves a substantial investment of time – and of money as a result. In the process, the usual variability in laboratory work (e.g. in the recording of spectra by different operators and/or on different days, in the samples to be analyzed) is incorporated into the model. The incorporation of variability sources makes the model

more robust and avoids adverse effects of typical laboratory variations on the determination of the target parameter.

The model can lose its predictive capacity for reasons such as a dramatic change in the nature of the samples. A new calibration model better adjusted to the new situation must therefore be constructed. In other cases, however, the model can be re-adjusted (re-standardized) in order to ensure a predictive capacity not significantly different from the original one.

The calibration model may exhibit a decrease in the ability to predict new samples due to changes in the instrumentation. The differences in instrumentation may introduce variability in the spectra. The potential sources of variability include the following:

- (a) Replacing the analytical equipment with one of similar, better or rather different characteristics. If both systems are available simultaneously for an adequate length of time, then spectra can be recorded on both in order to derive as much information as possible in order to solve the problem. The original equipment is known as the *Master* and that replacing it as the *Slave*.
- (b) Transferring calibration to another work center. Because the ability to use the Master and Slave simultaneously may not exist, the amount of useful spectral information may be inadequate.
- (c) Breakdown of the instrument or end of its service lifetime. Repairing or replacing an instrument may alter spectral responses if the instruments are not perfectly matched. Because this is an unexpected event, spectra recorded prior to the incident are rarely available.

One plausible solution involves recalibration with the new equipment. This drastic choice entails ignoring the whole work previously done for this purpose, which is only acceptable in extreme cases where no alternative solution exists.

A host of mathematical techniques for standardizing calibration models is available, which focus on the coefficients of the model, the spectral response or the predicted values.⁸⁶

Standardizing the coefficients of the model entails modifying the calibration equation. This procedure is applicable when the original equipment is replaced (situation (a) above). Forina *et al.*⁸⁷ developed a two-step calibration procedure by which a calibration model is constructed for the Master ($Y-X$), its spectral response correlated with that of the Slave ($X-X'$) and, finally, a global model correlating variable Y with both X and X' is obtained. The process is optimized in terms of SEP and SEC for both instruments as it allows the number of PLS factors used to be changed. Smith *et al.*⁸⁸ propose a very simple procedure to match two different spectral responses.

Standardizing the spectral response is mathematically more complex than standardizing the calibration models but provides better results⁸⁹ as it allows slight spectral differences – the most common between very similar instruments – to be corrected via simple calculations. More marked differences can be accommodated with more complex and specific algorithms. This approach compares spectra recorded on different instruments which are used to derive a mathematical equation, allowing their spectral response to be mutually correlated. The equation is then used to correct the new spectra recorded on the Slave, which are thus made more similar to those obtained with the Master. The simplest

methods used in this context are of the univariate type, which correlate each wavelength in two spectra in a direct, simple manner. These methods, however, are only effective with very simple spectral differences. On the other hand, multivariate methods allow the construction of matrices correlating bodies of spectra recorded on different instruments for the above-described purpose. The most frequent choice in this context is piecewise direct standardization (PDS),⁹⁰ which is based on the use of moving windows that allow corrections to be applied in specific zones. Other methods⁸⁶ used for this purpose include simple wavelength standardization (SWS), multivariate wavelength standardization (MWS) and direct standardization (DS).

Standardizing the predicted values is a simple, useful choice that ensures smooth calibration transfer in situations (a) and (b) (p. XXX). The procedure involves predicting samples for which spectra have been recorded on the Slave using the calibration model constructed for the Master. The predicted values, which may be subject to gross errors, are usually highly correlated with the reference values. The ensuing mathematical relation, which is almost always linear, is used to correct the values subsequently obtained with the Slave.

Alternative mathematical methods such as artificial neural networks (ANN), maximum likelihood PCA and positive matrix factorization have also proved effective for calibration transfer, but are much more complex than the previous ones and are beyond the scope of this chapter.

10.6 Pharmaceutical applications

10.6.1 Determination of physical parameters

The NIR spectrum contains information about the physical characteristics of samples, as well as chemical information, which are the basis for the previously discussed applications. This makes it suitable for determining physical parameters.

Particle size determinations are of paramount significance to the pharmaceutical industry and incorrect grain-size analyses can lead to altered properties such as coating power, hinder subsequent mixing of powders (for tablet formulations) or powder and liquids (suspensions), and result in defective pressing of solid mixtures in manufacturing tablets. Because particle size is one of the physical parameters most strongly influencing NIR spectra, it is an effective alternative to the traditional methods involving sieving, light scattering by suspensions, gas adsorption on solid surfaces or direct inspection under a microscope.

Ciurczak *et al.*⁹¹ used the linear relationship of band intensity at a constant concentration on the average particle size at a preset wavelength to determine the average particle size of pure substances and granules. They found plots of absorbance vs particle size at variable wavelengths to consist of two linear segments, and the effect of particle size on reflectance measurements to be significantly reduced below 80 μm .

Ilari *et al.*⁹² explored the feasibility of improving the determination of the average particle size of two highly reflecting inorganic compounds (*viz.* crystalline and amorphous

NaCl) and an NIR-absorbing species (amorphous sorbitol), using the intercept and slope obtained by subjecting spectra to MSC treatment as input parameters for PLSR.

Blanco *et al.*⁹³ determined the average particle size of Piracetam[®] over the average size range of 175–325 μm with an error of $\pm 15 \mu\text{m}$. NIR was used for quantification of particle size with the aid of MLR and PLSR calibrations.

While particle size continues to be the physical property most frequently determined by NIR spectroscopy, several other parameters including the dissolution rate and the thickness and hardness of the ethylcellulose coating on theophylline tablets have also been determined using NIR, all with good errors of prediction.⁹⁴ Tablet hardness, which dictates mechanical stability and dissolution rate, has been determined in hydrochlorothiazide tablets.⁹⁵

The presence of an unwanted polymorph, even in small proportions, in an API can significantly affect its response by inducing its polymorphic transformation. The determination of polymorphs and *pseudo*-polymorphs, which can be regarded as impurities, is gaining significance, thanks to the fact that NIR can advantageously replace traditional X-ray diffraction methods on account of its high sensitivity and expeditiousness. A number of API polymorphs have been determined using NIR^{96–98} or Raman spectroscopy.⁹⁹ Blanco *et al.* applied this technique to the determination of the crystalline forms in amorphous antibiotics^{100,101} and in tablets.⁹⁷

Some authors have examined polymorphic transformations resulting from hydration of the product¹⁰² or the passage of time.^{47,55}

10.6.2 Determination of moisture

Water is one of the most strongly absorbing compounds in the NIR spectral region. This makes it an unsuitable solvent and considerably restricts the determination of species in water. Due to its strong absorbance, water can be determined as an analyte at very low concentrations. Direct inspection of a NIR spectrum allows one to distinguish differences in moisture content among batches of the same product. The presence of crystallization or adsorbed water in pure substances and pharmaceutical preparations, whether during treatment or storage of the sample, causes significant changes in those properties that influence chemical decay rates, crystal dimensions, solubility and compaction power, among others. NIR spectroscopy is an effective alternative to traditional analytical methods such as the Karl Fischer (KF) titration for quantifying moisture. The NIR spectrum for water exhibits five absorption maxima at 760, 970, 1190, 1450 and 1940 nm. The positions of these bands can be slightly shifted by temperature changes^{103–105} or hydrogen bonding between the analyte and its matrix.^{106,107} The bands at 760, 970 and 1450 nm correspond to the first three overtones of O–H stretching vibrations, whereas the other two are due to combinations of O–H oscillations and stretching. The specific band to be used to determine water will depend on the desired sensitivity and selectivity levels.¹⁰⁸ As a rule, the overtone bands are appropriate for this purpose when using solutions in solvents that do not contain O–H groups; on the other hand, the band at 1940 nm provides increased sensitivity.

Table 10.2 Applications of NIR spectroscopy in pharmaceutical determination

Analyte	Sample type	Calibration method	Remarks	References
Paracetamol	Tablet	PLS	Errors less than 1.5%	64
Rutin, Ascorbic acid	Tablet	MLR	Non-destructive quantitation method. Errors (SEP) less than 0.7%. Method validated using ICH-adapted guidelines	129
Acetylsalicylic acid	Tablet	PLS	Non-destructive quantitation method in three different formulations. Reflectance and transmittance modes compared. Errors less than 3%	130
Otilonium bromide	Powder and tablet	PLS	Non-destructive quantitation method. Errors less than 0.8%	131
Acetylsalicylic acid	Tablet	ANN	Errors less than 2.5%	132
Caffeine	Tablet	PLS	Identification and quantitation in mixtures (foodstuffs, sugar, others). Errors less than 2.3%	133
Analgin	Solid	PLS	Method validated following ICH-adapted guidelines. Errors less than 1.5%	134
Analgin	Solid	PCR, PLS, ANN	Different calibration strategies compared. Errors less than 0.7%	135
Cocaine, Heroin, MDMA	Solid	PLS	Non-destructive quantitation method	136
Miokamycin	Solid	PLS	Validation of the proposed method	137
Mannitol	Solid	PCR, PLS, ANN	Different routine parameters compared. Errors less than 0.15%	138
Senosides	Senna pods	PLS	Errors less than 0.1%	139
Senosides	Senna pods	PLS	Transflectance mode used. Method validated using ICH-adapted guidelines	140
Resorcinol	Water solution	MLR	Non-destructive quantitation method. Errors (SEP) less than 0.7%. Method validated using ICH-adapted guidelines	141
Dexketoprofen	Gel	PLS	Non-destructive quantitation method. Errors less than 0.8%	58
Ketoprofen	Gel	PLS	Non-destructive quantitation method in three different formulations. Reflectance and transmittance modes compared. Errors less than 3%	142

The earliest applications for quantitative analysis of liquid samples¹⁰⁹ and solid preparations¹⁰⁷ entailed sample dissolution in an appropriate solvent and using an MLR calibration. MLR calibration models can also be applied in methods based on reflectance measurement of spectra.

A number of moisture determinations in APIs and pharmaceutical preparations based on both reflectance and transmission measurements have been reported.^{110–114} Their results are comparable to those of the KF method.

The high sensitivity provided by the NIR technique has fostered its use in the determination of moisture in freeze-dried pharmaceuticals.^{115–120} The non-invasive nature of NIR has been exploited in determination of moisture in sealed glass vials.^{121–123}

10.6.3 Determination of active pharmaceutical ingredients

The strict regulations of the pharmaceutical industry have a significant effect on the quality control of final products, demanding the use of reliable and fast analytical methods. The capacity that the technique has for the simultaneous determination of several APIs with no need of, or with minimum, sample pretreatment has considerably increased its application in pharmaceutical analytical control. The main limitation of NIR is the relative reduced sensitivity that limits the determination of APIs in preparations when its concentration is smaller than 1%. Nevertheless, instrumental improvements allow the determination below this limit depending on the nature of the analyte and the matrix, with comparable errors to the ones obtained with other instrumental techniques. The reference list presents an ample variety of analytical methodologies, types of samples, nature of analyte and calibration models. A detailed treatment of each one eludes to the extension of this chapter. Many applications have been gathered in recent reviews.^{124–128} Table 10.2 summarizes the most recent reported uses of NIR in this context.

References

1. Springsteen, A. & Ricker, T. (1996) Standards for the measurement of diffuse reflectance. Part I; *NIR News* 7, 6.
2. Barnes, P.Y., Early, E.A. & Parr, A.C. (1988) NIST measurement services: Spectral reflectance. *NIST Special Publication*, SP250–48.
3. *European Pharmacopeia*, 4th Edition (2002), Section 2.2.40: Near infrared spectrophotometry.
4. Broad, N., Graham, P., Hailey, P., Hardy, A., Holland, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N. and Warren, P. Pharmaceutical applications, guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry. In Chalmers, J.M. and Griffiths, P.R. (eds); *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Vol. 5; John Wiley & Sons Ltd; Chichester, UK, 2002; pp. 3590–3610.
5. Olinger, J.M., Griffiths, P.R. and Burger, T. Theory of diffuse reflectance in the NIR region. In Burns, D. and Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York, 2001; pp. 19–52.

6. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., Pezuela, C. and Russo, E. (1994) Control analysis of a pharmaceutical preparation by near-infrared reflectance spectroscopy: A comparative study of a spinning module and fibre optic probe; *Anal. Chim. Acta* **298**, 183–191.
7. Mark, H. Qualitative discriminant analysis. In Burns, D. and Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York, 2001; pp. 351–362.
8. Bratchell, N. (1989) Cluster analysis; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **6**, 105–125.
9. Strouf, O. (1986) *Chemical Pattern Recognition*; Research Studies Press; Letchworth.
10. Cáceres-Alonso, P. and García-Tejedor, A. (1995) Non-supervised neural categorisation of near infrared spectra. Application to pure compounds; *J. Near Infrared Spectrosc.* **3**, 97–110.
11. Derde, M.P. and Massart, D.L. (1986) Supervised pattern recognition: The ideal method?; *Anal. Chim. Acta* **191**, 1–16.
12. Lachenbruch, P.A. (1975) *Discriminant Analysis*; Hafner Press; New York.
13. Coomans, D. and Massart, D.L. (1982) Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 1: K-nearest neighbour classification by using alternative voting rules; *Anal. Chim. Acta* **136**, 15–27.
14. Coomans, D. and Massart, D.L. (1982) Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 2: Probabilistic classification on the basis of the kNN method modified for direct density estimation; *Anal. Chim. Acta* **138**, 153–165.
15. Coomans, D. and Broeckaert, I. (1986) *Potential Pattern Recognition*; Wiley; New York.
16. Coomans, D., Derde, M.P., Massart, D.L. and Broeckaert, I. (1981) Potential methods in pattern recognition. Part 3: Feature selection with ALLOC; *Anal. Chim. Acta* **133**, 241–250.
17. Jurickskay, I. and Veress, G.E. (1981) PRIMA: A new pattern recognition method; *Anal. Chim. Acta* **171**, 61–76.
18. Derde, M.P. and Massart, D.L. (1986) UNEQ: A disjoint modelling technique for pattern recognition based on normal distribution; *Anal. Chim. Acta* **184**, 33–51.
19. VISION User Manual (1998) Foss NIRSystems, Silver Spring, Maryland, USA.
20. Gemperline, P.J. and Webber, L.D. (1989) Raw materials testing using soft independent modeling of class analogy analysis of near infrared reflectance spectra; *Anal. Chem.* **61**, 138–144.
21. Bertran, E., Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. and Montoliu, I.J. (2000) Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins; *J. Near Infrared Spectrosc.* **8**, 45–52.
22. Shah, N.K. and Gemperline, P.J. (1990) Combination of the Mahalanobis distance and residual variance pattern recognition techniques for classification of near-infrared reflectance spectra; *Anal. Chem.* **62**, 465–470.
23. Workman, J.J., Jr, Mobley, P.R., Kowalski, B.R. and Bro, R. (1996) Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985–1995, Part I; *Appl. Spectrosc. Rev.* **31**, 73–124.
24. Smola, N. and Urleb, U. (1999) Near infrared spectroscopy applied to quality control of incoming material in the pharmaceutical industry; *Farmaceutski Vestnik* **50**, 296–297.
25. Scafi, S.H. and Pasquini, C. (2001) Identification of counterfeit drugs using near-infrared spectroscopy; *Analyst* **126**, 2218–2224.
26. Ulmschneider, M., Barth, G. and Trenka, E. (2000) Building transferable cluster calibrations for the identification of different solid excipients with near-infrared spectroscopy; *Drugs* **43**, 71–73.
27. Ren, Y., Li, W., Guo, Y., Ren, R., Zhang, L., Jin, D. and Hui, C. (1997) Study on quality control of metronidazole powder pharmaceuticals using near infrared reflectance first-derivative spectroscopy and multivariate statistical classification technique; *Jisuanji Yu Yingyong Huaxue* **14**, 105–109.
28. Yoon, W.L., North, N.C., Jee, R.D. & Moffat, A.C. Application of a polar qualification system in the near infrared identification and qualification of raw pharmaceutical excipients. In Davies,

- A.M.C. and Giangiacomo, R. (eds); *Near Infrared Spectroscopy, Proceedings of the International Conference, 9th*, Verona, Italy, June 13–18, 1999; NIR Publications; Chichester, UK, 2000; pp. 547–550.
29. Blanco, M. and Romero, M.A. (2001) Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: A solution for identity confirmation; *Analyst* **126**, 2212–2217.
 30. Hackmann, E.R.M.K., De Abreu, E.M.C. and Santoro, M.I.R.M. (1999) Corn starch identification by near infrared spectroscopy; *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas* **35**, 141–146.
 31. Woo, Y., Kim, H. and Cho, J. (1999) Identification of herbal medicines using pattern recognition techniques with near-infrared reflectance spectra; *Microchem. J.* **63**, 61–70.
 32. Hernandez Baltazar, E. and Rebollar, B.G. (2002) Development of identification method by near-infrared spectroscopy: Acetaminophen tablets; *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* **33**, 42–47.
 33. Candolfi, A., De Maesschalck, R., Massart, D.L., Hailey, P.A. and Harrington, A.C.E. (1999) Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 923–935.
 34. Khan, P.R., Jee, R.D., Watt, R.A. and Moffat, A.C. (1997) The identification of active drugs in tablets using near infrared spectroscopy; *Pharm. Sci.* **3**, 447–453.
 35. Uhl, V.W. and Gray, J.B. (1967) *Mixing: Theory and Practice*; Academic Press; New York.
 36. Schirmer, R.E. (1991) *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, vol. 2, 2nd Edition; CRC Press; Boca Raton; pp. 31–126.
 37. Jensen, R., Peuchant, E., Castagne, I., Boirac, A.M. and Roux, G. (1988) One-step quantification of active ingredient in pharmaceutical tablets using near-infrared spectroscopy; *Spectrosc.* **6**(2), 63–72.
 38. Lonardi, S., Viviani, R., Mosconi, L., Bernuzzi, M., Corti, P., Dreassi, P., Murrazzu, C. and Corbin, G.J. (1989) Drug analysis by near-infrared reflectance spectroscopy. Determination of the active ingredient and water content in antibiotic powders; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 303–308.
 39. Dreassi, E., Ceramelli, G., Corti, P., Lonardi, P.S. and Perruccio, P. (1995) Near-infrared reflectance spectrometry in the determination of the physical state of primary materials in pharmaceutical production; *Analyst* **120**, 1005–1008.
 40. Reeves, J.B. (1995) Near- versus mid-infrared spectroscopy: Relationships between spectral changes induced by water and relative information content of the two spectral regions in regard to high-moisture samples; *Appl. Spectrosc.* **49**, 295–903.
 41. Plugge, W. and Van der Vlies, C.J. (1993) Near-infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 435–442.
 42. Corti, P., Dreassi, E., Ceramelli, G., Lonardi, S., Viviani, R. and Gravina, S. (1991) Near Infrared Reflectance Spectroscopy applied to pharmaceutical quality control. Identification and assay of cephalosporins; *Analysis* **19**, 198–204.
 43. Drennen, J.K. and Lodder, R.A. (1993) Pharmaceutical applications of near-infrared spectrometry. In Patonay, G. (ed.); *Advances in Near Infrared Measurements*, vol. 1; JAI Press; Greenwich, CT; 1993, pp. 93–112.
 44. Ciurczak, E.W. (1991) Following the progress of a pharmaceutical mixing study via near-infrared spectroscopy; *Pharm. Tech.* **15**, 140.
 45. Wargo, D.J. and Drennen, J.K. (1996) Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1415–1423.
 46. Cuesta, S.F., Toft, J., Van den Bogaert, B., Massart, D.L., Dive, S.S. and Hailey, P. (1995) Monitoring powder blending by NIR spectroscopy; *Fresenius J. Anal. Chem.* **352**, 771–778.

47. Van der Vlies, C., Kaffka, K.J. and Plugge, W. (1995) Qualifying pharmaceutical substances by fingerprinting with near-IR spectroscopy and the polar qualification system; *Pharm. Technol. Eur.* **7**, 46–49.
48. Hailey, P.A., Doherty, P., Tapsell, P., Oliver, T. and Aldridge, P.K. (1996) Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy part I. System development and control; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 551–559.
49. Sekulic, S.S., Ward, H.W., Brannegan, D.R., Stanley, E.D., Evans, C.L., Sciavolino, S.T., Hailey, P.A. and Aldridge, P.K. (1996) On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy; *Anal. Chem.* **68**, 509–513.
50. Sekulic, S.S., Wakeman, J., Doherty, P. and Hailey, P.A. (1998) Automated system for the online monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II: Qualitative approaches to blend evaluation; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1285–1309.
51. Blanco, M., Gonzalez, R. and Bertran, E. (2002) Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy; *Talanta* **56**, 203–212.
52. Ciurczak, E.W. (1987) Use of near infrared in pharmaceutical analyses; *Appl. Spectrosc. Rev.* **23**, 147.
53. Osborne, B.G. and Fearn, T. (1986) *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*; Wiley; New York, 1986.
54. Aldridge, P.K., Evans, C.L., Ward, H.W., Colgan, S.T., Boyer, N. and Gemperline, P.J. (1996) Near-IR detection of polymorphism and process-related substances; *Anal. Chem.* **68**, 997–1002.
55. Norris, T., Aldridge, P.K. and Sekulic, S.S. (1997) Determination of end-points for polymorph. Conversions of crystalline organic compounds using on-line near-infrared spectroscopy; *Analyst* **122**, 549–552.
56. Gimet, R. and Luong, A.T. (1987) Quantitative determination of polymorphic forms in a formulation matrix using the near infra-red reflectance analysis technique; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**, 205–211.
57. Buckton, G., Yonemochi, E., Hammond, J. and Moffat, A. (1998) The use of near infra-red spectroscopy to detect changes in the form of amorphous and crystalline lactose; *Int. J. Pharm.* **168**, 231–241.
58. Blanco, M. and Romero, M.A. (2002) Near infrared transreflectance spectroscopy. Determination of dexketoprofen in a hydrogel; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 467–472.
59. Thomas, E.V. and Haaland, D.M. (1990) Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis; *Anal. Chem.* **62**, 1091–1099.
60. Draper, N. and Smith, H. (1981) *Applied Regression Analysis*, 2nd Edition; Wiley; New York.
61. Martens, H. and Næs, T. (1991) *Multivariate Calibration*; Wiley; New York.
62. ASTM E1655-00. Standard practices for infrared, multivariate, quantitative analysis; In: Annual Book of Standards, vol. 3.06, American Society for Testing and Materials; West Conshohocken, PA, 1997.
63. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S. and Pezuela, C. (1997) Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry; *Analyst* **122**, 761–765.
64. Trafford, D., Jee, R.D., Moffat, A.C. & Graham, P. (1999) A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy; *Analyst* **124**, 163–167.
65. Corti, P., Ceramelli, G., Dreassi, E. and Mattii, S. (1999) Near infrared transmittance analysis for the assay of solid pharmaceutical dosage forms; *Analyst* **124**, 755–758.
66. Corti, P., Dreassi, E., Murratzu, C., Corbini, G., Ballerini, L. and Gravina, S. (1989) Application of NIRS to the quality control of pharmaceuticals. Ketoprofen assay in different pharmaceutical formulae; *Pharmaceutica Acta Helveticae* **64**, 140–145.
67. Buchanan, B. and Honigs, D. (1986) Trends in near-infrared analysis; *Trends Anal. Chem.* **5**, 154–157.

68. Honigs, D.E., Hieftje, G.M. and Hirschfeld, T. (1984) A new method for obtaining individual component spectra from those of complex mixtures; *Appl. Spectrosc.* **38**, 317–322.
69. Cowe, I.A., McNicol, J.W. and Cuthbertson, D.C. (1985) A designed experiment for the examination of techniques used in the analysis of near-infrared spectra. Part 2: Derivation and testing of regression models; *Analyst* **110**, 1233–1240.
70. Næs, T. and Isaksson, T. (1993) Non-linearity problems in NIR spectroscopy; *NIR News* **4**(3), 14.
71. Miller, C.E. (1993) Sources of non-linearity in near infrared methods; *NIR News* **4**(6), 3.
72. Long, R.L., Gregoriov, V.G., and Gemperline, P.J. (1990) Spectroscopic calibration and quantitation using artificial neural networks; *Anal. Chem.* **62**, 1791–1797.
73. Gemperline, P.J., Long, J.R. and Gregoriov, V.G. (1991) Nonlinear multivariate calibration using principal components regression and artificial neural networks; *Anal. Chem.* **63**, 2313–2323.
74. Næs, T., Kvaal, K., Isaksson, T. and Miller, C. (1993) Artificial neural networks in multivariate calibration; *J. Near Infrared Spectrosc.* **1**, 1–11.
75. Walczak, B. and Wegscheimer, W. (1993) Non-linear modelling of chemical data by combinations of linear and neural networks methods; *Anal. Chim. Acta* **283**, 508–517.
76. Liu, Y., Upadhyaya, B.R. and Naghedolfeizi, M. (1993) Chemometric data analysis using artificial neural networks; *Appl. Spectrosc.* **47**, 12–23.
77. Næs, T., Isaksson, T. and Kowalski, B.R. (1990) Locally weighted regression and scatter correction for near-infrared reflectance data; *Anal. Chem.* **62**, 664–673.
78. Isaksson, T., Miller, C.E. and Næs, T. (1992) Nondestructive NIR and NIT determination of protein, fat, and water in plastic-wrapped, homogenized meat; *Appl. Spectrosc.* **46**, 1685–1694.
79. Friedman, J.H. and Stuetzle, W. (1981) Projection pursuit regression; *J. Am. Stat. Assoc.* **76**, 817–823.
80. Beebe, K.R. and Kowalski, B.R. (1988) Nonlinear calibration using projection pursuit regression: Application to an array of ion-selective electrodes; *Anal. Chem.* **60**, 2273–2278.
81. Vogt, N.B. (1989) Polynomial principal component regression: An approach to analysis and interpretation of complex mixture relationships in multivariate environmental data; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **7**, 119–130.
82. Wold, S., Wold, N.K. and Skagerber, B. (1989) Nonlinear PLS modelling; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **7**, 53–65.
83. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf> Note for guidance. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 2003.
84. ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
85. Moffat, A.C., Trafford, A.D., Jee, R.D. and Graham, P. (2000) Meeting of the international conference on harmonisation's guidelines on validation of analytical procedures: Quantification as exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets; *Analyst* **125**, 1341–1351.
86. Feudale, R.N., Woody, H.T., Myles, A.J., Brown, S.D. and Ferre, J. (2002) Transfer of multivariate calibration models: A review; *Chem. Intell. Lab. Sys.* **64**, 181–192.
87. Forina, M., Drava, G., Armanino, C., Boggia, R., Lanteri, S., Leardi, R., Corti, P., Conti, P., Giangiacomo, R., Galliena, C., Bigoni, R., Quartari, I., Serra, C., Ferri, D., Leoni, O. and Lazzari, L. (1995) Transfer of calibration function in near-infrared spectroscopy; *Chem. Intell. Lab. Sys.* **27**, 189–203.
88. Smith, M.R., Jee, R.D. and Moffat, A.C. (2002) The transfer between instruments of a reflectance near-infrared assay for paracetamol in intact tablets; *Analyst* **127**, 1682–1692.
89. Wang, Y., Veltkamp, D.J. and Kowalski, B.R. (1991) Multivariate Instrument Standardization; *Anal. Chem.* **63**, 2750–2756.

90. Bouveresse, E., Hartmann, C., Massart, D.L., Last, I.R. and Prebble, K.A. (1996) Standardization of near-infrared spectrometric instruments; *Anal. Chem.* **68**, 982–990.
91. Ciurczak, E.W., Torlini, R.P. and Demkowicz, M.P. (1986) Determination of particle size of pharmaceutical raw materials using near-infrared reflectance spectroscopy; *Spectroscopy* **1**(7), 36.
92. Ilari, J.L., Martens, H. and Isaksson, T. (1988) Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance; *Appl. Spectrosc.* **42**, 722–728.
93. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., González, F. and Pous, R. Near infrared spectroscopy. In Hildrum, K.I., Isaksson, T., Næs, T. & Tandberg, A. (eds); *Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*; Ellis Horwood; Chichester, 1992; pp. 401–406.
94. Kirsch, J.D. and Drennen, J.K. (1995) Determination of film-coated tablet parameters by near-infrared spectroscopy; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 1273–1281.
95. Morisseau, K.M. and Rhodes, C.T. (1997) Near-infrared spectroscopy as a nondestructive alternative to conventional tablet hardness testing; *Pharm. Res.* **14**, 108–111.
96. Luner, P.E., Majuru, S., Seyer, J.J. and Kemper, M.S. (2000) Quantifying crystalline form composition in binary powder mixtures using near-infrared reflectance spectroscopy; *Pharm. Dev. Tech.* **5**, 231–246.
97. Otsuka, M., Kato, F., Matsuda, Y. and Ozaki, Y. (2003) Comparative determination of polymorphs of indomethacin in powders and tablets by chemometrical near-infrared spectroscopy and X-ray powder diffractometry; *AAPS PharmSciTech* **4**, 147–158.
98. Patel, A.D., Luner, P.E. and Kemper, M.S. (2000) Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy; *Int. J. Pharm.* **206**, 63–74. Erratum in: *Int. J. Pharm.* **212**, 295.
99. Deeley, C.M., Spragg, R.A. and Threlfall, T.L.A. (1991) Comparison of Fourier transform infrared and near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy for quantitative measurements: an application; *Spectrochim. Acta, Part A* **47A**, 1217–1223.
100. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S. and Perez-Maseda, C. (2000) Determination of polymorphic purity by near infrared spectrometry; *Anal. Chim. Acta* **407**, 247–254.
101. Blanco, M., Valdes, D., Bayod, M.S., Fernandez-Mari, F. and Llorente, I. (2004) Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry; *Anal. Chim. Acta* **502**, 221–227.
102. Higgins, J.P., Arrivo, S.M. and Reed, R. (2003) Approach to the determination of hydrate form conversions of drug compounds and solid dosage forms by near-infrared spectroscopy; *J. Pharm. Sci.* **92**, 2303–2316.
103. Lin, L. and Brown, C.W. (1992) Near-IR spectroscopic determination of sodium chloride in aqueous solution; *Appl. Spectrosc.* **46**, 1809–1815.
104. Delwiche, S.R., Norris, K.H. and Pitt, R.E. (1992) Temperature sensitivity of near-infrared scattering transmittance spectra of water-adsorbed starch and cellulose; *Appl. Spectrosc.* **46**, 782–789.
105. Lin, J. and Brown, C.W. (1993) Near-IR fiber-optic temperature sensor; *Appl. Spectrosc.* **47**, 62–68.
106. Sinsheimer, J.E. and Poswalk, N.M. (1968) Pharmaceutical applications of the near infrared determination of water; *J. Pharm. Sci.* **57**, 2007–2010.
107. Issa, R.M., El-Marsafy, K.M. and Gohar, M.M. (1988) Application of the near infrared spectrophotometry as an analytical procedure for the determination of water in organic compounds and pharmaceutical products; *An. Quim.* **84**, 312–315.
108. Böhme, W., Liekmeier, W., Horn, K. and Wilhelm, C. (1990) Water determination by near infrared spectroscopy; *Labor Praxis* **14**, 86–89.

109. Ludvik, J., Hilgard, S. and Volke, J. (1988) Determination of water in acetonitrile, propionitrile, dimethylformamide and tetrahydrofuran by infrared and near-infrared spectrometry; *Analyst* **113**, 1729–1731.
110. Keutel, H., Gobel, J. and Mehta, V. (2003) NIR diode array spectrometer in pharmaceutical production control; *Chemie Technik* **32**, 48–50.
111. Leasure, R.M. and Gangwer, M.K. (2002) Near-infrared spectroscopy for in-process moisture determination of a potent active pharmaceutical ingredient; *Am. Pharm. Rev.* **5**(1), 103–104, 106, 108–109.
112. Dunko, A. and Doveloglou, A. (2002) Moisture assay of an antifungal by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 145–154.
113. David, A.Z., Antal, I., Acs, Z., Gal, L. and Greskovits, D. (2000) Investigation of water diffusion in piracetam by microwave moisture measurement and near-infrared spectroscopy; *Hung. J. Ind. Chem.* **28**, 267–270.
114. Zhou, X., Hines, P. and Borer, M.W. (1998) Moisture determination in hygroscopic drug substances by near infrared spectroscopy; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 219–225.
115. Stokvold, A., Dyrstad, K. and Libnau, F.O. (2002) Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 867–873.
116. Birrer, G.A., Liu, J., Halas, J.M. and Nucera, G.G. (2000) Evaluation of a container closure integrity test model using visual inspection with confirmation by near infrared spectroscopic analysis; *J. Pharm. Sci. Tech.* **54**, 373–382.
117. Buhler, U., Maier, E. and Muller, M. (1998) Determination of the water content in lyophilizates with NIR; *Pharma Technologie Journal* **19**, 49–55.
118. Savage, M., Torres, J., Franks, L., Masecar, B. and Hotta, J. (1998) Determination of adequate moisture content for efficient dry-heat viral inactivation in lyophilized factor VIII by loss on drying and by near infrared; *Biologicals* **26**, 119–124.
119. Han, S.M. and Faulkner, P.G. (1996) Determination of SB 216469-S during tablet production using near-infrared reflectance spectroscopy; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1681–1689.
120. Derksen, M.W.J., Van De Oetelaar, P.J.M. and Maris, F.A. (1998) The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 473–480.
121. Moy, T., Calabria, A. and Hsu, C. (2001) Near infrared: A non-invasive method to determine residual moisture of lyophilized protein pharmaceuticals; *American Chemical Society 221st National Meeting*, BIOT-016. Meeting abstract.
122. Jones, J.A., Last, I.R., MacDonald, B.F. and Prebble, K.A. (1993) Development and transferability of near-infrared methods for determination of moisture in a freeze-dried injection product; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 1227–1231.
123. Kamat, M.S., Lodder, R.A. and DeLuca, P.P. (1989) Near-infrared spectroscopic determination of residual moisture in lyophilized sucrose through intact glass vials; *Pharm. Res.* **6**, 961–965.
124. Romanach, R.J. and Santos, M.A. (2003) Content uniformity testing with near infrared spectroscopy; *Am. Pharm. Rev.* **6**(2), 62, 64–67.
125. Lyon, R.C., Jefferson, E.H., Ellison, C.D., Buhse, L.F., Spencer, J.A., Nasr, M. and Hussain, A.S. (2003) Exploring pharmaceutical applications of near-infrared technology; *Am. Pharm. Rev.* **6**(3), 62, 64–66, 68–70.
126. Ciurczak, E.W. and Drennen, J.K. Pharmaceutical applications of near-infrared-spectroscopy. In Raghavachari, R. (ed.); *Near-Infrared Applications in Biotechnology*; Marcel Dekker Inc.; New York, 2001; pp. 349–366.
127. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S. and Pezuela, C. (1998) Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry; *Analyst* **123**, 135–150.

128. Ciurczak, E.W. and Drennen, J.K. Near-infrared spectroscopy in pharmaceutical and biomedical applications. In Burns, D., and Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker, Inc.; New York; 2001; pp. 609–632.
129. Sun, S., Du, D., Zhou, Q., Leung, H.W. and Yeung, H.W. (2001) Quantitative analysis of rutin and ascorbic acid in compound rutin tablets by near-infrared spectroscopy; *Analytical Sciences* **17**, 455–458.
130. Tian, L., Tang, Z., Liu, F., Gou, Y., Guo, Y. and Ren, Y. (2001) Nondestructive quantitative analysis of aspirin by near infrared spectroscopy and artificial neural network; *Fenxi Shiyanshi* **20**(1), 79–81.
131. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. and Pou, N. (2000) Development and validation of a near infrared method for the analytical control of a pharmaceutical preparation in three steps of the manufacturing process; *Fres. J. Anal. Chem.* **368**, 534–539.
132. Merckle, P. and Kovar, K.A. (1998) Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: Acetylsalicylic acid in mono and combination formulations; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 365–374.
133. Laasonen, M., Harmia-Pulkkinen, T., Simard, C., Raesaenen, M. and Vuorela, H. (2003) Development and validation of a near-infrared method for the quantitation of caffeine in intact single tablets; *Anal. Chem.* **75**, 754–760.
134. Ren, Y., Li, W., Guo, Y., Ren, Y., Zhang, L., Sun, Y. and Chen, B. (1997) Noninvasive analysis of analgin by PLS-near-infrared diffuse reflectance spectroscopy; *Jilin Daxue Ziran Kexue Xuebao* **3**, 99–102.
135. Ren, Y., Gou, Y., Tang, Z., Liu, P. and Guo, Y. (2000) Nondestructive quantitative analysis of analgin powder pharmaceutical by near-infrared spectroscopy and artificial neural network technique; *Anal. Lett.* **33**, 69–80.
136. Ryder, A.G., O'Connor, G.M. and Glynn, T.J. (1999) Identifications and quantitative measurements of narcotics in solid mixtures using near-IR Raman spectroscopy and multivariate analysis; *J. Forensic Sci.* **44**, 1013–1019.
137. Blanco, M., Coello, J., Eustaquio, A., Iturriaga, H. and MasPOCH, S. (1999) Development and validation of methods for the determination of miokamycin in various pharmaceutical preparations by use of near infrared reflectance spectroscopy; *Analyst* **124**, 1089–1092.
138. Yang, N., Cheng, Y. and Qu, H. (2003) Quantitative determination of mannitol in *Cordyceps sinensis* using near infrared spectroscopy and artificial neural networks; *Fenxi Huaxue* **31**, 664–668.
139. Pudelko-Koerner, C., Fischer, A., Lentzen, H., Glombitza, K.W. and Madaus A.G. (1996) Quantitative Fourier transform-near infrared reflectance spectroscopy of sennosides in Senna pods; *Pharm. Pharmacol. Lett.* **6**, 34–36.
140. Pudelko-Koerner, C. (1998) Quantitative near-infrared reflectance spectroscopy of sennosides from *Sennae fructus angustifoliae* in in-process and quality control including method validation; *Pharmazeutische Industrie* **60**, 1007–1012.
141. Cinier, R. and Guilment, J. (1996) Quantitative analysis of resorcinol in aqueous solution by near-infrared spectroscopy; *Vib. Spectrosc.* **11**, 51–59.
142. Kemper, M.S., Magnuson, E.J., Lowry, S.R., McCarthy, W.J., Aksornkoe, N., Watts, D.C., Johnson, J.R. and Shukla, A.J. (2001) Use of FT-NIR transmission spectroscopy for the quantitative analysis of an active ingredient in a translucent pharmaceutical topical gel formulation; *Pharm. Sci.* **3**(3), article 23.

UWB