



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**ESPECTROSCOPIA NIR Y RAMAN PARA EL
CONTROL DE CALIDAD EN INDUSTRIA
FARMACÉUTICA**

Julen Arruabarrena Gamboa

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Directores: Santiago Maspoch Andrés y Jordi Coello Bonilla

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

2014

Memoria presentada para aspirar al grado de doctor por **Julen Arruabarrena Gamboa**.

Julen Arruabarrena

Vº Bº,

Prof. Santiago Maspoch

Prof. Jordi Coello

Bellaterra, 22 de julio de 2014

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a las siguientes ayudas institucionales:

Universitat Autònoma de Barcelona

- Concesión beca PiF
- Concesión de una ayuda para una estancia de tres meses en un centro de investigación extranjero.

Agradecimientos

Hace prácticamente diez años que llegué a Catalunya, y con la presentación de esta Tesis se cierra un ciclo con su consiguiente incertidumbre futura. En el camino quedaron recuerdos, y en el camino siguen cabalgando sentimientos, sensaciones y compañeros. Giro la cabeza y observo la ruta realizada, mirando atrás mientras sonrío pero sin detener el continuo traqueteo.

El camino, poblado de personas que contribuyeron a que esta Tesis saliera adelante, agradezco a los compañeros del Grupo de Quimiometría Aplicada lo que aprendí con ellos y con los cuales compartí las amarguras y esfuerzos que todo gran proyecto exige. Quisiera también agradecer la oportunidad que me brindaron mis directores de realizar esta Tesis, que no sólo incluye la formación académica, sino que también me ha permitido ejercer docencia, me ha dado la oportunidad de investigar en el extranjero y me ha hecho crecer como persona y conocerme un a mí mismo un poco mejor.

I would like to thank also (but in English) Thomas and Margot for treating me so well, teaching me and for giving me the opportunity to learn about another culture, about another way of working and of course, about Pharmaceutical Analysis.

Y en especial, mis agradecimientos van para aquéllos que me han hecho sonreír en estos diez años. Vosotros sabéis quienes sois.

Azkenik, esker berezienak nire gurasoei. Hasiera batetik hor egon zarie eta ez dot inoiz ahaztuko.

“Well I’ve had my fun, if I don’t get well no more”

(James Burke Oden, 1941)

“Gogoko bajatzu paper au, gorde, bestela sutten erre”

Índice

RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
OBJETIVOS.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.....	3
1.2 NIR.....	8
1.2.1 Historia	8
1.2.2 Fundamentos.....	9
1.2.3 Instrumentacion.....	11
1.2.3.1 Fuente de radiación	12
1.2.3.2 Selector de longitud de onda	12
1.2.3.3 Compartimento de muestra	13
1.2.3.4 Detector	14
1.2.4 Aplicaciones	15
1.3 RAMAN.....	17
1.3.1 Historia	17
1.3.2 Fundamentos.....	17
1.3.3 Instrumentación.....	21
1.3.3.1 Iluminación de la muestra	23
1.3.3.2 Fuentes de excitación	25
1.3.3.3 Tipos de láser	26
1.3.3.4 Selectores longitud de onda	26
1.3.3.5 Detectores.....	27
1.3.4 Aplicaciones Raman	30
1.4 QUIMIOMETRÍA.....	32
1.4.1 Etapas de modelado	33
1.4.1.1 Selección de muestras de calibración.....	34
1.4.1.2 Método de referencia.....	35
1.4.1.3 Obtención de la señal analítica.....	35
1.4.1.4 Pretratamiento espectral	35
1.4.1.5 Construcción del modelo.....	37
1.4.1.6 Herramientas quimiométricas multivariantes	37
1.4.1.7 Validación del modelo.	39

1.5 DESARROLLO DE MÉTODOS CUANTITATIVOS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	42
1.5.1 Estrategias de calibración.....	43
1.5.2 Cuantificación en muestras intactas.....	46
1.5.3 Error de muestreo y submuestreo	47
1.6 SUBDIVISIÓN DE COMPRIMIDOS	50
1.6.1 ¿Para qué subdividir comprimidos?.....	50
1.6.2 Farmacopea europea.....	51
1.6.3 Farmacopea estadounidense.....	53
1.7 REFERENCIAS	55
2. MATERIAL Y MÉTODOS	61
2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	63
2.1.1 Perifem	63
2.1.2 Aldo Cumar.....	64
2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN	64
2.2.1 Perifem	64
2.2.2 Aldo Cumar.....	65
2.3 INSTRUMENTACIÓN.....	66
2.3.1 NIR.....	66
2.3.2. Raman.....	66
2.3.3 HPLC.....	67
2.4 REGISTRO ESPECTRAL NIR.....	67
2.4.1 Perifem	67
2.4.2 Aldo Cumar.....	68
2.5 REGISTRO ESPECTRAL RAMAN.....	68
2.5.1 Espectrómetro Bruker MultiRam	68
2.5.2 Espectrómetro Kaiser RXN1.....	70
2.5.2.1 Sonda PhAT	70
2.5.2.2 Sonda Microprobe.....	71
2.6 GRANULACIÓN EN CONTINUO	72
2.7. MÉTODOS DE REFERENCIA.....	74
2.7.1 Determinación principio activo (Perifem).....	74
2.7.2 Determinación de warfarina sódica (Aldo Cumar).....	75

Índice

2.7.3 Determinación de humedad en gránulos.....	75
2.7 SOFTWARE PARA EL TRATAMIENTOS DE DATOS.....	76
2.8 REFERENCIAS	78
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
3.1 AUMENTO DE PRECISIÓN Y SENSIBILIDAD EN LA DETERMINACIÓN NIR DE API A BAJA CONCENTRACIÓN	83
3.1.1 Introducción.....	83
3.1.2 Resultados	86
3.1.2.1 Determinación del tiempo óptimo de mezclado.....	87
3.1.2.2 Efecto de los pretratamientos espectrales.	89
3.1.2.3 Efecto de la compactación	93
3.1.2.4 Determinación de API	95
3.2 DETERMINACIÓN NIR POR REFLECTANCIA DE UN API A BAJA CONCENTRACIÓN COMERCIALIZADO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES...100	
3.2.1 Introduccion.....	100
3.2.2 Resultados	101
3.2.2.1 Presión de compactación	101
3.2.2.2 Cambios espectrales debidos a la presión.....	103
3.2.2.3 Determinación de API	105
3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO HERRAMIENTA AUXILIAR PARA LA EVALUACIÓN DE UNIFORMIDAD DE CONTENIDO EN COMPRIMIDOS DIVISIBLES DE WARFARINA.....110	
3.3.1 Introducción.....	110
3.3.2 Resultados	111
3.3.2.1. Efecto del pretratamiento espectral	112
3.3.2.2. Presión de compactación de las muestras de calibración.....	113
3.3.2.3. Análisis Raman	116
3.3.2.4. Calibración univariante.....	117
3.3.2.5. Calibración PLS	118
3.3.2.6. Determinación de warfarina en fracciones individuales.....	122
3.3.2.7. Efecto de la reducción del número de espectros	124
3.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA EN LA EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE CONTENIDO DE API EN COMPRIMIDOS DIVISIBLES	126
3.4.1 Introducción.....	126
3.4.2 Resultados	127
3.4.2.1 Análisis de superficie con sonda PhAT	129

3.4.2.2	Análisis con la sonda Microprobe	136
3.4.2.3	Error de submuestreo.....	141
3.5	COMPARACIÓN DE SONDAS NIR EN EL ANÁLISIS <i>IN-LINE</i> DE HUMEDAD DE SECADOR DE LECHO FLUIDO BAJO LA METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN BASADA EN INTERVALOS DE TOLERANCIA DE EXPECTATIVA β	146
3.5.1.	Introducción.....	146
3.5.2.	Metodología.....	151
3.5.2.1	Análisis NIR	151
3.5.2.2	Lotes de calibración y validación	152
3.5.2.3	Error estándar de laboratorio (SEL)	154
3.5.2.4	Desarrollo del modelo de calibración	155
3.5.3	Resultados	156
3.5.3.1	Datos de referencia.....	156
3.5.3.2	Inspección espectral	158
3.5.3.3	Modelo de calibración	159
3.5.3.4	Validación del modelo.....	160
3.5.3.5	Perfiles de exactitud	163
3.5.3.6	Monitorización de humedad	164
3.5.3.7	Comparación de sondas	166
3.6	REFERENCIAS.....	169
4.	CONCLUSIONES.....	173
5.	ANEXO (artículos publicados).....	179

Resumen

La introducción de la iniciativa PAT (*Process Analytical Technology*) por la FDA en 2004 implicó un cambio radical y fundamenta en la gestión de la calidad en la industria farmacéutica. El núcleo de la iniciativa se basa en la comprensión profunda de todas las etapas y procesos de manufacturación, e intenta facilitar la innovación y basar la toma de decisiones en el riesgo de no obtener la calidad necesaria. Resumidamente, el objetivo es evaluar la calidad en todos los puntos del proceso es decir la calidad del diseño y no únicamente la del producto, que es la estrategia que se ha utilizado históricamente.

La espectroscopia molecular, y en especial la espectroscopia NIR ha sido fundamental en el desarrollo de la iniciativa PAT. En una industria que trabaja fundamentalmente con sólidos, la flexibilidad de muestreo de la espectroscopia NIR junto a la utilización de sondas de fibra óptica permite obtener información física y química, cualitativa y cuantitativa, de manera no destructiva y prácticamente en tiempo real.

La espectroscopia Raman, que comparte numerosas características con la NIR, se ha introducido en la industria farmacéutica con retraso respecto a ésta y sus aplicaciones, establecimiento de protocolos y límites de actuación están aún en fase de desarrollo. Así, esta técnica ofrece, con características de muestreo aún más flexibles que las del NIR, información *complementaria* a la del infrarrojo cercano aunque con una complejidad espectral menor y con mayor potencial en algunos aspectos.

Actualmente, la industria farmacéutica se encuentra en un momento de cambio, donde progresivamente se están implementando las herramientas analíticas PAT, pero donde el grueso del control de calidad se realiza aún bajo el marco clásico. Así, en este contexto, estas técnicas de espectroscopia molecular juegan un papel de importancia tanto en el

análisis de control de calidad clásico (en la cualificación de materias primas o en la cuantificación de principios activos por ejemplo) como en el desarrollo e implementación de la iniciativa PAT.

Un punto crítico en el proceso de fabricación de un preparado farmacéutico sólido es el de asegurar la homogeneidad de la mezcla de principio activo (API) y excipientes. Bajo la iniciativa, asegurando esta homogeneidad se garantizaría la uniformidad de contenido de las dosificaciones. Sin embargo, cuando el API se encuentra a baja concentración (en el entorno del 1% p/p), debido a la limitada sensibilidad de estas técnicas, asegurar la homogeneidad e incluso verificar el contenido final de API con la precisión requerida por las autoridades regulatorias es aún problemático.

Dado el carácter variable del tamaño y morfología de las fracciones de comprimidos, la espectroscopia Raman es una excelente técnica para la cuantificación de principio activo en la fracciones de un comprimido ya que el área de muestreo puede ser ajustado de 50µm hasta varios mm. Sin embargo, debe considerarse el riesgo de submuestreo en el caso de concentraciones bajas por las razones anteriormente esgrimidas.

Una de las aplicaciones prácticas de la espectroscopia NIR es la cuantificación de agua, uno de los analitos de mayor relevancia en la industria farmacéutica. Así, resulta evidente la valía de la implementación de sondas NIR en proceso para la determinación de agua, que permitiría obtener información en tiempo real de lo que ocurre dentro del proceso farmacéutico.

Así, las secciones primera y segunda del capítulo de Resultados y Discusión de esta Tesis intentan aportar soluciones a la cuantificación de API a baja concentración. En la primera

Resumen

sección se desarrolla un protocolo para minimizar las diferencias en *scattering* entre muestras comerciales y las preparadas en laboratorio para la construcción del conjunto de calibración. Aunque los pretratamientos quimiométricos reducen estas diferencias, no las eliminan y, cuanto menores sean de entrada, mejor funcionarán los pretratamientos y mejores serán los modelos de calibración desarrollados.

En la sección primera, se comparan las propiedades analíticas de modelos de cuantificación desarrollados con muestras de laboratorio compactadas y pulverizadas para una preparación comercial sólida con dos API a baja concentración. La compactación favorece la reducción de las diferencias espectrales entre muestras comerciales y de laboratorio obteniéndose así una mayor precisión en la determinación cuantitativa.

En la sección segunda se utiliza el ajuste de la compactación para el desarrollo de un modelo de cuantificación único para la cuantificación de un principio activo en las cuatro dosificaciones en las que está comercialmente disponible.

Las secciones tercera y cuarta tratan de la utilización de la espectroscopia Raman para la cuantificación del principio activo de un preparado disponible en diferentes dosificaciones en comprimidos enteros y en sus potenciales fracciones además de para el estudio de la homogeneidad de contenido en una de las dosificaciones de este preparado comercial.

En la quinta y última sección, se utiliza la espectroscopia NIR para la determinación *in-line* de humedad y de punto final de proceso en un secador de lecho fluido operando en continuo mediante el novedoso protocolo de validación de los intervalos de tolerancia β y se comparan dos sondas NIR utilizadas para este fin.

The introduction of PAT (Process Analytical Technology) initiative by the FDA in 2004 involved a radical and fundamental change in the quality management of the pharmaceutical industry. The core of this initiative is the deep understanding of all the manufacturing steps and processes attempting to ease innovation and to base decision-making on the risk of not achieving the required quality. Briefly, the objective is to assess the quality at all steps of the process, the quality of design and not just the quality of the product, which is the approach that has been historically used.

The molecular spectroscopy, and particularly the NIR spectroscopy has been a basic tool in the development of the PAT initiative. Within an industry that works primarily with solids, the sampling flexibility of NIR spectroscopy and the utilization of fiber optic probes allow to acquire physical and chemical information, both qualitative and quantitative, non-destructively and almost in real time.

Raman spectroscopy, which shares many features with NIR spectroscopy, has been introduced in the pharmaceutical industry with a delay with respect of NIR, and its applications, working protocols and its performance boundaries are still under development. Thus, this technique offers even more flexibility than NIR does, providing *complementary* information to NIR although spectrally less complex and with higher potential in some aspects.

Currently are times of change for the pharmaceutical industry, where PAT analytical tools are progressively being implemented, but where the bulk of quality control is still done under the classical framework. Thus, in this context, these molecular spectroscopic techniques play an important role in the classical quality control (in the qualification of raw materials or in the

Abstract

quantification of active ingredients for example) and in the development and implementation of the PAT initiative.

A critical point in the fabrication process of a solid pharmaceutical preparation is to ensure homogeneity of the mixture of active ingredient (API) and excipients. Under this initiative, the assurance of the homogeneity would guarantee the uniformity of the API content. However, when the API is at low concentrations (around 1% w/w), due to the limited sensitivity of these techniques, it is still troublesome to assure the homogeneity or to quantify the API content with the precision required by the regulatory authorities.

Despite being a common practice, the use of score line in order to allow greater dose flexibility (especially important for pediatric and geriatric patients), no pharmaceutical guideline has been provided for the correct divisibility of tablets until the mid-2000s. Thus, the necessity of evaluation of content homogeneity has arisen in order to consider a fraction of a tablet a precise dose. In the case of high concentration ($> 25\%$ w/w) tablets this is not a problem since the concentration is highly correlated with the weight of the fraction. Thus, the evaluation of the homogeneity of content for a fraction of tablet has become necessary to be considered a precise dose.

Given the variable nature of the size and morphology of fractions of tablets, Raman spectroscopy is an excellent technique for the quantification of active ingredient in the fractions of a tablet since the sampling area of $50\mu\text{m}$ can be adjusted up to several mm. However, the risk of subsampling must be considered in the case of low concentration preparations due to the reasons given above.

One of the practical applications of NIR spectroscopy is the quantification of water which is one of the most important analytes in the pharmaceutical industry. Thus, it is clear that the implementation of NIR probes in process for determining water is very advantageous, what would provide real-time information of what happens within the pharmaceutical process.

Thus, the first and second sections of Results and Discussion chapter of this thesis provide solutions to the quantification of API at low concentration. The first section develops a protocol to minimize scattering differences between commercial tablets and laboratory-prepared for the construction of the calibration set. Although chemometric pretreatments reduce these differences, they do not eliminate them, so the smaller former differences are, the better the pretreatments and the calibration developed models work.

In the first section, the quantification analytical properties of calibration models developed with laboratory compacted and powdered samples are compared for API quantification of a solid commercial preparation with two API at low concentration. Compaction helps to reduce spectral differences between laboratory and commercial samples what drives to a more precise quantitative determination.

In the second section, adjustment of compaction pressure of laboratory prepared samples is used to quantify the active ingredient in four doses of a commercially available preparation using a single calibration model.

The third and fourth sections discuss the use of Raman spectroscopy for, on one hand, quantify of the active ingredient of a preparation available in different dosages in whole tablets and in their potential fractions and also for the study of the content homogeneity on one of the dosages of this commercial preparation.

Abstract

In the fifth and final section, NIR spectroscopy is used for in-line moisture determination and end point prediction of a continuous-operating fluid bed dryer with calibration models validated through the novel validation protocol of tolerance β intervals and the performance of two NIR probes is compared.

Objetivos

Durante los últimos 25 años las técnicas espectroscópicas como el NIR o el Raman han revolucionado el ámbito de control de calidad, facilitando el desarrollo de la iniciativa PAT, con la que se pone el foco en la comprensión frente al ensayo como herramienta de decisión. Así, una de las más importantes aportaciones de dichas técnicas ha sido abrir la posibilidad del análisis de muestras farmacéuticas en fase sólida sin apenas pretratamiento.

Actualmente, tanto el NIR como el Raman están en una etapa de transición en la que asumen un doble papel, ya que tienen un importante rol en el control de calidad bajo las regulaciones actuales y a su vez son técnicas fundamentales en el desarrollo de la iniciativa PAT.

Las potencialidades de la espectroscopia NIR han sido ampliamente explotadas en el campo farmacéutico pero, a pesar de ello, quedan aún algunos aspectos del desarrollo analítico por mejorar, en especial en la cuantificación de compuestos a baja concentración, debido a la limitada sensibilidad de la técnica. En el caso de la espectroscopia Raman, su implementación en la industria está un paso por detrás del NIR y quedan por resolver numerosos aspectos prácticos para que sea posible emplear todas las posibilidades de la técnica.

El objetivo nuclear de la presente tesis ha sido el desarrollo y aplicación de metodologías sencillas, rápidas y fiables para la determinación de principios activos a baja concentración, tanto en preparados farmacéuticos como en sus potenciales fracciones, y el desarrollo de aplicaciones *in-line* en el entorno PAT mediante las técnicas espectroscópicas NIR y Raman.

Objetivos

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollo de metodologías NIR que permitan una mejora en la sensibilidad y la simplificación de métodos en la determinación de API a baja concentración.
2. Utilización de espectroscopia Raman para la cuantificación de API y el estudio de su distribución de en las potenciales fracciones de comprimidos divisibles.
3. Aplicación de nuevas metodologías de validación en el desarrollo de métodos NIR para la determinación de humedad en un secador de lecho fluido y posterior comparación de diferentes sondas NIR.

1 INTRODUCCIÓN

Capítulo primero

1.1 CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

La industria farmacéutica está sometida a estrictas regulaciones debido a las graves repercusiones en la salud pública que conllevan los errores en este sector. Así, se ha desarrollado históricamente un marco regulatorio donde, a través de un sistema de producción en lotes y análisis en laboratorio, verificando el cumplimiento de una serie de especificaciones, se han podido proveer productos de calidad. A pesar de esta rigidez operativa, la industria ha sido reticente al cambio. Los procesos de fabricación se han considerado prácticamente inamovibles ya que todo cambio se gestiona a través de los organismos regulatorios, creando cierta inseguridad jurídica ante innovaciones.

Por tanto, los esfuerzos se basan en reducir la variabilidad de los procesos con el fin de obtener una baja variabilidad en los parámetros de los que depende la calidad del producto final, es decir, producción dentro de especificaciones prefijadas. De esta manera, se convierte en accesoria la comprensión del proceso, centrando la atención en parámetros de calidad de *entrada y salida*.

Este marco regulatorio desincentiva la innovación y prueba de ello es que, a diferencia de la mayoría de las grandes industrias, la farmacéutica es una industria que aún está anclada en la producción discontinua.

Este rígido marco regulatorio se vio fuertemente sacudido en 2004, cuando la *Food and Drug Administration* (FDA) publicó un guía (1) en la que se propuso cambiar el paradigma

Capítulo primero

e incentivar en última instancia la comprensión de los procesos y la gestión de la calidad, lo que se ha denominado iniciativa PAT (*Process Analytical Technology*).

A pesar de que los principios del PAT se han venido aplicando en ciertas industrias, como en la petroquímica, desde los años 1970, bajo el nombre de *Process Analytical Chemistry* (PAC) (2) se considera un cambio de paradigma en la industria farmacéutica. Sus principios básicos son:

- Incorporar sistemas de gestión del riesgo y la calidad sin comprometer la calidad del producto final.
- La gestión sinérgica de los sistemas de revisión e inspección entre la industria y la FDA
- Alentar la innovación en la manufactura farmacéutica
- Dirigir los esfuerzos a los riesgos sanitarios más significativos

De esta manera, el enfoque se basa en principios científicos para la comprensión y mitigación de los riesgos relacionados con productos de baja calidad. Así el proceso farmacéutico ideal se caracteriza en:

- La calidad del producto se evalúa a lo largo del proceso de fabricación
- Las especificaciones de producto y de proceso están basadas en la comprensión de cómo los factores de fabricación afectan a la calidad del producto
- Garantía de calidad en tiempo real
- Las políticas y procedimientos regulatorios se acomodan al conocimiento científico actual.

Introducción

- Las regulaciones consisten en el nivel de conocimiento científico de cómo la formulación y los procesos afectan a la calidad del producto y la capacidad de controlar los procesos para minimizar el riesgo de obtener producto de baja calidad.

Las técnicas de espectroscopia molecular y en especial el NIR, han tenido un papel fundamental en el desarrollo de iniciativa PAT debido a su carácter no invasivo y a la posibilidad de utilizar sondas de fibra óptica, lo que permite el muestreo en cualquier punto de la cadena de producción y la obtención de información relacionada con numerosos atributos de calidad.

En resumen, tanto la espectroscopia NIR como Raman permiten, en un entorno PAT:

- Realizar análisis multicomponente a partir de un espectro
- Analizar muestras sin pretratamiento
- Monitorizar procesos
- Delegar análisis rutinarios en personal no especializado

En este momento nos encontramos en un momento de cambio donde la iniciativa PAT se implementa en un contexto de convivencia con las estrategias clásica de control de calidad. Las técnicas espectroscópicas como el Raman, y en especial el NIR, juegan un doble papel. Por un lado son esenciales en el control de calidad clásico, como por ejemplo en la cualificación de materias primas (3) o en la cuantificación de principios activos (4). Por otro lado, la facilidad de implementación ha hecho que estas técnicas espectroscópicas tengan un papel fundamental en el desarrollo de la iniciativa PAT en el rol de analizadores de procesos.

Capítulo primero

El abanico de analizadores de procesos para la obtención de medidas en tiempo real ha evolucionado desde aquéllas que aportan información univariante como puede ser el pH, la presión o la temperatura a aquéllas que suministran información multivariante relacionable con atributos de calidad químicos, físicos y/o biológicos.

En el marco de la filosofía PAT, el análisis *inline* es un caso particular de gran importancia ya que la implementación de sondas en el proceso permite obtener información en tiempo *real* del proceso, sin ninguna perturbación respecto al funcionamiento rutinario y abre la posibilidad a una mayor comprensión del proceso así como de las eventuales alteraciones o problemas que surjan en el uso rutinario.

Así, la adquisición de información crítica del proceso durante la producción permite el ajuste de parámetros en tiempo real para mantener las especificaciones del producto dentro de los límites preestablecidos, minimizando la pérdida de lotes. En este sentido, los analizadores de procesos son esenciales en el desarrollo del marco PAT

Actualmente, las espectroscopias NIR y Raman han sido aplicadas con éxito en el control de los diversos procesos que componen la cadena de producción farmacéutica. En la **tabla 1-1** se enumeran algunas aplicaciones de las dos técnicas a las distintas etapas del proceso farmacéutico.

Tabla 1 - 1: Algunas aplicaciones PAT de las espectroscopias NIR y Raman para procesos farmacéuticos.

Etapa	Técnica	Atributo de calidad evaluado	Evaluación de datos	Año	Referencia
Mezclado	NIR	Homogeneidad	MBSD	1996	(5)
Mezclado	Raman	Homogeneidad	Univariante D.Mahalanobis	2005	(6)
Mezclado	Nir+Raman	Homogeneidad	Intensidad	2013	(7)
Granulación	NIR	Humedad	-	2000	(8)
Granulación	Raman	<i>Mapping</i> 3D	Univariante	2009	(9)
Extrusión	Raman	Comprensión proceso	PCA+PLS	2011	(10)
Extrusión	NIR	Uniformidad contenido	PLS	2012	(11)
Secado	NIR	Punto final	-	2000	(12)
Secado	NIR+Raman	Transformación fase API	PLS	2007	(13)
Comprimidos	NIR	Uniformidad contenido	PLS	2008	(14)
Recubrimiento	NIR	Cantidad de recubrimiento	PCA	1996	(15)
Recubrimiento	Raman	Grosor recubrimiento	PLS	2005	(16)
Peletización	Raman/NIR	Cambios de estado sólido API	Univariante	2005	(17)
Liofilizado	NIR	Cambios fase manitol	PCA	2007	(18)

1.2 NIR

1.2.1 HISTORIA

Aunque descubierta en los albores del siglo XIX por William Herschel (19), la región espectral de infrarrojo cercano (NIR), comprendida entre los 780 y 2500 nm, no obtuvo sus primeras aplicaciones analíticas hasta principios de la década de 1960 debido a sus características de bandas poco intensas y solapadas lo que dificultaba la asignación visual de bandas asociadas a grupos funcionales.

Fueron los trabajos de Norris y Butler los que en la década de 1960, desarrollaron la base para la posterior expansión exponencial de aplicaciones NIR. Dadas las características de esta técnica (20), se propuso para la cuantificación de algunos componentes en muestras biológicas. Más adelante, a principios de la década de los 1970, se extendió el desarrollo de métodos (21) para la determinación de parámetros de la industria agropecuaria con el objeto de sustituir métodos clásicos de química húmeda que hicieran viable acercar el análisis químico al lugar de producción. Cabe resaltar que, paradójicamente, una de las ventajas del NIR frente al IR en el análisis de componentes mayoritarios es que la baja intensidad de las bandas NIR (ya que son sobretonos de las bandas de absorción fundamentales del MIR) permite analizar muestras sin previa dilución, lo que abrió la puerta al análisis *in situ*.

A partir de la década de los 70 los avances en la electrónica permitieron un importante desarrollo del análisis multivariante lo que abrió paso a la extensión del uso de la espectroscopia NIR en otros productos industriales tales como alimentos para ganado (22),

polímeros (23), productos textiles (24), farmacéuticos o petrolíferos (25). Así, el desarrollo de la quimiometría permitió la extracción de información relevante y la extensión del uso de la espectroscopia NIR a problemas más complejos.

Por tanto, la espectroscopia NIR, junto a otras técnicas, favoreció un cambio de paradigma en el Control de Calidad industrial en el último cuarto del siglo XX, ya que hizo posible un nuevo planteamiento donde no es necesario llevar la muestra al laboratorio, si no que hace posible el análisis en el lugar de producción, de manera no invasiva, multicomponente y sin requerimientos de personal especializado.

1.2.2 FUNDAMENTOS

La región espectral del infrarrojo (IR), que se extiende de los 780 nm a los 10^6 nm se divide en tres subregiones en función del fenómeno físico que genera la absorción.

- Infrarrojo lejano (FIR), comprendido entre $4 \cdot 10^4$ y 10^6 nm, la absorción está relacionada con fenómenos de rotación molecular
- infrarrojo medio (MIR), comprendido entre 2500 y $4 \cdot 10^4$ nm la absorción está relacionada con vibraciones moleculares fundamentales ($\Delta v = \pm 1$).
- infrarrojo cercano (NIR), comprendido entre 780 y 2500 nm la absorción está relacionada con sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales del MIR.

En general, se puede considerar que las moléculas tienen dos tipos de propiedades; las estáticas, asociadas a composición, conformación, estructura, estereoquímica y morfología y las dinámicas, asociadas a traslación, rotación y vibración. Son las propiedades dinámicas

Capítulo primero

las responsables de la existencia de la espectroscopia NIR y las estáticas son las propiedades más interesantes para los usuarios de NIR, por tanto, la comprensión del origen del espectro NIR exige dos tareas:

1. Cómo puede utilizarse el espectro NIR para detectar propiedades dinámicas
2. Comprender la relación entre las propiedades dinámicas y estáticas.

La energía vibracional, en el modelo más sencillo, se refiere a la oscilación de dos átomos mediante un enlace en una molécula. Dicha energía se puede expresar a la manera de un oscilador armónico simple. Para acercar el modelo a la realidad se incorpora la anharmonicidad:

1. Anharmonicidad mecánica: se debe a que el tamaño de los núcleos determina la distancia máxima de acercamiento de dos átomos y a que una separación suficientemente grande provocaría la disociación de la molécula.
2. Anharmonicidad eléctrica: se debe a que la energía potencia (E_v) de un enlace no es simple función cuadrática de su distancia si no que se aproxima mejor a una ecuación polinómica de orden mayor.

Las consecuencias de la anharmonicidad, que hace posible las transiciones responsables de la espectroscopia NIR son:

1. Las transiciones de sobretono, los aumentos en el número cuántico mayores de uno están permitidas ($\Delta v \geq 2$).
2. Las bandas de combinación (el aumento simultáneo de dos número cuánticos debidos a un único fotón son posibles).

3. Las separaciones entre niveles energéticos no son iguales, a diferencia del modelo del oscilador armónico.

En espectroscopia NIR sólo las vibraciones que resultan en un cambio del momento dipolar (producto de la carga y la distancia) de la molécula son activas. En términos generales, las vibraciones pueden ser de dos tipos: estiramiento (aquellas en las que los átomos de un enlace oscilan alargando y acortando la distancia del mismo sin modificar el eje ni el ángulo de enlace) y flexión (aquellas que modifican continuamente el ángulo de enlace). Así, la vibración de estiramiento del enlace de una molécula diatómica homonuclear no es activa en NIR ya que no da lugar a un cambio en el momento dipolar y las moléculas diatómicas necesitan de dipolo permanente para ser activas. En cambio, las moléculas polinucleares sólo requieren momento dipolar inducido por la vibración. Así, los enlaces con la relación de masas de átomos elevado (como es el caso de los enlaces hidrógeno-heteroátomo) tienden a ser muy anharmónicos, por tanto producen bandas más intensas y las vibraciones de tensión asimétrica tienden a ser más anharmónicas que las simétricas, con iguales consecuencias.

1.2.3 INSTRUMENTACION

A pesar del temprano descubrimiento de la radiación NIR, la aparición de los primeros instrumentos comerciales no sucedió hasta los años 50 del siglo XX (como extensión de los espectrómetros UV), debido a que la debilidad de las bandas de absorción exige instrumentación con bajo nivel de ruido, gran sensibilidad y estabilidad, especialmente para aplicaciones cuantitativas. El esquema básico de un espectrómetro NIR se compone de:

Capítulo primero

- Fuente de radiación
- Sistema de selección de longitud de onda
- Compartimento de muestra
- Detector

1.2.3.1 FUENTE DE RADIACIÓN

La lámpara de tungsteno con ventana de cuarzo sigue siendo la fuente de radiación más utilizada debido a su bajo coste, su gran robustez y su emisión de 320 a 2500 nm, que abarca en su totalidad la región. Otra fuente de radiación son los *Light Emitting Diodes* (LED) atractivos por su pequeño tamaño y su alta eficiencia, pero emiten sólo hasta 1600 nm, lo que supone la pérdida de la mitad del espectro NIR.

1.2.3.2 SELECTOR DE LONGITUD DE ONDA

Un buen sistema de selección de onda es fundamental para un correcto funcionamiento del espectrómetro. Así, debe ser capaz de una anchura de banda exacta y debido a la baja intensidad de la absorción, debe presentar una buena relación señal/ruido.

Los selectores de longitud de onda se pueden clasificar en dispersivos o no dispersivos. Los primeros habitualmente disponen de un conjunto de monocromadores constituidos por colimadores para los haces de entrada y salida junto a un elemento dispersante, que es la parte fundamental del sistema que permite la descomposición de radiación incidente siendo las más habituales las redes de difracción. Los no dispersivos componen un grupo heterogéneo; en él se encuentra el *Acousto-Optic Tunable Filters* (AOTF), que selecciona longitudes onda variando el índice de refracción de un cristal birrefringente a través de radiofrecuencias y los instrumentos de Transformada de Fourier (FT-NIR).

1.2.3.3 COMPARTIMENTO DE MUESTRA

El compartimento de muestra del espectrómetro NIR depende de la aplicación para la cual se utilice. La espectroscopia NIR ofrece una gran versatilidad para el análisis de muestras sólidas, líquidas y gaseosas, pudiendo adaptarse el compartimento de muestra al tipo de muestra a analizar. Además las sondas de fibra óptica permiten *llevar el instrumento a la muestra* en vez *llevar la muestra al instrumento* haciendo la espectroscopia NIR una excelente herramienta pero los análisis *on-line* e *in-line*, es decir, no invasivo.

Existen tres modos de registro en cuanto a la geometría del detector y la fuente del detector, las cuales se muestran en la **figura 1-1**. El modo de registro más habitual para muestras sólidas opacas es el de reflectancia difusa, donde el detector recoge la radiación remitida por la muestra. Así, además de ser posible el análisis de polvos o comprimidos, es posible implementar la espectroscopia NIR en cualquier punto de la línea de producción. En el modo de registro de transmitancia la fuente de radiación y el detector se colocan en lados opuestos de la muestra. Así, se utiliza para el análisis de líquidos (26), gases (27) y para el análisis cuantitativo (28). Por último, en el modo transflectancia se coloca un reflector a un lado de la muestra quedando la fuente la radiación y el detector al otro lado.

Capítulo primero

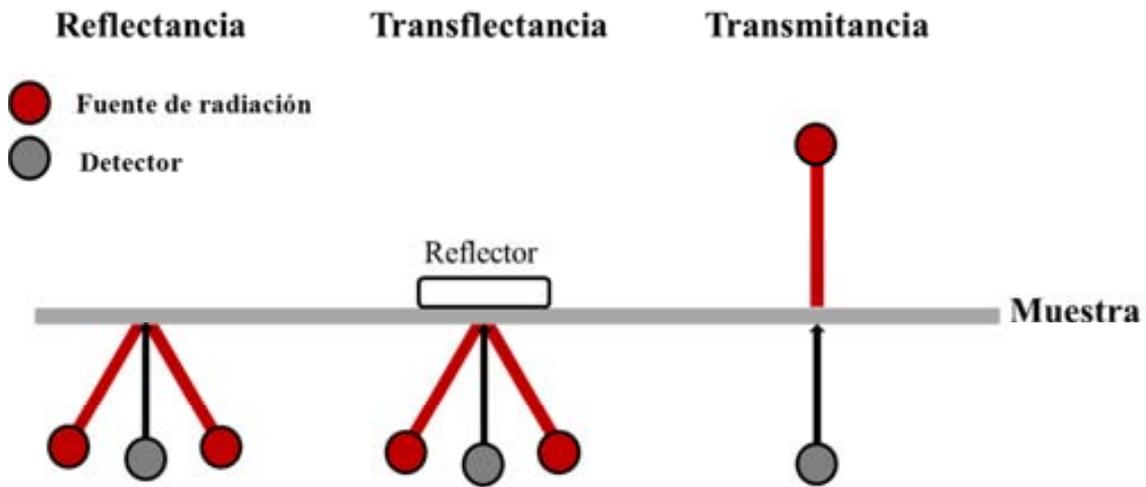


Figura 1 - 1: las tres geometrías de iluminación en espectrómetros NIR; reflectancia, transflectancia y transmitancia.

1.2.3.4 DETECTOR

Generalmente, los detectores NIR se fabrican a base semiconductores como son los de InGaAs, InAs, InSb, PbS o Si en forma de arreglos de fotodiodos. Estos son componentes electrónicos de conductancia asimétrica que cuentan con baja resistencia a la corriente en una dirección y alta resistencia en otra. Consisten en una pieza cristalina del metal donde un extremo está cargado negativamente y el otro positivamente (habitualmente a través del dopaje del cristal con metales con diferente número de electrones de valencia). Los más habituales son los de PbS que cubre eficientemente la región 1100-2500nm. Para la región más cercana al Visible se utiliza los arreglos de fotodiodos ya que debido a su amplio uso en todo tipo de industria su coste es bajo.

1.2.4 APLICACIONES

Siguiendo al gran desarrollo que tuvo la espectroscopia NIR en el ámbito agroalimentario en las décadas de 1970 y 1980, la eclosión en la industria farmacéutica se produjo en la década de los 1990 (29). Así, dada la intensa absorción NIR del agua, uno de los analitos más importantes de la industria farmacéutica, las primeras aplicaciones fueron determinaciones de agua en productos liofilizados (30), disolventes (31) y comprimidos (32). Otra de las aplicaciones tempranas fue la determinación de principio activo (33).

La aplicación de la espectroscopia NIR se extendió en un inicio especialmente en el análisis cualitativo. Se han desarrollado métodos para identificación de materias primas (34), mediante la comparación del espectro NIR con una biblioteca espectral (35), siendo posible la discriminación de materias primas provenientes de diferentes proveedores.

El análisis cuantitativo se desarrolló hasta alcanzar la práctica totalidad del proceso farmacéutico. Se han desarrollado métodos para la determinación cuantitativa de diversos parámetros de importancia en la industria farmacéutica, como son la concentración de principio activo y excipientes en las distintas etapas del producción (36) (materias primas, granulados, núcleos o comprimidos), el tamaño de partícula (37), densidad aparente (38). La bibliografía (39, 40) ofrece varias revisiones exhaustivas acerca de las aplicación de la tecnología NIR en el ámbito farmacéutico.

Un aspecto importante que tuvo que ser abordado fue la adaptación al NIR de los protocolos de validación de métodos analíticos, que fueron desarrollados para la validación de métodos analíticos univariantes y alguno de los atributos de calidad que se exigen, como es por ejemplo la selectividad, tienen difícil cabida en métodos multivariantes. Así, la

Capítulo primero

publicación de la guía E1655-97 (41) supuso un hito en el desarrollo de validaciones para métodos NIR multivariantes a la que siguió la aplicación de esta guía a casos prácticos (32, 42). Finalmente, y tras ser discutida la adaptación de los atributos de la guía oficial ICH para la validación de métodos analíticos (43) se publicó una guía en la que se abordó el desarrollo y validación de métodos NIR en el ámbito farmacéutico (44).

En resumen, hoy día el NIR puede considerarse como la herramienta analítica básica del entorno PAT ya que es posible su implementación en cualquier etapa del proceso, desde la identificación de la materia prima hasta el análisis cuantitativo pasando por el control de mezclas. Por otro lado, es también esencial en el control de calidad bajo la estrategia clásica, lo que comporta que esta técnica juegue un importante doble papel en la transición entre ambas estrategias.

1.3 RAMAN

1.3.1 HISTORIA

El fenómeno Raman fue descubierto el año 1928 por *Sir C. V. Raman* lo que le valió el premio Nobel de 1930 (45). De todas maneras, este efecto ya había sido predicho en 1923 por Smekal, basado en cálculos teóricos (46). El efecto Raman se basa en la dispersión inelástica de la radiación electromagnética como resultado de un intercambio energético entre radiación y vibración molecular. Los fundamentos teóricos del efecto han sido bien descritos en la literatura (47, 48).

1.3.2 FUNDAMENTOS

En Espectroscopia Raman, las muestras son iluminadas con una fuente de radiación monocromática. Hoy en día se utiliza radiación láser en las regiones espectrales del visible e infrarrojo cercano. La energía de esta fuente de radiación es mucho mayor a la necesaria para llevar las moléculas a un estado vibracional excitado. La mayor parte de la radiación es remitida a la misma longitud de onda, dispersión Rayleigh. Solamente una fracción del orden de 10^{-8} es dispersada inelásticamente por las moléculas de la muestra, indicando un cambio energético ocurrido entre la luz incidente y la muestra. Esta dispersión inelástica se denomina efecto Raman. Esta radiación puede ser de menor frecuencia (radiación Stokes) o de mayor frecuencia (radiación anti-Stokes). A temperatura ambiente, dado que el estado vibracional fundamental estará más poblado que el excitado, la radiación Stokes será más

Capítulo primero

intensa que el anti-Stokes. A temperatura altas (e.g. 500°C), se invierte esta relación, de acuerdo con la distribución de Boltzmann. Por tanto, la mayoría de los equipos comerciales detectan únicamente la radiación Stokes.

La regla de selección para que una molécula sea activa en Raman es que se produzca un cambio en su polarizabilidad durante un modo normal. Se entiende por polarizabilidad vibracional la capacidad de la nube electrónica de una molécula para distorsionarse en presencia un campo electromagnético. Así, la superposición de vibraciones elementales de enlaces da lugar a las vibraciones moleculares, llamadas modos normales.

Cada uno de estos modos normales tiene su propia frecuencia asociada. Un átomo tiene tres grados de libertad (cada uno de los ejes espaciales xyz). Por tanto, una molécula de N átomos tendrá $3N$ grados de libertad: 3 traslaciones, 3 rotaciones, y $3N-6$ modos normales. Por ejemplo, la facilidad para distorsionar la nube electrónica (es decir, cambio de polarizabilidad) de una molécula diatómica será diferente para tres estados vibracionales de su vibración armónica. Así, la elongación del enlace provoca una mayor facilidad para el movimiento de los electrones. Este cambio en la polarizabilidad es el necesario para la actividad Raman. En el caso de las moléculas más complejas es necesaria la aplicación de la mecánica cuántica para determinar qué modos normales provocan un cambio en la polarizabilidad.

El espectro Raman se dispone como la diferencia en frecuencia (usualmente en unidades de número de onda) entre el haz incidente y el radiación dispersada frente a la intensidad. Placzek desarrolló la siguiente ecuación que permite el cálculo de la intensidad Raman de una determinada vibración:

$$I = cte \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_v} \right)^4 \frac{NI_0}{1 - e^{(-h\nu/kT)}} [45(\alpha^S)^2 + 13(\alpha^a)^2]$$

Donde ν_0 es la frecuencia de la radiación incidente, ν_v la frecuencia de vibración de la molécula, N el número de moléculas activas en Raman irradiadas, I_0 la intensidad de la fuente de radiación, h la constante de Planck, k la constante de Boltzmann, T la temperatura, α^S la polarizabilidad de la moléculas que provocan la radiación Stokes y α^a la polarizabilidad de las que provocan la radiación Anti-Stokes.

De todas maneras, la intensidad Raman también se suele determinar a través de parámetros instrumentales y de muestra (tipo de detector, volumen muestreado, tamaño de partícula, índice de refracción y concentración del compuesto considerado). Además, la dispersión ocurre en todas la direcciones, pero sólo una fracción es detectada. Así, en el esquema clásico de retrodispersión, el detector sólo recoge la radiación Raman dispersada en la misma dirección del haz incidente.

La irradiación de materiales mediante láser puede provocar la aparición de diferentes fenómenos: dispersión, absorción y fluorescencia.

En la **figura 1-2** se esquematizan las transiciones Raman junto a la absorción IR y la fluorescencia. Las líneas discontinuas muestran estados virtuales para poder distinguirlos de estados excitados reales. Dado el carácter inherentemente débil del efecto Raman, las diferentes transiciones pueden interferir significativamente. Además, el haz láser puede dar lugar a episodios de fotodegradación, calentamiento y ablación de la muestra. El haz incidente puede ser absorbido cuando su longitud de onda corresponda a una banda de absorción en el espectro de la molécula provocando la transición a un estado electrónico

Capítulo primero

excitado. Además también puede ocurrir la absorción de la radiación previamente dispersada. La fluorescencia puede provocar sustanciales interferencias cuando la molécula es excitada a un estado electrónico superior; la molécula decae a un estado energético inferior mediante una transición no radiativa (el estado vibracional fundamental del estado excitado) seguido de un decaimiento al estado electrónico fundamental (**fig 1-2**). Esta última transición, radiación fluorescente, interfiere en la señal Raman.

La intensidad Raman aumenta con la cuarta potencia de la frecuencia de la fuente de emisión. Así, el uso de láseres de longitud de onda corta favorece el aumento de la señal pero a su vez aumenta la probabilidad de que la fluorescencia oscurezca la señal. En la elección de la longitud de onda del láser para el análisis Raman se debe llegar a una solución de compromiso donde la señal Raman sea lo bastante intensa y donde la fluorescencia no interfiera. Dado que la intensidad Raman es proporcional a la intensidad del haz incidente, es favorable utilizar la intensidad más alta posible, a pesar de que puede provocar efectos destructivos. Así, la absorción de energía es insuficiente para la transferencia se desplaza al área circundante dando lugar al calentamiento de muestra. La ablación láser es un fenómeno mediante el cual se elimina material de la muestra, debiéndose a la conjunción de los efectos de fotodescomposición y expansión térmica. Además, la propia radiación laser puede provocar un efecto mecánico. Así, cuando la energía suministrada a la muestra por unidad de tiempo es mayor que la energía de enlace y cuando la energía se disipa, se produce la ablación dando lugar a la formación de un cráter.

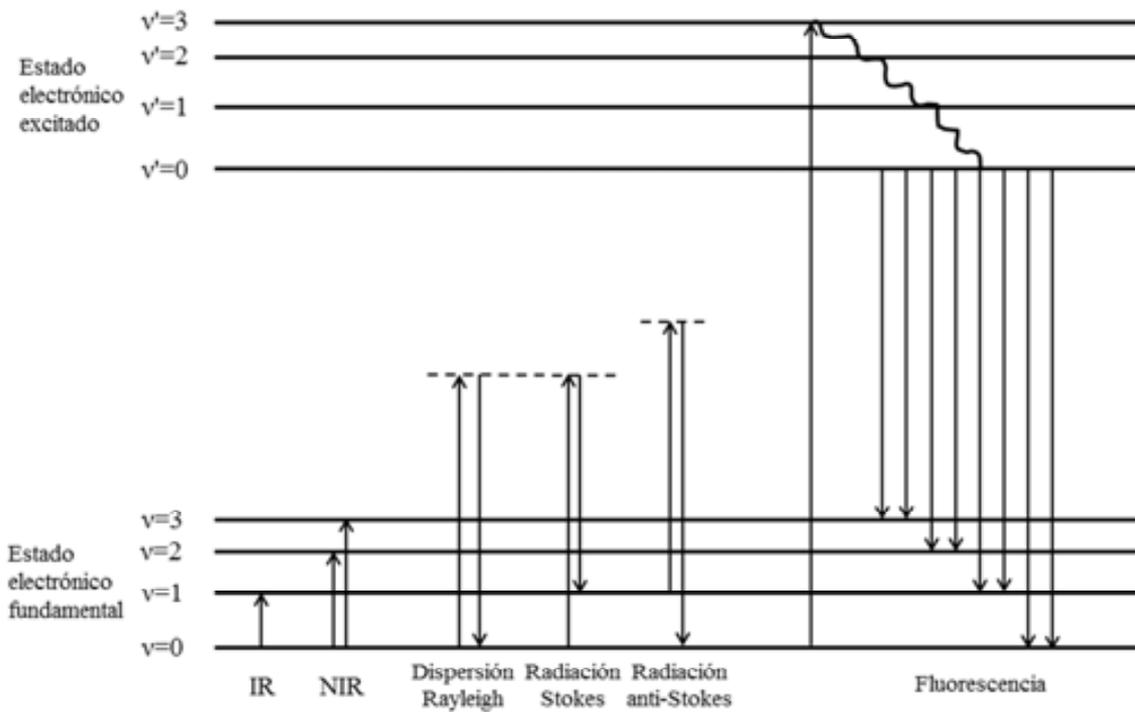


Figura 1 - 2: Absorción IR y NIR, efecto Raman y fluorescencia.

1.3.3 INSTRUMENTACIÓN

Los equipos Raman comerciales consisten en cuatro componentes básicos:

1. Una fuente de excitación, normalmente un láser de onda continua.
2. Un sistema de iluminación y colección espectral de la muestra
3. Selector de longitud de onda
4. Sistemas de detección y procesado de la información.

Capítulo primero

Desde un punto de vista práctico, un parámetro determinante en el uso de la espectroscopia Raman es la longitud de onda de la fuente láser de excitación. Los primeros espectrómetros utilizados fueron los dispersivos equipados con láseres de espectro visible, que ofrecen una gran sensibilidad (debido a que la intensidad del fenómeno Raman inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de excitación) pero también favorecen la aparición de fenómenos de fluorescencia, lo que limita su uso en “muestra de la vida real”; aquéllas que pueden contener impurezas que provoquen fluorescencia. Así, el desarrollo de espectrómetros de transformada de Fourier (2-3 órdenes de magnitud más sensibles que los dispersivos) equipados con láser de infrarrojo cercano ha permitido la aplicación de esta técnica a un amplio abanico de tipos de muestras, entre ellas las asociadas a la industria farmacéutica.

Además, merecen mención dos tecnologías relacionadas: la microscopía confocal Raman(49), que permite el análisis en profundidad de sólidos sin necesidad de realizar cortes transversales y alcanza resoluciones espectrales del orden del micrómetro. En esta técnica, el haz láser es enfocado hacia un punto de difracción limitada en la muestra. La radiación Raman dispersada se reenfoca a una pequeña apertura confocal que actúa como filtro espacial, recogiendo la radiación Raman proveniente únicamente del punto muestreado. Por otro lado, se halla la Espectroscopia Raman de Superficie Aumentada (SERS) (49). En esta técnica, la dispersión Raman proviene de un compuesto adsorbido en un metal estructurado, obteniéndose un aumento en la señal de tres a seis órdenes de magnitud. El fenómeno SERS se produce por dos vías; gracias al aumento del campo electromagnético producido por la superficie del metal y debido a la formación de complejos de transferencia de carga entre la superficie y el analito.

1.3.3.1 ILUMINACIÓN DE LA MUESTRA

Dado el carácter inherentemente débil de la dispersión Raman, la geometría de iluminación y colección de radiación Raman resulta determinante a la hora obtener información válida de la muestra. En los últimos años, a través de la invención y/o evolución de diferentes geometrías se ha dotado de gran versatilidad a la espectroscopia Raman. En la **figura 1-3** se esquematizan las cuatro geometrías consideradas.

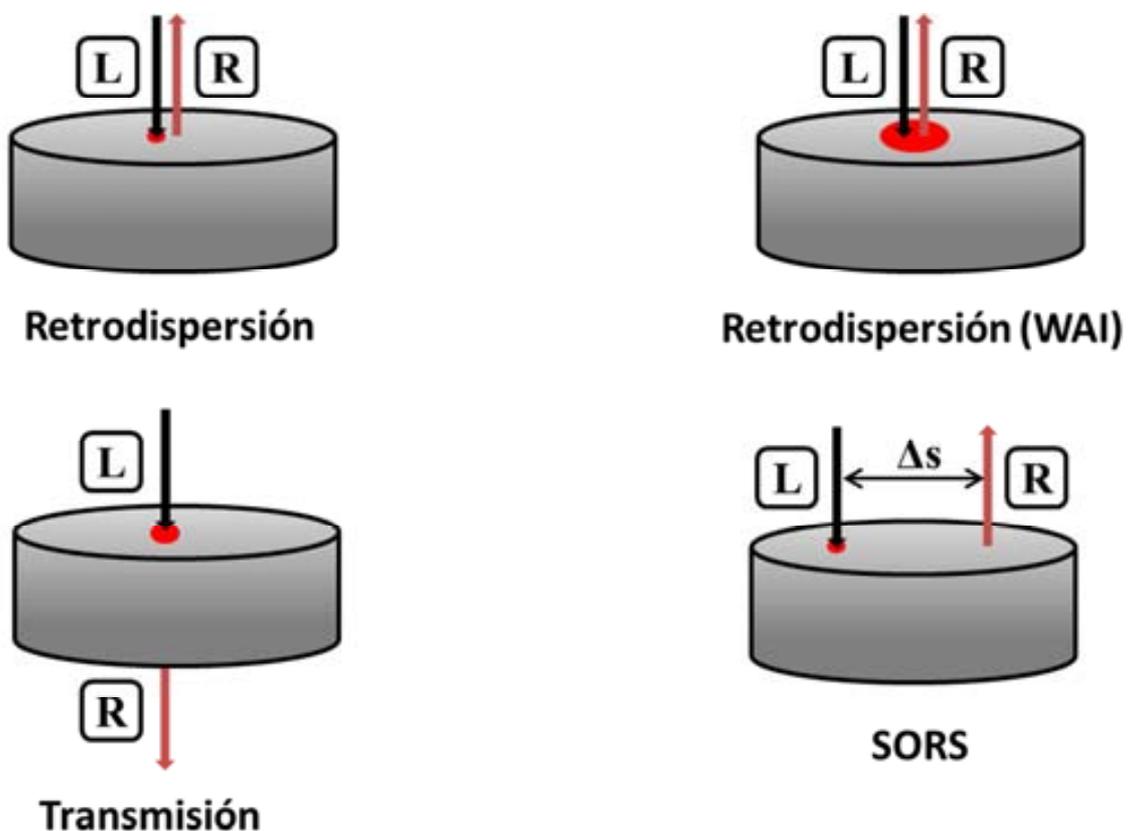


Figura 1 - 3: geometrías de iluminación en espectroscopia Raman. Leyenda: R – señal Raman, L – haz láser y Δs – desplazamiento espacial

RETRODISPERSIÓN

Esta es la geometría clásica, como se ilustra en la **figura 1-3**, donde la fuente de radiación y el colector de la señal se encuentran en el mismo sentido respecto a la muestra. Un

Capítulo primero

inconveniente, sobre todo en aplicaciones cuantitativas es la baja penetración de la radiación láser en la muestra lo que provoca que la mayoría de la señal Raman provenga de las primeras capas de la muestra. Por tanto, si la superficie de la muestra es diferente a su interior (debido, por ejemplo, a la aplicación de una laca) el espectro en geometría de retrodispersión no será representativo de la muestra.

WIDE AREA ILLUMINATION

Con objeto de aumentar la representatividad de estos espectros, en los últimos años se han desarrollado sondas que permiten la iluminación de una mayor área de la muestra (pasando de las decenas de micrómetros al orden de milímetros de diámetro), llamado Wide Area Illumination (WAI)(50). Además del evidente aumento en representatividad del espectro, lo cual incluso posibilita, en algunos casos, la cuantificación de principio activo con un único espectro, también reduce la iluminancia, reduciendo así el peligro de aparición de fenómenos de fluorescencia y/o destrucción de muestra o, visto desde otro punto de vista, permite utilizar una mayor potencia de láser sin los riesgos anteriormente descritos, en los casos en los que la señal Raman sea demasiado débil.

ESPECTROSCOPIA RAMAN DE TRANSMISIÓN

La geometría de retrodispersión, la convencional, tiene dos limitaciones inherentes:

- La señal analítica proviene únicamente de las primeras capas de la muestra (51).
- La señal Raman está habitualmente solapada con la señal de fluorescencia (52).

A pesar de la especificidad de la información Raman, el análisis cuantitativo de muestras mediante retrodispersión plantea inconvenientes como son la dependencia de la superficie (que puede ser diferente del interior de la muestra) y el bajo volumen de muestra analizado.

Así, se ha planteado el uso de geometría de transmisión para el análisis de API en comprimidos ya que:

- Permite muestrear virtualmente la totalidad del comprimido
- La señal Raman no se ve oscurecida por la fluorescencia
- Los comprimidos farmacéuticos son habitualmente poco absorbentes (reflectancia difusa) lo que permite que la radiación Raman se transmita a través de la muestra.

ESPECTROSCOPIA RAMAN ESPACIALMENTE DESPLAZADA (SORS)

La geometría SORS se basa (53) en que la mayoría de los materiales, y en concreto los procedentes de la industria farmacéutica interaccionan con la radiación en forma de reflectancia difusa. Así, se registran (al menos) dos espectros; uno en el punto de iluminación y otro a cierta distancia y se realiza una substracción escalada para así eliminar la contribución espectral de la superficie de la muestra. De esta manera, es posible conocer la composición de diferentes capas de la muestra de manera directa. Una de sus primeras aplicaciones fue la autenticación de un preparado farmacéutico a través del empaquetado (54).

1.3.3.2 FUENTES DE EXCITACIÓN

Antes del desarrollo de los láseres, a principios de los años 60, la fuente de excitación estándar era la lámpara de arco de mercurio equipado con un filtro para transmitir un rango limitado de longitudes de onda. Debido a la baja practicidad de estas lámparas, el desarrollo de los láseres tuvo una gran acogida entre los espectroscopistas.

Los láseres son fuentes de excitación ideales para Raman debido a:

Capítulo primero

1. Pueden producir un haz monocromático de gran potencia (1-2 W para los de onda continua y de 10 a 100 W para pulsados).
2. Los haces láser son altamente monocromáticos
3. El diámetro del haz láser pueden reducirse de los habituales 1-2 mm hasta el rango de los micrómetros usando simples sistemas de lentes.

1.3.3.3 TIPOS DE LÁSER

1. **Láseres de gas de onda continua:** Estos láseres operan en la región del visible. Una gran corriente de descarga atraviesa de un tubo de plasma que contiene Ar o Kr.
2. **Láseres de neodimio-YAG:** Estos son láseres en estado sólido. El YAG ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) es el receptor de los iones Nd^{+3} que son los que realmente generan el láser. Estos láseres se fabrican en formatos tanto de onda continua como pulsadas. La longitud onda principal de estos láseres es 1064 nm, la cual es ideal para los sistemas FT-Raman que operan en la región espectral del NIR.
3. **Láseres de diodo:** la emisión de estos láseres se produce en la unión p-n de semiconductores. Su uso en productos domésticos como lectores de CD y en las redes de comunicación por fibra óptica ha reducido notablemente su coste. Para su aplicación en excitación Raman, es necesaria la reducción de la deriva en la longitud de onda.

1.3.3.4 SELECTORES LONGITUD DE ONDA

La señal Raman es varios órdenes de magnitud más débil que la dispersión Rayleigh, por lo que es necesaria una separación eficiente de ambas radiaciones. Así, el enfoque más sencillo es el del filtro de interferencia, donde dos superficies ópticamente planas generan

una interferencia constructiva y transmiten longitudes de onda del doble del grosor del filtro. Su uso queda restringido a espectrómetros Raman con iluminación láser en el espectro visible, ya que su sensibilidad es baja.

Por otro lado, la aparición de espectrómetros equipados con interferómetros, cuya sensibilidad es varios órdenes de magnitud mayor que los dispersivos, ha permitido la utilización de iluminación láser en el infrarrojo cercano, que, a pesar de que la señal Raman sea menos intensa, es menos susceptible a fenómenos de fluorescencia que interfieran las señal Raman.

1.3.3.5 DETECTORES

La señal Raman es inherentemente débil y el detector ha sido el componente instrumental que ha retrasado la aparición de instrumentos comerciales respecto a otras técnicas espectrométricas. En la presente sección se presentan los más utilizados. Previamente, se definen algunos conceptos necesarios para caracterizar el rendimiento de los detectores:

- **Corriente de oscuridad:** es la señal generada espontáneamente en el detector y que es debida predominantemente a carga producida térmicamente por lo que es habitual en enfriamiento de los detectores para reducir la corriente oscura (55).
- **Eficiencia cuántica: (QE):** es el porcentaje de fotones de entrada que son convertidos en carga eléctrica por el detector, propiedad que depende de la longitud de onda de los fotones. El QE es un parámetro crítico que determina la adecuación del detector al experimento (56).
- **Ruido de lectura:** inherente a electrónica que amplifica y procesa la señal. Depende del tiempo de integración y de la amplitud de la señal. Cuando la señal es

Capítulo primero

intensa este efecto es despreciable pero puede limitar la relación señal/ruido cuando la amplitud de señal es baja.

DETECTORES DE CANAL ÚNICO

Llamadas así porque contienen un único punto sensible a la luz, fueron los utilizados hasta el desarrollo de los detectores multicanal, que posibilitaron la aparición de instrumentos modernos. Así, el registro es de naturaleza secuencial; al ajuste de la rendija le sigue la colección del dato a cada paso del monocromador. El registro secuencial consume mucho tiempo y además exige que todas las condiciones experimentales, salvo la longitud de onda que eventualmente se mide se mantengan constantes. Los más utilizados han sido los tubos fotomultiplicadores aunque también se han utilizado los fotodiodos que después cobrarán relevancia en el desarrollo de los detectores multicanal.

DETECTORES MULTICANAL

Éstos detectores cuentan con múltiples elementos de resolución (áreas separadas sensibles a la luz) ordenados en forma matricial. Así, el espectrómetro dispersará diversas longitudes de onda permitiendo su detección simultánea.

FOTODIODOS EN LÍNEA (PDA)

Los PDA consisten fotodiodos montados en un soporte de silicio. La radiación incidente crea un par agujero-electrón que descarga un capacitor en cada fotodiodo. La cantidad total de corriente necesaria para recargar el capacitor a su valor nominal determina la cantidad de radiación que ha impactado en el fotodiodo.

Su eficiencia cuántica presenta un máximo a 550 nm y se mantiene por encima del 20% entre los 200 y 900nm. Presentan, respecto a otros detectores multicanal, una corriente de

oscuridad y un ruido de lectura muy alto. Inicialmente, fueron un gran avance respecto a las placas fotográficas, pero se vieron superados por los detectores CCD.

CHARGE-COUPLED DEVICE (CCD)

Los CCD consisten en píxeles montados en un chip de silicio. Cada uno de los píxeles cuenta con varios electrodos basados en semiconductores de óxidos metálicos. Su coste se ha reducido ostensiblemente en los últimos años debido a su uso en aparatos electrónicos de consumo masivo. Su QE depende de su construcción, situándose el máximo de QE entre los 500 y 800 nm. Así, son los detectores de elección para trabajar en el espectro visible.

DETECTORES DE Ge

Los detectores de Ge se utilizan cuando se irradia la muestra con láseres en la región espectral NIR (habitualmente el láser Nd:YAG, que emite a 1064 nm) ya que en esta región la eficiencia cuántica de los detectores CCD es baja. Así, mantiene una eficiencia cuántica por encima del 60% entre los 800 y 1600 nm. Debido a su elevado ruido de lectura, es necesario promediar espectros para obtener una relación señal/ruido, siendo habitual la utilización de nitrógeno líquido para enfriarlo y reducir la corriente de oscuridad y así posibilitar largos tiempos de integración.

DETECTORES DE InGaAs

Los detectores de indio, galio y arsénico (InGaAs) se desarrollaron como mejora respecto a los detectores de Ge. La región espectral sensible se extiende de los 800 a los 1700 nm (hasta 2200 en función de la composición del detector) con una eficiencia cuántica promedio del 80%.

1.3.4 APLICACIONES RAMAN

Antes de mediados de los años 1980, la espectroscopia Raman de materiales farmacéuticos era prácticamente imposible, ya que la señal Raman quedaba enmascarada debido a la fluorescencia provocada por los láseres del espectro visible. La implementación de nuevas configuraciones experimentales como son la Transformada de Fourier (FT) y los detectores CCD, permitió evitar la fluorescencia. Estos dos nuevos tipos de configuración han permitido la utilización de láseres de rojo lejano e infrarrojo cercano. Los fotones Raman resultantes de la excitación de estos láseres evita la zona espectral dominada por el fenómeno de fluorescencia (450-680 nm).

Varios aspectos de la espectroscopia Raman la hacen muy atractiva para el análisis en estado sólido en la industria farmacéutica. Habitualmente los API contienen anillos aromáticos y estructura conjugadas que proporcionan intensas señales Raman, a diferencia de los excipientes, que suelen consistir en cadenas alifáticas, por lo que esta técnica puede potencialmente ser superior al NIR para el análisis de APIs a concentraciones bajas. La intensidad de la señal Raman del agua es baja, lo que, a diferencia de la espectroscopia NIR, permite el análisis en medios acuosos como el test de disolución.

Una de las primeras aplicaciones de la espectroscopia Raman dentro del ámbito farmacéutico fue la cuantificación simultánea de principios activos (57) (tanto en estado sólido como en solución). Los resultados en estado sólido fueron mejores que en solución lo que llevó a los autores a concluir que *“tiene un gran potencial para la determinación simultánea en estado sólido con mínima preparación de muestra”*.

Introducción

Así, sus primeras aplicaciones han sido la identificación de materias primas (previa construcción de bibliotecas espectrales) (58), cuantificación de principios activos (59), cribado de polimorfos (el espectro Raman es en general sensible a la forma cristalina, de la que dependen las características farmacocinéticas de los API) (60) y el soporte durante el escalado de procesos químicos (61). Además, dado que en general el área de muestreo de Raman (al menos en los instrumentos tradicionales) es pequeña, permite el análisis de componentes minoritarios en muestras heterogéneas así como el de su distribución. Este enfoque ha sido utilizado, por ejemplo, para el estudio de distribución de hormonas en parches transdermales (62). La revisión exhaustiva de las aplicaciones Raman en el campo farmacéutico se puede encontrar en la bibliografía (63-65).

1.4 QUIMIOMETRÍA

Las técnicas analíticas, y en especial las espectrometrías generan una gran cantidad de datos relacionados con las muestras analizadas y en muchos casos no directamente relacionada con los parámetros fisicoquímicos de interés. La conversión de los datos en información útil ha dado lugar al nacimiento de la disciplina de la Quimiometría (66, 67).

La Quimiometría se define como el desarrollo y aplicación de técnicas tanto matemáticas como químicas para la extracción de información química de medidas analíticas (68).

La complejidad de los espectros NIR, compuestos de bandas anchas y solapadas debido a las bandas de combinación y sobretonos de vibración de las que está compuesto, hace necesaria en la mayor parte de los casos el tratamiento de los datos para obtener información útil tanto cualitativa como cuantitativa.

En cuanto a la espectroscopia Raman, sus bandas son estrechas lo que permite en muchos casos tanto la identificación de compuestos (por análisis directo del espectro) como la cuantificación mediante regresión univariante. A pesar de ello, cuando se analizan muestras en estado sólido, es habitualmente necesario el uso de técnicas quimiométricas para adecuar los espectros al consiguiente análisis, especialmente para fines cuantitativos.

En los siguientes apartados se describen brevemente las técnicas quimiométricas utilizadas para el desarrollo de la Tesis.

1.4.1 ETAPAS DE MODELADO

A diferencia de los métodos químicos clásicos, donde la estrategia habitual es la de hallar una señal analítica específica para después interpolar (en el caso del análisis cuantitativo) los resultados en una recta de calibrado, en los métodos multivariantes una etapa clave es la preparación un conjunto de muestras de calibración que sea representativo del conjunto de muestras que se pretenden analizar mediante dicho método (no sólo en la propiedad a determinar si no en todas las propiedades físicas y químicas a las que sea sensible la técnica analítica) y que tenga un rango de la propiedad a analizar lo bastante amplio para obtener resultados estables.

En un segundo paso, se escoge la herramienta quimiométrica más adecuada para relacionar la información espectral con la propiedad a analizar. Por último, se evalúa la capacidad predictiva del modelo de calibración analizando un conjunto de muestras representativas del uso en rutina ulterior del modelo. Así, si los resultados obtenidos con el modelo son aceptables (comparados con valores de referencia) el modelo se considera válido. En la **figura 1-4** se muestra un esquema general del modelado.

Capítulo primero

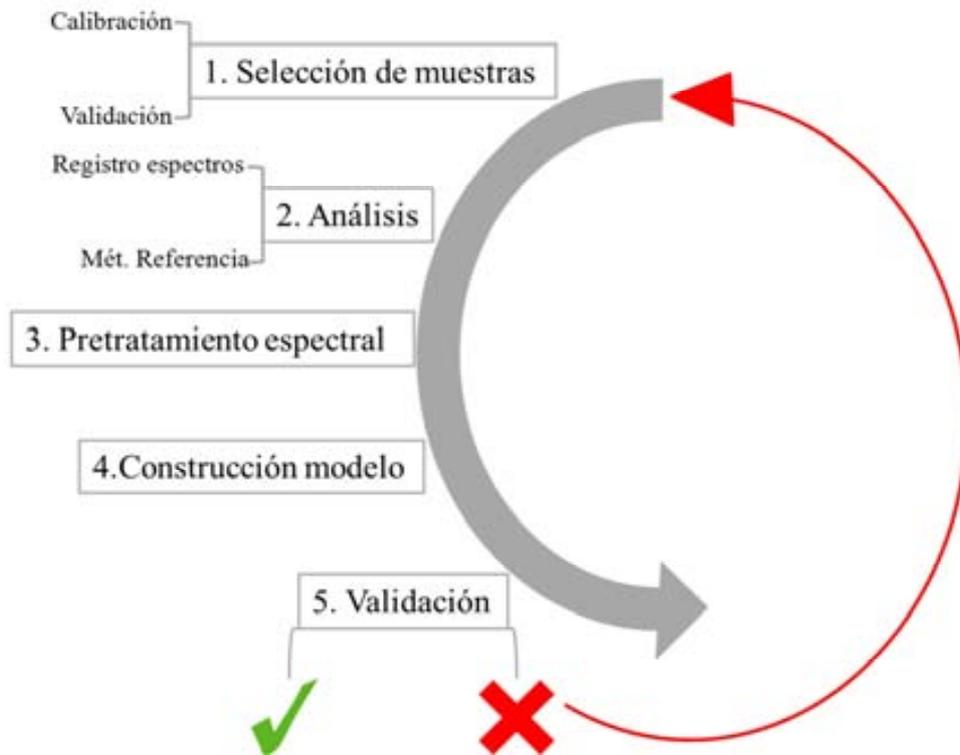


Figura 1 - 4: esquema general del proceso de modelado para técnicas espectroscópicas multivariantes.

1.4.1.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

El conjunto de calibración debe contener las fuentes de variabilidad esperadas para las muestras para las que se prepara el método. En el caso de la industria farmacéutica ejemplos de dichas fuentes pueden ser diferentes lotes de fabricación, proveedores de materias primas o tamaño de partícula de alguno de los componentes (69).

Análogamente a la construcción clásica de rectas de calibración, el intervalo recogido de cada una de las fuentes de variabilidad recogidas ha de ser más amplia en el conjunto de muestras de calibración que en el de validación para que estas últimas queden dentro del espacio experimental del conjunto de calibración.

Además, ningún proceso industrial es estático, sino que es habitual que sufra cambios, como puede ser el cambio en el proveedor de una materia prima. Por tanto, es necesaria la actualización periódica del modelo de calibración y la consiguiente validación de la misma convirtiendo el desarrollo y validación de un método multivariante en un proceso *circular*.

1.4.1.2 MÉTODO DE REFERENCIA

Se llama método de referencia a aquéllos que permiten medir el parámetro de interés de una manera precisa y exacta. Al realizar la calibración usando estos valores como verdaderos, la precisión y exactitud del método multivariante dependerán de la precisión y exactitud del método de referencia.

1.4.1.3 OBTENCIÓN DE LA SEÑAL ANALÍTICA

En esta etapa se registran las muestras mediante la técnica escogida y se almacenan los datos para su posterior análisis.

Es importante señalar que la construcción y validación del modelo es un proceso complejo, es siempre necesario realizar una inspección visual de los espectros para detectar posibles errores. Un buen modelo de calibración requiere tanto de unos valores fiables de método de referencia como unos espectros representativos y reproducibles.

1.4.1.4 PRETRATAMIENTO ESPECTRAL

En la mayoría de las ocasiones, debido a la dependencia del espectro de numerosas variables no controlables, es necesario reducir su variabilidad mediante la aplicación de pretratamientos espectrales. Es decir, se trata de reducir las contribuciones no deseadas al espectro siendo posible también de esta manera aumentar la reproducibilidad de

Capítulo primero

adquisición espectral. Por otro lado, algunos de los pretratamientos permiten también desenmascarar la señal analítica aumentando la relación señal ruido.

PROMEDIADO DE ESPECTROS

Es habitual, sobre todo en el adquisición de espectro de sólidos, obtener varios espectros de la misma muestra con el objeto de reducir el ruido espectral. Además puede ser útil para reducir el riesgo de submuestreo.

DERIVADAS

Las derivadas son uno de los pretratamientos más utilizados porque permiten reducir algunos de los problemas característicos de la espectroscopia NIR y en algunos casos de la espectroscopia Raman. Así, la primera derivada permite eliminar los términos constantes como es el desplazamiento de línea base y la segunda permite eliminar los términos que varían linealmente con la longitud de onda.

Los dos algoritmos más habituales son el *Moving Average Segment Convolution* desarrollado por Norris y Williams y el desarrollado por Savitzky y Golay (70).

NORMALIZACIÓN

Aunque existen distintos tipos de normalización (sobre el área, entre el máximo y el mínimo del espectro) y el más habitual en espectroscopia Raman es la normalización a vector unidad, ya que una de las principales fuentes de variabilidad en espectroscopia Raman es la intensidad del láser. Mediante este pretratamiento se favorece la reducción en la variabilidad de la intensidad de la fuente de radiación.

VARIABLE NORMAL ESTÁNDAR (SNV)

El SNV centra y autoescala restando el valor medio del espectro a la intensidad a cada longitud de onda y dividiendo por la desviación estándar. Éste pretratamiento es habitual en espectroscopia NIR, ya que permite reducir las diferencias en el *scattering* (debido a la variabilidad del tamaño de partícula y compresión de la muestra) (71).

1.4.1.5 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

Una vez pretratados los espectros, se escoge una herramienta quimiométrica que permita establecer la relación más simple entre la señal analítica y el parámetro objetivo, evitando caer en el sobreajuste (cuando el modelo es representativo del conjunto de muestras de calibración pero no de las de validación). En la construcción del modelo se evalúan numerosos parámetros implicados en el cálculo como son, número de factores, detección de muestras anómalas, intervalo de longitudes de onda. Cabe resaltar que en general la construcción de modelo carece de *herramientas de decisión* y que en general se construyen en base *herramientas de diagnóstico* para después evaluar su capacidad predictiva (72).

1.4.1.6 HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS MULTIVARIANTES

La utilización de información espectral, debido a sus características (gran número de variables, elevada correlación entre las mismas), exige la utilización de herramientas de exploración y calibración que permitan trabajar en estas condiciones

El primer método multivariante utilizado (dada la limitada capacidad de computación), fue la Regresión Lineal Múltiple (MLR), que no trata de modelar la estructura subyacente. El objetivo del MLR es encontrar una combinación lineal de variables r_j de manera que los valores c estimados por el modelo sean lo más cercanos posibles a los valores de referencia

Capítulo primero

C. El criterio de cercanía se define como el mínimo de suma de cuadrados de las desviaciones respecto a los valores conocidos.

El desarrollo de ordenadores modernos posibilitó la utilización de la compresión de los datos, para, de manera análoga al PCA, desarrollándose, entre otros, el Partial Least Squares (PLS) (73, 74). Este método estima simultáneamente los factores subyacentes de las matrices R (en espectroscopia, información espectral) y C (valores de la propiedad analítica de interés). Estos factores se utilizan para definir un subespacio en \mathbf{R} para modelar C y a la vez se utiliza la matriz C para definir \mathbf{R} . El modelo resultante es:

$$R = TP + E$$

$$C = UQ + F$$

Donde T y U son los *scores* de R y C respectivamente, P y Q son los *loadings*. Los factores T no son óptimos, como en el caso del PCA para definir R ; son rotados para definir simultáneamente C . Idealmente, cuando las fuentes de variación de R y C son las mismas, sus factores son iguales. No obstante, para aplicaciones reales este hecho no se cumple, aunque sí se pueden utilizar para estimar los factores de la siguiente manera:

$$u = bt + e$$

Donde \mathbf{b} es la relación interna entre \mathbf{u} y \mathbf{t} que sirve para evaluar la necesidad de más factores y para efectuar la predicción de muestras desconocidas.

Además existen otros métodos de calibración multivariante como son el Principal Component Regression (PCR) o las Redes Neuronales Artificiales (ANN) pero en esta Tesis sólo se ha utilizado PLS.

1.4.1.7 VALIDACIÓN DEL MODELO.

La validación es la etapa crítica en el desarrollo de métodos analítica, ya que *decide* si el modelo funciona correctamente o no. Así, en el caso de no obtener resultados adecuados, se reconstruye el modelo. Por tanto, ésta es la etapa en la que se evalúa la adecuación del modelo objetivo. Existen numerosas estrategias para *diagnosticar* el correcto funcionamiento del modelo y es precisamente este abanico de herramientas la que puede producir discrepancias acerca de la bondad del modelo quimiométrica. Así, la pregunta básica que debe responder el criterio de validación es “¿Es el método adecuado para las muestras que se pretenden analizar en el futuro?”. La bibliografía muestra tres tendencias a la hora de escoger una estrategia para *decidir* la validez el método.

1. Parámetros estadísticos descriptivos: ésta ha sido la estrategia de decisión clásica y la que rige en las guías oficiales de validación. Así, la guía ICH para validación de métodos analíticos (75) exige, para la validación de la linealidad, el coeficiente de correlación, la pendiente y la suma de cuadrados residuales. Además, requiere otros parámetros estadísticos descriptivos para validar la precisión (repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad), la especificidad y la exactitud entre otras. De esta manera, no existe un único parámetro que permita *decidir* la adecuación de un método a su fin, si no que se utilizan conjuntamente múltiples parámetros estadísticos descriptivos, que pueden llegar a llevar a conclusiones contradictorias. Merecen especial mención, dada su importancia en la validación de métodos multivariantes, los parámetros para la evaluación del error de predicción:
 - a. Error estándar de predicción (SEP): este parámetro permite calcular la desviación media de los valores de predicción respecto a los de referencia y

Capítulo primero

además tiene en cuenta el sesgo en el cálculo. Este parámetro se ha utilizado en diversos trabajos (76, 77).

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{I-1} \sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - y_{i,ref} - bias)^2}$$

- b. Error cuadrático medio de predicción (RMSEP): este parámetro sólo difiere del SEP en que no tiene en cuenta el sesgo para calcular el error

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - y_{i,ref})^2}$$

- c. Error estándar relativo de predicción (RSEP): este parámetro divide la desviación de cada valor predicho entre el valor de referencia obteniéndose el error en forma porcentual

$$RSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - y_{i,ref})^2}{\sum_{i=1}^I (y_{i,ref})^2}}$$

A pesar de ello, se ha de tener en cuenta estos parámetros se utilizan en combinación con otros (como son el coeficiente de correlación, sesgo o los distintos parámetros de medida de error de calibración; SEC, RSEC, RMSEC, parámetros análogos a los anteriormente descritos).

2. El uso de test de hipótesis para comprobar si las diferencias obtenidas entre los valores de referencia y los predichos por la técnica espectroscópica son significativas. Así, cuando el test de hipótesis no es significativo se entiende la ausencia del efecto (diferencia entre valores de referencia y predicción). De todas

maneras, el punto débil de este criterio es que la ausencia de una prueba de un efecto no es la prueba de la ausencia de éste. Este enfoque se utiliza generalmente para evaluar si la diferencia media entre los resultados de dos métodos (por ejemplo multivariante *vs.* de referencia) es significativa (por ejemplo, mediante un test t pareado para evaluar el sesgo del método).

3. El tercer enfoque, el más novedoso, fue desarrollado por Hubert *et. al.* (78-80) durante la década de los años 2000. El núcleo de este tipo de validación se basa en la capacidad predictiva del método en las condiciones de rutina en las cuales se aplicará el método, utilizando una estrategia estadística llamada intervalos de tolerancia. Para ello, se realizan experimentos de validación con diferentes fuentes de variabilidad (por ejemplo, días u operadores) y se calcula una distribución normal de los residuales respecto a los valores conocidos (el nivel de confianza depende del propósito de la validación) y se compara con el valor umbral (en forma porcentual) preestablecido. Así, la exactitud y la precisión se evalúan conjuntamente expresados como error total. En el capítulo de resultados y discusión se profundiza en los principios de este novedoso tipo de validación.

En progresión coherente con la implementación de estas técnicas espectroscópicas en combinación con métodos multivariantes a la industria farmacéutica, se ha producido la adaptación al documento de validación de métodos analíticos ICH Q2. Siguiendo los criterios de esta guía se evalúan la veracidad, la precisión (repetitividad y precisión intermedia), la linealidad y la exactitud. Se ha aplicado a numerosas determinaciones en procesos o productos acabados (81-84), etapas de proceso (85, 86) o excipientes (87, 88).

1.5 DESARROLLO DE MÉTODOS CUANTITATIVOS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

El análisis cuantitativo es uno de los aspectos fundamentales en el control de calidad de la industria farmacéutica, siendo de especial relevancia el análisis de contenido de API. En el paradigma clásico, todo análisis de API (generalmente analizados mediante técnicas cromatográficas) conlleva un pretratamiento de extracción del analito, generándose la recta de calibrado a partir de disolución y posterior dilución del analito puro. Así, el análisis cuantitativo queda restringido a laboratorios y personal especializado siendo necesaria la destrucción de la muestra e imposibilitando la obtención de información directa.

La habitual complejidad de los datos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas (especialmente para NIR) dificulta en la mayoría de las ocasiones relacionar la señal analítica con el parámetro a determinar de forma directa mediante regresión de mínimos cuadrados. Por tanto, se han desarrollado una serie de técnicas quimiométricas que permiten relacionar múltiples variables (en general correlacionadas entre sí) con el parámetro o parámetros de interés. Así se ha dado lugar al análisis multivariante.

En la sección cuarta de la Introducción de esta Tesis se ha descrito el procedimiento general para el desarrollo de métodos cuantitativos. Las muestras farmacéuticas poseen unas características bien definidas que obligan a adaptar el procedimiento general. Estas características son:

- Las mezclas se componen de componentes conocidos.
- La variabilidad de las muestras es muy pequeña, especialmente para los parámetros de calidad como puede ser la concentración de principio activo.
- Las muestras sujetas a análisis son habitualmente formas sólidas.

Por tanto el análisis cuantitativo exige desarrollar una estrategia de calibración que:

- Permita ensanchar el rango de concentraciones del analito objeto, ya que habitualmente las muestras de producción comprenden un rango muy estrecho.
- Mantenga el resto de las contribuciones espectrales (las debidas tanto a propiedades físicas como químicas) constantes respecto a la muestra objetivo
- Que la concentración del analito no esté correlacionada con la de otro componente en el conjunto de calibración.

1.5.1 ESTRATEGIAS DE CALIBRACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo de un método multivariante mediante técnicas espectroscópicas de muestras en fase sólida merece más consideraciones que el de un método clásico donde se preparan los patrones a partir de la dilución de una solución de concentración conocida. Así, el objetivo de la construcción del conjunto de muestras de calibración no es sólo crear un intervalo donde la relación señal/concentración sea estable, sino también el de que las muestras de calibración sean *representativas* de las que se analizarán ulteriormente. Dado que no es viable aislar la señal analítica del analito, la contribución espectral de la matriz también deberá ser representativa de la muestra. A continuación se describen las estrategias más habituales, desde la más sencilla (mezcla de

Capítulo primero

los compuestos puros) hasta la más compleja (preparar muestras a diferentes concentraciones mediante el mismo proceso industrial con el que se preparan las muestras a analizar).

MEZCLAS DE COMPUESTOS PUROS

Esta es la estrategia más sencilla y la primera que fue utilizada para la cuantificación de principios activos (89). Se preparan muestras a partir de los ingredientes puros. Esta estrategia resulta la más simple ya que los preparados farmacéuticos suelen componerse de mezclas de pocos ingredientes. De todas maneras, la divergencia de los métodos de preparación de muestra entre el laboratorio y el proceso industrial y las diferencias en propiedades físicas entre los ingredientes de laboratorio y los del proceso farmacéutico hace que los resultados obtenidos mediante esta estrategia sean cuestionables ya que no incluye la variabilidad del proceso farmacéutico. Este problema se puede solucionar añadiendo muestras comerciales al conjunto de muestras de calibración (modelos de calibración mixtos).

INFRA Y SOBREDOSIFICACIÓN

Ésta es una alternativa a la mezcla de compuestos puros que ofrece mejores resultados (90). En lugar de utilizar compuestos puros, se parte de molturado de la muestra comercial y se varía la concentración adicionando excipientes para reducir y principio activo para aumentar la concentración (en el caso de la cuantificación de principio activo). Así, las propiedades físicas y químicas de las muestras de calibración son más parecidas a las de producción que en la estrategia de mezcla de compuestos puros. Por otro lado, es importante la utilización de diseño de experimentos para reducir la correlación de concentraciones de las muestras de calibración entre los componentes de la muestra

provocando problemas de selectividad. Además, habitualmente es necesaria la adición de muestras comerciales en el modelo con el fin de incluir la variabilidad de producción lo que se denomina calibración mixta.

PLANTA PILOTO

Esta es la estrategia que mejores resultados proporciona. Consiste en la obtención de muestras de concentración inferior y superior a la nominal por el mismo procedimiento que el utilizado para la fabricación de muestras comerciales. De esta manera las propiedades físicas de las muestras de calibración son las mismas que las de calibración. Esta estrategia no es muy utilizada debido al elevado coste de fabricación de las muestras de calibración, pero es la más apropiada para la cuantificación en comprimidos intactos, especialmente para espectroscopia NIR de transmitancia (91).

ESPECTRO PROCESO

En aquellos casos que se conocen en profundidad todos los detalles del proceso se puede utilizar la estrategia del espectro proceso (92), en el que calcula *el espectro de la diferencia* entre las muestras de calibración (preparadas a partir de compuestos puros) y las muestras a analizar. Así, la adición del espectro proceso al espectro de las muestras de calibración da lugar espectros comparables a los de las muestras comerciales, posibilitando la construcción de un conjunto de calibración sin la necesidad de determinar su contenido en API por el método de referencia, sino por pesada de los componentes puros que las conforman. De esta manera se evita la utilización de métodos instrumentales de referencia en el desarrollo del método analítico, los cuales se pueden considerar el paso más costoso (en términos de tiempo y monetario) en el desarrollo de un método NIR o Raman.

1.5.2 CUANTIFICACIÓN EN MUESTRAS INTACTAS

Las primeras aplicaciones cuantitativas por NIR se realizaron mediante análisis de comprimidos previamente pulverizados para así, minimizar las diferencias físicas (esencialmente distribución de tamaño de partícula) y por tanto de *scattering* entre muestras de calibración y producción y también para hacer independiente el tamaño de muestra de la forma de la muestra (93).

Uno de los objetivos primarios de la implementación de las técnicas espectroscópicas en la industria farmacéutica es minimizar la manipulación de la muestra para así obtener información representativa, de manera no invasiva e, idealmente, en tiempo real (en un caso ideal, el método analítico debiera ser capaz de analizar todos los comprimidos fabricados.). La cuantificación de API en comprimidos intactos ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía tanto en modo transmitancia como reflectancia.

Algunos API presentan una alta actividad farmacológica, lo que obliga a formularlos en baja concentración. El diseño de preparaciones de baja concentración es de gran importancia para la industria farmacéutica debido a los problemas de homogeneidad y al control de las unidades terapéuticas. A pesar de la idoneidad de las espectroscopias NIR y Raman para el análisis rápido, su baja sensibilidad hace que la determinación de API a baja concentración sea problemático (94).

1.5.3 ERROR DE MUESTREO Y SUBMUESTREO

En el análisis de sólidos el concepto de muestra representativa resulta mucho más complejo. Una mezcla homogénea líquida presenta la misma concentración de sus componentes en todos sus puntos, sin ninguna consideración especial. En cambio, para considerar una mezcla de sólidos homogénea cuando la proporción entre sus componentes en diferentes puntos de la muestra es el mismo exige ciertas consideraciones. Así, la homogeneidad dependerá del tamaño de muestreo, y de la densidad, tamaño y otras propiedades físicas de las partículas que componen la muestra. Además, dependerá también de la proporción de los componentes: una mezcla binaria de concentración 1:1 necesitará un tamaño de muestreo mucho menor que la misma mezcla en proporción 1:99 (59). Este hecho es importante para la espectroscopia NIR, especialmente en el análisis de muestras a baja concentración y determinante en el caso de la espectroscopia Raman en el que problema del submuestreo ha sido ampliamente discutido.

Al contrario del análisis por vía húmeda, previa extracción del analito, el análisis de muestra sólida intacta plantea muchas cuestiones en cuanto al muestreo. Así, en la mayoría de las situaciones, la adquisición espectral se realiza en modo reflectancia por lo que sólo se recoge información en la superficie de la muestra. Por tanto, el desarrollo de un método analítico deberá tener en cuenta que el espectro recogido será representativo de la muestra.

En espectroscopia NIR, cuya área de muestreo es habitualmente del orden del centímetro cuadrado, es habitual registrar varios espectros de la muestra para después promediarlos, moviendo la muestra entre adquisiciones espectrales con el objeto de reducir la variabilidad

Capítulo primero

de *scattering* entre los distintos registros espectrales. Se obtiene así información espectral de todo la superficie de la muestra.

En el caso de la espectroscopia Raman, el principal inconveniente para su aplicación con fines cuantitativos es la relativamente baja reproducibilidad debida a la heterogeneidad intrínseca de una mezcla de sólidos junto con el reducido diámetro del haz láser que irradia la muestra (habitualmente del orden de 100 μm) lo que provoca que la adquisición de un único espectro no sea representativo de la composición global de la muestra. Así, la solución tradicional fue la adquisición de una serie de espectros en una cuadrícula de puntos sobre la muestra (59). El problema de este procedimiento es que el error de muestreo es inversamente a la raíz cuadrada de la masa muestreada (como muestra la siguiente ecuación) que en el caso del registro espectral equivale al número de puntos muestreados, por lo que recoger información representativa puede conllevar un tiempo de adquisición espectral demasiado largo para un entorno de control de calidad.

$$s \propto \frac{k}{\sqrt{n}}$$

Donde **s** es la desviación estándar de la medida, **k** una constante asociado al nivel de confianza y **n** es el número de medidas realizadas.

Así la tecnología instrumental ha evolucionado en dos direcciones para solventar este problema. Por un lado se han desarrollado sondas y/o sistema que permiten la iluminación láser de una mayor área (pasando de la escala de μm^2 a mm^2), llamado Wide Area Illumination (WAI) (50). Por otro lado, se han desarrollado geometrías alternativas como son la de transmisión (especialmente indicada para la cuantificación a baja concentración) o, la desplazada espacialmente, donde el detector y la fuente de radiación se encuentran

Introducción

separados por una cierta distancia. Por último, se ha propuesto también incorporar al soporte de muestra un rotor para recoger el espectro a lo largo del perímetro de un círculo descrito sobre la muestra, pero resulta evidente el pobre encaje de esta alternativa en un entorno de control de calidad.

A pesar del desarrollo de estas nuevas tecnologías, la mayoría de los instrumentos comerciales y usados en la industria farmacéutica utilizan la geometría de retrodispersión y fuente de radiación láser de diámetro pequeño (100-300 μ m) por lo que el submuestreo sigue siendo hoy en día el principal problema a nivel práctico en el análisis cuantitativa de API en muestras sólidas intactas por Raman.

1.6 SUBDIVISIÓN DE COMPRIMIDOS

1.6.1 ¿PARA QUÉ SUBDIVIDIR COMPRIMIDOS?

Existen varias razones, tanto médicas como económicas, por las cuales la subdivisión de comprimidos es una práctica habitual en la industria farmacéutica.

1. Flexibilidad de dosificación. Ésta es la principal razón para la subdivisión de comprimidos; en algunas ocasiones son necesarias dosis precisas y a la vez ajustables de un principio activo, sobre todo en los casos de medicamento de índice terapéutico estrecho como pueden ser los inhibidores ECA, los anticoagulantes o las hormonas tiroideas (95). Además, determinados grupos de pacientes como son los pediátricos y geriátricos habitualmente necesitan dosis inferiores a las comerciales. Se considera que la flexibilidad de dosis por subdivisión de comprimidos es preferible a la administración en polvo (debido a los riesgos de contaminación) y preparaciones líquidas (por los posibles problemas de estabilidad) (95).
2. Una segunda razón, aunque menos relevante, es la facilitación de la ingesta cuando el comprimido es demasiado voluminoso.
3. Por último, la razón del ahorro económico: las líneas de subdivisión permiten reducir el número de dosificaciones comercializadas y además hacer posible al paciente adquirir dosificaciones dobles y tomar sólo una mitad.

1.6.2 FARMACOPEA EUROPEA

A pesar de que la subdivisión de tabletas es una práctica habitual en la industria farmacéutica, no se produjo hasta 2001 la primera mención a la subdivisión de comprimidos en la Farmacopea Europea (96). En ella se exige por primera vez someter a los comprimidos subdivididos a los test “Uniformidad de Contenido en Dosis individual” o “Uniformidad de Masa”.

Las directivas respecto a la subdivisión en la Farmacopea Europea han ido evolucionando en el tiempo, en los años posteriores a la introducción del concepto de “subdivisión”, se produjeron diversos cambios, en los que ha ido prevaleciendo el test de “Uniformidad de Masa” sobre el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis individual”. A continuación se muestran detalladamente los cambios que se han ido produciendo a lo largo en la Farmacopea Europea hasta hoy en día.

- **Octubre 2001 (revisión):** primera implementación de estándares de subdivisión de comprimidos. Se requiere el test “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” o el test “Uniformidad en Masa” en función de cuál resulte adecuado (96).
- **Abril 2002 (proposición):** Se propone que los comprimidos sean divididos a mano (97).
- **Octubre 2002 (proposición):** Se propone que el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” pueda ser sustituido por el test de “Uniformidad en Masa” cuando el contenido en principio activo sea superior a 25 mg o al 25% w/w (98).
- **Abril 2003 (proposición):** se propone que el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” prevalezca sobre el test de “Uniformidad de Masa” cuando el

Capítulo primero

contenido del principio activo sea inferior a 2 mg o al 2% w/w. Además se propone que ambas mitades deban ser incluidas en los test (98).

- **Enero 2004 (proposición):** Se propone que todos los comprimidos subdividibles deban cumplir el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” sin importar el contenido en principio activo (99).
- **Abril 2004 (proposición):** Se propone la sustitución el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” por el de “Uniformidad en Masa” (100).
- **Junio 2004 (revisión):** Se establece el test de “Uniformidad de Masa” en todos los casos salvo cuando el contenido del principio activo sea inferior a 2 mg o al 2% w/w (101).
- **Octubre 2005 (proposición):** Se propone que en el proceso de fabricación se asegure la eficacia de la marca de subdivisión para que el paciente reciba la dosis adecuada. Además, se propone eliminar el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual”. Por último se propone un cambio en el test de “Uniformidad de Masa” (102).
- **Diciembre 2005 (revisión):** Sólo aquellos comprimidos para los que sea necesaria la marca de subdivisión para cumplir con la posología deberán ser testados. Se elimina el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual”. Se varía el test de “Uniformidad de Masa” (103).
- **Diciembre 2006 (proposición):** Se propone eliminar la restricción de aplicar el test de “Uniformidad de Masa” únicamente a los comprimidos para los que sea necesario la marca de subdivisión para cumplir con la posología. Se piden instrucciones para cuando la subdivisión no sea posible o el comprimido se deshaga.

Se proponen test adicionales para evaluar la eficacia de la marca de subdivisión; “Pérdida de Masa por Subdivisión” y “Facilidad de Subdivisión” (104).

- **Junio 2008:** No hay cambios respecto a la anterior edición (105).

1.6.3 FARMACOPEA ESTADOUNIDENSE

La primera mención a la necesidad de directrices para la subdivisión de comprimidos en el ámbito estadounidense no ocurrió hasta el año 2009 (106), a través de un artículo de *Stimuli*. Así se partió de las evolucionadas directrices de la Farmacopea Europea. Dicho *Stimuli* considera que el atributo de calidad más importante, bajo el cual quedarán subordinados el resto, es la exactitud de división, que se evalúa a través bien del “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual, o bien del test de “Uniformidad en Masa”. Se considera el test de “Uniformidad de Masa” presente en la Farmacopea como adecuado para este fin, en cambio, discrepa con requerir este test únicamente a aquellas preparaciones para las que la posología lo exija. Por tanto se pretende requerir el test de “Uniformidad de Masa” a todos los comprimidos que presenten línea de subdivisión. Las razones que se esgrimen para ello son:

1. La presencia de una línea de subdivisión indica que el comprimido se puede dividir.
2. Se considera incómodo que las exigencias de la farmacopea dependan del prospecto
3. La dependencia de la exigencia del test respecto a la posología se considera poco objetivo
4. Esta limitación de este test deja los usos “fuera de etiqueta” (como son los pacientes pediátricos o geriátricos) fuera de regulación.

Capítulo primero

Además, se proponen test para la pérdida en masa (exigiendo que sea inferior al 3% respecto al comprimido intacto).

Por tanto, se propone que todas aquellos comprimidos que presenten línea de subdivisión deben cumplir los test de “Uniformidad en Masa” y “Pérdida de masa por subdivisión”.

En 2013 se publicó una Guía para la Industria (107) en la que se profundiza en las directrices del *Stimuli*. Así se proponen un conjunto de exigencia para los comprimidos subdividibles:

- Aplicar el test de “Uniformidad de Contenido en Dosis Individual” a aquellos comprimidos que contengan menos de 25 mg o menos del 25% en masa de principio activo. Para el resto de casos requiere el test de “Uniformidad de Contenido”.
- La divisibilidad deberá ser demostrada en ambos extremos de dureza del comprimido, mediante el test de “Pérdida en Masa” y del test de Friabilidad, éste último aplicado a las porciones.

Por último, indica que los productos que cumplan estos criterios puedan ser etiquetar la presencia de la línea de subdivisión como “subdivisión funcional”.

De todas maneras, la actual edición de la Farmacopea Estadounidense (108) aún no menciona la subdivisión de comprimidos.

1.7 REFERENCIAS

1. FDA U, CVM O. Guidance for Industry: PAT—a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. Rockville, MD. 2004.
2. Callis JB, Illman DL, Kowalski BR. Process analytical chemistry. *Anal Chem.* 1987;59(9):624A-37A.
3. Kemper MS, Luchetta LM. A guide to raw material analysis using near infrared spectroscopy. *Journal of near infrared spectroscopy.* 2003;11(3):155-74.
4. Ginot Y, Bernard-Moulin P, Cinier R, Despagne F, Dubost J, Francès L, et al. Quantitative analysis using near infrared spectroscopy, Application to tablet content uniformity, I. Methodology. *STP pharma pratiques.* 2010;20(2).
5. Sekulic SS, Ward HW, Brannegan DR, Stanley ED, Evans CL, Sciavolino ST, et al. On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy. *Anal Chem.* 1996;68(3):509-13.
6. Hausman DS, Cambron RT, Sakr A. Application of Raman spectroscopy for on-line monitoring of low dose blend uniformity. *International journal of pharmaceutics.* 2005;298(1):80-90.
7. Allan P, Bellamy LJ, Nordon A, Littlejohn D, Andrews J, Dallin P. *< i> In situ</i> monitoring of powder blending by non-invasive Raman spectrometry with wide area illumination. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;76:28-35.*
8. Rantanen J, Räsänen E, Tenhunen J, Käsäkoski M, Mannermaa J-P, Yliruusi J. In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near infrared sensor: an evaluation of particle size and binder effects. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(2):271-6.
9. Walker G, Bell S, Greene K, Jones D, Andrews G. Characterisation of fluidised bed granulation processes using in-situ Raman spectroscopy. *Chemical Engineering Science.* 2009;64(1):91-8.
10. Saerens L, Dierickx L, Lenain B, Vervaet C, Remon JP, Beer TD. Raman spectroscopy for the in-line polymer–drug quantification and solid state characterization during a pharmaceutical hot-melt extrusion process. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(1):158-63.
11. Saerens L, Dierickx L, Quinten T, Adriaensens P, Carleer R, Vervaet C, et al. In-line NIR spectroscopy for the understanding of polymer–drug interaction during pharmaceutical hot-melt extrusion. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(1):230-7.
12. Morris KR, Stowell JG, Byrn SR, Placette AW, Davis TD, Peck GE. Accelerated fluid bed drying using NIR monitoring and phenomenological modeling. *Drug development and industrial pharmacy.* 2000;26(9):985-8.
13. Kogermann K. Understanding solid-state transformations during dehydration: new insights using vibrational spectroscopy and multivariate modelling. 2008.
14. Tabasi SH, Fahmy R, Bensley D, O'Brien C, Hoag SW. Quality by design, part I: Application of NIR spectroscopy to monitor tablet manufacturing process. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):4040-51.
15. Kirsch JD, Drennen JK. Near-infrared spectroscopic monitoring of the film coating process. *Pharm Res.* 1996;13(2):234-7.
16. Romero-Torres S, Pérez-Ramos JD, Morris KR, Grant ER. Raman spectroscopic measurement of tablet-to-tablet coating variability. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38(2):270-4.
17. Sandler N, Rantanen J, Heinämäki J, Römer M, Marola M, Yliruusi J. Pellet manufacturing by extrusion-spheronization using process analytical technology. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6(2):E174-E83.
18. Romero-Torres S, Wikström H, Grant ER, Taylor LS. Monitoring of mannitol phase behavior during freeze-drying using non-invasive Raman spectroscopy. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2007;61(2):131-45.
19. Herschel W. Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun. By William Herschel, LL. DFRS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 1800;90:284-92.
20. Norris K, Butler W. Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples. *Bio-Medical Electronics, IRE Transactions on.* 1961;8(3):153-7.
21. Norris K, Barnes R, Moore J, Shenk J. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Science.* 1976;43(4):889-97.
22. Shenk JS, Westerhaus MO. Accuracy of NIRS instruments to analyze forage and grain. *Crop science.* 1985;25(6):1120-2.

Capítulo primero

23. Crandall EW, Jagtap AN. The near-infrared spectra of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1977;21(2):449-54.
24. Connell J, Norris K. The Prediction of the Yield of Greasy Wool by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Part I: Principles and Washed Wool1. *Textile Research Journal*. 1980;50(6):371-80.
25. Kelly JJ, Barlow CH, Jinguji TM, Callis JB. Prediction of gasoline octane numbers from near-infrared spectral features in the range 660-1215 nm. *Anal Chem*. 1989;61(4):313-20.
26. Broad NW, Jee RD, Moffat AC, Eaves MJ, Mann WC, Dziki W. Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Analyst*. 2000;125(11):2054-8.
27. Werle P, Slemr F, Maurer K, Kormann R, Mücke R, Jänker B. Near-and mid-infrared laser-optical sensors for gas analysis. *Optics and Lasers in Engineering*. 2002;37(2):101-14.
28. Drennen JK, Lodder RA. Nondestructive near-infrared analysis of intact tablets for determination of degradation products. *J Pharm Sci*. 1990;79(7):622-7.
29. Ciurczak E. Uses of near-infrared spectroscopy in pharmaceutical analysis. *Applied spectroscopy reviews*. 1987;23(1-2):147-63.
30. Last I, Prebble K. Suitability of near-infrared methods for the determination of moisture in a freeze-dried injection product containing different amounts of the active ingredient. *J Pharm Biomed Anal*. 1993;11(11):1071-6.
31. Weyer L. Near-infrared spectroscopy of organic substances. *Applied Spectroscopy Reviews*. 1985;21(1-2):1-43.
32. Trafford A, Jee R, Moffat A. A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy. *Analyst*. 1999;124(2):163-7.
33. Zappala AF, Post A. Rapid near IR spectrophotometric determination of meprobamate in pharmaceutical preparations. *J Pharm Sci*. 1977;66(2):292-3.
34. Candolfi A, De Maesschalck R, Massart D, Hailey P, Harrington A. Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA. *J Pharm Biomed Anal*. 1999;19(6):923-35.
35. Blanco M, Romero M. Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: a solution for identity confirmation. *Analyst*. 2001;126(12):2212-7.
36. Blanco M, Coello J, Eustaquio A, Iturriaga H, MasPOCH S. Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 1999;392(2):237-46.
37. Ilari J, Martens H, Isaksson T. Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance. *Applied spectroscopy*. 1988;42(5):722-8.
38. Otsuka M. 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):244-50.
39. Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44(3):683-700.
40. Jamrógiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;66:1-10.
41. ASTM. ASTM E1655. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. ASTM International West Conshohocken, PA; 1997.
42. Eustaquio A, Blanco M, Jee R, Moffat A. Determination of paracetamol in intact tablets by use of near infrared transmittance spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 1999;383(3):283-90.
43. Moffat AC, Trafford AD, Jee RD, Graham P. Meeting 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. The opinions expressed in the following article are entirely those of the authors and do not necessarily represent the views of either The Royal Society of Chemistry or the Editor of The Analyst. *Analyst*. 2000;125(7):1341-51.
44. Note for guidance on the use of Near Infrared Spectroscopy by the Pharmaceutical Industry and the data requirements for new submissions and variations, (2003).
45. Raman C, Krishnan K. A new type of secondary radiation. *Nature*. 1928;121(3048):501-2.
46. Van Vleck J. On the Vibrational Selection Principles in the Raman Effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1929;15(9):754.
47. Gardiner DJ. Introduction to Raman scattering. *Practical Raman spectroscopy*: Springer; 1989. p. 1-12.

48. Long DA, Long D. Raman spectroscopy: McGraw-Hill New York; 1977.
49. Lewis IR, Edwards H. Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line: CRC Press; 2001.
50. Kim M, Chung H, Woo Y, Kemper M. New reliable Raman collection system using the wide area illumination (WAI) scheme combined with the synchronous intensity correction standard for the analysis of pharmaceutical tablets. *Anal Chim Acta*. 2006;579(2):209-16.
51. Matousek P, Parker A. Bulk Raman analysis of pharmaceutical tablets. *Applied spectroscopy*. 2006;60(12):1353-7.
52. Matousek P, Parker A. Non-invasive probing of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 2007;38(5):563-7.
53. Matousek P, Clark I, Draper E, Morris M, Goodship A, Everall N, et al. Subsurface probing in diffusely scattering media using spatially offset Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy*. 2005;59(4):393-400.
54. Eliasson C, Matousek P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset Raman spectroscopy. *Anal Chem*. 2007;79(4):1696-701.
55. Sweedler JV, Ratzlaff KL, Denton MB, editors. Charge-transfer devices in spectroscopy. *Charge-transfer Devices in Spectroscopy*; 1994.
56. Giles JH, Ridder TD, Williams RH, Jones DA, Denton MB. Product review: selecting a CCD camera. *Anal Chem*. 1998;70(19):663A-8A.
57. Kontoyannis CG. Quantitative determination of CaCO₃ and glycine in antacid tablets by Laser Raman Spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 1995;13(1):73-6.
58. McCreery RL, Horn AJ, Spencer J, Jefferson E. Noninvasive identification of materials inside USP vials with Raman spectroscopy and a Raman spectral library. *J Pharm Sci*. 1998;87(1):1-8.
59. Strachan CJ, Rades T, Gordon KC, Rantanen J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(2):179-92.
60. Langkilde FW, Sjöblom J, Tekenbergs-Hjelte L, Mrak J. Quantitative FT-Raman analysis of two crystal forms of a pharmaceutical compound. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(6):687-96.
61. El Hagrasy AS, Chang S-Y, Desai D, Kiang S. Raman spectroscopy for the determination of coating uniformity of tablets: assessment of product quality and coating pan mixing efficiency during scale-up. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2006;1(1):37-42.
62. Armstrong CL, Edwards HG, Farwell DW, Williams AC. Fourier transform Raman microscopic study of drug distribution in a transdermal drug delivery device. *Vibrational spectroscopy*. 1996;11(2):105-13.
63. D Patel B, J Mehta P. An overview: application of Raman spectroscopy in pharmaceutical field. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2010;6(2):131-41.
64. Michelet A, Boiret M, Lemhachheche F, Malec L, Tfayli A, Ziemons E. Use of Raman spectrometry in the pharmaceutical field. *STP Pharma Pratiques*. 2013;23(2).
65. Shin K, Chung H. Wide area coverage Raman spectroscopy for reliable quantitative analysis and its applications. *Analyst*. 2013;138(12):3335-46.
66. Massart DL, Vandegiste, B. G. M., Buydens, L. M. C. , De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers, J. Amsterdam: Elsevier. 1997.
67. Beebe KR, Pell, R.J., Seasholtz, M.B. *Chemometrics. A practical guide*. New York: John Wiley & sons; 1998.
68. Kowalski BR. *Chemometrics: Views and propositions*. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 1975;15(4):201-3.
69. Zamora D, Blanco M, Bautista M, Mulero R, Mir M. An analytical method for lubricant quality control by NIR spectroscopy. *Talanta*. 2012;89:478-83.
70. Savitzky A, Golay MJ. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal Chem*. 1964;36(8):1627-39.
71. Barnes R, Dhanoa M, Lister SJ. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*. 1989;43(5):772-7.
72. De Bleye C, Chavez P-F, Mantanus J, Marini R, Hubert P, Rozet E, et al. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;69:125-32.
73. Wold H. Soft modeling by latent variables: the nonlinear iterative partial least squares approach. *Perspectives in probability and statistics, papers in honour of MS Bartlett*. 1975:520-40.

Capítulo primero

74. Wold H. Soft modelling. The basic design and some extensions. In systems under indirect observation. In: Jöreskog KGaW, H, editor. Amsterdam 1982.
75. ICH. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. 2005.
76. Ito M, Suzuki T, Yada S, Kusai A, Nakagami H, Yonemochi E, et al. Development of a method for the determination of caffeine anhydrate in various designed intact tablets by near-infrared spectroscopy: A comparison between reflectance and transmittance technique. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(4):819-27.
77. Schönbrodt T, Mohl S, Winter G, Reich G. NIR spectroscopy—a non-destructive analytical tool for protein quantification within lipid implants. *Journal of controlled release.* 2006;114(2):261-7.
78. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(3):579-86.
79. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—Part II. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):70-81.
80. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):82-96.
81. Feng Y-C, Hu C-Q. 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.* 2006;41(2):373-84.
82. Peinado A, Hammond J, Scott A. Development, validation and transfer of a Near Infrared method to determine in-line the end point of a fluidised drying process for commercial production batches of an approved oral solid dose pharmaceutical product. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(1):13-20.
83. Wang X, Fu Q, Sheng J, Yang X, Jia J, Du W. Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufacturers using near-infrared diffuse reflection spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy.* 2010;53(2):214-7.
84. Blanco M, Alcalá M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. *European journal of pharmaceutical sciences.* 2006;27(2):280-6.
85. Mantanus J, Ziémons E, Rozet E, Streel B, Klinkenberg R, Evrard B, et al. Building the quality into pellet manufacturing environment—feasibility study and validation of an in-line quantitative near infrared (NIR) method. *Talanta.* 2010;83(2):305-11.
86. Blanco M, Cueva-Mestanza R, Peguero A. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(4):797-804.
87. Blanco M, Alcalá M, Bautista M. Pharmaceutical gel analysis by NIR spectroscopy: Determination of the active principle and low concentration of preservatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008;33(4):409-14.
88. Karande AD, Heng PWS, Liew CV. In-line quantification of micronized drug and excipients in tablets by near infrared (NIR) spectroscopy: Real time monitoring of tableting process. *International journal of pharmaceutics.* 2010;396(1):63-74.
89. Gimet R, Luong A. Quantitative determination of polymorphic forms in a formulation matrix using the near infra-red reflectance analysis technique. *J Pharm Biomed Anal.* 1987;5(3):205-11.
90. Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, Pou N. Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses. *Analyst.* 2001;126(7):1129-34.
91. Broad NW, Jee RD, Moffat AC, Smith MR. Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets. *Analyst.* 2001;126(12):2207-11.
92. Blanco M, Peguero A. Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2010;29(10):1127-36.
93. Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, Serrano D. Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets. *Analyst.* 1998;123(11):2307-12.
94. Ziémons E, Mantanus J, Lebrun P, Rozet E, Evrard B, Hubert P. Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):510-6.
95. Van Santen E, Barends D, Frijlink H. Breaking of scored tablets: a review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(2):139-45.

96. Pharmacopoeia E. Monograph 0478. European Pharmacopoeia supplement 41. Strasbourg: Council of Europe; 2002. p. 2433-6.
97. LPJ Vaes HF, DM Barends. The breaking of scored tablet prior to Ph. Eur. Test. *Pharmeuropa*. 2002;14(2):302-4.
98. Tablets. *Pharmeuropa*. 2003;15(2):322-4.
99. JC van der Steenm HF, N Rodenhuis, DM Barends. The Ph. Eur. requirements for scored tablets; sampling procedure and test. *Pharmeuropa*. 2004;16(1):51-5.
100. Tablets. *Pharmeuropa*. 2004;16(2):250-2.
101. Pharmacopoeia E. Monograph 0478. European Pharmacopoeia 50. Strasbourg: Council of Europe; 2005. p. 626-8.
102. Tablets. *Pharmeuropa*. 2005;17(4):512-4.
103. Pharmacopoeia E. Monograph 0478. European Pharmacopoeia supplement 55. Strasbourg2006. p. 4166-8.
104. D.M. Barends DWG, J.C. van der Steen, D. de Kaste, H.W. Frijlink. Results of a Market Surveillance Study in The Netherlands on Break-Mark Tablets. *Pharmeuropa Scientific Notes*. 2006;2006(2):1-7.
105. Pharmacopoeia E. Monograph 0478. France: European Directorate for Quality Medicines, 2008: 748-751; 2008.
106. Green G, Berg C, Polli EJ, Barends DM. Pharmacopeial Standards for the Subdivision Characteristics of Scored Tablets. *Pharmacop Forum*. 2009;35(6).
107. CDER CfDEaR. Guidance for Industry: Tablet Scoring: Nomenclature, Labeling, and Data for Evaluation. In: Services HaH, editor. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2013.
108. Pharmacopoeia U, editor US Pharmacopoeia Convention, 37th ed.2013: Rockville, MD.

Capítulo primero

2 MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo segundo

En el transcurso de esta tesis se estudiaron dos formulaciones comerciales y un proceso farmacéutico y en este capítulo se describen las metodologías utilizadas para la preparación de los conjuntos de calibración, muestras de laboratorio, registro de espectros tanto NIR como Raman, el tratamiento de datos seguidos para la obtención de los parámetros analíticos de interés así como una descripción del proceso farmacéutico estudiado.

2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1.1 PERIFEM

Perifem es un medicamento comercializado por Organon Española S.A. para la prevención de los síntomas de la menopausia. Se presenta en blíster de 21 comprimidos; conteniendo 11 de ellos (azules) únicamente valerato de estradiol (VE) y los restantes (blancos) contienen acetato de medroxiprogesterona (MPA) además del valerato de estradiol. Los contenidos VE y MPA son respectivamente 2 y 10 mg por comprimido, lo que supone el 1,6 y 8% p/p de concentración. Para ambos tipos de comprimido los excipientes mayoritarios son el almidón de maíz y la lactosa.

Capítulo segundo

2.1.2 ALDO CUMAR

Aldo Cumar es una preparación comercializada por Laboratorios Aldo Union S.A. cuyo principio activo es la warfarina sódica, la cual es un derivado sintético del dicumarol que actúa como inhibidor de la vitamina K reduciendo la cantidad de un conjunto de proteínas responsables de la coagulación sanguínea. El preparado comercial se presenta en cuatro dosificaciones de 1, 3, 5 y 10 mg por comprimido que corresponde a concentraciones del 1, 3, 5 y 2,5 % p/p. Las dosificaciones de 1, 3 y 5 mg por comprimidos presentan una marca transversal para su división en mitades y la de 10 mg presenta dos marcas perpendiculares que permiten su división en cuartos o mitades. Los excipientes mayoritarios para todas las dosificaciones son la lactosa monohidrato (el prospecto indica una concentración de *ca.* 60% p/p para la cuatro dosificaciones) y la celulosa microcristalina.

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

2.2.1 PERIFEM

Dado que el objetivo era construir un modelo de calibración para cada uno de los API y el bajo nivel de concentración, se prepararon muestras de calibración siguiendo la estrategia de sobre e infradosificación de muestras comerciales previamente molidas, ampliando el

Materiales y métodos

rango de concentraciones entre el 75 al 125% p/p del valor nominal en cinco niveles (75, 88, 100, 112 y 125% p/p). Se prepararon dos conjuntos de muestras en los que se variaba la concentración de uno de los API dejando la concentración del otro en el nivel nominal. Además, se prepararon tres mezclas de los excipientes mayoritarios, almidón de maíz y lactosa (3:1, 1:1 y 1:3 p/p) y se preparó una muestra de cada nivel de concentración de API con cada una de las mezclas de excipientes con el objetivo de que las concentraciones de los API no estuvieran correlacionadas con las de los excipientes.

2.2.2 ALDO CUMAR

El objetivo de la preparación de muestras de laboratorio para Aldo Cumar fue cubrir todo el rango de concentraciones de las muestras comerciales (1-7 % p/p). Para ello, se prepararon, mediante el procedimiento de infra y sobredosificación muestras de laboratorio de 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, y 7 % p/p. En cada nivel de concentración se prepararon dos muestras variando la concentración del excipiente mayoritario (lactosa 60% p/p) en un $\pm 5\%$ (a 55 y 65 % p/p) con el fin de incluir la variabilidad en la concentración de este excipiente en el modelo de calibración. Dado que el almidón de maíz es el segundo excipiente mayoritario, se alcanzó el 100% de mezcla con este excipiente.

2.3 INSTRUMENTACIÓN

A continuación se describen los instrumentos analíticos utilizados en esta tesis.

2.3.1 NIR

Los espectros NIR se registraron con un espectrómetro FOSS 5000 (equipado con el módulo Rapid Content Analyzer) en modo reflectancia. Cada espectro es el promedio de 32 scans y se registra en el intervalo espectral 1100-2498 nm con una resolución espectral de 2 nm.

2.3.2. RAMAN

Los espectros Raman se registraron con dos espectrómetros diferentes. El primer equipo utilizado fue el FT-Raman MultiRam comercializado por Bruker (Billerica, MA). La fuente de emisión es un láser de 1064 nm y contiene un detector de Ge enfriado a 78K con nitrógeno líquido. El compartimento de muestra contiene una estación xyz que permite mover el haz láser en un rango de 10 mm en los tres ejes. El diámetro del área iluminada por el láser es 100 μm pudiéndose usar una opción de desenfoque aumentándolo hasta 500 μm .

El segundo espectrómetro es el RamanRxn1 comercializado por Kaiser Optical Systems (Ann Arbor, MI) tiene una fuente de iluminación de 785nm y un detector CCD enfriado a 233K. Cuenta con dos sondas; una *macro* (1mm de haz) y otra *micro* (100 μm de haz).

2.3.3 HPLC

Las determinaciones cromatográficas se realizaron con un Agilent 1100 equipado con una columna Symmetry Shield RP18 de 25 cm de longitud y 0.46cm de diámetro interno además de un detector UV-Vis DAD G1315B de espectro completo.

2.4 REGISTRO ESPECTRAL NIR

2.4.1 PERIFEM

Dado que el objetivo de la preparación de muestra es la comparación de la capacidad predictiva de modelos de calibración NIR utilizando muestras de calibración en polvo y compactadas, una vez homogeneizadas las mezclas de polvos, se procedió a la adquisición del espectro NIR de dichas mezclas. Después, se compactaron las muestras y se registró el espectro del comprimido. En ambos casos se calculó el espectro como el promedio de 32 barridos. Así,

- Para el registro de muestra en polvo, se introdujo una cantidad de aproximadamente 300mg pesados exactamente en una cubeta de 1cm de diámetro y se adquirieron tres espectros removiendo el polvo antes de cada registro.
- Para el registro de muestras compactadas, se registró el espectro por triplicado, rotando las muestras antes de cada adquisición. En el caso de las muestras comerciales,

Capítulo segundo

dada la presencia de relieves en una de las caras, el espectro sólo se registró en una de las caras. En el caso de las muestras de calibración una vez compactadas, el espectro se registró en ambas caras realizándose por tanto el promediado de seis espectros por muestra.

2.4.2 ALDO CUMAR

El procedimiento seguido fue similar al anteriormente descrito. Las muestras de calibración compactadas se registraron por ambas caras realizando por tanto el promediado de seis espectros y en el caso de las muestras comerciales se registraron sólo por una cara debido a la presencia de relieves en una de ellas.

2.5 REGISTRO ESPECTRAL RAMAN

Mediante Raman sólo se analizó el preparado comercial Aldo-Cumar, pero se utilizaron distintos procedimientos para la adquisición de espectro.

2.5.1 ESPECTRÓMETRO BRUKER MULTIRAM

Previo al registro espectral se aseguró el enfriamiento de detector y la estabilidad de la fuente de radiación láser. En todas las medidas se utilizó una potencia de láser de 300 mW. Como primer paso, se colocó la muestra en la plataforma xyz y se ajustó la altura (eje z) para maximizar la intensidad del fenómeno Raman. Dado que el objetivo primero era la

Materiales y métodos

determinación de warfarina en la escala macro, se utilizó el modo desenfocado, que permite ampliar el diámetro del láser hasta 500 μm además de disminuir el riesgo de un eventual cambio en el espectro debido al calentamiento de la muestra o la degradación de la propia muestra.

Para las muestras de laboratorio se registraron 16 puntos por cara, en cuadrícula cuadrada 4x4, maximizando el tamaño de la cuadrícula para aumentar la representatividad del conjunto de espectros. En el caso de las muestras de producción, se registraron ocho espectros por cada una de las fracciones subdividibles; así, se registraron 16 espectros de cada uno de los comprimidos de AC-1, AC-3 y AC-5 y 32 de AC-10 (fragmentable en cuartos). En la **figura 2-1** se muestra el esquema de registro espectral para este equipo.

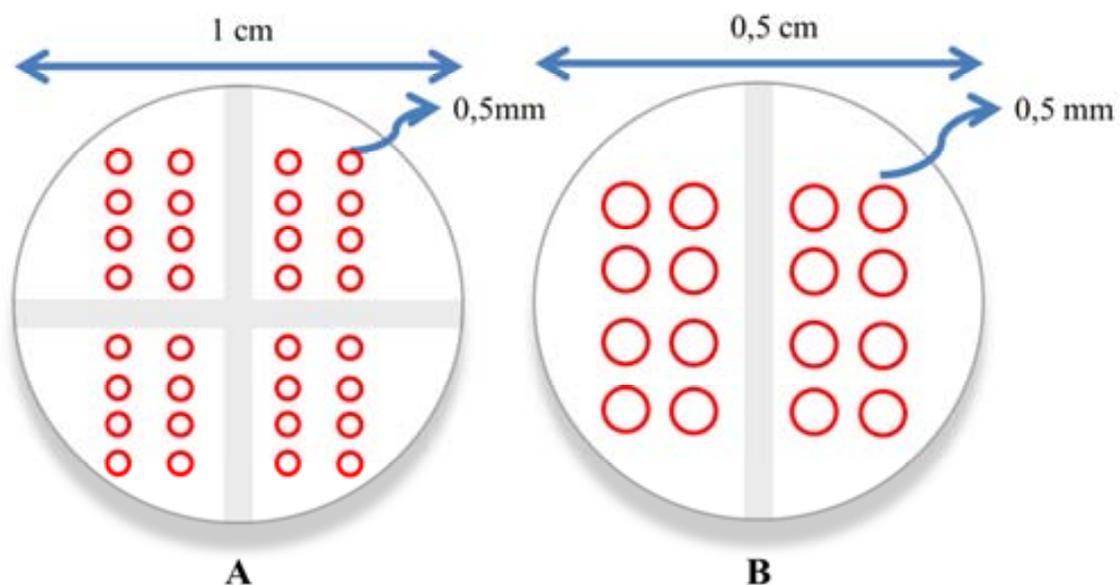


Figura 2 - 1: esquema de la adquisición espectral para A) AC-10 y B) AC-1, AC-3 y AC-5.

Capítulo segundo

Se empezó utilizando la que es la resolución espectral estándar, 4cm^{-1} , pero la adquisición de los 8 espectros por fracción divisible se demoraba más de lo razonable en términos de Control de Calidad. Por tanto, se decidió reducir la resolución espectral a 16cm^{-1} , tras comprobar que esta reducción en la resolución espectral no provocaba la distorsión de las bandas espectrales. Así, el tiempo de adquisición de espectros que se situó en *ca.* 4 min para las dosificaciones AC-1, AC-3 y AC-5 y en 8 min para AC-10. Se registraron los espectros Raman entre 3600 y 50 cm^{-1} . Teniendo en cuenta la interpolación que calcula el software cada 8 cm^{-1} el espectro final se compone de 460 puntos.

2.5.2 ESPECTRÓMETRO KAISER RXN1

Este equipo permite la utilización de diferentes sondas Raman, lo que aporta gran versatilidad al mismo. Así, se realizó el registro espectral con dos sondas cuya diferencia reside en el tamaño de iluminación: la sonda PhAT tiene un diámetro de 1mm mientras que la sonda Microprobe tiene un diámetro de $100\mu\text{m}$. El resto de variables instrumentales fueron : 4 segundos de tiempo de exposición para la sonda Microprobe, 8 s para la sonda PhAT y resolución espectral de 0.3cm^{-1} y potencia de láser de 400 mW para ambas sondas.

2.5.2.1 SONDA PhAT

Esta sonda se utilizó para el registro espectral con fines cuantitativos en la superficie de los comprimidos AC-10. Éste consistió, como se muestra en la **figura 2-2** en dos espectros por cuarto.

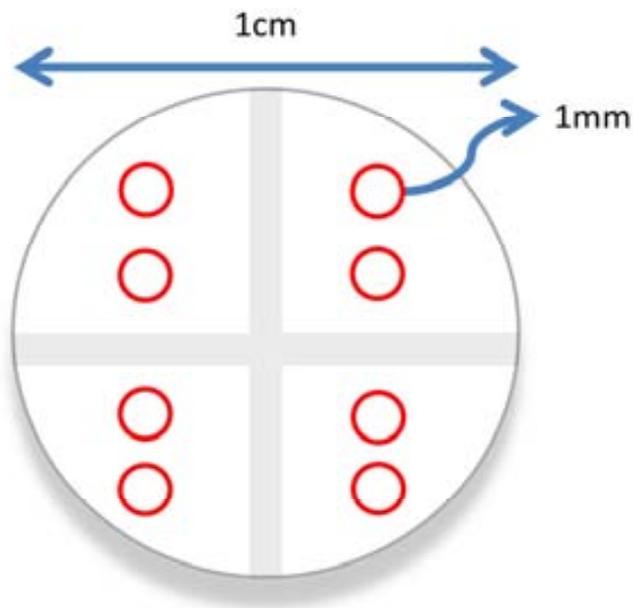


Figura 2 - 2: esquema de registro espectral con la sonda PhAT.

2.5.2.2 SONDA MICROPROBE

En el caso de la sonda Microprobe, se utilizó su reducido tamaño de *haz* para el estudio de la homogeneidad de distribución en superficie e interior del comprimido. Como ilustra la **figura 2-3** se adquirió una línea de 50 espectros ligeramente solapados en la superficie de los comprimidos AC-10 y en el interior de los mismos, previa división del comprimido.

Capítulo segundo

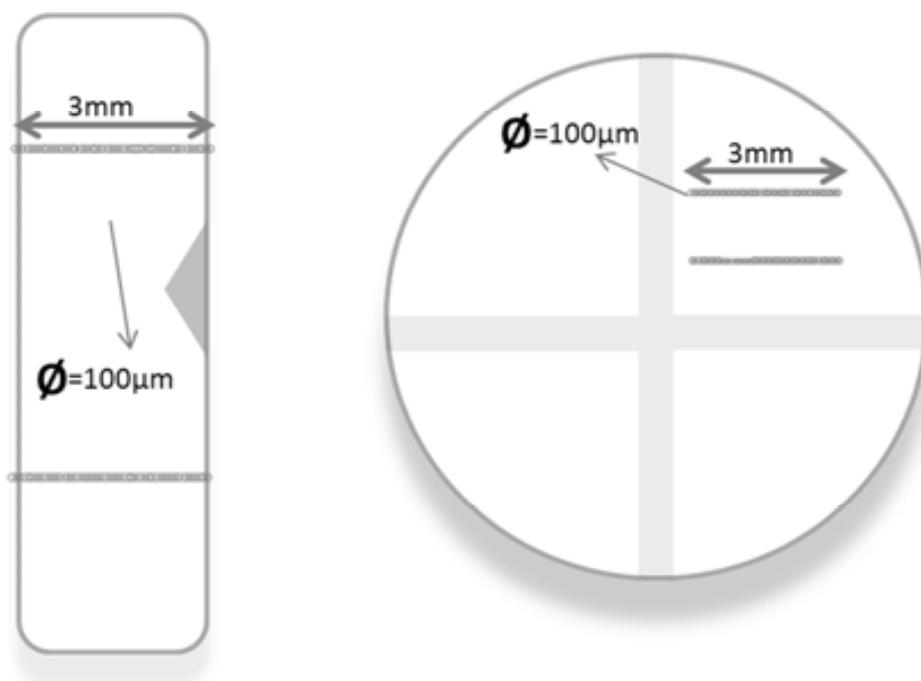


Figura 2 - 3: esquema de registro espectral con la sonda Microprobe. A la izquierda se muestra el registro en el interior de los comprimidos AC-10 y a la derecha en su superficie.

2.6 GRANULACIÓN EN CONTINUO

La granulación es el proceso por el cual las partículas primarias de polvo se preparan para adherirse entre sí y formar mayores estructuras, que se conocen como gránulos. Los objetivos de este proceso, entre otros, son mejorar las propiedades de deslizamiento y compactación de la mezcla y evitar la segregación de los componentes de la mezcla.

La mezcla granulada ha consistido en una mezcla de teofilina (API, 30% p/p), lactosa (excipiente 67,5% p/p) y polivinilpirrolidina (*binder*, 2,5% p/p). Esta mezcla seca ha sido granulada utilizando agua destilada como líquido granulador. La humedad residual en la mezcla seca es del 3,5% debido al agua de hidratación de la lactosa.

Materiales y métodos

Los gránulos se produjeron y se secaron con una unidad ConsiGma™-25 (GEA Pharma Systems nV, Collette™, Wommelgem, Belgium), que consisten en tres grandes piezas: un granulador de doble husillo, un secador de lecho fluido de seis celdas paralelas y un sistema de descarga.

El estudio se centró en el secador de lecho fluido (FBD). Éste cuenta con seis celdas paralelas alimentadas de forma secuencial por el granulador y tras el secado (en el cual es posible establecer el tiempo de secado, el flujo de aire y su temperatura), los gránulos se extraen mediante del segmento de secado mediante una válvula rotacional de salida, dando lugar a un proceso semi-continuo. Dos de las seis celdas del FBD cuentan con puertos que permiten la implementación de sondas. En la **figura 2-4** se muestra el equipo ConsiGma-25 utilizado en el desarrollo de este trabajo.



Figura 2 - 4: ConsiGma-25, el granulador- secador en lecho fluido utilizado en este estudio.

Capítulo segundo

El FBD permite ajustar múltiples parámetros, pero el objeto del estudio ha sido el desarrollo y validación de un método para la determinación de humedad y no un diseño de experimentos de los parámetros. Así, sólo se varió la temperatura del aire de entrada con el fin de obtener rango de concentraciones de humedad lo bastante amplio, ya que experimentos previos mostraron que éste era el parámetro con la mayor influencia. Así, el flujo de aire ha sido de 360 m³/h, el tiempo de alimentación de 5 minutos dando lugar a un caudal de masa de 32 g/min, un tiempo de secado total de 15 minutos (incluyendo el tiempo de alimentación) y se ha variado la temperatura del aire de entrada entre 35 y 75°C. El rendimiento de cada lote (entendido por el contenido descargado secuencialmente por cada celda) ha sido de *ca.* 1.25kg de gránulos.

2.7. MÉTODOS DE REFERENCIA

2.7.1 DETERMINACIÓN PRINCIPIO ACTIVO (PERIFEM)

El método de referencia HPLC fue desarrollado a partir de un trabajo previo (1) cambiando acetonitrilo por metanol y aumentando la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil para obtener tiempos de retención adecuados (en comparación al tiempo muerto). Las condiciones cromatográficas definitivas fueron: a) fase móvil NH₄NO₃ (pH 5.7±0.1; 0.07M)- MeOH (10:90, v/v), b) temperatura de elución de 25°C (la columna se introdujo en

una cámara termostatzada, c) $\lambda=280\text{nm}$ y d) $20\mu\text{L}$ volumen de inyección. Bajo dichas condiciones el tiempo de elución de MPA fue de 3.2 min y el de VE 7.4 min. Todas las soluciones fueron filtradas a través de una membrana de nylon de $0.45\mu\text{m}$ previa inyección HPLC.

2.7.2 DETERMINACIÓN DE WARFARINA SÓDICA (ALDOCUMAR)

El punto de partida del método HPLC fueron dos trabajos de la bibliografía (2, 3). Las condiciones finales fueron: a) H_3PO_4 (pH 3.0 ± 0.1 ; 0.001M)-ACN (50:50, v/v), b) temperatura de elución de 25°C , c) $\lambda=280\text{nm}$, d) volumen de inyección $10\mu\text{L}$. Todas las soluciones fueron filtradas a través de una membrana de nylon de $0.45\mu\text{m}$. Bajo estas condiciones el tiempo de retención de la warfarina fue de 11.0 min. Se utilizó un estándar analítico de warfarina para la construcción de la curva de calibrado. En cualquier caso, el pH ácido de la fase móvil permitió la protonación de la molécula de warfarina observándose el mismo comportamiento para la warfarina y su sal sódica.

2.7.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN GRÁNULOS

La humedad residual en los gránulos se ha determinado mediante volumetría Karl Fischer utilizando un valorador V30 Mettler-Toledo. Se ha utilizado metanol como disolvente y la

Capítulo segundo

muestra ha consistido en *ca.* 0.1g de gránulos pesados con exactitud que han sido agitados durante tres minutos. El análisis se realizó por triplicado, muestreando en diferentes puntos de cada lote con objeto de introducir la heterogeneidad de la muestra en el cálculo del error de laboratorio.

2.7 SOFTWARE PARA EL TRATAMIENTOS DE DATOS

- Vision 2.5.1 (Foss, Silversprings, Estados Unidos). Software de control del instrumento del espectrómetro NIR FOSS 5000. Se ha utilizado para este fin y para el exportado de los espectros.
- OPUS 6.5 (Bruker, Estados Unidos). Este es el software de control de instrumento del espectrómetro MultiRam de Bruker. Además de permitir el pretratamiento espectral y la construcción de modelos cuantitativos y realizar análisis exploratorios, permite utilizar la cámara de vídeo acoplada a la plataforma xyz lo que permite adquirir imágenes de la muestra durante la adquisición espectral.
- Unscrambler ediciones 9.8 y X (Camo, Noruega). Programa para el tratamiento multivariante de los datos. Incorpora los pretratamientos espectrales más habituales (SNV, normalizaciones, promediado, derivadas de Savitzky-Golay o suavizados) y herramientas quimiométricas también habituales con PCA o PLS.

- Kaiser Optical Analyzer Control (Ann Arbor, MI). Programa para el control de instrumento para los espectrómetros Kaiser..
- Simca-P 12 (Umea, Suecia). Programa para el tratamiento de datos. Especialmente diseñado para la manipulación de información de proceso (en los cuales es de gran importancia la variable tiempo). Así, es muy adecuado para el pretratamiento y el uso de herramientas quimiométricas habituales como PCA o PLS en el estudio de procesos.

En esta tesis se han desarrollado métodos cuantitativos para la determinación de concentración de principio activo, que es uno de atributos críticos de calidad más importantes en la industria farmacéutica. Para ello se utilizó la herramienta quimiométrica PLS1 previo tratamiento de los espectros con combinaciones de pretratamientos como las derivadas de Savitzky-Golay y normalizaciones. Los modelos fueron construidos mediante validación cruzada. El criterio utilizado para determinar el ancho de ventana móvil de las derivadas fue el mayor que no distorsionara el espectro. Para la evaluación de la capacidad predictiva de los modelos bajo distintos pretratamientos, número de factores PLS o rangos espectrales, se analizaron muestras comerciales posteriormente analizadas por el método de referencia y se compararon los valores espectroscópicos hallados con los de referencia mediante, entre otros criterios, Error Estándar de Predicción (SEP), valores de pendiente y ordenada en el origen y el test t para muestras apareadas de valores predichos frente a los de HPLC.

2.8 REFERENCIAS

1. De Orsi D, Gagliardi L, Turchetto L, Tonelli D. HPLC determination of warfarin and acenocoumarol in raw materials and pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(4):891-5.
2. Ceresole R, Rosasco M, Forastieri C, Segall A. HPLC Determination of Acenocoumarol and its Major Thermal Degradation Product. *J Liq Chromatogr Related Technol.* 2007;31(2):179-87.
3. Segall A, Hormaechea F, Vitale M, Perez V, Pizzorno M. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of estradiol valerate and medroxyprogesterone acetate in a tablet formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 1999;19(5):803-8.

Materiales y métodos

Capítulo segundo

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

3.1 AUMENTO DE PRECISIÓN Y SENSIBILIDAD EN LA DETERMINACIÓN NIR DE API A BAJA CONCENTRACIÓN

3.1.1 INTRODUCCION

A pesar del gran desarrollo de las técnicas espectroscópicas moleculares en muestras sólidas, no existe una teoría que defina de una manera completa la absorción de la radiación en un medio dispersante. La aproximación más conocida fue la desarrollada por Kubelka y Munk (K-M) en los años 1930 y que ha sido revisada recientemente por Dahm *et. al.* (1).

En la función de K-M, la reflectancia de una muestra de grosor infinito (cuya transmitancia pueda ser considerada nula) está relacionada como el cociente de las propiedades ópticas fundamentales expresadas como absorción (K) y *scattering* (S), tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$A(R_m, 0) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{R_\infty} = \frac{2K}{S}$$

El coeficiente de absorción, K, para una muestra difiere de la potencia absorbida por el material del que está compuesta la muestra por varias razones:

1. Huecos: una muestra dispersante contiene en general huecos, reduciendo la fracción de radiación absorbida por un determinado grosor de muestra.

Resultados y discusión

2. Reflexión de superficie: cada partícula refleja parte de la radiación incidente, limitando así la fracción de radiación absorbida.
3. Distancia recorrida: el coeficiente de absorción lineal de la muestra depende la distancia real recorrida por la muestra a través de la muestra (por unidad de grosor). Ésta es distinta de la distancia recorrida en un medio homogéneo (donde la distancia recorrida es igual al grosor de la muestra) ya que
 - a. La radiación dispersada es difusa por lo que viaja en todas las direcciones.
 - b. La radiación es reflejada hacia delante y hacia atrás entre las superficie internas de la partícula.

Dadas las limitaciones de la ecuación de Kubelka-Munk (1), a nivel práctico es preferible utilizar una aproximación puramente experimental, adaptando la reflectancia a la clásica ley de Beer-Lambert-Bourget.

$$A = \log \frac{1}{R_{rel}} = a_{\lambda} \cdot f \cdot c$$

donde la reflectancia relativa (R_{rel}) es el cociente entre la reflectancia de la muestra y la de un materia referencia, a_{λ} es el término asociado a la información química. f es el camino óptico y c es la concentración. La expresión se reduce a $a_{\lambda}=k \cdot c$ cuando el camino óptico es el mismo para todas las muestras. A pesar de ello, como se ha comentado anteriormente, definir el camino óptico de una muestra sólida semiabsorbente no resulta viable dado el gran número de propiedades físicas de las que depende (índice de refracción, relación entre tamaño de partícula y longitud de onda, grado de compactación, superficie de la muestra...).

Resultados y discusión

Por lo tanto, los cambios en el coeficiente de absorción K entre muestras son esperables y son llamados “cambios en *scattering*” que se plasman espectralmente en desplazamientos y derivas de línea base. Solo cuando el camino óptico es el mismo para todas las muestras, la absorbancia aparente se puede relacionar linealmente con la concentración. Dado que este enfoque necesita de un tamaño de partícula uniforme, resulta poco práctico, por lo que se utilizan pretratamientos espectrales de diferente naturaleza para reducir las diferencias en *scattering* y así mejores las calibraciones y sus predicciones.

La espectroscopia NIR ofrece numerosos beneficios al análisis farmacéutico, pero a pesar de ello, su baja sensibilidad hace dificultosa la determinación precisa de APIs cuya proporción en masa se encuentra cerca o por debajo del uno por ciento. En estos casos, la metodología de selección y preparación de muestras es determinante para el desarrollo de un buen método analítico. Así, un acercamiento razonable sería la de reducir el ruido disminuyendo las diferencias en *scattering* del conjunto de muestra calibración, especialmente entre los *distintos tipos de muestras* (en función de su origen, composición y forma de preparación) que formen el conjunto de muestras calibración y predicción.

La condición esencial para que se produzca el fenómeno de *scattering* es un cambio en el índice de refracción del medio. Así, en un sólido particulado, este fenómeno se produce en las interfases aire-partícula, por lo que aquellas muestras con menor grado de compactación o, en un caso extremo, en polvo, la componente de *scattering* será mayor. Además, una menor componente de *scattering* provocará un alargamiento de camino óptico efectivo lo que pudiera dar lugar a un aumento en la sensibilidad del método analítico.

Resultados y discusión

El objetivo de esta sección de la tesis es el desarrollo de un procedimiento NIR para la determinación de los dos API del preparado hormonal Perifem (acetato de medroxiprogesterona (MPA), 8% p/p y valerato de estradiol (VE), 1,6% p/p), formulación que contiene dos dosificaciones: una que sólo contiene VE (comprimidos azules) y otra que contiene tanto MPA como VE (comprimidos azules), comparando la utilización de muestras de calibración en polvo y compactadas en la construcción de un modelo de calibración bajo la estrategia de sobre e infradosificación, a la que se hizo referencia en la introducción de la tesis. Para ambas dosificaciones las concentraciones corresponden a las anteriormente mencionadas.

3.1.2 RESULTADOS

La divergencia en las propiedades de *scattering* entre las muestras intactas de producción y las muestras dopadas molturadas usadas para ampliar el rango de la calibración es una de las limitaciones inherentes al uso de conjuntos de muestras de calibración mixtos (2). Este hecho puede ser superado mediante la molturación de las muestras comerciales previa al análisis pero se reduciría el rendimiento del muestreo, lo que dificultaría su aplicación en el control de calidad de lotes de producción. Un método analítico de control de calidad debe analizar las muestras con el mínimo tratamiento previo, e idealmente sin ningún pretratamiento.

Cuando la contribución espectral del API es baja, debido a una baja concentración y/o baja absorptividad, una determinación precisa puede ser problemática. Así, la semejanza en

propiedades de scattering entre las muestras a analizar y las de calibración proporcionará una mayor precisión en la determinación, que puede ser crítica a baja concentración.

Con el fin de aumentar la precisión, se evaluaron diferentes pretratamientos espectrales para encontrar cuál de ellos podía reducir las diferencias de *scattering* en mayor medida entre las muestras en polvo y las compactadas. La hipótesis subyacente es que la compactación de las muestras de calibración reduciría las diferencias de *scattering* entre las muestras de calibración y de producción y además debería conducir a un ligero aumento en el camino óptico efectivo. Como resultado, se esperaba un aumento de la precisión del método.

3.1.2.1 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MEZCLADO

Debido a la necesidad de una etapa de homogeneización en la preparación de muestras de laboratorio y al riesgo de segregación debido a la baja concentración de uno de los analitos (3), se realizó una prueba para hallar el tiempo de mezclado óptimo. Para ello se preparó una mezcla 1:1 en peso de molturado de comprimidos y lactosa monohidrato. Se introdujo la mezcla en la túbula y se registró (*offline*) un espectro NIR cada 5 min hasta alcanzar los 40 min. Se calculó el residual medio por longitud de onda entre registros consecutivos (**figura 3-1**) mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados y discusión

Donde $A_{t=x}$ es la absorbancia (entendida como $\log 1/R$) en una determinada λ en un determinado tiempo de mezclado, $A_{t=x+5}$ en su medida consecutiva y n_λ el número de λ medidas y $b_{m,t}$ la media de residuales para dos tiempos de mezclado consecutivos.

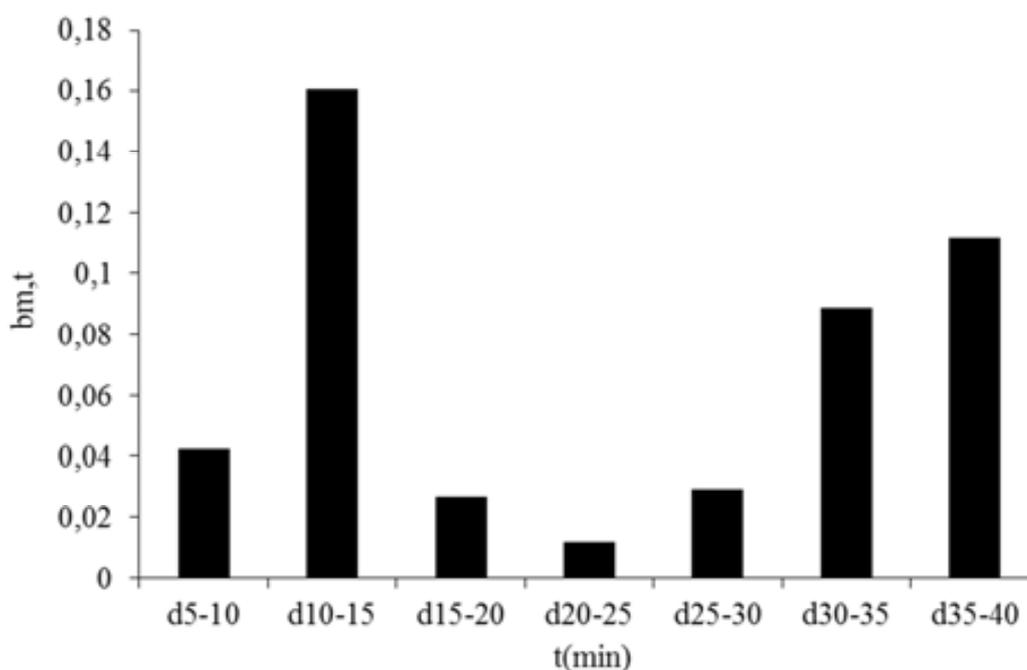


Figura 3 - 1: sumatorio de las diferencias espectrales entre registros espectrales a tiempos de mezclado consecutivos.

Se observa que la mínima diferencia entre espectros consecutivos se produce entre los 20 y 25 minutos de mezclado. Dado que este parámetro no refleja los cambios que se producen en las diferentes regiones espectrales, se calculó también la desviación estándar de los registros espectrales consecutivos (tres espectros por tiempo de mezclado) como se muestra en la **figura 3-2**. Para facilitar la interpretación de estos valores, se ha añadido también el espectro de desviación estándar de seis espectros consecutivos como medida de variabilidad espectral intrínseca al registro espectral (s mínima). Como se puede observar,

la desviación estándar entre los tiempos de mezclado 20 y 25 min muestra una línea horizontal congruente con los resultados de la **figura 3-1**.

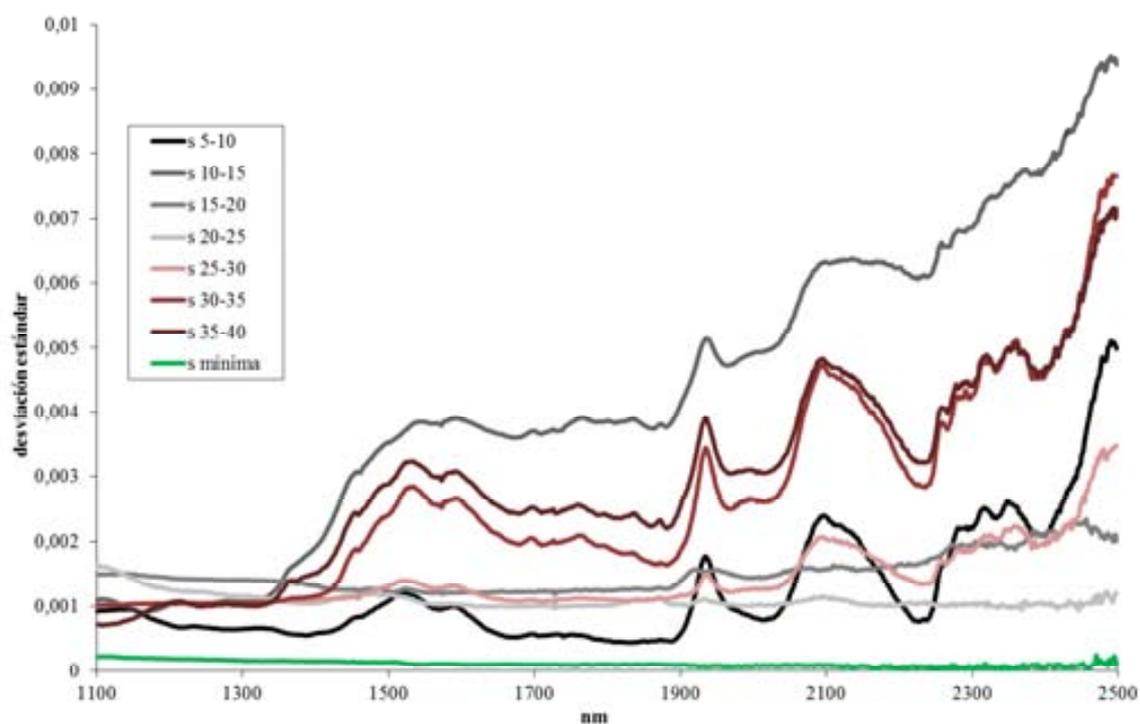


Figura 3 - 2: desviación estándar del registro espectral a tiempos de mezclado consecutivos.

Así, estos dos parámetros permitieron escoger un tiempo de 22min como el adecuado para la homogeneización de las muestras. Como se puede ver en la **figura 3-1**, el residual medio por longitud de onda tiene un mínimo entre 20 y 25 minutos. Además, en la **figura 3-2** se observa que el residual de dichos tiempos de mezclado es el que menos varía a lo largo del espectro.

3.1.2.2 EFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS ESPECTRALES.

Para evaluar la capacidad de los distintos pretratamientos para eliminar las diferencias espectrales debidas a la presentación física de la muestra (las diferencias de *scattering*), se pulverizaron varias muestras de producción, se registró el espectro NIR de dichas muestras,

Resultados y discusión

se compactaron y se volvió a registrar su espectro NIR. Por tanto, se registró el espectro de la *misma* muestra (entendida como composición química) en las dos presentaciones físicas; pulverizadas y compactadas. Este procedimiento se repitió con cinco muestras.

El primer parámetro utilizado para evaluar la semejanza entre espectros fue el coeficiente de correlación, pero se obtuvieron correlaciones muy altas para todos los pretratamientos. Además, este parámetro evalúa la semejanza entre perfiles espectrales, pero no refleja diferencias cuantitativas entre espectros con el mismo perfil pero diferente intensidad. Así, la información cuantitativa se obtuvo mediante la suma de los cuadrados de diferencias relativas en cada longitud de onda, la cual es usada para calcular el parámetro **b** para cada muestra. Con el fin de tener una referencia del valor mínimo esperable, se calculó un parámetro similar, **B_m**, para evaluar las diferencias entre espectros registrados en diferentes días de la misma muestra. De hecho, **B_m** se calculó como el valor promedio de cinco muestras de producción, las cuales se almacenaron en un desecador antes y durante los registros espectrales para prevenir posibles cambios espectrales debidos a absorción de humedad.

$$b_m = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \left(\frac{X_i^{\text{compactado}} - X_i^{\text{en polvo}}}{X_i^{\text{en polvo}}} \right)^2}$$

$$B_m = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \left(\frac{X_i^{\text{día 1}} - X_i^{\text{día 2}}}{X_i^{\text{día 1}}} \right)^2}$$

Donde $X^{\text{compactado}}$ es la intensidad de la muestra compactada a cada longitud de onda y $X^{\text{pulverizado}}$ se refiere al mismo parámetro para la muestra en polvo.

Resultados y discusión

Los resultados mostraron (**tabla 3-1**) que cualquiera de los pretratamientos evaluados hace que los espectros en polvo y compactado sean prácticamente iguales, siendo la combinación de SNV y 2D la que minimizaba las diferencias, a pesar de que la inversión en el orden de este pretratamiento (2D seguido de SNV) produjo resultados parecidos. Cabe resaltar que las derivadas transformaron algunos valores de señal a cerca de cero, lo que provocó un valor exagerado del cociente. Dado que este artefacto matemático estaba provocado por el pretratamiento, dichos puntos espectrales se eliminaron del cálculo de **b**. Fue sorprendente que el valor **B_m** para SNV fuera superior al del espectro crudo, pudiendo ser explicado por la presencia de amplias zonas espectrales en el SNV cercanas a cero que, debido a la naturaleza de normalización del pretratamiento provocaron la aparición de valores altos del cociente. Otros artefactos provocados por el SNV como son la variabilidad del desplazamiento de banda y la no linealidad han sido publicados previamente (4).

Tabla 3 - 1: Efecto de pretratamientos en las diferencias espectrales entre muestras en polvo y compactadas (b) y Ec. XX. B_m es una medida de la reproducibilidad instrumental (Ec. XX).

	Abs	SNV	1D ^a	2D ^b	2D+SNV ^c	SNV+2D ^b
b ₁	583,5	59,8	58,5	56,9	24,4	22,4
b ₂	1184,9	60,9	57,1	79,0	41,1	31,9
b ₃	173,0	74,0	60,1	87,2	31,0	35,7
b ₄	160,7	69,2	61,4	111,3	55,6	45,0
b ₅	638,1	31,1	117,5	79,2	20,2	32,0
B _m	0,4	4,5	25,9	6,2	10,5	6,2

Longitudes de onda eliminadas de cálculo:

^a1314nm y 1432nm

^b1314, 1432 y 1528nm

^c1164, 1314, 1460 y 1528nm

En la **figura 3-3** se muestran, (a) los espectros crudos de comprimidos blancos intactos, pulverizados y compactados (b) los mismos espectros tras el pretratamiento SNV+2D. En el caso de los espectros crudos las diferencias en las propiedades de *scattering* se observan a simple vista y los espectros de las muestras de producción intactas se dividen en dos

Resultados y discusión

conjuntos correspondientes a los lotes de producción. Esta diferencia espectral puede ser atribuida a una diferente presión de compactación (5).

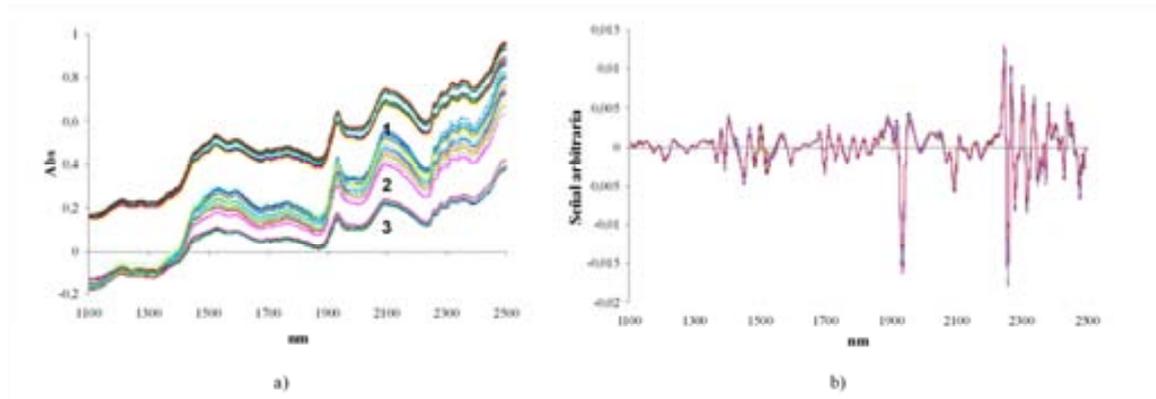


Figura 3 - 3: (a) Espectros crudos de comprimidos de producción (1), pulverizadas (2), compactadas en laboratorio (3) y (b) los mismos espectros tras SNV y 2D.

Los espectros de las muestras compactadas en laboratorio son prácticamente paralelos a los espectros de las muestras de producción y estas diferencias pueden ser también atribuidas a la presión de compactación. En cambio, las muestras en polvo mostraron mayor variabilidad espectral y un cambio en la pendiente respecto a los otros dos grupos de muestras debido a las grandes diferencias en propiedades de scattering. Cabe resaltar que, a pesar de que el pretratamiento de SNV seguido de 2D minimiza las diferencias espectrales, se encuentran algunas diferencias significativas en las bandas de absorción del agua (centradas en 1440 y 1940 nm). A pesar de que el procedimiento experimental se ejecutó con la mayor celeridad posible, necesitó varias horas; queda claro que durante ese tiempo las muestras absorbieron humedad ambiental, introduciendo una diferencia “artificial” entre los registros de las muestras en polvo y compactadas. Por tanto, las zonas espectrales 1400 a 1500 nm y 1900 a 2000 nm se eliminaron de los consiguientes cálculos.

3.1.2.3 EFECTO DE LA COMPACTACIÓN

La bibliografía acerca de la relación de la presión de compactación y la propiedades de *scattering* indica que un aumento de la presión provoca un aumento de camino óptico efectivo, o dicho de otro modo, la masa efectiva de muestra analizada aumenta (6). Una consecuencia práctica de este hecho debiera ser un aumento de la sensibilidad, hecho de gran relevancia dada la baja sensibilidad de la técnica. Con el fin de demostrar esta hipótesis, se molturaron varias muestras de producción; se registró su espectro NIR, se compactaron y se volvió a registrar el espectro NIR. De esta manera, se obtuvo el espectro de la “misma” muestra en polvo y compactada. Con objeto de facilitar la comparación de los espectros y eliminar el desplazamiento de línea base entre ellos, se trataron los espectros con segunda derivada. En la **figura 3-4** se muestran los espectros 2D en valor absoluto. Como se puede observar, la señal para la muestra compactada es mayor a lo largo de todo el espectro e independiente de la longitud de onda. Así, puede atribuírsele a la compactación un aumento (entendido como la relación $\text{señal}_{\text{compactado}}/\text{señal}_{\text{en polvo}}$) en el camino óptico efectivo de 2.0 ± 0.1 .

Resultados y discusión

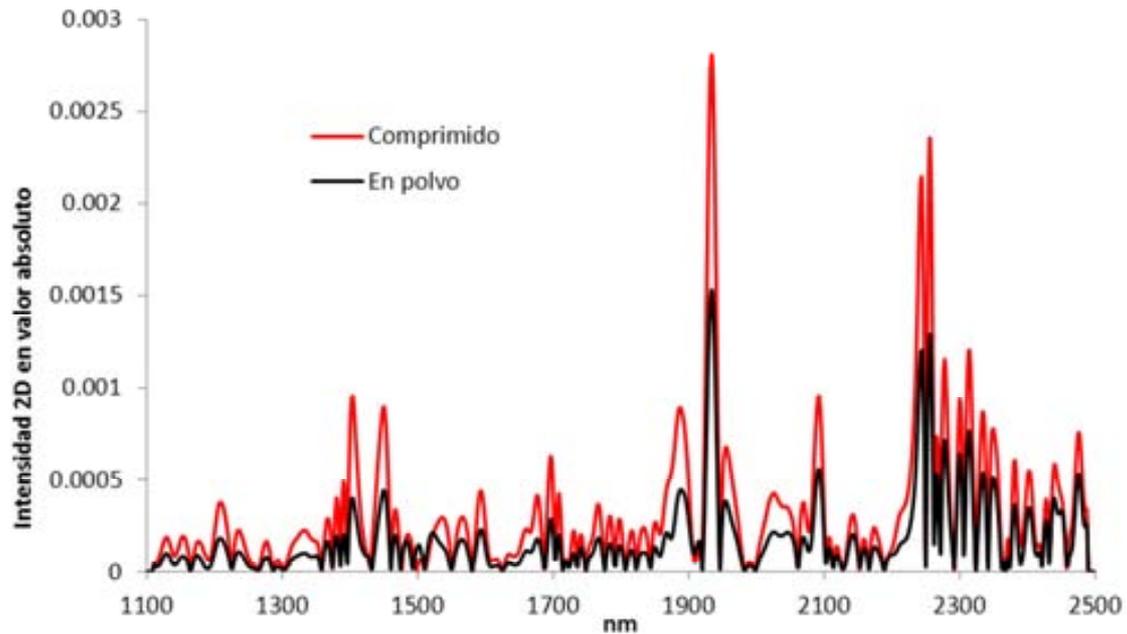


Figura 3 - 4: Valores absolutos del espectro 2D de una misma muestra en polvo y compactada.

Este hecho concuerda con el modelo teórico donde la compactación de la muestra hace que se reduzca el volumen de aire presente, provocando una disminución en el *scattering*. Por tanto, la intensidad de la radiación reflejada por la muestra será menor, pero la penetración en la muestra aumentará (6, 7). Así, la compactación de la muestra hará que el camino óptico efectivo aumente, por tanto, la sensibilidad aumentará. En la **figura 3-5** se esquematiza este fenómeno.

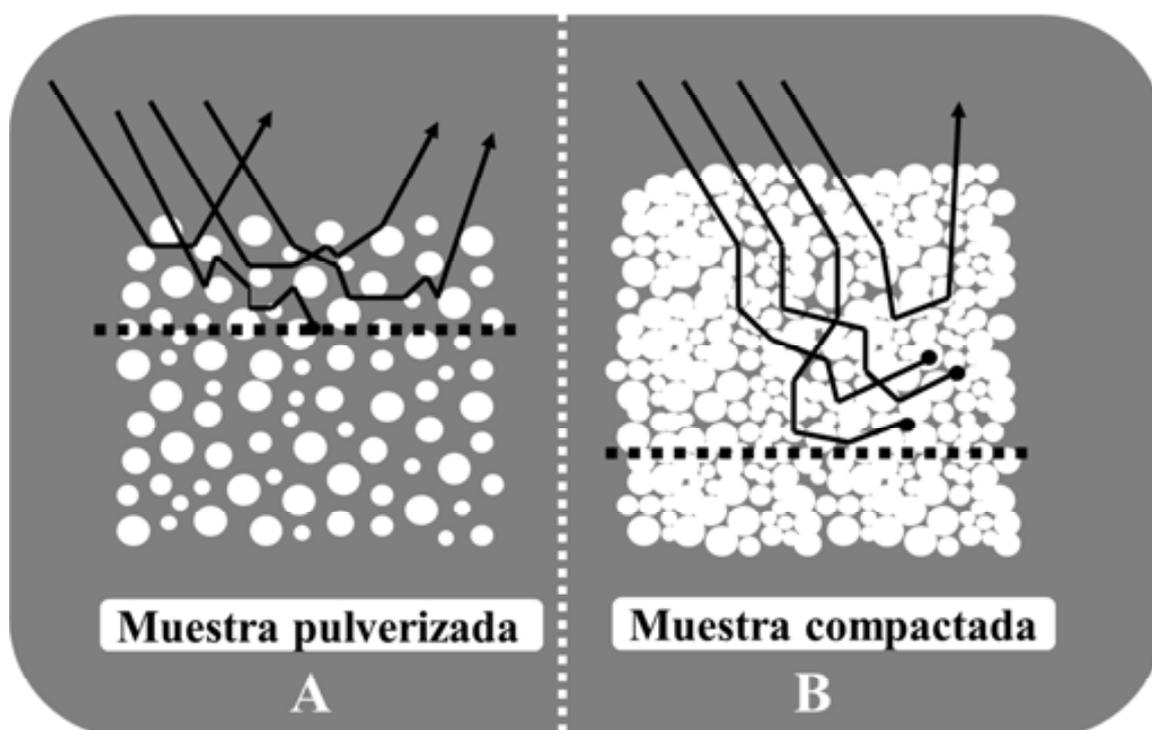


Figura 3 - 5: esquematización de las consecuencias en la reflectancia de una muestra por efecto de la compactación.

3.1.2.4 DETERMINACIÓN DE API

Los modelos cuantitativos se desarrollaron tratando los espectros con la combinación de SNV seguido de 2D. Se ensayaron distintos intervalos espectrales; el espectro completo, el espectro completo eliminando las bandas de absorción del agua (1400 a 1500 y 1900 a 2000 nm) y la estrecha región de 1100 a 1300 nm. A pesar de que esta última pudiera considerarse demasiado estrecha, ambos API presentan bandas de absorción características en este intervalo, mientras que las bandas de absorción de los excipientes son menos intensas en esta región que a longitudes de onda largas. Para ilustrar este hecho, se simuló un espectro binario a partir del espectro puro (previo pretratamiento 2D) de VE (ya que se trata del API a concentración más baja) y del excipiente mayoritario asumiendo una contribución espectral equivalente a la concentración de los componentes (1,6 para VE y

Resultados y discusión

98,4 % p/p para la lactosa monohidrato). Para la evaluación de los datos se sumaron las intensidades en valor absoluto en intervalos de 200nm (sc, suma de contribución espectral). A pesar de ser una estimación aproximada, la **figura 3-6** muestra claramente que la contribución espectral del API es mayor en el intervalo espectral de 1100 a 1300 nm.

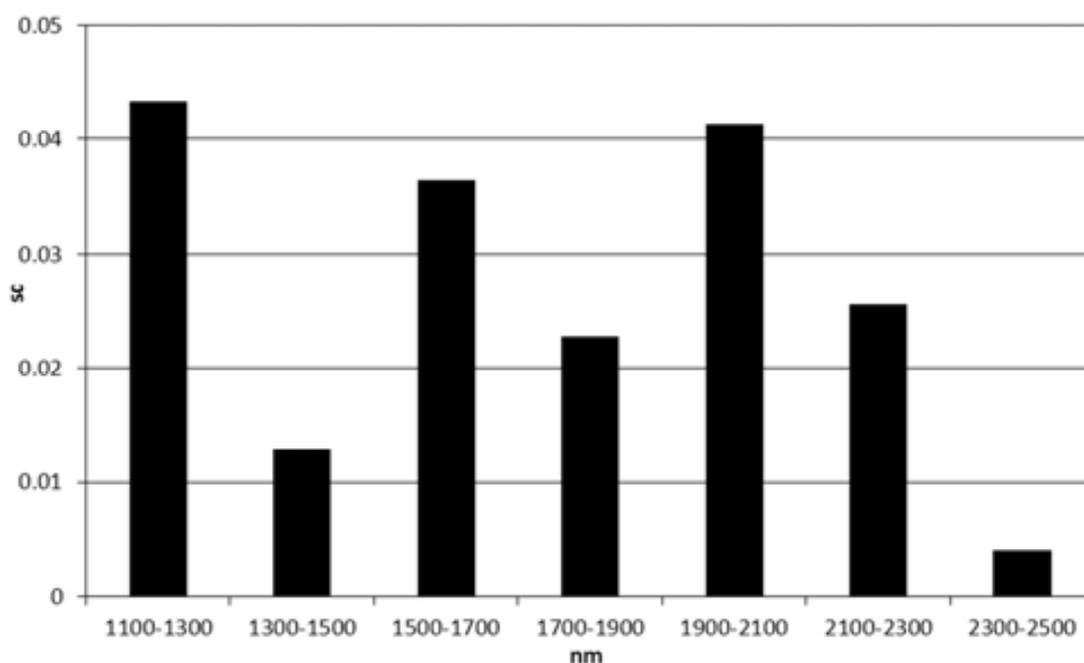


Figura 3 - 6: Contribución espectral relativa de VE (a concentración nominal) con el excipiente mayoritario como matriz.

Las figuras de mérito de los modelos PLS desarrollados se muestran en las **tablas 3-2, 3-3 y 3-4**. Con el fin de simplificarlas, sólo se muestran aquéllos que dieron mejores resultados, a pesar de que en algunos casos se obtuvieron resultados sin diferencias estadísticamente significativas utilizando diferentes intervalos de longitudes de onda. Cabe resaltar que en todos los casos fue posible obtener modelos de calibración aceptables y que la cuantificación de VE necesitó 5-6 factores para el modelado, frente a los tres que fueron necesarios en el caso de MPA (ya que la concentración de esta última es cinco veces

Resultados y discusión

superior). De todas maneras, la principal conclusión extraída de las figuras de mérito es que la mejor precisión (entendida como menores valores de SEP, intervalos de confianza más estrechos de intercepto y pendiente NIR vs. HPLC), se obtiene en todo los casos utilizando muestras compactadas de calibración. Esto es coherente con la situación descrita anteriormente; los modelos construidos con muestras de calibración compactadas obtienen mayor sensibilidad, lo que conlleva una menor dispersión de los valores de predicción.

Tabla 3 - 2: Figuras de mérito de los mejores modelos para la determinación de VE en comprimidos blancos.

	Compactadas		En polvo		
	cal	pred	cal	6	pred
Factores PLS		6			
Número de muestras	21	13	21	6	16
Intervalo espectral (nm)	1100-1300		1100-1400,1500-1900,2000-2450		
Pendiente	0,99±0,03	1,04±0,08	0,99±0,02		0,91±0,10
Intercepto (mg/100mg)	0,02±0,04	-0,07±0,14	0,02±0,04		0,14±0,15
SEC/SEP (mg/100mg)	0,027	0,042	0,025		0,056

Tabla 3 - 3: Figuras de mérito de los mejores modelos para la determinación de VE en comprimidos azules.

	Compactadas		En polvo		
	cal	pred	cal	5	pred
Factores PLS		5			
Número de muestras	18	13	18	5	13
Intervalo espectral (nm)	1100-1400,1500-1900,2000-2450				
Pendiente	0,97±0.04	0,93±0.10	0,94±0.06		0,98±0.10
Intercepto (mg/100mg)	0,05±0.07	0,09±0.16	0,09±0.16		0,03±0.25
SEC/SEP (mg/100mg)	0,042	0,039	0,055		0,062

Tabla 3 - 4: Figuras de mérito de los mejores modelos para la determinación de MPA en comprimidos azules.

	Compactadas		En polvo		
	cal	pred	cal	3	pred
Factores PLS		3			
Número de muestras	17	16	19	3	16
Intervalo espectral (nm)	1100-1400,1500-1900,2000-2450				
Pendiente	1,00±0.01	1,01±0.03	0,98±0.03		1,10±0.09
Intercepto (mg/100mg)	0,03±0.10	0,08±0.28	0,12±0.24		-0,84±0.72
SEC/SEP (mg/100mg)	0,101	0,097	0,204		0,260

Resultados y discusión

En las **tablas 3-5** y **3-6** se muestran los resultados obtenidos en la predicción de muestras de producción. No se hallaron diferencias significativas entre los valores NIR y los valores HPLC de referencia (test t pareado).

Tabla 3 - 5: Determinación de VE y MPA en comprimidos azules individuales, Valor nominal 2mg y 10 mg/comprimido respectivamente, Todos los resultados se expresan en mg API/comprimido.

VE				
Masa (mg)	HPLC	NIR	Δ^a	
117,0	1,84	1,87	0,03	
117,9	1,85	1,87	0,02	
117,5	1,86	1,84	-0,02	
119,8	1,91	1,88	-0,03	
117,7	1,88	1,83	-0,05	
118,0	1,89	1,87	-0,02	
119,7	1,92	1,89	-0,03	
119,2	1,93	1,91	-0,02	
			t_{exp}	0,30
			promedio	-0,01
			sd	0,03
MPA				
Masa (mg)	HPLC	NIR	Δ^a	
117,0	9,36	9,30	-0,06	
117,9	9,43	9,34	-0,09	
117,5	9,44	9,50	-0,06	
119,8	9,66	9,72	0,06	
117,7	9,51	9,51	0,00	
118,0	9,48	9,37	-0,11	
119,7	9,73	9,66	-0,07	
119,2	9,74	9,85	0,11	
^a : (NIR mass – HPLC mass)			t_{exp}	0,41
$t_{crit}:2,36; \alpha=0,05; n=8$			promedio	-0,03
			sd	0,08

Resultados y discusión

Tabla 3 - 6: Determinación de VE en comprimidos blancos individuales. Valor nominal de 2mg/comprimido. Todos los resultados se expresan en mg VE/comprimido.

Masa (mg)	HPLC	NIR	Δ^a
119,3	1,91	1,98	0,07
118,7	1,89	1,91	0,02
118,8	1,91	1,87	-0,04
118,8	1,90	1,96	0,06
119,7	1,91	1,88	-0,03
119,6	1,93	1,89	-0,04
120,1	1,91	1,88	-0,03
120,8	1,91	1,93	0,02
120,9	1,91	1,91	0,00
^a : (masa NIR – masa HPLC) $t_{crit}: 2,31; \alpha=0,05; n=9$		t_{exp}	0,23
		promedio	0,00
		sd	0,04

3.2 DETERMINACIÓN NIR POR REFLECTANCIA DE UN API A BAJA CONCENTRACIÓN COMERCIALIZADO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

3.2.1 INTRODUCCION

La warfarina es un medicamento ampliamente utilizado desde que fue comercializado por primera vez a finales de los años 1950. Es un derivado sintético del dicumarol y actúa como antagonista de la vitamina K, actuando en el hígado reduciendo la concentración en sangre de unas pocas proteínas que favorecen la coagulación de la sangre. Debido al riesgo de hemorragia asociado a este medicamento, la dosificación debe estar estrictamente controlada. Para ello, se comercializan distintas dosificaciones del medicamento que habitualmente contienen marcas de corte para aumentar la flexibilidad de la dosis.

Tal y como se ha mencionado en la introducción, los espectros NIR registrados en modo de reflectancia difusa contienen tanto información física como química de la muestra sólida. Por tanto, el conjunto de muestras de calibración debería, idealmente, incorporar tanto la variabilidad química como la física. El problema de la variabilidad química se puede afrontar con la infra y sobre dosificación de comprimidos comerciales molidos y la variabilidad física en las muestras de producción puede incluirse incluyendo en el modelo

muestras provenientes de diferentes lotes de producción. Además, es posible reducir las diferencias en propiedades de *scattering* aplicando pretratamiento espectrales; siendo la combinación de segunda derivada seguida de una normalización (SNV) la que mejores resultados proporciona, al menos en lo referente a algunos análisis de sólidos farmacéuticos (8).

Dado que el *scattering* en comprimidos sólidos depende también de la presión de compactación, se ha de realizar previamente un análisis del efecto de presión. La idea subyacente es sencilla: a pesar de que los pretratamientos matemáticos reducen la variabilidad del *scattering*, es decir, las diferencias en propiedades físicas, cuanto mayor sea la reducción en la diferencia físicas, mayor precisión se obtendrá en el modelo de calibración, lo que puede ser crítico en la determinación de un API a baja concentración.

Así, el objetivo de esta sección de la tesis es la cuantificación de un preparado de warfarina sódica disponible en cuatro dosificaciones (de 1 a 10 mg por comprimido y del 1 al 5% p/p) a través de un único método NIR en modo reflectancia.

3.2.2 RESULTADOS

3.2.2.1 PRESIÓN DE COMPACTACIÓN

Se tomaron varias muestras comerciales, se molturaron y diferentes porciones se compactaron a diferentes presiones. Se registraron los espectros NIR de estos comprimidos preparados en laboratorio y se calculó un PCA con los mismos. Por otro lado, se registraron

Resultados y discusión

los espectros de cinco muestras por dosificación y se proyectaron en el espacio del PCA calculado anteriormente (figura 3-7).

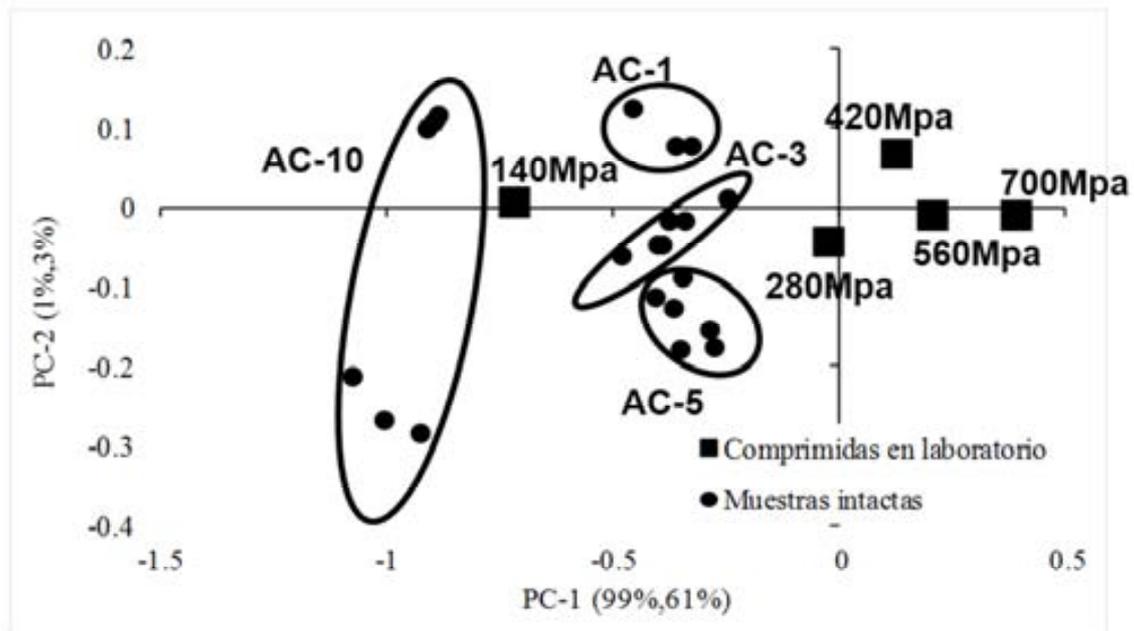


Figura 3 - 7: Proyección de los espectros SNV de las muestras comerciales en el espacio PCA de las muestras molturadas y compactadas a diferentes presiones. El primer número entre paréntesis indica la varianza explicada por el PCA y el segundo la de las muestras proyectadas.

Resulta evidente que las muestras compactadas a diferentes presiones (cuadrados) aparecen sistemáticamente ordenadas a lo largo del PC1. Los espectros proyectados de AC-1, AC-3 y AC-5 aparecen entre las muestras a 140 y 280 MPa, mientras que las AC-10 aparecen más cerca de la muestra compactada a 140 MPa, con un *score* en PC-1 más bajo. Estos hechos pueden ser interpretados asumiendo que las presiones de compactación para AC-1, AC-3 y AC-5 son muy parecidas (hecho comprensible, ya que comparten tamaño y forma), y que las AC-10 se compactan a una presión menor (también comprensible atendiendo a su mayor tamaño). Como solución de compromiso, se escogió una presión de compactación de

210 MPa para la preparación de las muestras de calibración, próxima a la de las muestras AC-1, AC-3 y AC-5.

3.2.2.2 CAMBIOS ESPECTRALES DEBIDOS A LA PRESIÓN

La comparación de comprimidos comerciales y preparados en laboratorio reveló un desplazamiento de banda entre 1480 y 1560 nm ocasionado por la compactación en laboratorio de las muestras (**figura 3-8 i**) tras el pretratamiento escogido (segunda derivada seguida de SNV; se obtienen los mismo resultados tras la aplicación de solo la segunda derivada). Se halló el mismo desplazamiento cuando se compararon los espectros de una muestra comercial intacta y tras su molturado y recompactación en laboratorio. Por tanto, se puede interpretar que la compactación de laboratorio es la responsable de este cambio espectral.

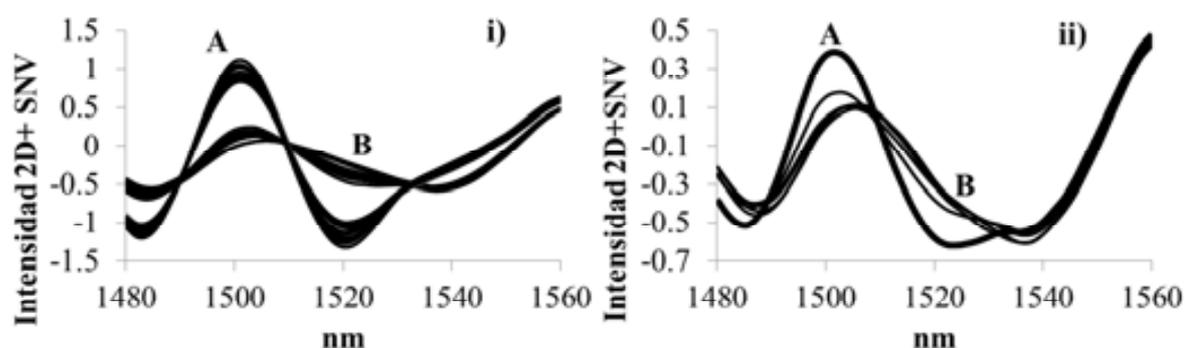


Figura 3 - 8: i) espectro de muestras comerciales intactas (a) y preparadas en laboratorio (b) y ii) espectro de lactosa en polvo (a) y compactada a diferentes presiones (b) tras pretratamiento 2D+SNV.

La comparación del espectro del API y de los excipientes mayoritarios sugirió que el componente del cual cambia el espectro tras la compactación es la lactosa. Para confirmar esta hipótesis, se comparó el espectro de la lactosa en polvo y comprimida a diferentes

Resultados y discusión

presiones (**figura 3-8 ii**). Queda claro que el desplazamiento de la banda de absorción de la lactosa encaja con el de las muestras de laboratorio debido a la compactación. Así, han sido publicados cambios en el espectro NIR de la lactosa debidos a la(s) forma(s) cristalina (9). De todas maneras, ninguno de estos cambios espectrales coincide con el hallado en este trabajo. Los cambios en el espectro NIR de la lactosa debidos a la presión de compactación han sido reportados previamente (10), pero no han sido estudiados en profundidad.

Se ha demostrado que la compresión produce un cambio en la posición de la banda de absorción debido al cambio de la forma cristalina de excipientes (11). Asumiendo que algo similar pudiera ocurrir en este caso, se registró el espectro XRD de lactosa en polvo y compactada, pero no se hallaron diferencias (**figura 3-9**). Por tanto, la razón fundamental de este desplazamiento queda sujeta a la futura investigación. Desde un punto de vista práctico, la conclusión principal para el desarrollo cuantitativo del trabajo, es la exclusión de intervalo espectral 1480-1560 nm con el fin de reducir la variabilidad entre muestras no debida a cambios en la concentración de API.

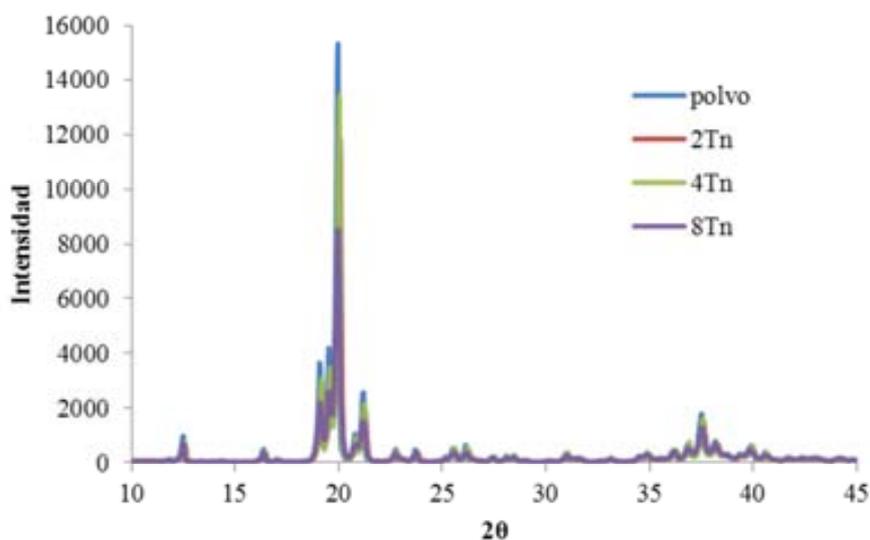


Figura 3 - 9: espectro de difracción de rayos X de lactosa en polvo y compactada a diferentes presiones.

3.2.2.3 DETERMINACIÓN DE API

Al igual que el intervalo espectral 1480-1560 nm, los valores a longitudes de onda mayores de 2400 nm se excluyeron debido al ruido espectral en esta región.

Dado que la presión de compactación (y por tanto las propiedades de *scattering*) de AC-10 son diferentes a las de AC-1, AC-3 y AC-5, se construyeron tres modelos de calibración; uno para las cuatro dosificaciones, otro sólo para AC-1, AC-3 y AC-5 y un último específicamente para AC-10. La composición del conjunto de muestras de calibración y sus figuras de mérito se muestra en la **tabla 3-7**. Siendo los resultados muy similares en términos de SEC y SECV y sin hallarse diferencias significativas entre ellos, se escogió el modelo único para las cuatro dosificaciones y se evaluó su capacidad predictiva con el conjunto de muestras de validación, consistiendo ésta sólo en muestras comerciales, ya que al contener éstas un intervalo de concentraciones muy amplio (del 1 al 5% p/p), no se consideró necesaria la validación con muestras de laboratorio a lo largo de todo el rango lineal, como es habitual en los casos donde se cuantifica una única dosificación.

Resultados y discusión

Tabla 3 -7: Figuras de mérito de los modelos de calibración desarrollados.

Dosificaciones	todas	todas excepto AC-10	solo AC-10
Muestras lab	22	22	17
Muestras comerciales	27	20	7
Variables latentes	4	4	4
Pendiente	0,99±0,02	0,98±0,02	0,98±0,03
Intercepto (mg/g)	0,34±0,50	0,43±0,61	0,51±0,86
SEC (mg/g)	1,57	1,88	1,34
SECV (mg/g)	2,11	2,41	1,82

Antes de aplicar el modelo de calibración al conjunto de muestras de validación, se analizaron sus características en profundidad.

Como se ha mencionado anteriormente, se prepararon dos muestras de laboratorio para cada nivel de concentración; una de ellas con una a un nivel superior al nominal (65% p/p) y otra a un nivel inferior (55% p/p). Con el fin de detectar cualquier efecto sistemático, se calcularon los residuales de los valores predichos por el modelo de calibración y se realizó un test t de los mismos, sin hallarse diferencia significativa entre ambos grupos.

Como criterio auxiliar para asegurar la selectividad del modelo, la Farmacopea Europea recomienda que *“para calibraciones PLS o PCR los (...) loadings pueden ser representados y las regiones con una alta correlación ser comparadas con el espectro del analito”*.

Siguiendo esta idea, la **figura 3-10** compara el *loading* de la primera variable latente del modelo PLS, que explica el 84,4 % de la varianza Y, con el espectro del API en segunda derivada. De esta manera resulta evidente la correlación entre vectores, con un coeficiente de correlación de 0,68.

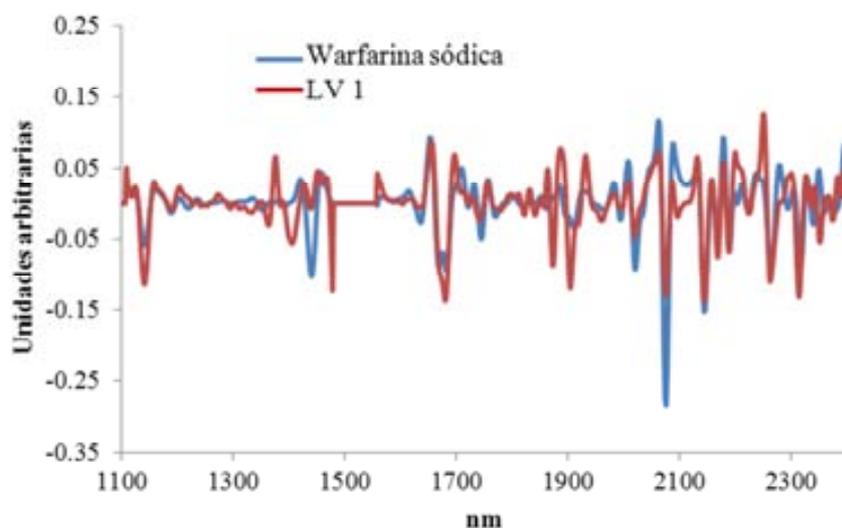


Figura 3 - 10: Vector de loading del primer componente PLS del modelo seleccionado y el espectro de warfarina sódica en segunda derivada (normalizados).

Se incluyeron once muestras por dosificación en el conjunto de predicción, provenientes de al menos dos lotes por dosificación. La distribución (media y desviación estándar) de la masa de los comprimidos y los valores de HPLC y NIR se muestran en la **tabla 3-8**. Es evidente la excelente coincidencia entre los valores predichos NIR y los de referencia HPLC. Además, la pendiente ($0,99\pm 0,02$) y el intercepto ($0,34\pm 0,50$) de la recta NIR frente HPLC contienen los valores objetivo de 1 y 0 respectivamente, con un SEP de 1,41mg API/g comprimido. Se realizó un test F ($\alpha=0,05$) y se concluyó que no existían diferencias significativas entre los valores de SEC y SEP. La representación gráfica de estos datos se muestra en la **figura 3-11**. Los test t pareados (entre los valores predichos NIR y los HPLC de referencia para el contenido en API de los comprimidos individuales de cada dosificación) muestran que no existen diferencias significativas.

Resultados y discusión

Tabla 3 - 8: Comparación de los valores hallados de contenido en API en comprimidos individuales con los valores HPLC de referencia (promedio± desviación estándar).

	Lotes	n	masa ^a	NIR ^a	HPLC ^a	t _{exp} ^b
AC-1	3	11	102±2	1,01±0,05	1,03±0,05	0,76
AC-3	3	11	101±1	2,85±0,19	2,83±0,18	0,25
AC-5	4	11	104±5	4,86±0,23	4,91±0,29	0,81
AC-10	2	11	249±5	9,44±0,18	9,44±0,19	0,02

a: todos los resultados se expresan en mg

b: t_{crit}:2,23; α=0,05; n=11

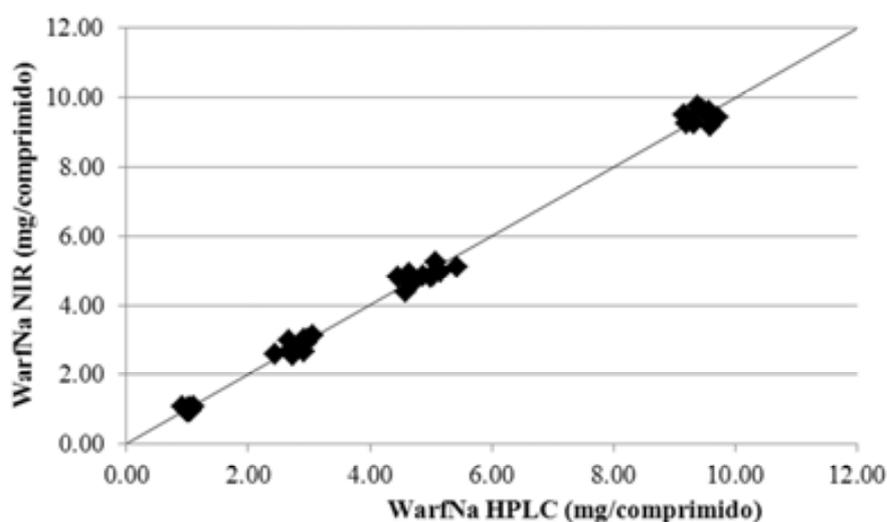


Figura 3 - 11: Valores de predicción del contenido en API de las muestras comerciales frente a los valores HPLC de referencia. Se incluye la recta objetivo (pendiente 1- intercepto 0).

La repetitividad y la precisión intermedia se evaluaron de acuerdo a los criterios de la guía de la EMA; la repetitividad se basó en el RSD% de seis medidas consecutivas y la precisión intermedia en la RSD% de las medidas en tres días diferentes (12). Los resultados se muestran en la **tabla 3-9**. La RSD% bajo condiciones de repetitividad está en el orden del 1% mientras que la reproducibilidad entre días está en el orden del 2%.

Resultados y discusión

Tabla 3 - 9: Repetitividad (n=6 medidas) y precisión intermedia (m=3 días) expresadas como desviación estándar relativa (%RSD).

	Repetitividad	Precisión intermedia
AC-1	0,87	1,89
AC-3	0,99	1,94
AC-5	1,03	0,89
AC-10	1,31	2,40

3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO HERRAMIENTA AUXILIAR PARA LA EVALUACIÓN DE UNIFORMIDAD DE CONTENIDO EN COMPRIMIDOS DIVISIBLES DE WARFARINA

3.3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la sección anterior, una de las maneras de flexibilizar la dosis de un medicamento es la inclusión de marcas de subdivisión en los comprimidos. De esta manera, porciones de comprimido se convierten en dosis por lo que es importante el desarrollo de métodos de cuantificación para estas porciones. Debido a la variabilidad y reducido tamaño de dichas porciones, no es viable su cuantificación no destructiva mediante espectroscopia NIR. Así, la espectroscopia Raman resulta ideal para este fin ya que el área de iluminación de la muestra es ajustable y habitualmente de pequeño tamaño.

Como se ha discutido en la introducción, los actuales organismos reguladores prevalecen la uniformidad en peso frente sobre la uniformidad de contenido entre porciones. Así, el ensayo exigido por la Farmacopea europea (13) establece criterios de conformidad para las

masas de los fragmentos y acerca de la manera de dividirlos: a mano, tal como lo haría el paciente. Literalmente: *“Tomar 30 comprimidos al azar, dividirlos en mitades y, (...), tomar 1 parte para el ensayo y desechar la otra... Los comprimidos cumplen el ensayo si no más de 1 masa individual está fuera de los límites del 85 y 115 % de la masa promedio. Si los comprimidos no cumplen el ensayo si más de 1 masa individual cae fuera de estos límites o si 1 masa individual cae fuera de los límites del 75 y 125% de la masa promedio.”*

Este ensayo se complementa con la Guía para la Industria publicada por la FDA (14) que se refiere a la pérdida de masa en la fragmentación considerándose no sólo la fragmentación en mitades. Sólo se requieren 15 comprimidos en el ensayo y la clave es una diferencia en masa no superior al 3,0% entre la suma de las masas de las fracciones y la del comprimido original.

El objetivo de esta sección es la cuantificación mediante espectroscopia Raman de warfarina sódica en comprimidos enteros y en las porciones que delimitan sus marcas de subdivisión y el uso adaptado de las directrices de la farmacopea para el estudio de la homogeneidad de contenido en API de las porciones.

3.3.2 RESULTADOS

Teniendo en cuenta los dos criterios citados anteriormente, se tomaron 30 comprimidos de AC-1 (1 mg por comprimido, 1% p/p de API) y AC-10 (10 mg por comprimido, 4% p/p de API) y se pesaron, se dividieron a mano y las fracciones (mitades para AC-1 y cuartos para AC-10) fueron pesados individualmente. Los resultados se muestran en la **tabla 3-10**. Como se puede observar, ambas formulaciones cumplen los criterios de uniformidad de

Resultados y discusión

masa de las dos agencias. Este es un progreso significativo respecto a trabajos anteriores (15), donde los requerimientos no fueron cumplidos en el ensayo con preparaciones del mismo API.

Tabla 3-10: Datos de uniformidad de masa

	n	Masa comprimido entero		Masa 1 ^a fracción		Muestras fuera del 85-115% del promedio	Muestras fuera del 75-125% del promedio	Pérdida masa >3.0% ^b
		promedio	sd	promedio	sd			
AC-1 (mitades)	30	101,4	1,1	51,0	3,7	1	0	0
AC-10 (cuartos)	30	249,7	2,2	63,7	3,3	0	0	0

^aTodos los resultados expresados en mg.

^bLa suma de la masa de las fracciones es al menos un 3,0 % por debajo de la masa del comprimido completo.

3.3.2.1. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ESPECTRAL

En la **figura 3-12a** se muestra el espectro promedio a partir de 10 espectros individuales para cada una de las cuatro dosificaciones. Como se puede observar, el espectro de AC-3 muestra un desplazamiento de la línea base. Dado que la única diferencia en composición entre AC-1, AC-3 (3 mg por comprimido, 3% p/p de API) y AC-5 (5 mg por comprimido, 5% p/p de API) son los colorantes utilizados para diferenciar estas tres dosificaciones, por lo que se atribuyó el desplazamiento de línea base al colorante presente en AC-3; E-131.

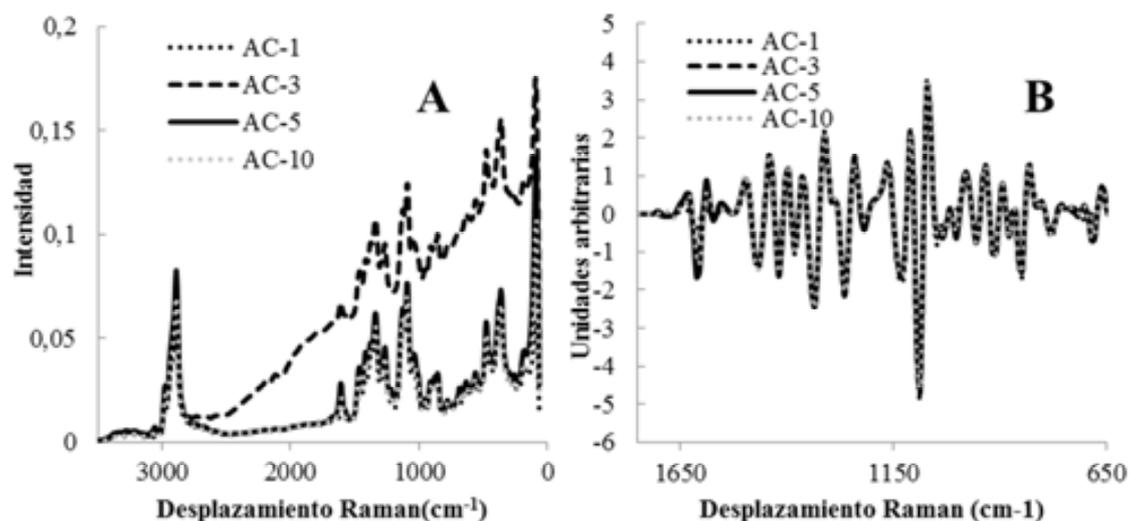


Figura 3 - 12: espectro de las cuatro dosificaciones a) en crudo y b) tras el pretratamiento 2D+SNV en el rango espectral escogido (1703-654 cm⁻¹).

Con el fin de favorecer la determinación conjunta de las cuatro dosificaciones y para eliminar las diferencias espectrales debidas al contenido en API, se calculó la segunda derivada de todos los espectros, seguida de la Variable Normal Estándar (SNV) (4). En la **figura 3-12b** se representan los espectros ya pretratados en el rango espectral de trabajo, mostrando que los desplazamientos de línea base han sido perfectamente corregidos.

3.3.2.2. PRESIÓN DE COMPACTACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

Primeramente, se evaluó el efecto de la presión de compactación ejercida sobre las muestras de calibración en la intensidad de los picos Raman. Con tal fin, se molturaron varias muestras de AC-1, se homogeneizó el polvo resultante y diferentes alícuotas fueron compactadas a presiones crecientes (cinco niveles, de 140 a 700 MPa). Se adquirieron 16 espectros por muestra (en forma de cuadrícula), se pretrataron como se ha mencionado anteriormente y promediaron para obtener un espectro representativo por muestra. La

Resultados y discusión

representación conjunta de los espectros no mostró ninguna diferencia entre ellos tras el pretratamiento 2D+SNV (**figura 3-13** y **figura 3-14**). Por otra parte se representó la intensidad Raman a diferentes números de onda frente a la presión de compactación (R^2 entre 0,03 y 0,2). Además se calculó un PCA y no se halló ningún agrupamiento o tendencia atribuible a la presión de compactación. Esta es una gran diferencia respecto a la espectroscopia NIR, donde los espectros se ordenan claramente en función de la presión de compactación (5). Este hecho se puede deber a la baja penetración del láser en espectroscopia Raman en comparación a la fuente de radiación en NIR. De todas maneras cabe resaltar que los espectros de los comprimidos comerciales intactos fueron ligeramente distintos a los molturados y compactados, lo cual puede ser atribuido a pequeños pero significativos cambios en la distribución de tamaños de partícula debido al proceso de molturado o a una diferencia en la textura de la superficie.

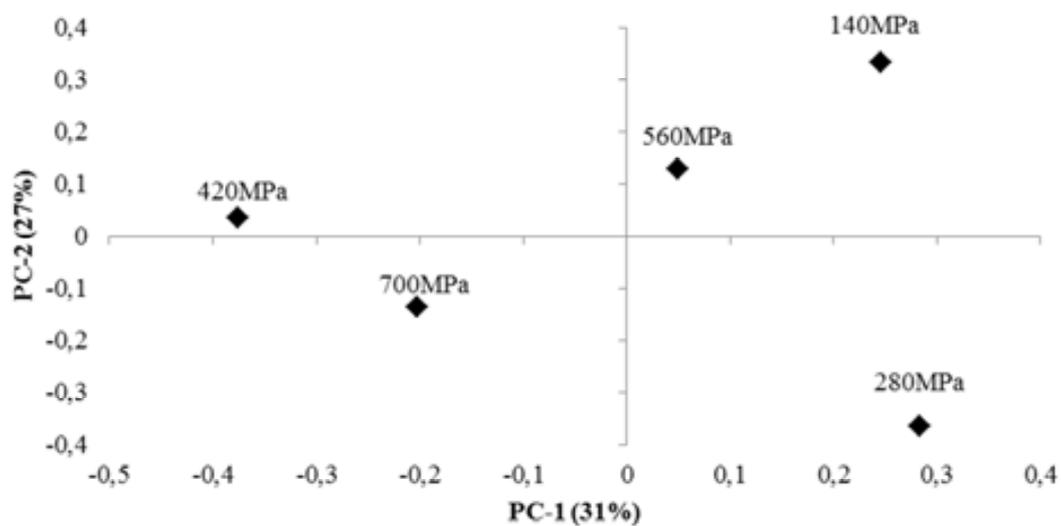


Figura 3 - 13: PCA de los espectros pretratados (2D+SNV) de cinco muestras de laboratorio compactadas a presiones de 140 a 700 MPa.

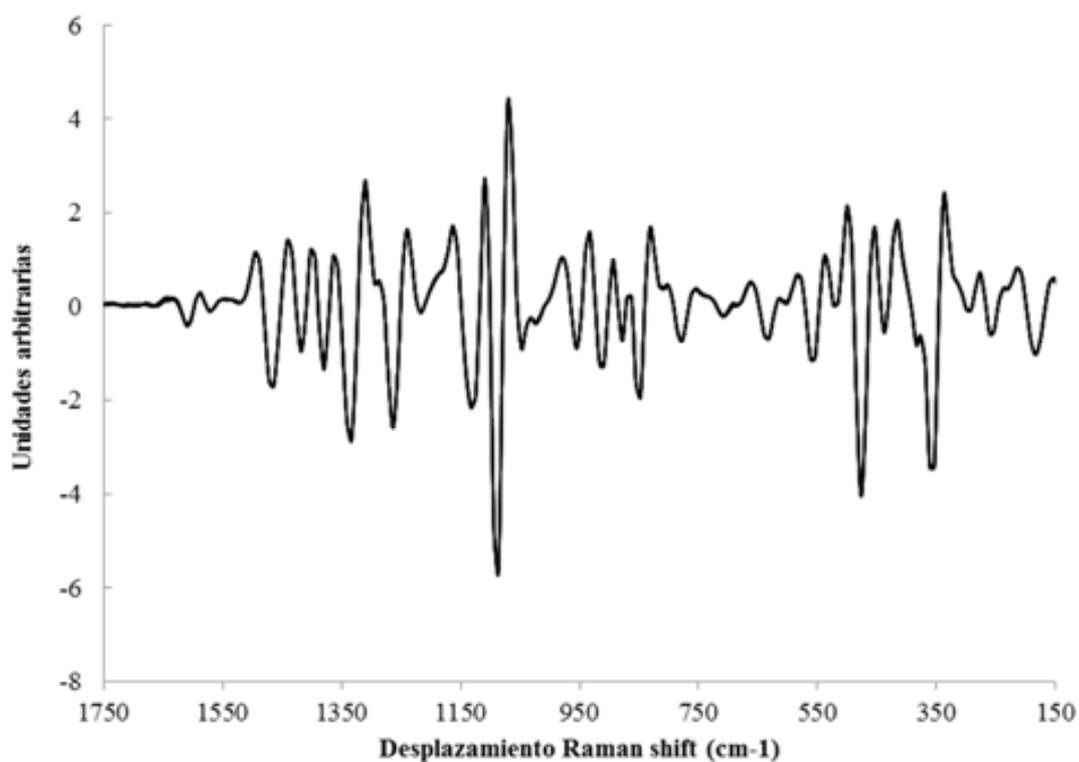


Figura 3 - 14: Espectro tras segunda derivada y SNV de cinco muestras de laboratorio sometidas a presiones de compactación de 140 a 700 MPa.

Resultados y discusión

3.3.2.3. ANÁLISIS RAMAN

El objetivo de esta parte del trabajo fue demostrar que la espectroscopia Raman se puede utilizar como técnica analítica complementaria para asegurar que las diferentes porciones de los comprimidos no difieren significativamente del contenido de API nominal y que puede ser suficiente rápido para aplicarse en el análisis de rutina.

De hecho, mediante los ensayos de uniformidad de masa se ha demostrado que las masas de los fragmentos no difieren significativamente de los valores esperados. Si se asume que el API está uniformemente distribuido, el ensayo de uniformidad de masa sería suficiente, pero la uniformidad de distribución se ha demostrar, no sólo asumir. Esta asunción resultaría aceptable si la homogeneidad de la mezcla fuera previamente aceptada, pero ésta no es una cuestión sencilla cuando la proporción en masa del API es baja. Por otro lado, no se puede despreciar el riesgo de segregación o aglomeración en la fase de compactado.

La metodología seguida para el desarrollo del procedimiento Raman fue:

- Se visualizaron los espectros y se suprimieron los pocos que mostraban desviación evidente (50 de un total de 1500). Se aplicaron los pretratamientos correspondientes para reducir los desplazamientos de línea base, se normalizaron y promediaron, obteniéndose un espectro por comprimido (comercial o preparado en laboratorio).
- Se ensayaron distintos procedimientos de calibración (univariante, PLS, distintos rangos espectrales...) usando el espectro medio de cada comprimido y los valores HPLC de referencia.
- Una vez logrado un buen modelo, se aplicó a los espectros de los potenciales fragmentos (mitades de AC-1, AC-3 y AC-5 y cuartos para AC-10).

3.3.2.4. CALIBRACIÓN UNIVARIANTE

En la **figura 3-15** se muestran los espectros del API, los excipientes mayoritarios y una muestra comercial. Como se puede observar, el único contribuyente a la banda de 1606cm^{-1} es el API. Esto era previsible ya que los excipientes no contienen anillos aromáticos. A pesar de que la intensidad del pico sea relativamente baja en el comprimido comercial (la concentración de API es también baja) se evaluó la viabilidad de la calibración univariante.

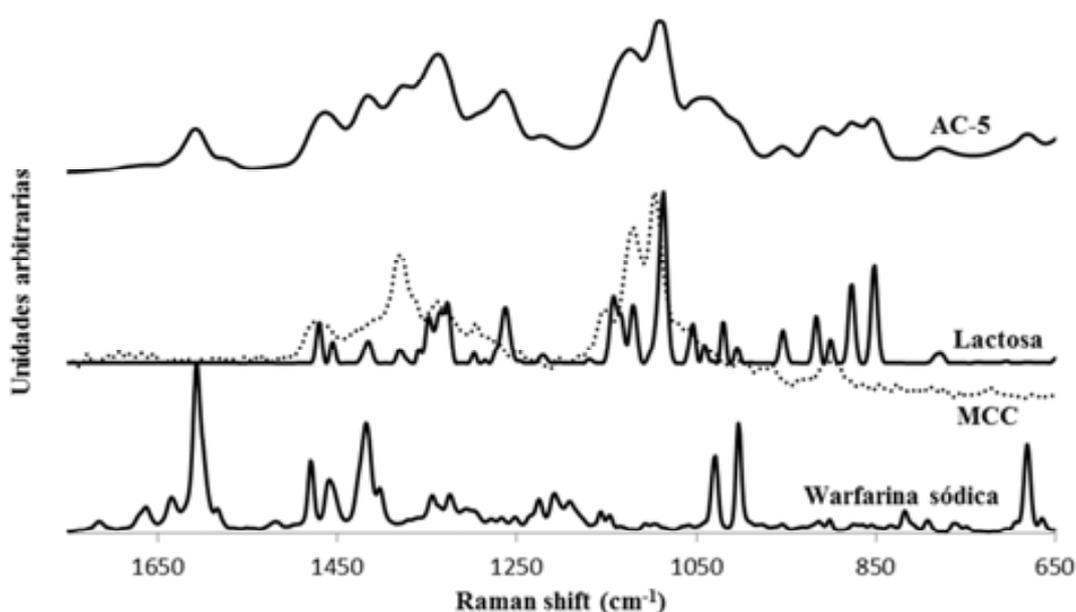


Figura 3 - 15: Espectro del API, los dos excipientes mayoritarios y el de una muestra de AC-5.

La representación de la intensidad a 1603 cm^{-1} frente a la proporción en masa del API (mg warfarina sódica/ g muestra) muestra (**figura 3-16**) que existe una relación cuasi lineal entre intensidad y concentración. De todas maneras se observa un cambio en la pendiente entre concentraciones de 25 y 30 mg/g, impidiendo el uso de la calibración univariante para las cuatro dosificaciones. Por lo tanto, se ensayó una calibración multivariante basada en PLS.

Resultados y discusión

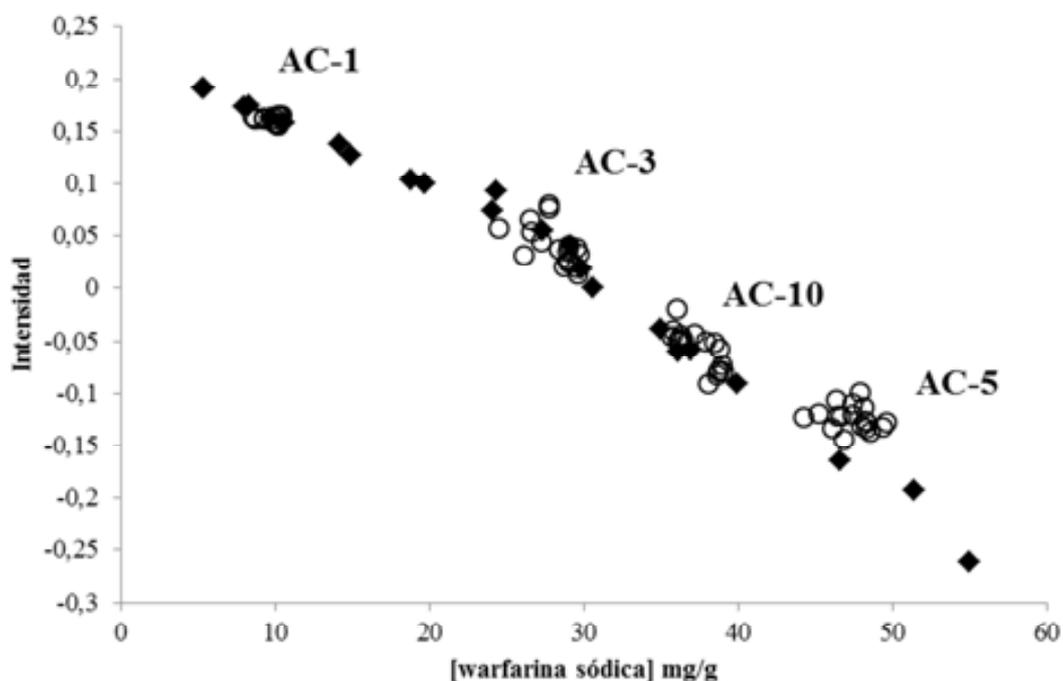


Figura 3 - 16: Representación de la intensidad del pico a 1606 cm-1.

3.3.2.5. CALIBRACIÓN PLS

Uno de los inconvenientes principales de la espectroscopia Raman cuando se aplica con fines cuantitativos es su baja reproducibilidad entre días, debido principalmente a la reproducibilidad de la fuente de radiación láser (16). A pesar de que estos problemas han sido reducidos en los instrumentos modernos, todavía existen. La **figura 3-17** muestra el PCA de las muestras comerciales usadas en este estudio. El PC1 (69% de la varianza) agrupa las muestras en dos conjuntos cuyos espectros han sido registrados con cuatro meses de diferencia. Este podría ser un efecto de lote o, con mayor probabilidad, se deba al largo tiempo transcurrido. El PC2 (23% de varianza), ordena las muestras en función de la concentración de API.

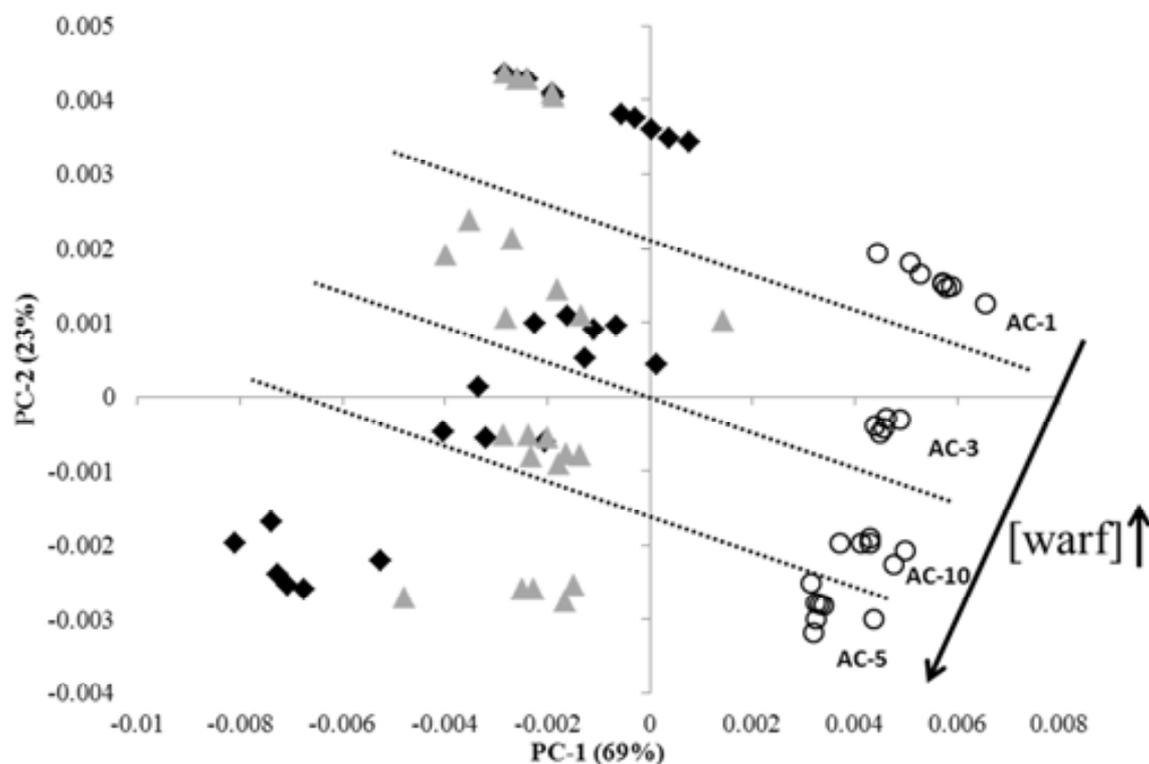


Figura 3 - 17: PCA de los espectros de las muestras comerciales tras el pretratamiento (2D+SNV) y región espectral (1700-654 cm^{-1}) escogidos. Las muestras de calibración se representan con “♦” y las muestras de predicción con “▲” (analizados dos meses después del con junto de calibración) y “○” (analizadas cuatro meses después del conjunto de calibración). La concentración nominal de los muestras es 10, 30, 40 y 50 mg/g para AC-1, AC-3, AC-10 y AC-5 respectivamente.

El modelo PLS fue inicialmente desarrollado utilizando solo muestras de calibración preparadas en laboratorio. A pesar de que se obtuviera un relativamente buen modelo de calibración (RMSEC=2,07 mg/g , pendiente de la recta HPLC vs. Raman= 0,99), la predicción de muestras comerciales mostró una pequeña pero significativa desviación (pendiente HPLC vs. Raman en predicción= 0,92; bias= -0,55 mg/g ; SEP= 2,17 mg/g). Este hecho no es sorprendente, es una situación habitual en espectroscopia NIR, donde las diferencias en propiedades de *scattering* entre muestras comerciales y de laboratorio fuerzan la utilización de un conjunto de muestras de calibración mixto compuesto de

Resultados y discusión

muestras comerciales y preparadas en laboratorio. Las primeras introducen variabilidad física y las segundas ensanchan el rango de concentración de API (2).

Así, se construyó el conjunto de muestras de calibración con muestras preparadas en laboratorio y comerciales (provenientes de dos lotes de producción por dosificación). Todos estos espectros se registran en unos pocos días. El conjunto de muestras de predicción estaba compuesto por muestras comerciales (provenientes de otros dos lotes de producción por dosificación) cuyos espectros fueron registrados dos y cuatro meses después de las muestras de calibración. Las figuras de mérito del modelo definitivo se detallan en la **tabla 3-11**. Como se puede observar, los intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta de regresión predicho vs. referencia contienen los valores de 1 y 0 respectivamente. Además, se practicó un test t pareado entre los valores de contenido de API por HPLC y Raman para cada dosificación y no se hallaron diferencias significativas, demostrando así la exactitud del método propuesto.

Tabla 3 - 11: Figuras de mérito del modelo PLS desarrollado.

	Muestras calibración	Muestras predicción
Muestras laboratorio	25	--
Muestras comerciales	22	42
LV		2
Varianza explicada (%)		99,09
Pendiente	0,99±0,01	0,99±0,02
Intercepto (mg/g)	0,3±0,5	0,4±0,7
SEC/P (mg/g)	1,58	1,80
SECV (mg/g)	1,72	--

Como criterio auxiliar para garantizar que el procedimiento de calibración multivariante realmente determina el API y no otro compuesto correlacionada espectralmente, la

Resultados y discusión

Farmacopea Europea afirme que “para calibraciones PLS o PCR, (...) los loadings pueden ser representados y las regiones con gran coeficiente comparadas con el espectro del analito” (17). Este gráfico se muestra en la **figura 3-18**. La gran similitud entre ambos espectros es evidente, con $r^2=0,93$.

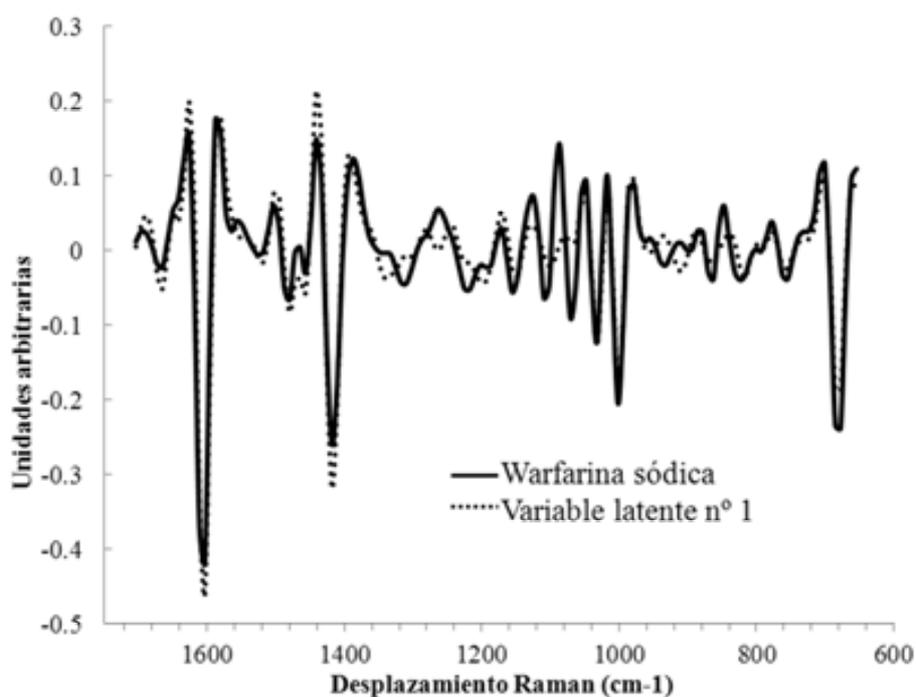


Figura 3 - 18: Representación solapada del espectro de la warfarina sódica y la primera variable latente del modelo PLS desarrollado.

Los datos muestran que el modelo está determinando el API y que es capaz de salvar las diferencias físicas entre muestras comerciales y preparadas en laboratorio además de no verse afectado por los lapsos de tiempo entre registros espectrales con precisión exactitud razonables. Las muestras de laboratorio se habían preparado a dos niveles de concentración de lactosa, un 5% por encima y por debajo del valor nominal. Se practicó un test t y no se hallaron diferencias significativas entre las muestras de concentración superior e inferior de

Resultados y discusión

lactosa. Este hecho sugiere que una cierta variabilidad en la concentración del excipiente mayoritario no afecta a la exactitud de la determinación de API.

Se evaluaron la repetitividad y la precisión intermedia. La repetitividad se basó en la % RSD de seis medidas consecutivas y la precisión intermedia en la % RSD de medidas en tres días distintos (12) (una muestra por dosificación). Se muestran los resultados en la **tabla 3-12**. Ambos parámetros se hallan en el rango del 1 al 4 %.

Tabla 3 - 12: repetitividad (n=6 medidas) y precisión intermedia (m= 3 días) de la predicción de contenido en API en % RSD.

	Repetitividad	Precisión intermedia
AC-1	3,94	2,28
AC-3	1,60	2,03
AC-5	2,40	3,70
AC-10	1,74	0,73

3.3.2.6. DETERMINACIÓN DE WARFARINA EN FRACCIONES INDIVIDUALES

Una vez se hubo desarrollado un modelo robusto se aplicó a los espectros promedio de las potenciales fracciones individuales; mitades para AC-1, AC-3 y AC-5 (ya que la marca de división sólo permite este fraccionamiento) y cuartos para AC-10. Para estimar el contenido en API, se consideró que las potenciales fracciones de cada comprimido iguales.

Las **figuras 3-19** y **3-20** muestran los histogramas obtenidos para las muestras del conjunto de predicción, cuyos espectros se registraron dos y cuatro meses después de las de calibración. En ningún caso la desviación estándar entre mitades y cuartos fue superior al 5%, y todas las muestras se hallaron en un $\pm 15\%$ respecto al valor promedio. En este

sentido, se puede afirmar que todas las muestras estudiadas hubieran cumplido el ensayo de uniformidad de contenido, en caso de poder aplicarse a las porciones de un comprimido.

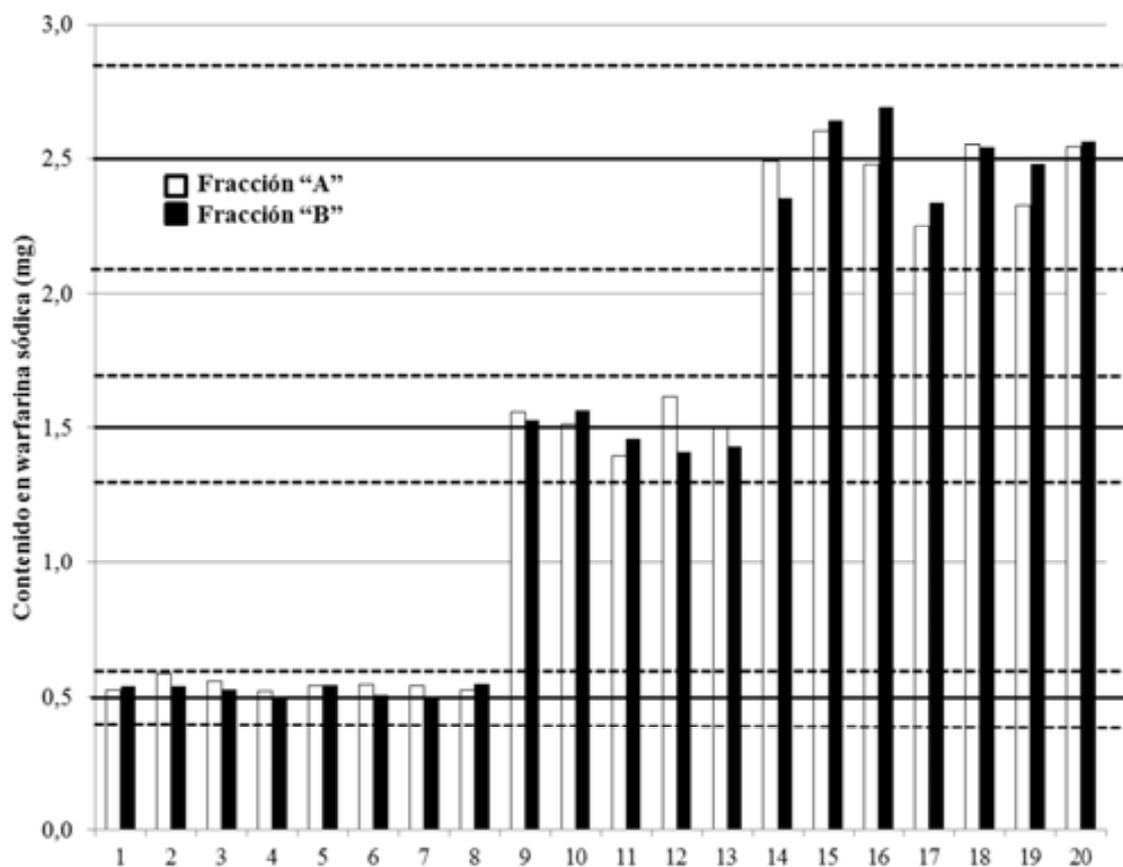


Figura 3 - 19: contenido en API predicho para muestras de AC-1 (1-8), AC-3 (9-13) y AC-5 (14-20) en las mitades del conjunto de muestras de predicción. La las líneas continuas indican el contenido medio de cada dosificación y las discontinuas los límites $\pm 15\%$.

Resultados y discusión

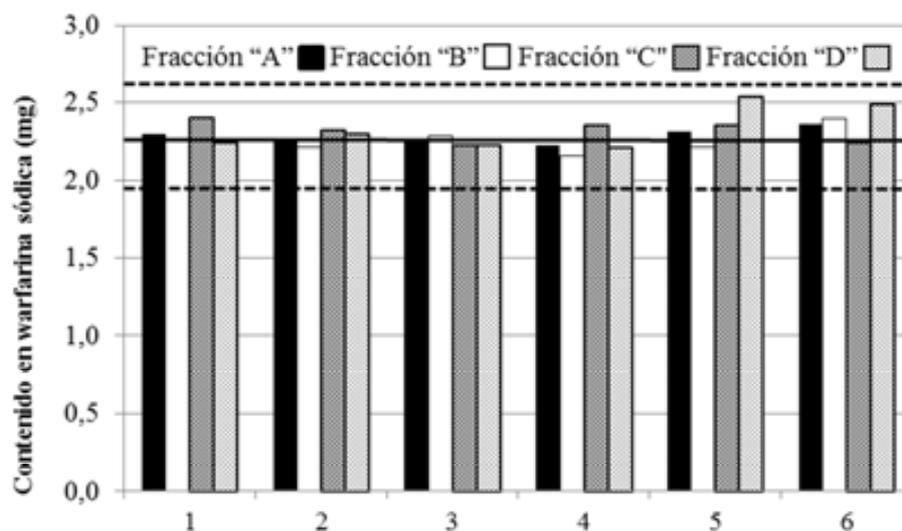


Figura 3 - 20: contenido en API predicho para muestras AC-10 en los cuartos del conjunto de muestras de predicción. Las líneas continuas indican el contenido medio de cada dosificación y las discontinuas los límites $\pm 15\%$.

3.3.2.7. EFECTO DE LA REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE ESPECTROS

Los resultados mostrados en la sección anterior demuestran que el procedimiento propuesto en este estudio puede ser útil para confirmar la uniformidad de distribución de API en comprimidos o al menos para garantizar que el contenido en API para las potenciales fracciones corresponde al contenido esperado. Este es claramente un procedimiento más rápido que el procedimiento HPLC estándar. De todas maneras, las aplicaciones para análisis en rutina o dentro del marco de control PAT para procesos de producción requieren métodos lo más rápidos posible. La clave para garantizar una correcta cuantificación es el área de muestreo. Es evidente que una mayor área de la iluminación láser dar lugar a la adquisición de información espectral más representativa. Esta queda limitada por la instrumentación y también por el número de espectros registrados; en este caso 8 espectros por potencial fracción. La evolución de la precisión con el número de espectros

Resultados y discusión

promediados (**figura 3-21**) muestra que, en este caso, el registro de 4 espectros por porción hubiera sido suficiente, reduciendo a la mitad el tiempo requerido para el análisis. La anómala alta precisión encontrada para AC-1 puede ser atribuido a que todas las muestras provenían de un único lote.

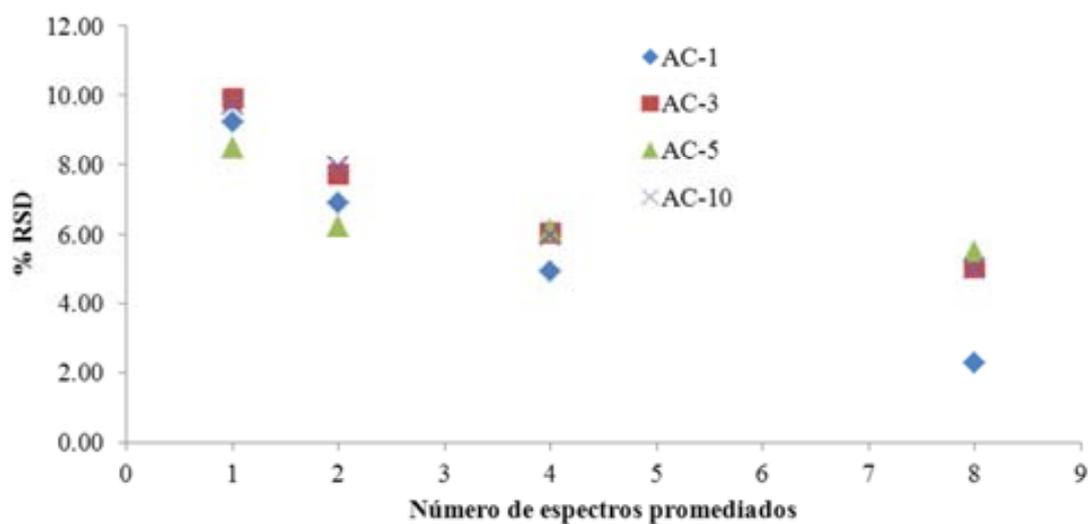


Figura 3 - 21: Desviación estándar relativa en el contenido en API predicho respecto al número de espectros promediados.

3.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO HERRAMIENTA COMPLEMENTARIA EN LA EVALUACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE CONTENIDO DE API EN COMPRIMIDOS DIVISIBLES

3.4.1 INTRODUCCIÓN

En la sección anterior se estudió la cuantificación mediante Raman de API en las porciones de una formulación de comprimidos divisibles. En la presente sección se estudió la homogeneidad de contenido en API de forma más global en una de estas formulaciones (AC-10, diez mg de API por comprimido, divisible en cuartos, 4% p/p de API). Para ello, se utilizaron dos sondas Raman que abarcan un amplio rango de tamaño de *spot* (de 100µm a 1mm de diámetro), siendo el objetivo del trabajo estudiar la homogeneidad a nivel *macro* y a nivel *micro* tanto de manera cuantitativa (utilizando valores de referencia obtenido mediante HPLC) como de manera cualitativa (basado en área de pico característico) y evaluando la homogeneidad en la superficie del comprimido y en el interior del mismo.

3.4.2 RESULTADOS

A pesar de que la longitud de onda de la fuente láser ha sido de 785nm (extremo rojo del espectro visible), los espectros de los comprimidos comerciales han mostrado una gran emisión de fluorescencia y un efecto *bleaching* pronunciado. La **figura 3-22a** muestra nueve espectros registrados consecutivamente en el mismo punto de un comprimido usando la sonda Microprobe y la **figura 3-22b** compara el segundo y séptimo espectro tras pretratarlos con segunda derivada. Estas figuras muestran que, espectro tras espectro, la señal total se atenúa y la intensidad de los picos aumenta hasta, al menos, el séptimo espectro. A pesar de que la normalización (**figura 3-22c**) disminuye las diferencias entre estos dos espectros y que la diferencia se vuelve prácticamente despreciable en el pico más característico del API (1606 cm^{-1} , se muestra en la **figura 3-23**), observando el espectro en general, las diferencias son aún significativas. La variación espectral debido a *bleaching* con la sonda PhAT no es tan acusada como para la Microprobe, pero también se observan variaciones de intensidad significativas. El uso de espectros tras eliminar totalmente la fluorescencia mediante *bleaching* ha sido propuesto en la bibliografía (18), pero desde un punto de vista práctico este procedimiento es inviable para su aplicación en análisis de rutina. Por tanto, para consiguiente tratamientos, solo se ha considerado el uso del primer espectro.

Resultados y discusión

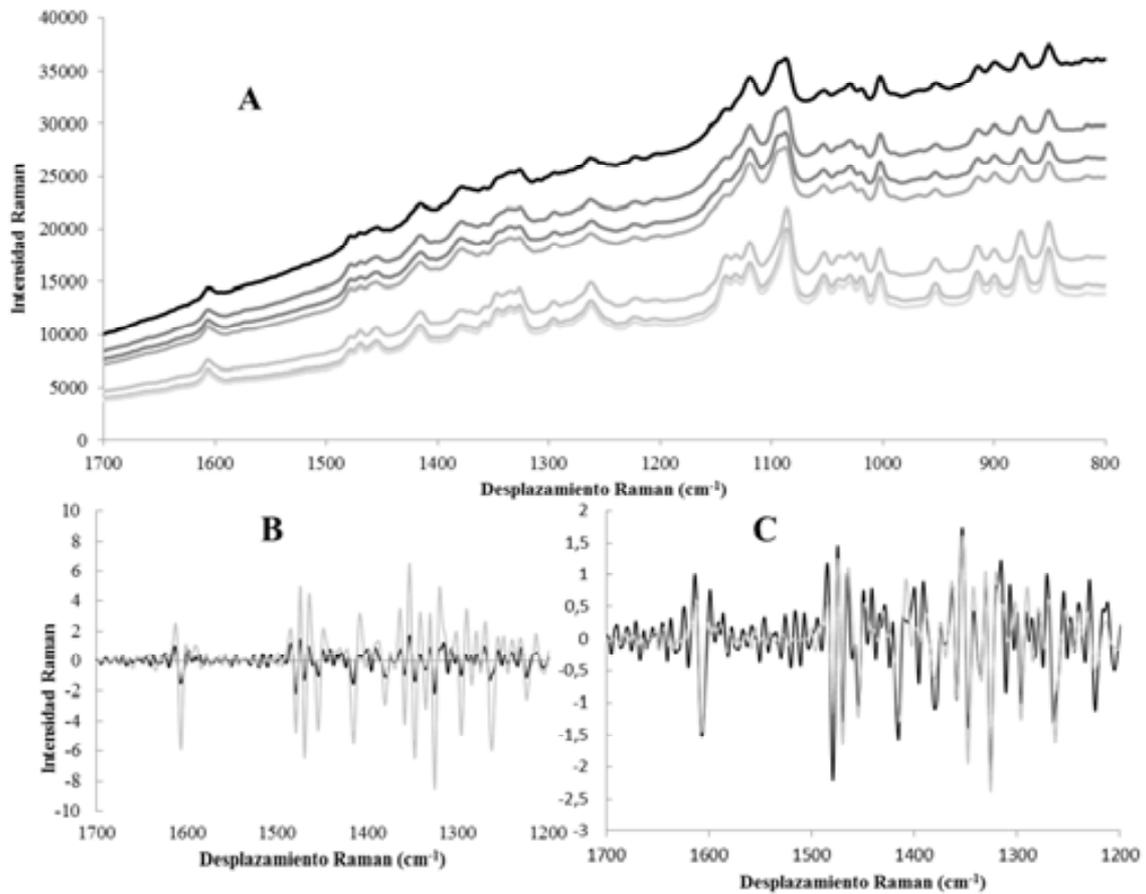


Figura 3 - 22: A) Siete espectros adquiridos consecutivamente en el mismo punto de un comprimido (de negro a gris), B) Primer y séptimo espectro tras segunda derivada y C) tras segunda derivada y normalización.

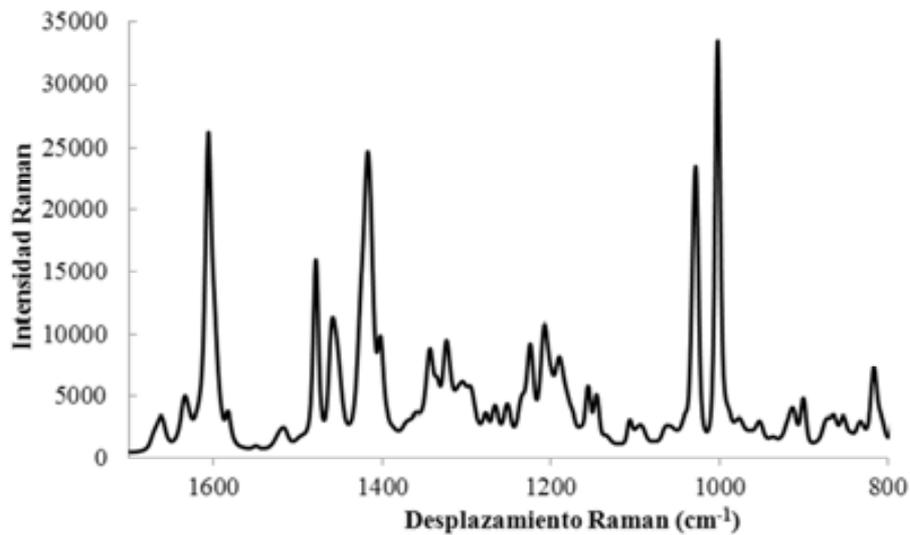


Figura 3 - 23: espectro de warfarina sódica pura registrada con la sonda Microprobe.

3.4.2.1 ANÁLISIS DE SUPERFICIE CON SONDA PhAT

El objetivo primario de este trabajo ha sido la evaluación de la espectroscopia Raman como herramienta auxiliar para estimar la distribución de API en las potenciales porciones de un comprimido divisible. En el caso de la formulación estudiada en el presente trabajo, AC-10, la marca en forma de cruz sugiere la fragmentación en cuartos. Recientemente se ha publicado un trabajo (19) en el que aborda este problema desde un punto de vista estrictamente cuantitativo y usando una fuente de radiación láser de 1064 nm. El desarrollo de modelos cuantitativos tiene la ventaja de obtener datos fáciles de interpretar y comparar pero también conlleva ciertas limitaciones:

- Requiere la preparación de comprimidos de calibración.
- Requiere el desarrollo y validación de un método multivariante-
- Al aplicarlo al control de calidad en rutina, es necesario comprobar que el espectro de la muestra pertenece a la misma población que las muestras utilizadas en el desarrollo del modelo.

A pesar de que todas estas limitaciones pueden superarse y que un procedimiento Raman cuantitativo podría funcionar perfectamente como herramienta analítica de control en un proceso de fabricación, ésta debería ser lo más sencilla posible, idealmente no requerir información previa (es decir, modelo de calibración) y proveer resultados sólidos en el análisis de todos los comprimidos. Si el espectro Raman del API contiene un pico no interferido por otros componentes del comprimido, resulta evidente que la medida de la intensidad de pico (o su área) podría usarse como señal analítica cualitativa para evaluar la uniformidad de distribución del API en el comprimido.

Resultados y discusión

MODELO CUANTITATIVO

Siguiendo una secuencia jerárquica lógica, la uniformidad en contenido debería ser primero comprobada en comprimidos para después, en un segundo paso, comprobar la uniformidad en las potenciales fracciones en las que el comprimido puede ser dividido.

Para ello, se desarrolló un modelo cuantitativo PLS mixto (usando en la etapa de calibración muestras preparadas en laboratorio por sobre e infradosificación y 10 comprimidos comerciales pertenecientes a un mismo lote. Para la validación, se utilizaron 20 comprimidos provenientes de 2 lotes (10 comprimidos por lote) diferentes al utilizado en la etapa de calibración. Las características del modelo han sido: rango espectral 1200-950 cm^{-1} , pretratamiento de normalización vector unidad, 2 variables latentes, 25 muestras de calibración, 20 muestras de validación. Las figuras de mérito obtenidas han sido: pendiente e intercepto Raman vs. HPLC $0,97 \pm 0,03$ y $0,11 \pm 0,16\%$ p/p respectivamente, SECV=0,27 % p/p y SEP=0,18 % p/p.

La Farmacopea Europea define la un uniformidad de contenido en unidad de dosis como “el grado de uniformidad en el contenido de la sustancia activo entre unidades de dosis”. Este concepto es aplicable tanto a comprimidos enteros como a sus fracciones (en caso de que la dosis terapéutica coincida con la de una de estas fracciones).

Para comprobar la uniformidad de comprimidos enteros, se toman diez, se determina su contenido en API mediante un método analítico validado, expresado en mg por comprimido y se calcula el Valor de Aceptación (AV), definido como:

$$AV = |M - \bar{X}| + k * s$$

Donde X es el contenido en API expresado como porcentaje respecto a su valor nominal $M=101,5$ si $\bar{X} > 101,5$; $M=\bar{X}$ if $98,5 > \bar{X} > 101,5$; $M=98,5$ si $\bar{X} < 98,5$, k es 2,0 si $n=10$ o 2,4 si $n=30$ y s es la desviación estándar del contenido en API expresado como porcentaje respecto al valor nominal.

Un lote de producción se considera uniforme si $AV \leq 15,0$. En la **tabla 3-13** se muestra la variabilidad de masa, y el valor promedio y desviación estándar de los valores encontrados por HPLC y Raman junto al valor de AV asociado a cada caso.

Tabla 3 - 13: Contenido medio de API, desviación estándar y Valor de Aceptación (AV) para diez comprimidos de los dos lotes del conjunto de predicción.

Lote	Masa (mg)	HPLC	AV	PLS (Raman)	AV	t_{exp}
A	256±6	9,52±0,26	9.5	9,34±0,45	17,9	1,03
B	256±6	9,75±0,24	6.8	9,99±0,49	11,7	1,42

Todos los resultados expresados en mg/comprimido; 10 muestras por lote; (test t pareado, $t_{crit}=2,26$, $\alpha=0,05$)

El contenido de cada comprimido (Raman) ha sido estimado como la media de ocho valores por comprimido. El test t pareado muestra que no hay diferencias significativas entre los procedimientos Raman y HPLC ($\alpha=0,05$). De todas maneras, la mayor desviación estándar del procedimiento Raman (en términos de %RSD; Raman≈5%, HPLC≈2.5%) incrementa el valor de AV y así, para el lote A, este hecho junto a un valor medio por debajo del valor nominal provocan que el lote A no supere el test y, de acuerdo con las regulaciones de farmacopea, el número de comprimidos analizados debiera ser incrementado a 30, y el AV recalculado.

Resultados y discusión

La **figura 3-24** muestra la distribución de %RSD dentro de comprimido (ocho espectros) para diez comprimidos por lote. Mientras que el lote B la distribución es relativamente simétrica, el lote A muestra una alta asimetría con altos valores de %RSD. La aplicación del test de Cochran muestra, con un nivel de significación de $\alpha=0,05$, que las varianzas del lote A difieren significativamente mientras que el lote B no.

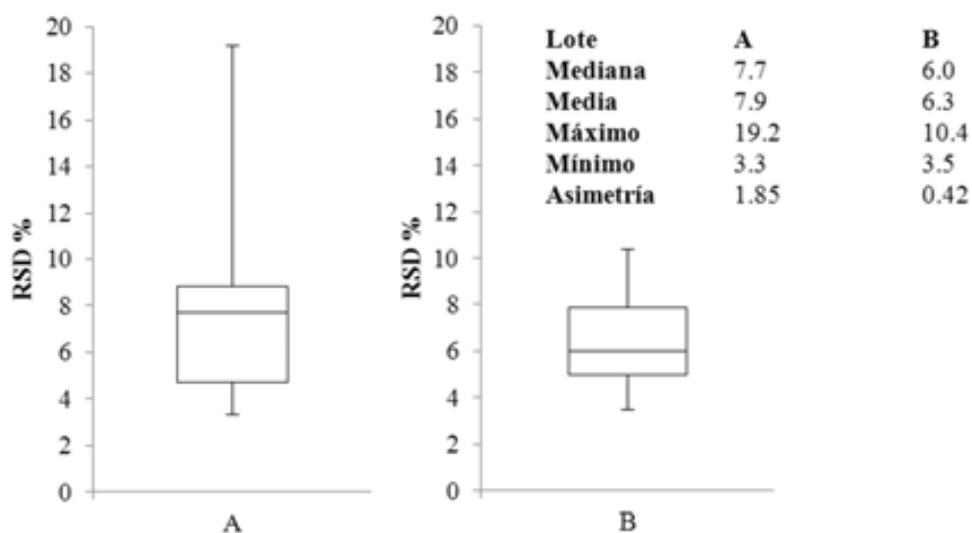


Figura 3 - 24: Diagrama de cajas de distribución de RSD% de dentro de comprimido para el análisis cuantitativo de cada lote de producción junto a los datos estadísticos descriptivos de dicha distribución.

ANÁLISIS DE CUARTOS

Si los resultados se analizan como el valor medio predicho para cada comprimido y se establece un valor umbral en el $\pm 15\%$ del valor medio de lote, (lo cual puede considerarse como una extensión del criterio uniformidad de contenido en dosis individual (20)), dos cuartos se encuentran más allá del límite del $\pm 15\%$ mientras que todos los cuartos del lote B están dentro de los límites (**figuras 3-25 y 3-26**).

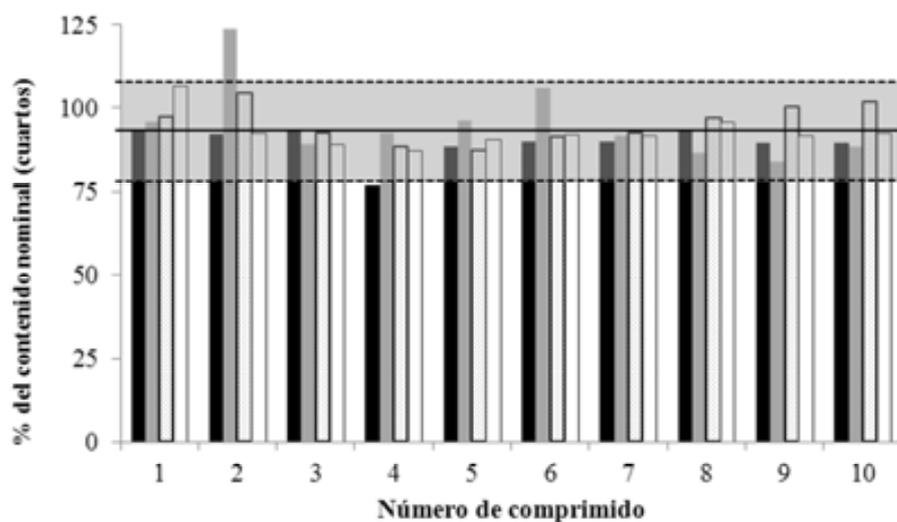


Figura 3 - 25: Predicción del contenido en API de los cuartos individuales del lote A. El área sombreada indica el $\pm 15\%$ de la media.

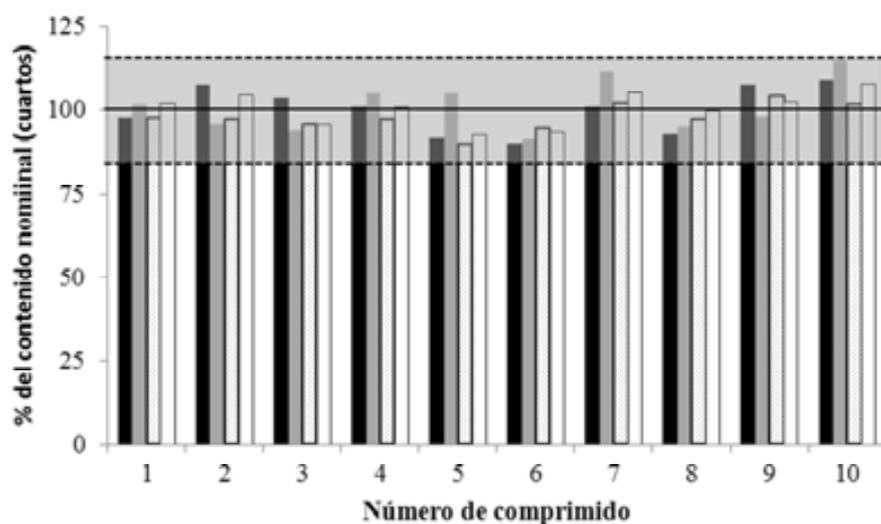


Figura 3 - 26: Predicción del contenido en API de los cuartos individuales del lote B. El área sombreada indica el $\pm 15\%$ de la media.

Resultados y discusión

Resumiendo,

- Ambos lotes superan los requerimientos de uniformidad de contenido de la farmacopea para comprimidos enteros.
- La distribución de AP en el lote B muestra un mayor grado de homogeneidad que el lote A (demostrado por la significativa diferencia en varianza y la presencia de dos valores de predicción de contenido en API más allá del valor umbral del $\pm 15\%$ en este último lote.

ANÁLISIS CUALITATIVO

Los datos mostrados anteriormente y en el trabajo anterior (19) indican que el desarrollo de modelos cuantitativos de API en las potenciales fracciones de un comprimido es posible. A pesar de ello, este desarrollo es laborioso y la calidad de los resultados se ven afectadas por cambios en la textura de la superficie, cambios en el suministro de materias primas y otros cambios en el proceso de fabricación. Por tanto, es interesante compararlos con otros procedimientos menos laboriosos. Si el API tiene una banda característica, no interferida por otros componentes de la formulación, la comparación de intensidades o áreas de pico registrados en diferentes puntos de la muestra podría ser suficiente para evaluar la homogeneidad de distribución de API.

El gráfico de cajas del análisis cualitativo (**figura 3-27**) muestra la distribución de %RSD de área de pico dentro de comprimido (ocho espectros) para diez comprimidos por lote. Su comparación con la **figura 3-24** (análisis cuantitativo) evidencia que los valores encontrados son significativamente más altos. Este hecho no es sorprendente ya que el análisis cuantitativo utiliza un método multivariante en un área espectral donde aparecen las bandas Raman más intensas del API y que la cuidadosa selección de las variables latentes

Resultados y discusión

reduce el efecto del ruido presente en el espectro. La intensidad del único pico no interferido (1606 cm^{-1}) es relativamente baja. Así, se puede asumir que la variabilidad en el método cuantitativo está principalmente relacionada con la diferencia de contenido en API en función del punto muestreado del comprimido, mientras que la variabilidad de la medida de área en un pico de baja intensidad está también relacionada con el ruido intrínseco del registro espectral.

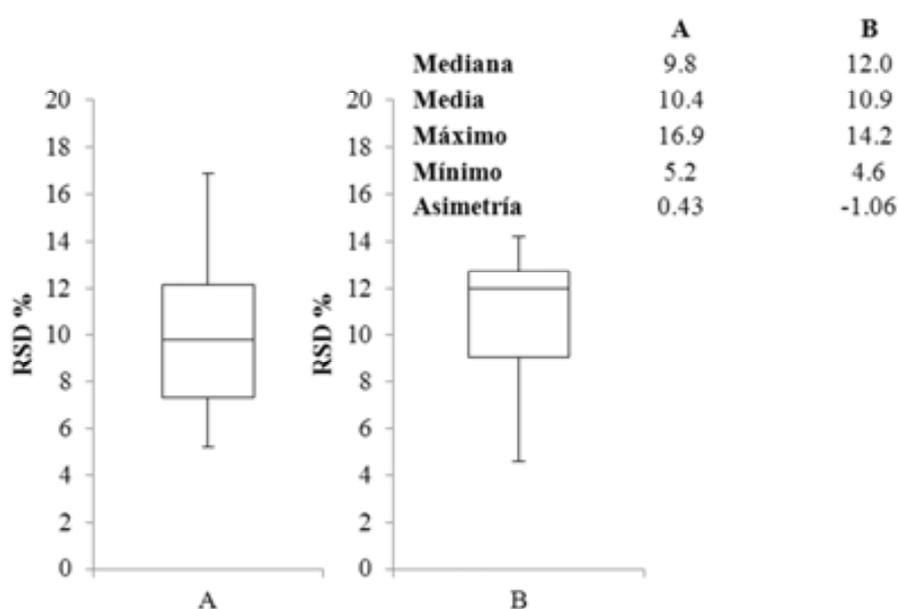


Figura 3 - 27: Diagrama de cajas de distribución de RSD% de dentro de comprimido para el análisis cualitativo de cada lote de producción junto a los datos estadísticos descriptivos de dicha distribución.

De todas maneras, cabe resaltar que, en concordancia con el análisis cuantitativo, los mayores valores de %RSD, es decir, la máxima variabilidad dentro de comprimido, se halla en el lote A. La comparación mediante el test de Cochran muestra que la varianza de uno de los comprimidos es significativamente mayor al resto en este lote, a diferencia de lote B. En

Resultados y discusión

el caso del análisis cualitativo, no existe valor de referencia o nominal con el que comparar el valor promedio por cuarto.

Si el API está mal distribuido dentro de comprimido, se esperarían diferencias significativas entre cuartos. Así, para $\alpha=0,05$, la máxima diferencia esperable entre dos valores dentro de una población es de 2,8s (3,6 para $\alpha=0,01$). Esta idea se puede aplicar para calcular si la máxima diferencia entre los cuartos de un comprimido individual es significativa o puede ser atribuida a un efecto aleatorio. Debido a dificultades para estimar el valor de s, se ha concluido que la comparación se debiera hacer con el criterio más conservador ($\alpha=0,01$). Así, los resultados muestran que sólo un comprimido del lote A presenta diferencias significativas entre cuartos. Cuando este criterio se ha aplicado al análisis cuantitativo los resultados han sido consistentes ya que se han hallado diferencias significativas entre cuartos en uno de los comprimidos del lote A y en ninguno del lote B.

3.4.2.2 ANÁLISIS CON LA SONDA MICROPROBE

Una crítica que se puede realizar al análisis de homogeneidad mediante espectroscopia Raman es que sólo se obtiene información de la superficie. A pesar de que el contenido en API de la superficie se supone refleja el contenido global (la correlación entre valores Raman y HPLC en el análisis cuantitativo da cuenta de ello) se puede argumentar que el proceso de compactación puede alterar la superficie por aparición de irregularidades, provocando que el espectro Raman no sea representativo del contenido global en API del comprimido. A pesar de ser poco probable, este fenómeno no puede ser excluido.

Con el fin de evaluar la distribución de API en el núcleo del comprimido, se dividieron varias tabletas y se registró el espectro tal y como se muestra en la **figura 2-3** usando un

Resultados y discusión

spot de 100 μ m de diámetro. Así se registraron dos líneas transversales de 50 *spots* parcialmente solapados por comprimido.

Dado que la superficie interna (lijada para obtener una superficie plana en la escala macroscópica) y la externa son muy diferentes, se registraron varias líneas siguiendo el mismo procedimiento en la superficie externa de varios comprimidos. La comparación de líneas internas y externas debiera ser entendida como una validación indirecta del análisis de las líneas internas.

ANÁLISIS DE SUPERFICIE

Con el fin de comprobar la correlación entre el área de pico y la concentración en esta configuración experimental, se registraron varias líneas de espectros en cuatro comprimidos preparados en laboratorio. La **tabla 3-14** muestra el área promedio para cada línea, su %RSD, los valores de concentración de API y la ecuación del ajuste de los puntos por mínimos cuadrados. Además, se incluye la interpolación de seis muestras de producción. A pesar de que los resultados estén ligeramente sesgados, su cercanía al valor nominal de 4% p/p puede considerarse prueba del buen funcionamiento del procedimiento de registro espectral.

Resultados y discusión

Tabla 3 - 14: Área medio de pico (1606 cm⁻¹), % RSD, concentración predicha y de referencia y ecuación de calibrado.

Muestras calibración	Area (A)		HPLC (% p/p)
	Media	% RSD	
Muestra cal. nº 6	0,0222		8,18
Muestra cal. nº 9	0,0156	16,4	6,53
Muestra cal. nº 10	0,0118	11,5	4,10
Muestra cal. nº 15	0,0075	17,1	2,68
A = 0,0025·C + 0,0009; R² = 0,9673			
Muestras predicción	Area (A)		Predicción (% p/p)
	Media	% RSD	
Lote A, muestra nº1	0,0111	20,7	4,10
Lote A, muestra nº 2	0,0109	22,2	4,04
Lote B, muestra nº 1	0,0113	17,1	4,20
Lote B, muestra nº 2	0,0118	12,4	4,40
Lote B, muestra nº 3	0,0107	18,7	3,93
Lote B, muestra nº 4	0,0113	18,8	4,19

Siguiendo la misma metodología se compactó el API puro y se realizó la adquisición espectral. En este caso la %RSD de los 50 espectros resultó baja, del 0,8%. A pesar de que la intensidad del pico estudiado en API puro es más intensa que la del API en los comprimidos estudiados, este bajo valor indica una muy buena estabilidad de señal. Probablemente, el solapamiento espacial parcial de los puntos registrados facilita la estabilización y minimización del problema de desenfoque al analizar una superficie no totalmente plana.

La %RSD de área de pico para las muestras comerciales osciló entre el 11 y el 17%. La disminución del área muestreada (respecto a la sonda PhAT) aumenta el error de muestreo. Este problema se tratará en el último apartado de esta sección.

Para facilitar la inspección visual, cada valor de área se ha dividido entre el valor promedio de los 50 puntos. La **figura 3-28a** muestra una línea registrada en una muestra de

Resultados y discusión

calibración de concentración de API cercana a la nominal. Dado que su preparación incluyó cuidadosas etapas de molturado y mezcla, se puede asumir una distribución uniforme de API, y por tanto, las diferencias entre *spots* deberían corresponder sólo a la diferencia aleatoria debida al reducido tamaño del área muestreada. Para dicho comprimido, todos los cocientes se sitúan entre 0,8 y 1,2.

La **figura 3-28b** muestra los resultados de una línea de espectros registrados en un comprimido del lote B que muestra una tendencia muy similar a la anterior. De todas maneras, a fin de detectar anomalías se consideró un criterio más conservador que el simple “comportamiento ideal”. Asumiendo una %RSD ideal en torno a 12-13%, y estableciendo un nivel crítico de 3s como valor umbral, los puntos cuyo cociente de área esté entre 0,6 y 1,4 se pueden considerar esperables, mientras que los puntos más allá de estos límites puede considerarse anómalos y una probable prueba de la presencia de un aglomerado, como puede observarse en las **figuras 3-28c y 3-28d**. Evidentemente, un aglomerado no debería considerarse con un único punto anómalo si no con varios puntos consecutivos mostrando una deriva sistemática, como puede observarse en la **figura 3-28c**, donde cuatro puntos consecutivos (equivalente a 150 μm) sobrepasan el umbral de 1,4.

Resultados y discusión

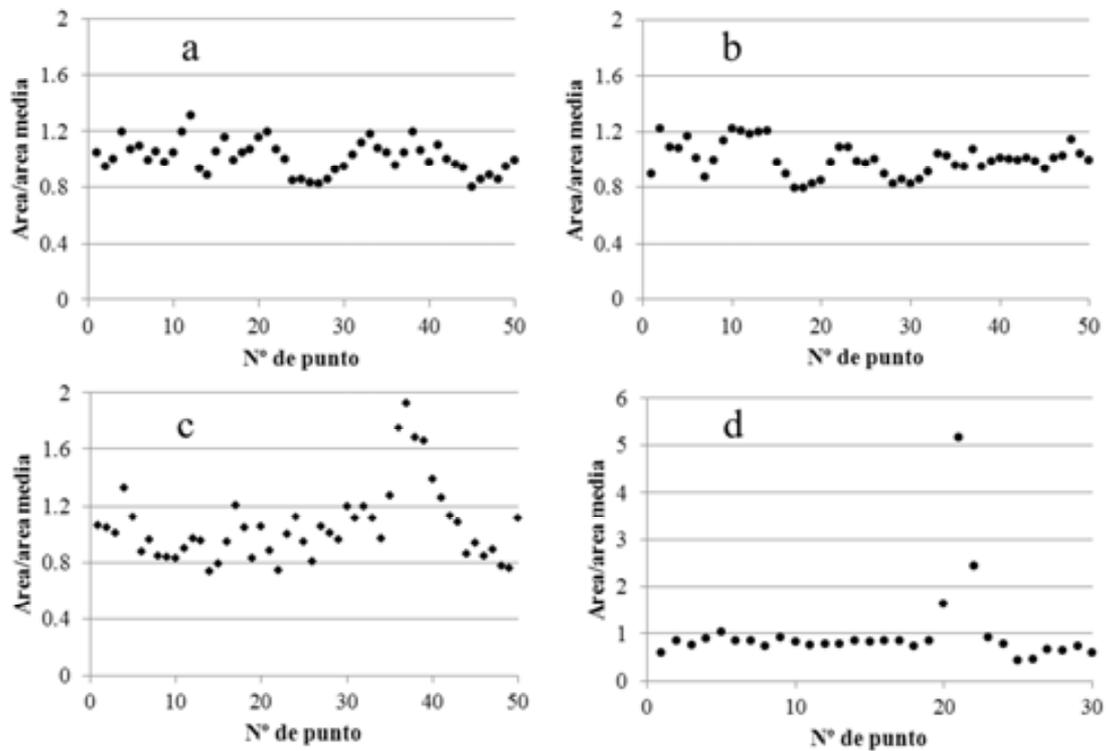


Figura 3 - 28: cocientes área/área media para: a) una muestra de correlación, b) y c) líneas de la superficie de dos comprimidos del lote B y d) una línea interior de un comprimido del lote A.

LÍNEAS INTERIORES

La **tabla 3-15** resume los principales resultados en el análisis de líneas interiores. A pesar de registrar 50 espectros por línea, se eliminaron diez en cada extremo para evitar las áreas biseladas. Así, sólo se utilizaron 30 puntos para los consiguientes cálculos que correspondían a una distancia aproximada de dos mm del núcleo de los comprimidos. El análisis de los datos muestra que la magnitud de las áreas promedio para las líneas interiores y exteriores es muy similar lo que puede confirmar que, bajo estas condiciones experimentales, la textura física no afecta significativamente, validando ulteriores conclusiones. Además, para dos muestras se registraron líneas tanto interiores como exteriores y se obtuvieron resultados muy parecido, tal y como muestra la **tabla 3-16**.

Resultados y discusión

Las seis líneas del lote A muestra valores medios muy similares con una %RSD muy baja (4,4%) mientras que para las doce líneas del lote B es del 19.5%. Este valor tan alto es principalmente debido a la presencia de aglomerados en tres de ellos. Estas diferencias se reflejan en que todas las líneas del lote A no contienen puntos fuera del intervalo 0,6-1,4 mientras que tres de las doce líneas del lote B sí.

Tabla 3 -15: comparación de los valores de área medios para las líneas entre lotes.

Lote	nº comprimidos	mínimo	máximo	mediana	media	% RSD ^a	Fuera del umbral 0.6-1.4 ^b
A	3	0,0109	0,0123	0,0113	0,0114	4,4	0
B	6	0,0099	0,0187	0,0114	0,0122	19,5	3

^a % RSD media por lote; 2 líneas por comprimido.

^b líneas que incluyen al menos un punto fuera del intervalo 0,6-1,4.

Tabla 3 - 16: Comparación del área media de pico de API entre las líneas registradas en superficie y las interiores.

Lote	superficie		núcleo	
A	Línea 1	0,0111	Línea 1	0,0123
	Línea 2	0,0109	Línea 2	0,0112
B	Línea 1	0,0107	Línea 1	0,0108
	Línea 2	0,0113	Línea 2	0,0124

3.4.2.3 ERROR DE SUBMUESTREO

El error de submuestreo se puede definir como la dispersión de resultados debida a la no-uniformidad de las muestras a analizadas. Aunque el API esté distribuido aleatoriamente, el comprimido se compone de un conjunto de partículas. Así, el número de partículas de API analizadas, para un determinado tamaño de *spot*, depende por su concentración, el tamaño de partícula de API y excipientes y la penetración del láser en la muestra.

La variabilidad de la señal Raman debida al submuestreo ha sido ampliamente discutida en la literatura (21). La teoría analítica de muestreo se rige, al menos en sus aspectos más

Resultados y discusión

sencillos, por la ley de distribución binomial. Esta ha sido aplicada en espectroscopia Raman con el fin de estimar la probabilidad de detectar partículas individuales cuando el tamaño de *spot* está por debajo del de partícula (22). El análisis de error de submuestreo no se ha aplicado a *spots* de mayor tamaño debido a la dificultad y complejidad del tratamiento de datos. Si, como primera aproximación, se asume igual volumen y densidad para todas las partículas de la muestra, es posible estimar el número total de partícula que habrían de ser muestreadas para obtener un determinado error de muestreo.

Para un error de muestreo s_r (desviación estándar en %) y una probabilidad de encontrar el analito p ($q=1-p$), la cantidad total de partícula a muestrear se define como:

$$N = \frac{q}{p} \left(\frac{100}{s_r} \right)^2$$

Así, En un caso como éste, con una concentración de API del 4%, la relación entre el número total de partículas que se deberían muestrear y la desviación estándar (suponiendo que el error analítico es muy inferior al error de muestreo) produce la **tabla 3-17**. El diámetro de partícula se estima suponiendo que solo se analiza la superficie, es decir, superficie del *spot* dividido entre el número de partículas.

Tabla 3 - 17: relación entre la desviación estándar esperada, el número y tamaño de partículas analizadas aplicando la ley de distribución binomial.

S_r (%)	N	$\varnothing=100 \mu\text{m}$	$\varnothing=1\text{mm}$
2	60000	0,41	4,08
5	9600	1,02	10,21
10	2400	2,04	20,41
15	1067	3,06	30,62
20	600	4,08	40,82
30	267	6,12	61,24

Resultados y discusión

Así, para obtener un error de muestreo “ideal” del 2% se deberían analizar 60.000 partículas; 9.600 para un error del 5%, asumiendo una distribución totalmente aleatoria. El hecho del gran número de partículas que han de ser muestreadas tiende a ser minimizado en la literatura; por ejemplo “A pesar del relativamente gran diámetro de *spot* de los instrumentos FT (100-2000 μm) no es generalmente suficiente para eliminar el error de muestreo en comprimidos farmacéuticos, bien porque los tamaños de partícula de los constituyentes son tan grandes que sólo se muestrean unas pocas o bien por la presencia de inhomogeneidades en las muestras” (23). El autor parece olvidar que una %RSD del 5-10% es esperable únicamente debido a la aleatoriedad de muestreo, sin formación de aglomerados.

El cálculo de la %RSD no es posible debido a la dificultad en estimar el volumen real de muestra analizado. A pesar de que la penetración de radiación ha sido estimado en aproximadamente 1 mm, la intensidad Raman se reduce con la penetración (que también depende de la potencia del láser). Por otro lado, el procedimiento experimental incluyó el enfoque con un microscopio 10x, lo que reduce profundidad de campo.

Se realizó una tentativa para determinar experimentalmente el tamaño de partícula del API mediante Microscopía de Barrido de Electrones (SEM). Dado que las partículas son de forma rectangular (en la imagen bidimensional), se realizó un análisis de tamaño basado en la longitud de 130 partículas y el ancho 225. Se calculó la mediana de cada uno de los valores (para evitar la influencia en el cálculo de valores extremos) y el área promedio de partícula obtenida fue de $92 \mu\text{m}^2$. Esta área equivaldría a una partícula circular de 11 μm de diámetro. Una de las imágenes SEM utilizadas para la determinación del tamaño de partícula de API puro se muestra en la **figura 3-29**.

Resultados y discusión

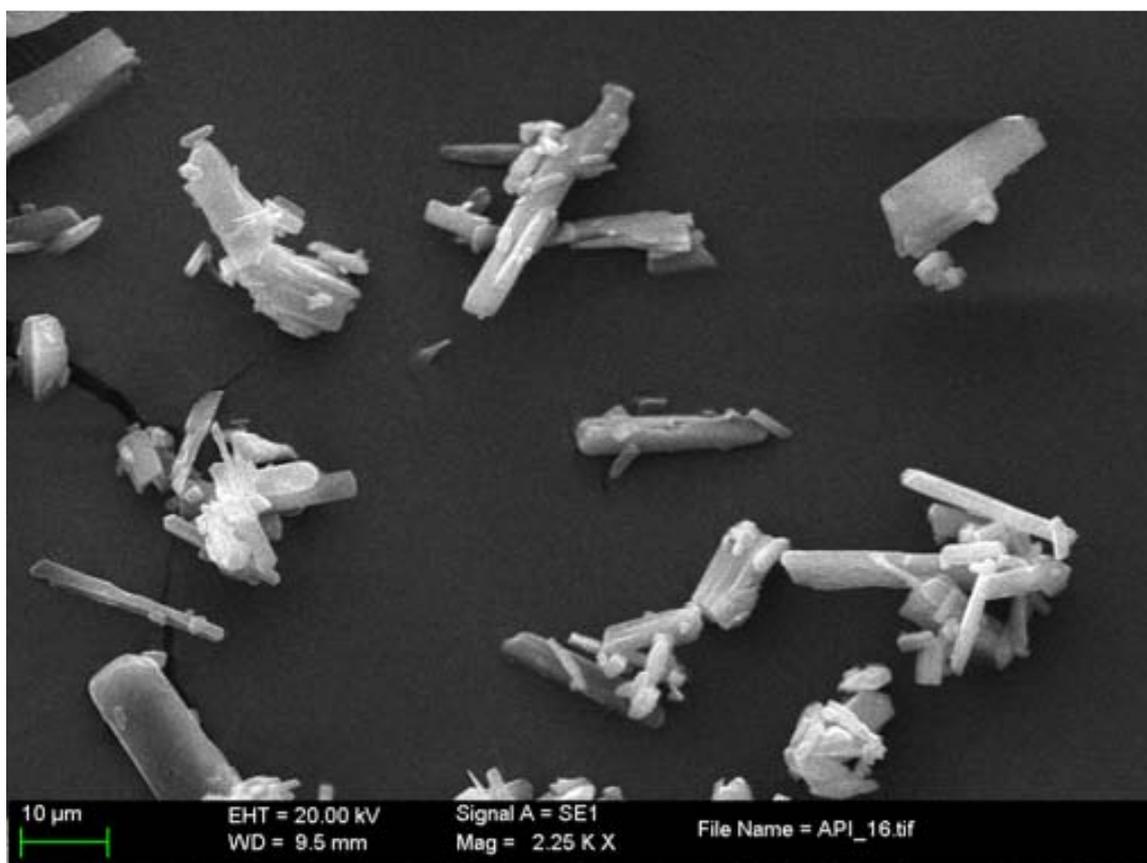


Figura 3 - 29: imagen de API puro obtenida por SEM para el cálculo de tamaño de partícula de API.

Volviendo a la **figura 3-24**, la media de RSD dentro de comprimido para ambos lotes en el análisis cuantitativo es del 6%, que corresponde a un tamaño de partícula aparente de 11-12 μm . Por lo tanto, existe una total concordancia entre el tamaño de partícula aparente calculado experimentalmente y el estimado a través del RSD dentro de comprimido.

El ajuste no es tan bueno con la sonda de 100 μm dado que la potencia del láser se mantuvo constante, lo que supone que penetró más en la muestra, por lo que el número de partículas analizado fue superior a las de la superficie del *spot*. Con toda la precaución debida a los

Resultados y discusión

pocos datos analizados, se puede decir que la teoría de distribución binomial estima el error mínimo de muestreo al utilizar *spots* grandes.

3.5 COMPARACIÓN DE SONDAS NIR EN EL ANÁLISIS *IN-LINE* DE HUMEDAD DE SECADOR DE LECHO FLUIDO BAJO LA METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN BASADA EN INTERVALOS DE TOLERANCIA DE EXPECTATIVA β

3.5.1. INTRODUCCIÓN

El secado en lecho fluido (FBD) es un proceso estándar en la industria farmacéutica que se aplica tras la granulación para devolver los gránulos a su contenido en humedad inicial (24), por lo que la monitorización del contenido en agua y la determinación de punto final son muy importantes. El método clásico ha sido la monitorización de las variables de proceso (por ejemplo, la temperatura del aire de salida), pero cuentan con el inconveniente de no ofrecer información directamente relacionada con las variables críticas de proceso por lo que la calidad de la monitorización está sujeta a la comparación con a los lotes de producción anteriores, por lo que un cambio en la condiciones de producción sesgaría la interpretación de la información obtenida. Así, en las dos últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas para la monitorización de parámetros y atributos de calidad

críticos, con objeto de obtener información de monitorización poco dependiente de la de lotes anteriores o de las propiedades de las materias primas.

Como se ha explicado en la introducción de esta tesis, una de las técnicas más populares para la monitorización de humedad en sólidos es la espectroscopia NIR; la señal del agua es intensa, su medida es fácilmente implementable y la señal que se obtiene es robusta. El principal inconveniente de la técnica es la naturaleza de su señal; los sobretonos de las bandas del IR medio conducen a espectros compuestos por bandas anchas solapadas, lo que hace necesaria la utilización de herramientas quimiométricas para el análisis de los datos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos NIR es laborioso y necesita siempre de un método de referencia.

Tal y como se ha descrito en la introducción, la filosofía de la iniciativa PAT no radica en evaluar la calidad en los productos si no en que la calidad se asegure con el diseño del proceso por lo que se alienta que el método analítico ofrezca una profunda comprensión de los fundamentos físicos y químicos en los que se sustenta el proceso, evitando el desarrollo empírico de métodos analíticos. Así, técnicas espectroscópicas como el NIR, encajan en este marco.

El FBD, como la mayoría de los procesos farmacéuticos, se realiza habitualmente de manera discontinua, dado que la maquinaria para el procesado en lotes está instalada en las plantas de producción de la industria. Un cambio hacia el procesado en continuo requeriría grandes inversiones, formación del personal, nuevos procesos de validación de documentación regulatoria (la cual es muy estricta en el ámbito farmacéutica). De todas maneras, la producción en continuo presenta ventajas respecto al discontinuo,

Resultados y discusión

principalmente evitar el escalado (que puede realizarse en la *cuarta dimensión*, es decir, el tiempo), conduciendo a un proceso más flexible, en el que el papel de las técnicas de monitorización se vuelve esencial.

Una de las mayores fuentes de error en la monitorización *inline* en los procesos farmacéuticos es el error de muestreo debido a la utilización de cantidades de muestras pequeñas en el análisis de lotes enteros. Esta cuestión ha sido discutida por Green *et. al.* (25). Así, no sólo la posición si no también la geometría y el área de la sonda son parámetros críticos en el funcionamiento del espectrómetro y por tanto del método analítico.

Como se señaló en la introducción de esta Tesis, la validación es la etapa más crítica en el desarrollo de un método analítico, a pesar de que los parámetros para la adecuada validación de métodos multivariantes sean aún discutidos en su aplicación al análisis farmacéutico (26). Así, la validación de un modelo multivariante siguiendo la manera *clásica* implica la comparación de múltiples parámetros, conduciendo en muchas ocasiones a una situación en la que diferentes parámetros puede llevar a diferentes conclusiones contradictorias o parciales.

Hace algunos años se propuso un enfoque global para la validación de métodos analíticos (27-29), que evalúa conjuntamente la exactitud y la repetitividad y precisión intermedia a la vez.

El objetivo de este nuevo procedimiento de validación es reconciliar los objetivos de la validación con los del procedimiento analítico junto a proveer una herramienta de decisión sencilla basada en el error total (sesgo + precisión intermedia). Este enfoque permite

minimizar el riesgo de aceptar un procedimiento que no sea suficientemente exacto, o al contrario, de rechazar un procedimiento válido.

El objetivo de un buen procedimiento analítico es la cuantificación, tan exacta como sea posible, de las futuras muestras que el laboratorio haya de determinar. La fiabilidad de los valores estimados depende de la adecuación de las medidas realizadas en muestras conocidas (muestras de validación), el diseño experimental y el número de replicados durante la fase de validación. Sin embargo, estos valores estimados de sesgo y varianza no son objetivos *per se*.

Desarrollar un procedimiento sin sesgo y sin error tiene un alto coste. Este objetivo es inviable para el analista que generalmente dispone de un tiempo limitado para optimizar los parámetros analíticos, incluso utilizando diseño experimental.

Para superar esta situación de compromiso, el analista debe tomar los riesgos mínimos. Para controlar este riesgo, se puede invertir el razonamiento habitual y se puede fijar como asunción inicial que sólo un máximo de medidas futuras estén fuera de los límites de aceptación (por ejemplo el 5%). Así, esta proporción es el mayor riesgo que el analista asume.

Un procedimiento será cualificado si puede garantizar que la diferencia entre cada medida y su valor verdadero está dentro de los límites de aceptación predefinidos por el analista.

Sabiendo que los parámetros de “sesgo verdadero” y “precisión verdadera” serán siempre desconocidos, pero que serán estimados a través de las medidas obtenidas en la fase de validación, ¿cuál es el objetivo de la validación? Bajo estas condiciones parece razonable que el objetivo sea proveer a los laboratorios y cuerpos regulatorios de “garantías” de que

Resultados y discusión

todas las medidas realizadas serán lo bastante próximas al valor verdadero desconocido o que al menos la diferencia será menor que un límite aceptable teniendo en cuenta el uso futuro del método.

Así, el objetivo de la validación es minimizar el riesgo tanto del consumidor como del productor. Por tanto, el objetivo de la validación no puede limitarse a obtener valores estimados de sesgo y varianza, sino que debe enfocarse en la evaluación del riesgo incluso si estos valores estimados se utilizan para evaluar el riesgo. Respecto al objetivo, se deben aclarar dos conceptos:

- “Lo bastante cerca”: la diferencia entre la medida realizada en rutina y su valor verdadera será menor a un determinado porcentaje (definido por el límite de aceptación).

$$-\lambda < x - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu_T| < \lambda$$

donde λ es el límite de aceptación fijado *a priori* por el analista basado en los objetivos del método, x es el medida en la muestra de validación y μ_T el valor verdadero.

- “Garantía”: la probabilidad de que cualquier medida esté “lo bastante cerca del valor verdadero.

$$P(|x - \mu_T| < \lambda) \geq \beta$$

donde β es la proporción de medidas dentro de los límite de aceptación.

Así, teniendo en cuenta los requisitos de las agencias reguladoras, en el presente trabajo se utilizó una β del 95% de medidas correctas y una λ del $\pm 15\%$.

En resumen, se realizan experimentos con diferentes fuentes de variabilidad (por ejemplo, días u operadores de registro) y se calcula una distribución normal de los residuales, dependiendo el nivel de confianza del propósito de la validación (β) y se compara con un

valor umbral preestablecido (2). De esta manera la exactitud y precisión intermedia de los futuros resultados en rutina se expresa conjuntamente como error total. Además, la representación sugerida de los datos permite una evaluación sencilla e intuitiva. Un buen ejemplo de la aplicación en procedimiento de validación es el trabajo de Ziemons *et. al.* En la determinación de paracetamol en jarabes de baja concentración (30).

Esta metodología ha sido recientemente aplicada a métodos multivariantes en industria farmacéutica. A pesar de que la implementación de la iniciativa PAT es uno de los ámbitos de investigación y desarrollo más activos, solo unos pocos trabajos discuten el uso de la metodología de intervalos de tolerancia en medida *inline* (31).

El objeto de la presente sección es el desarrollo de métodos cuantitativos NIR robustos para dos sondas NIR con diferentes geometrías y su comparación en la monitorización de la concentración de agua durante el proceso de secado en un FBD utilizando la metodología de intervalos de tolerancia descrita anteriormente.

3.5.2. METODOLOGÍA

3.5.2.1 ANÁLISIS NIR

El objetivo de este estudio ha sido la comparación de dos sondas por lo que se mantuvieron las variables instrumentales lo más cercanas posible. Así, la resolución espectral se estableció en 8 cm^{-1} , se registró un espectro cada 20 s (en el caso de los experimentos *inline*) y los rangos espectrales fueron de 10.000 a 4000 cm^{-1} en el caso del Thermo Antaris II (ANT) y 10.000 a 4500 cm^{-1} para el Matrix-F (LHP). Para el registro de espectros *inline*

Resultados y discusión

las sondas se implementaron en los dos puertos del secador en posiciones opuestas (Thermo Antaris II en la celda número 5 y Matrix-F en la celda número 2), se mantuvieron siempre en la misma posición (rotación y profundidad).

La mayor diferencia entre sondas es la punta, tal y como se ilustra en la **figura 3-30**. La LHP cuenta con siete ventanas radiales de zafiro que irradian y recogen la luz en el giro completo de 360°. En cambio, la ANT tiene la geometría clásica de sondas NIR con sólo una ventana.



Figura 3 - 30: sondas implementadas; Nicolet Antaris II (izquierda) y LightHouse (derecha)

3.5.2.2 LOTES DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN

Para la construcción del modelo de calibración se prepararon 20 lotes a 5 temperaturas (4 lotes en cada una) del aire de entrada del secador. Inmediatamente después de la descarga se adquirieron cinco espectros de los gránulos en diferentes puntos del lote.

En el caso de los lotes de validación, el objetivo ha sido comparar el funcionamiento de los métodos analíticos desarrollados en cuanto a la capacidad predictiva en el futuro uso en rutina, por lo que se utilizó la metodología estadística de los intervalos de tolerancia esperados β (27-29). Para tal fin, se implementaron las sondas y se produjeron, con ambas sondas operando en paralelo, tres lotes cada día durante cuatro días a tres nivel de

Resultados y discusión

concentración final de humedad (denominados **bajo, medio y alto**; en un rango que abarca del 3,6 al 6,5% p/p; definiéndose cada uno de estos niveles por la temperatura del aire de entrada), dando lugar a un total de 36 lotes por sonda, tal y como se ilustra en la **figura 3-31**. Como se ha comentado anteriormente, los espectros *inline* se registraron cada 20 s durante el procesado. Además, una vez descargado el lote, se procedió a registrar cinco espectros en diferentes puntos del lote (espectros *offline*). Así, se realizaron dos validaciones paralelas, una, en condiciones dinámicas, con el promedio de los últimos cinco espectros registrados en el proceso (VAL-IN), asumiendo que la concentración de agua no varía respecto al final del proceso, y otra, en condiciones estáticas, con el promedio de cinco espectros registrados después de la descarga de los gránulos (validación *offline*, VAL-OFF).

Resultados y discusión

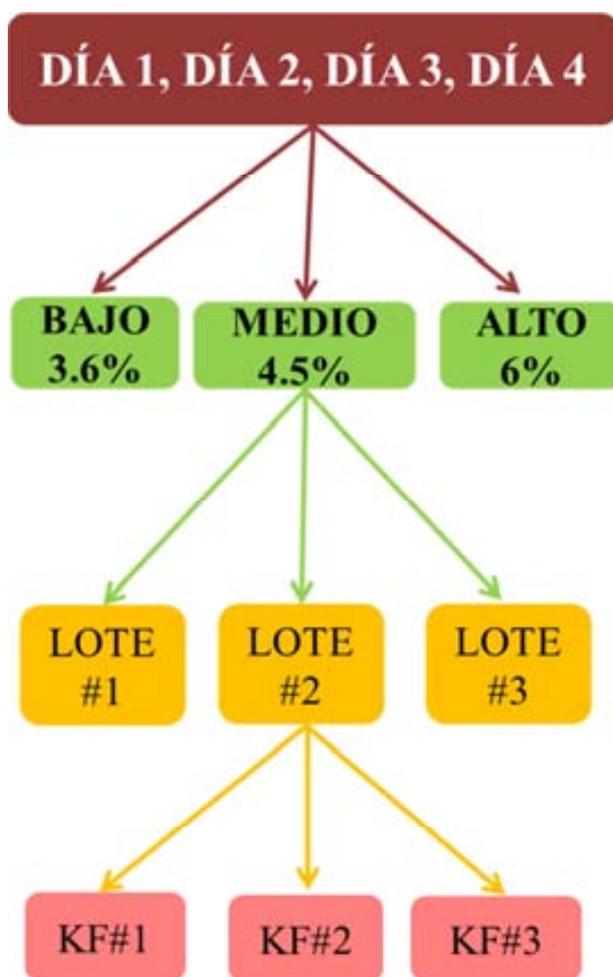


Figura 3 - 31: Esquema de las muestra de validación para cada sonda.

Tras la descargar de cada lote la concentración de humedad se determinó por triplicado a través del método de referencia (valoración Karl-Fischer). La principal ventaja de esta metodología para la preparación de las muestras de calibración y validación reside en que no es necesario alterar el funcionamiento del FBD para la extracción de muestra durante el proceso para ampliar el rango de concentraciones.

3.5.2.3 ERROR ESTÁNDAR DE LABORATORIO (SEL)

En el presente estudio, el método de referencia ha presentado varias fuentes de error:

- Heterogeneidad dentro de lote.
- Pérdida de humedad (especialmente relevante para lotes de concentración de humedad elevada) debido al lapso entre la descarga y el análisis Karl-Fischer
- El error intrínseco del método.

De esta forma, se ha calculado el error estándar de laboratorio (SEL) en base a la guía E1655-05 de la ASTM (32). Así, se ha podido estimar el error mínimo en la calibración, ya que el error del método multivariante depende del error del método de referencia(33).

3.5.2.4 DESARROLLO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

Los modelos de calibración PLS han sido desarrollados para cada sistema espectrómetro-sonda de forma independiente. Se han ensayado los pretratamientos SNV y primera y segunda derivada junto con sus combinaciones en diferentes regiones espectrales (aquéllas en las que el agua absorbe la radiación NIR). La bondad del ajuste se ha evaluado en las etapas iniciales en términos de SECV y linealidad.

Los modelos de calibración desarrollados se han evaluado comparando las concentraciones de humedad predichas en las muestras de validación *offline* con los datos en estas mismas muestras del método de referencia. Los parámetros evaluados fueron:

- La linealidad del gráfico predicho vs. referencia.
- El Error Estándar de Validación (SEV, como lo define la ASTM, también llamado RMSEP) para el conjunto de muestras de validación así como para los diferentes niveles de concentración de agua (**bajo, medio, alto**).
- La distancia al modelo de los datos espectrales: una herramienta diagnóstica que permite evaluar la similitud entre los datos de calibración y el espectro predicho

Resultados y discusión

(un valor del mismo orden en calibración y validación permite descartar la presencia de sobreajuste).

El último paso en el desarrollo del método fue el cálculo de los perfiles de exactitud para los datos de predicción en el conjunto de validación (tanto VAL-OFF como VAL-IN)

Por último, tras desarrollar y validar los métodos, se calcularon los perfiles de secado para los experimentos a nivel **bajo** (dado que estos experimentos son los más cercanos a un proceso de secado real) y se comparó el funcionamiento de las sondas. Debido a la falta de valores de referencia, se prestó especial atención al parámetro de distancia al modelo (DmodX) en este este paso.

3.5.3 RESULTADOS

3.5.3.1 DATOS DE REFERENCIA

Previo a la evaluación de los espectros se evaluó la calidad de los resultados Karl-Fischer de referencia dado que la calidad de los resultados NIR está sujeta a ésta. Se halló un SEL ligeramente más alto para los lotes de validación de contenido en humedad alto que para los de contenido bajo e intermedio debido a una mayor pérdida de humedad entre la descarga y el análisis de referencia en los primeros. Los datos se muestran en la **tabla 3-18**.

Tabla 3 - 18: Error estándar de laboratorio (SEL) para diferentes grupos de muestras

	muestras	replicados	SEL (%w/w)
VAL BAJO	24		0,16
VAL MEDIO	24	3	0,16
VAL ALTO	24		0,18
VAL TODO	72		0,17
CAL	20		0,13

La validación en este estudio se realizó siguiendo la guía desarrollada por Hubert *et. al.* (27-29) pero su filosofía está ligada al enfoque clásico de los métodos de química húmeda en lo que las muestras de referencia se preparan a partir de patrones. En cambio, no es posible establecer el contenido en humedad de las muestras de validación, ya que es altamente dependiente de los parámetros de proceso. El cálculo del intervalo de expectativa de tolerancia β requiere que todas las muestras tengan el mismo valor de referencia, por lo que fue necesario el alineamiento de los datos de validación mediante la siguiente ecuación. Dado que la validación se realizó en tres niveles de concentración, se realizó el alineamiento para cada nivel de concentración.

$$Y_{alineado} = b * (\bar{x} - Y_{no\ alineado})$$

Donde $Y_{alineado}$ es el nuevo valor predicho para una determinada muestra, b es la pendiente de la curva de calibración predicho vs. referencia, \bar{x} es el valor de referencia promedio e $Y_{no\ alineado}$ es el valor de predicción original de la muestra.

La **figura 3-32** muestra la dispersión de los valores de referencia y los valores medios de concentración de agua para cada nivel en predicción tras el alineamiento. Como se puede observar, la dispersión en el nivel bajo es la menor, ya que, en estas condiciones, los

Resultados y discusión

gránulos están secos (el agua residual en este nivel está relacionado con las moléculas de agua de hidratación de la lactosa).

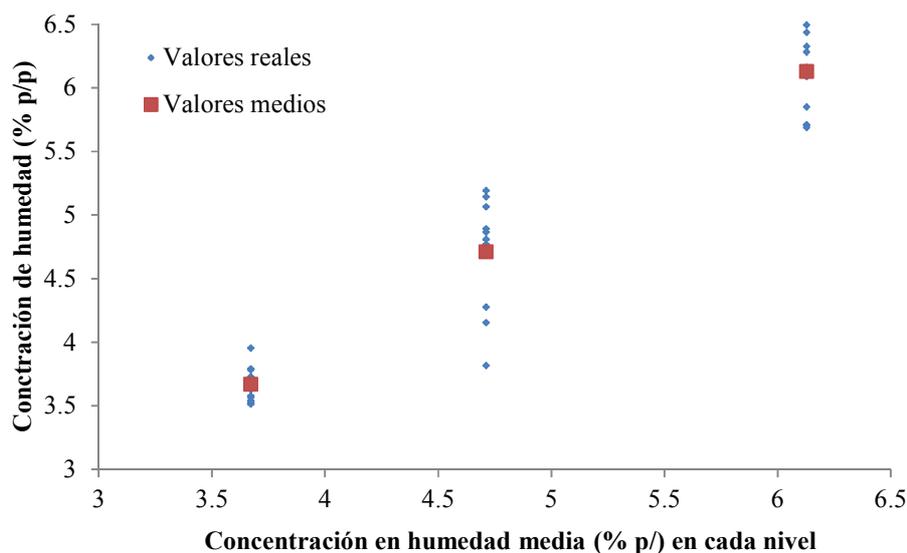


Figura 3 - 32: dispersión de la concentración humedad de referencia alrededor del valor medio para nivel

3.5.3.2 INSPECCIÓN ESPECTRAL

La primera conclusión tras la representación de los datos de los espectros de calibración fue que el rango espectral sólo presente en ANT (4000 a 4500 cm^{-1}) no resultaba útil ya que presentaba mucho ruido (debido a la emisión de cuerpos negros). Dado que el objetivo de este estudio es la comparación de las sondas, los datos han de ser lo más comparables posible. Por tanto, la región espectral de 4000 a 4500 cm^{-1} , sólo presente en ANT no se utilizó en los siguientes cálculos.

3.5.3.3 MODELO DE CALIBRACIÓN

Como se comentó anteriormente, debido a los cambios físicos en los gránulos durante el secado y el uso de espectros estáticos para predecir espectros dinámicos, fue necesario el pretratamiento espectral previo al desarrollo del modelo de calibración. Los rangos espectrales fueron seleccionados de acuerdo con las bandas de absorción del agua. Cuando la temperatura aumenta estas bandas se mueven hacia mayores números de onda (34), por lo que se juzgó necesario escoger las bandas de absorción completas y no solo los máximos. Así, se evaluaron cuatro intervalos: $7.300-6.526\text{cm}^{-1}$, $5.407-4.875\text{cm}^{-1}$, $7.300-6.526$ y $5.407-4.875\text{cm}^{-1}$ y $7.300-4.875\text{cm}^{-1}$.

Siguiendo la estrategia descrita, se escogieron los mejores modelos de calibración en función de la capacidad predictiva *offline* (VAL-OFF) e *inline* (VAL-IN) a lo largo de todo el rango de calibración (**tabla 3-19**). La comparación de SEL y SEV para los espectros VAL-OFF e VAL-IN muestra cocientes SEV/SEL muy bajos en todos los casos, hecho especialmente relevante para los experimentos de concentración de agua de nivel bajo, dado que es el entorno de esta concentración será donde eventualmente hubiera de tomarse una decisión acerca del punto final del proceso de secado. En resumen, el cociente SEV/SEL para los tres niveles de concentración y para el rango completo está en todos los casos por debajo de dos.

Resultados y discusión

Tabla 3 - 19: resumen de los datos de calibración y validación de los mejores modelos de desarrollados para cada sonda.

		LHP	ANT
Pretratamiento		1D+SNV	2D+SNV
Rango número onda (cm ⁻¹)		5407-4875	
CAL	Factores PLS	2	1
	Varianza X explicada (%)	99,7	92,3
	Varianza Y explicada (%)	95,7	91,9
	SECV (% p/p)	0,27	0,37
	SEV BAJO (% p/p)	0,16	0,15
VAL- OFF	SEV MEDIO(% p/p)	0,13	0,20
	SEV ALTO (% p/p)	0,20	0,18
	SEV total (% p/p)	0,17	0,18
	SEV BAJO (% p/p)	0,15	0,17
VAL- IN	SEV MEDIO (% p/p)	0,19	0,31
	SEV ALTO (% p/p)	0,16	0,29
	SEV total (% p/p)	0,17	0,26

3.5.3.4. VALIDACIÓN DEL MODELO

Como se ha mencionado anteriormente la estrategia de validación propuesta por Hubert *et al.* (27-29) consiste en la revisión del objetivo de validación, fijándose éste en función de futuro uso al cual será destinado: asegurar que la diferencia entre el valor medido (y_i) y el valor verdadero (μ_T , desconocido) sea al menos menor que un límite preestablecido (λ).

$$|y_i - \mu_T| < \lambda$$

Si se fija λ en el 20%, el procedimiento analítico sería aceptable si se asegura que la probabilidad de que una medida caiga fuera de los límites de aceptación es menor o igual al riesgo máximo (5% para métodos analíticos) que el analista puede tomar en el uso en rutina.

$$\Pr(|y_i - \mu_T| < \lambda) \geq \beta$$

Los cálculos estadísticos de los intervalos de tolerancia se describen en la **figura 3 – 33**: una vez desarrollado el modelo de calibración se alinean los datos (tratándose cada nivel de concentración de manera independiente), para después calcular la varianza intra e inter día y la de repetitividad y precisión intermedia. En el paso número 5 se muestra el concepto de error total, suma del sesgo en valor absoluto y precisión intermedia. Como ilustra el sexto paso, el cálculo de la proporción de medidas que caen dentro del límite de aceptación (predefinido) no tiene solución exacta. La solución propuesta por varios autores (35, 36) consiste en calcular el intervalo de tolerancia, según lo propuesto por Mee (37), ilustrado en el paso 7 de la **figura 3-33**. Para ello, se escoge un valor de k mediante el cual la proporción de resultados futuros esperados dentro de los límites sea igual a β . Así, en el caso de que el intervalo de tolerancia esté totalmente incluido en los límites de aceptación $[-\lambda, +\lambda]$, la proporción esperada de resultados dentro de los límites de aceptación será mayor que β .

Resultados y discusión

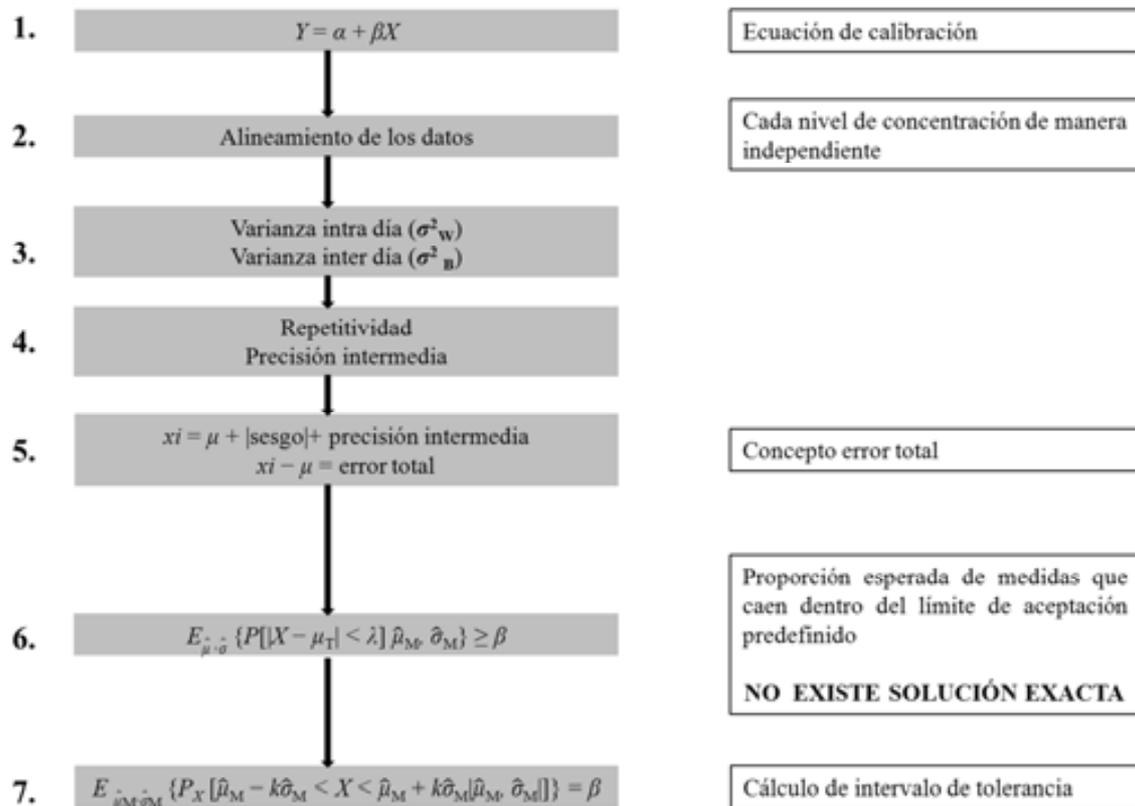


Figura 3 - 33: Diagrama para la construcción de los perfiles de exactitud.

La determinación clásica de la veracidad, precisión o linealidad entre otros no ofrece una herramienta de decisión unívoca. En cambio, esta nueva estrategia proporciona una herramienta de decisión, llamado perfil de exactitud, construido a través del procedimiento de error total, que se obtiene calculando el intervalo de expectativa de tolerancia β para cada nivel de concentración permitiendo la evaluación de la proporción esperada de medidas futuras que caerán fuera de los límites de aceptación- Así, se posibilita el control del riesgo asociado con el uso del método analítico.

3.5.3.5 PERFILES DE EXACTITUD

Las **figuras 3-34 y 3-35** muestran los perfiles de exactitud para ANT y LHP para el análisis VAL-OFF y VAL-IN. Las líneas rojas discontinuas muestran los intervalos de tolerancia y las continuas muestran el sesgo. Resulta evidente que la calidad de predicción no está relacionada con la concentración de agua en los gránulos, sugiriendo que las medidas se realizaron muy por encima del límite de cuantificación de las técnicas analíticas empleadas. Así, la mayor fuente de error ha resultado ser la pérdida de agua debido al lapso entre el registro espectral y la determinación de agua mediante el método de referencia, ya que los mejores resultados se obtuvieron en el nivel de concentración bajo. También se observa, como cabía esperar, que los intervalos de tolerancia son menores en el caso de los espectros VAL-OFF dado que éstos se registraron con muestra estática tal como fueron registrados los espectros de calibración. En general, la calidad de predicción es buena para ambas sondas en registro VAL-OFF y VAL-IN quedando los intervalos de tolerancia por debajo del umbral de aceptación del 20% preestablecido.

Resultados y discusión

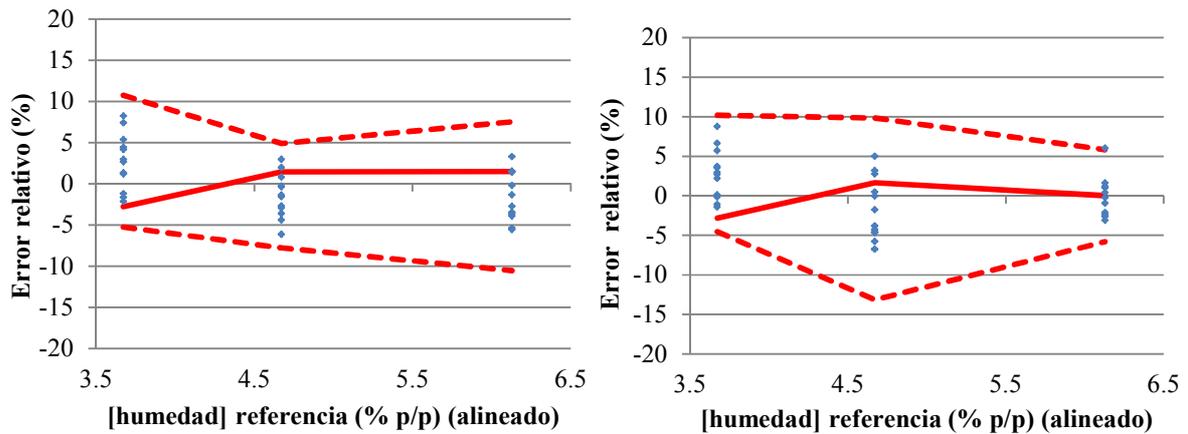


Figura 3 - 34: perfiles de exactitud para la sonda LHP offline (izquierda) e inline (derecha).

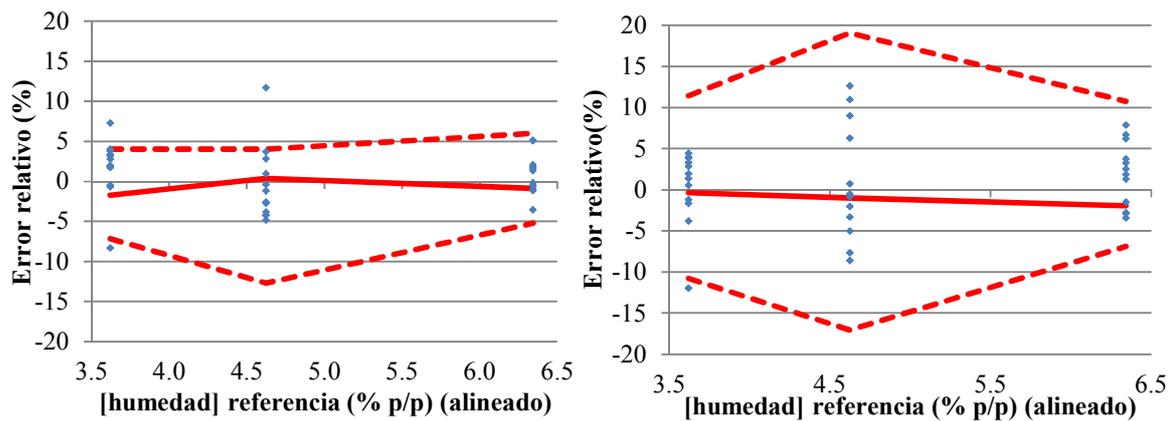


Figura 3 - 35: perfiles de exactitud para la sonda ANT VAL-OFF (izquierda) y VAL-IN (derecha)

3.5.3.6 MONITORIZACIÓN DE HUMEDAD

Una vez desarrollados los modelos para ambas sondas se procedió a la predicción de la concentración de agua *inline* durante el proceso de secado en FBD. Se tomaron en consideración que:

Resultados y discusión

- El tiempo total de los experimentos de validación es de 15 minutos y el tiempo de alimentación de materia prima en el FBD es de 5 minutos, por lo que la predicción sólo se ha realizado en los últimos diez minutos de cada experimento.
- El propósito del FBD es el secado hasta la concentración de humedad previa a la introducción de la materia prima en el FBD, por lo que la predicción sólo se ha realizado en los experimentos a nivel de concentración bajo, aquellos que se pueden considerar procesos de secado reales.
- El rango validado se comprende entre el valor promedio de nivel bajo y el del nivel alto por lo que los resultados fuera de este rango no deberían considerarse válidos. De todas maneras, los valores por debajo de la media del nivel bajo pero muy cerca de esta se tomaron por válidos.

Debido a la ausencia de valores de referencia en los datos *inline*, ha sido necesaria otra manera para evaluar la calidad de las predicciones. Para tal fin se ha tomado la distancia al modelo de los datos espectrales (definido como D_{modX} en Simca-P), con el fin de evaluar la disimilaridad entre el espectro predicho y los espectros de la matriz de calibración. Así, D_{modX} se puede considerar una excelente herramienta diagnóstica para detectar espectros anómalos.

En general, los perfiles construidos para los experimentos de nivel bajo mostraron tendencias coherentes, a pesar de ser diferentes entre ellos debido a la gran influencia de la temperatura inicial (que depende de la temperatura del aire de entrada en el experimento anterior) y no sólo de la temperatura del aire de entrada.

Resultados y discusión

Se diferencian dos claras áreas en los perfiles de secado. Una primera con una elevada velocidad de secado y una segunda en la que la velocidad de secado es muy baja (**figura 3-36**). La primera es la etapa limitada por la transferencia de calor, que ocurre durante el período en el que el agua de superficie o débilmente asociada a las partículas se evapora de la superficie de las partículas. La segunda etapa es la limitada por la difusión, en la que el agua presente en las partículas ha de difundir a la superficie antes de evaporarse. Estos resultados son consistentes con trabajos previos (38).

3.5.3.7 COMPARACIÓN DE SONDAS

ARTEFACTOS ESPECTRALES

Como análisis básico del comportamiento de las sondas *inline* se han representado simultáneamente los espectros originales (sólo de los últimos diez minutos de cada proceso, una vez llena la celda) de ambas sondas y se hallaron varios artefactos espectrales (no representativos de la muestra) para la sonda ANT en cada uno de los procesos. Este hecho confirma el trabajo de Green *et. al* (25). En cambio, no se halló ningún artefacto en los procesos monitorizados con la sonda LHP, hecho que sugiere que la diferente geometría de las sondas está implicada en el divergente comportamiento de las sondas. Con el fin de descartar un problema inherente al espectrómetro de la sonda ANT, se representaron los espectros de calibración (es decir, espectros estáticos) de ambas sondas y no se halló ningún artefacto espectral. Por tanto, la geometría de LHP permite una mejor monitorización de un FBD.

CAPACIDAD PREDICTIVA

Como se ha comentado, la metodología de perfiles de exactitud es una buena herramienta de decisión sobre la calidad de la determinación cuantitativa y la capacidad predictiva de

las sondas se evaluó en base a ésta. Los perfiles de exactitud para la predicción *offline* son bastante similares para las dos sondas, obteniéndose límites de tolerancia de alrededor del 10% (**figuras 3-34 y 3-35**). En cambio, la comparación de los perfiles *inline* muestra que los de la sonda LHP son claramente superiores a los de ANT (como se puede observar en las **figuras 3-34 y 3-35**), que es realmente lo más importante, ya que el objetivo de los métodos analíticos desarrollados es la predicción *inline*.

A pesar de que los perfiles de exactitud son la herramienta final para la evaluación de un método analítico ya que evalúa el riesgo en futuras medidas, cabe señalar que durante el desarrollo del modelo de calibración los diversos parámetros estadísticos de error (RMSEE, RMSECV y SEV) han sido mucho más estables al cambio de pretratamiento o de región espectral en el caso del LHP, demostrando un mejor comportamiento de esta sonda.

MONITORIZACIÓN DE PROCESO

El comportamiento de las sondas en la monitorización del proceso de secado también fue comparado. Para tal fin se tomaron los experimentos del nivel bajo realizados simultáneamente en las dos sondas (un total de nueve experimentos). Como se ha mencionado anteriormente, se encontraron varios artefactos espectrales en cada experimento con la sonda ANT mientras que no se halló ninguno con la sonda LHP. Además, se halló que, para los experimentos con ANT, los primeros espectros tras el llenado de la celda dibujan un *plateau*, como se ilustra en la **figura 3-36**. Para entender este fenómeno, se representaron también simultáneamente (con ambas sondas), los perfiles de monitorización para los experimentos de nivel alto. Resultó evidente que el modelo de calibración para ANT no era capaz de predecir correctamente valores de concentración de agua superiores al límite superior de calibración. En cambio, en el caso de la sonda LHP, se

Resultados y discusión

obtuvieron perfiles de humedad razonables considerando: a) la tendencia lineal en la etapa de transferencia de calor ($R^2 > 0,99$) y b) la concentración en humedad de los gránulos antes de entrar en el FBD ha estado muy cerca del primer valor predicho después de que la celda estuviera cargada. Así, el método analítico con LHP permite una mejor *comprensión del proceso*.

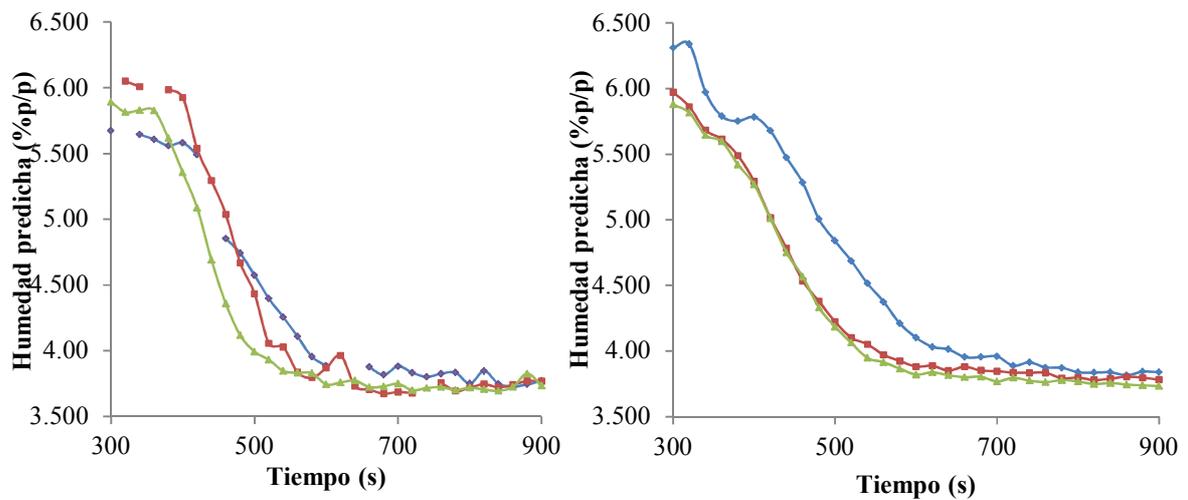


Figura 3 - 36: perfiles de secado predicho para tres lotes ejecutados simultáneamente con ANT (izquierda) y LHP (derecha)

3.6 REFERENCIAS

1. Dahm DJ, Dahm KD. The physics of near-infrared scattering. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2001;2.
2. Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, Pou N. Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses. *Analyst*. 2001;126(7):1129-34.
3. Ely D, Chamarthy S, Carvajal MT. An investigation into low dose blend uniformity and segregation determination using NIR spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006;288(1):71-6.
4. Fearn T, Riccioli C, Garrido-Varo A, Guerrero-Ginel JE. On the geometry of SNV and MSC. *Chemom Intell Lab Syst*. 2009;96(1):22-6.
5. Blanco M, Alcalá M. Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: a contribution to process analytical technologies. *Anal Chim Acta*. 2006;557(1):353-9.
6. Otsuka M, Tanabe H, Osaki K, Otsuka K, Ozaki Y. Chemoinformetrical evaluation of dissolution property of indomethacin tablets by near-infrared spectroscopy. *J Pharm Sci*. 2007;96(4):788-801.
7. Short SM, Cogdill RP, Wildfong PL, Drennen JK, Anderson CA. A near-infrared spectroscopic investigation of relative density and crushing strength in four-component compacts. *J Pharm Sci*. 2009;98(3):1095-109.
8. Arruabarrena J, Coello J, Maspoch S. Enhancing sensitivity and precision on NIR reflectance determination of an API at low concentration: Application to an hormonal preparation. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;60:59-64.
9. Gombás Á, Antal I, Szabó-Révész P, Marton S, Erős I. Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by near infrared spectroscopy (NIRS). *International journal of pharmaceutics*. 2003;256(1):25-32.
10. Franch-Lage F, Amigo JM, Skibsted E, Maspoch S, Coello J. Fast assessment of the surface distribution of API and excipients in tablets using NIR-hyperspectral imaging. *International journal of pharmaceutics*. 2011;411(1):27-35.
11. Shinzawa H, Awa K, Ozaki Y. Compression-induced morphological and molecular structural changes of cellulose tablets probed with near infrared imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 2011;19(1):15.
12. ICH. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. 2005.
13. Tablets, (2013).
14. CDER CfDEaR. Guidance for Industry: Tablet Scoring: Nomenclature, Labeling, and Data for Evaluation. In: Services HaH, editor. Rockville, MD: Food and Drug Administration; 2013.
15. Hill SW, Varker AS, Karlage K, Myrdal PB. Analysis of drug content and weight uniformity for half-tablets of 6 commonly split medications. *J Manag Care Pharm*. 2009;15(3):253-61.
16. Park SC, Kim M, Noh J, Chung H, Woo Y, Lee J, et al. Reliable and fast quantitative analysis of active ingredient in pharmaceutical suspension using Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2007;593(1):46-53.
17. Pharmacopoeia E. 2.2.24. Infrared Absorption Spectrophotometry. *European Pharmacopoeia* 80. Strasbourg2013. p. 38-9.
18. Heinz A, Savolainen M, Rades T, Strachan CJ. Quantifying ternary mixtures of different solid-state forms of indomethacin by Raman and near-infrared spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;32(3):182-92.
19. Arruabarrena J, Coello J, Maspoch S. Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets. *International journal of pharmaceutics*. 2014.
20. Pharmacopoeia E. 2.9.6 Uniformity of Content in Single-Dose Preparations. In: Europe Co, editor. *European Pharmacopoeia* 80. Strasbourg2013.

Resultados y discusión

21. S.J. Fraser KCG. Raman spectroscopy in the study of pharmaceuticals: the problems and solutions to sub-sampling and data analysis. *European Pharmaceutical Review*. 2014;19:27-32.
22. Stewart SP, Bell SE, Fletcher NC, Bouazzaoui S, Ho YC, Speers SJ, et al. Raman spectroscopy for forensic examination of β -ketophenethylamine “legal highs”: Reference and seized samples of cathinone derivatives. *Anal Chim Acta*. 2012;711:1-6.
23. Ekins S, Sasic S. *Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy*: John Wiley & Sons; 2008.
24. Michael B, Michael EA. *Fluidised-bed granulation: A chronology*. Drug development and industrial pharmacy. 1991;17(11):1437-63.
25. Green RL, Thurau G, Pixley NC, Mateos A, Reed RA, Higgins JP. In-line monitoring of moisture content in fluid bed dryers using near-IR spectroscopy with consideration of sampling effects on method accuracy. *Anal Chem*. 2005;77(14):4515-22.
26. De Bleye C, Chavez P-F, Mantanus J, Marini R, Hubert P, Rozet E, et al. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;69:125-32.
27. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36(3):579-86.
28. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—Part II. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(1):70-81.
29. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(1):82-96.
30. Ziémons E, Mantanus J, Lebrun P, Rozet E, Evrard B, Hubert P. Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53(3):510-6.
31. Mantanus J, Ziémons E, Rozet E, Streel B, Klinkenberg R, Evrard B, et al. Building the quality into pellet manufacturing environment—feasibility study and validation of an in-line quantitative near infrared (NIR) method. *Talanta*. 2010;83(2):305-11.
32. *Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis*, E1655-05 (2012).
33. Faber K, Kowalski BR. Improved prediction error estimates for multivariate calibration by correcting for the measurement error in the reference values. *Applied spectroscopy*. 1997;51(5):660-5.
34. Räsänen E, Rantanen J, Jørgensen A, Karjalainen M, Paakkari T, Yliruusi J. Novel identification of pseudopolymorphic changes of theophylline during wet granulation using near infrared spectroscopy. *J Pharm Sci*. 2001;90(3):389-96.
35. Hoffman D, Kringler R. A total error approach for the validation of quantitative analytical methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-64.
36. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158(1):111-25.
37. Mee RW. β -expectation and β -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics*. 1984;26(3):251-4.
38. Morris KR, Stowell JG, Byrn SR, Placette AW, Davis TD, Peck GE. Accelerated fluid bed drying using NIR monitoring and phenomenological modeling. *Drug development and industrial pharmacy*. 2000;26(9):985-8.

Resultados y discusión

Resultados y discusión

4 CONCLUSIONES

Conclusiones

Se han desarrollado nuevas estrategias y metodologías para la determinación de API a través de espectroscopia NIR, espectroscopia Raman y mediante la utilización de herramientas quimiométricas. Las principales conclusiones derivadas del trabajo de investigación presentado en esta memoria se desgranar a continuación.

1. Se ha estudiado la capacidad de distintos pretratamientos espectrales para la minimización de las diferencias entre espectros de muestras pulverizadas y compactadas. La combinación de SNV y segunda derivada ha resultado el pretratamiento que minimiza las diferencias entre las dos presentaciones de muestra.
2. La intensidad de las bandas de los espectros registrados en las muestras compactadas ha resultado sistemáticamente mayor a la de las pulverizadas. Este hecho es coherente con la reducción en el *scattering* de la radiación debido a la compactación, que resulta en un aumento del camino óptico efectivo y en la fracción de masa analizada. Como era de esperar, la compactación hace que los espectros de las muestras de calibración sean más similares a los de producción y aumenta de manera efectiva la sensibilidad, mejorando la precisión en la determinación de los API.
3. Se han desarrollado métodos NIR para la determinación de API a baja concentración en:
 - a. Una formulación compuesta de dos API a baja concentración (valerato de estradiol, 1,6% p/p y acetato de medroxiprogesterona, 8% p/p).
 - b. Una formulación de warfarina sódica disponible en cuatro dosificaciones (de 1 a 10 mg por comprimido, representando concentraciones entre 1 y 5% p/p) con un modelo de calibración único para todas las dosificaciones.

En ambos casos, el registro espectral se realizó con muestra intacta y la precisión y exactitud han sido comparables a las del método HPLC de referencia.

4. Se ha desarrollado un método Raman sencillo y fiable para la determinación de warfarina, medicamento que necesita un estricto control de contenido en sus preparaciones comerciales, no sólo en comprimidos enteros de las distintas dosificaciones, sino también en las potenciales fracciones que sugieren las marcas de división presentes en los comprimidos. A pesar de que la estimación de contenido en API en potenciales fracciones de un comprimido divisible no sea actualmente obligatoria, es evidente la necesidad de asegurar la toma de la dosis prescrita por parte del paciente por lo que, tarde o temprano, los organismos regulatorios adoptarán una decisión a este respecto.
5. Se ha estudiado la homogeneidad de distribución de warfarina sódica en la superficie e interior de un preparado comercial a nivel macroscópico y a nivel microscópico y se han comparado los resultados. A pesar de que la sonda macroscópica ofrece mejores resultados cuantitativos debido a su mayor superficie muestreada, la sonda microscópicas ofrece posibilidades complementarias:
 - a. Permite estudiar la distribución de API en diferentes partes del comprimido (núcleo o exterior).
 - b. Permite detectar pequeños aglomerados.
 - c. Se obtiene una mayor relación señal-ruido, lo que permite obtener intervalos de confianza más estrechos en la estimación de tamaño de aglomerado.

Conclusiones

6. Se han comparado dos sondas NIR en la monitorización de la humedad durante el proceso de secado en un secador de lecho fluido (FBD) operando en continuo mediante la metodología estadística de los intervalos de tolerancia esperados β . Así,
 - a. Se ha aplicado con éxito la metodología de validación de intervalos de tolerancia esperados β a un método multivariante NIR *in-line*.
 - b. Se ha demostrado que es posible desarrollar modelos NIR de calibración para la determinación de humedad *in-line* robustos y validados sin necesidad de perturbar el FBD.
 - c. La comparación entre sondas muestra que los resultados *offline* (registro espectral estático) son muy similares, en cambio, los resultados *inline* (registro espectral dinámico) muestran que la sonda LightHouse (siete ventanas) es muy superior a la sonda Antaris (1 ventana) en el registro *inline* ya que no presenta artefactos espectrales durante monitorización y los perfiles de secado son más consistentes.

5

ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

1. Enhancing sensitivity and precision on NIR reflectance determination of an API at low concentration: Application to an hormonal preparation
2. NIR reflectance determination of warfarin in a solid preparation commercialized at different API mass proportions
3. Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets
4. NIR spectroscopic method for the in-line moisture assessment during drying in a six-segmented fluid bed dryer of a continuous tablet production line: validation of quantifying abilities and uncertainty assessment (aceptado)



Enhancing sensitivity and precision on NIR reflectance determination of an API at low concentration: Application to an hormonal preparation

J. Arruabarrena, J. Coello, S. Maspoch*

Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2011

Received in revised form 21 October 2011

Accepted 24 October 2011

Available online 29 October 2011

Keywords:

NIR reflectance

Precision

Scattering

Hormone

Sensitivity

ABSTRACT

The use of a mixed calibration sample set (intact production tablets and powdered doped samples used to enlarge calibration range) is a usual procedure for the NIR reflectance determination of the API content of a pharmaceutical solid preparation. However, the high difference in scattering properties and the intrinsic low sensitivity of NIR make difficult the achievement of a good precision when API is at a low mass proportion ($\approx 1\%$, w/w). The compression of the calibration powdered samples has been studied as a very simple procedure to enhance the sensitivity of NIR reflectance measurements and, consequently, to improve precision. Different pretreatments (SNV, 1D, 2D and their combinations) have been applied to reduce the spectral difference between powdered and compressed samples. Although none eliminates completely this difference, the combined pretreatment SNV + 2D has proved to be the one with a better performance. Results obtained by using both calibration sample sets (powdered and compacted) in the quantification of estradiol valerate (VE, 2 mg/tablet, $\approx 1.6\%$, w/w) and medroxyprogesterone (MPA, 10 mg, $\approx 8\%$, w/w) in intact tablets of the hormonal preparation show that a slight but significant improvement in precision is obtained when using compacted samples for calibration. A HPLC procedure was developed to be used as reference method.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) has become an essential technique on the process quality assurance of many industries, especially on pharmaceutical [1]. NIR spectroscopy has several advantages over classical analytical techniques: there is no residue generation, a very important fact in green chemistry era; any sample presentation is allowed [2,3], the result of the analysis can be obtained immediately (live control of a process can be performed, not only final product control) [4], it is a versatile technique that can be used to analyze many different sample forms (gels, powdered, tablets, ...), it can be used for the determination of both physical and chemical parameters [5,6], it is a fast and non-destructive technique, etc. Nevertheless, it is clear that its popularity as analytical tool in the pharmaceutical industry comes from the possibility of analyzing solid samples, powdered or intact tablets, just measuring their reflectance spectra or, in a less extent, the transmission ones.

There is not a global accepted theory describing the radiation absorption of a scattering material. The best known approach is the so called, Kubelka–Munck (K–M) function; Eq. (1). Recently,

several authors have suggested new approaches [7] although the final equations are very similar and only the interpretation of the terms used changes slightly.

$$f(R) = \frac{1 - R_{\infty}}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} \quad (1)$$

In K–M function, the reflectance of an “infinite thick sample” (R_{∞}), i.e. the reflectance of a sample where transmittance can be neglected and considered null, is related to the ratio between two fundamental optical properties expressed as the absorption (K) and scattering (S) coefficients. Because of the practical and theoretical limitations of K–M approach [8] most analysts prefer to use a purely experimental approach, translating to reflectance the classical Beer–Lambert–Bourget's law; Eq. (2).

$$A_{\text{apparent},\lambda} = \log \frac{1}{R} = \log \frac{1}{R_{\text{sample}}/R_{\text{ref}}} = a_{\lambda} \cdot f \cdot c = k \cdot c \quad (2)$$

where the relative reflectance (R) is the ratio of the absolute reflectance of the sample (R_{sample}) and the reflectance of the reference (R_{ref}); a_{λ} is the term associated with the chemical information; f is the optical pathlength and c is the concentration. The expression can be summarized to $A_{\text{apparent},\lambda} = kC$, assuming the pathlength to be constant for different samples. However, this fact is almost never completely true since it depends, in a complex way, on the physical properties of the samples (refraction index, ratio between

* Corresponding author. Tel.: +34 935811011; fax: +34 935812379.

E-mail address: santiago.maspoch@uab.es (S. Maspoch).

wavelength and particle size, compressing degree, sample surface, particle distribution. . .). Hence, small changes in the proportional constant k , have to be expected from sample to sample. These changes are usually referred as “changes in scattering” and are mainly visualized as a spectral baseline shift or drift. If the scattering can be considered constant for different samples, the apparent absorbance ($\log 1/R$) can be linearly related to the concentration of the analyte. Since it is rather difficult in practice, several spectral pretreatments (derivatives, Standard Normal Variate. . .) are usually applied to reduce these variations [9] and improve the calibration/prediction performances.

A stable calibration model requires to be developed on a wide range of the independent variable (i.e. concentration range of the analyte). This is a very serious problem in many industrial applications and especially in pharmaceutical analysis, where samples have a very narrow concentration interval around the nominal value due to their very reproducible production.

It is clear that the best procedure to prepare calibration samples with the physical properties of the commercial ones would be to produce the calibration samples exactly as the commercial are prepared (i.e. in the production or at least in a pilot plant). However, this procedure is very expensive and has only been exceptionally used [10]. A classical approach is the preparation of calibration samples in the analytical laboratory mixing the ingredients (active pharmaceutical ingredient [API] and excipients) in different proportions. In order to introduce the physical characteristics and the variability of the commercial preparation into the calibration model, several tablets from different production batches are included in the calibration set, just producing a mixed sample set (powdered samples to extend concentration range plus tablets to introduce production variability) [11]. A slightly different approach is to grind some production tablets and to over and under-dose by adding a known amount of API or a mixture of excipients, following a prefixed design to reduce collinearity. Since the powder from ground tablets still retains some of the production physical properties, this approach produces a calibration set much more similar to the production samples than the previous one [12]. However, as production samples have been employed, a reference method to quantify the actual content of API must be used.

NIRS sensitivity is not very high and the precise quantification of an API content at a mass proportion of about 1% (w/w) can be troublesome [13,14]. In these cases, the selection and preparation of samples must be carried out following a very precise methodology and the traditional ways do not seem to be the best ones to achieve the required sensitivity and precision. A reasonable approach is to reduce the noise in the calibration sample set minimizing the scattering differences between samples.

A powdered sample presents a higher scattering than a compressed one [15]. This is a problem in quantifying low content tablets, because the “effective pathlength” is smaller and consequently the sensitivity decreases.

The aim of this work is to report a NIR reflectance procedure to quantify the API content in a commercial hormone preparation (Perifem) which contains two APIs: medroxyprogesterone acetate (MPA) (at a mass proportion of aprox. 8%, w/w) and estradiol valerate (VE) (at a mass proportion of aprox. 1.6%, w/w). Since we know, these analytes have not been previously determined by a NIR procedure.

Two procedures to prepare the calibration sample set are assayed and compared. The first one is the above described mixed procedure of over- under-dosed powdered samples with intact commercial tablets. In a second one, these powdered samples are compressed by using a typical laboratory press to produce what is named “compressed calibration samples”. Also several spectral pretreatments commonly used to reduce scattering are assayed and the results compared.

2. Materials and methods

2.1. Instruments and software

Near infrared spectra were recorded on a NIRSystems 5000 spectrophotometer (FOSS, NIRSystems, MN, USA) equipped with a Rapid-Content Analyzer (RCA) module. HPLC reference method was performed by using an Agilent 1100 (Santa Clara, CA, USA), coupled to a G1315B DAD detector ($\lambda = 280$ nm) and a 25 cm long, 4.6 mm internal diameter SymmetryShield RP18 column. UV-Vis spectra of pure active compounds were acquired on a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) 8453A spectrophotometer. A Turbula T2C shaker mixer from WAB (Basel, Switzerland) was used for blending doped samples. Laboratory compressed tablets were prepared on a Perkin-Elmer 15.001 (Waltham, MA, USA) press, with a cross-section of 132.7 mm². Multivariate models were built up with the aid of Unscrambler X (Trondheim, Norway).

2.2. Production samples

Perifem[®] (Organon, Barcelona, Spain) samples from three different batches were directly purchased in different pharmaceutical stores. Each box contains a total of 21 uncoated pills, 11 of them colored in white and 10 in blue. Label claim for APIs are 2 mg of estradiol valerate (VE) in white pills and 2 mg of VE and 10 mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) in the blue ones, which represents a mass proportion of approximately 1.6% and 8%, respectively. Corn starch and lactose monohydrate are used in both cases as major excipients together with other minor excipients.

2.3. Laboratory samples

Under and over dosing of powdered production samples was used to enlarge the APIs concentration range from 75% to the 125% of the nominal concentration. In order to minimize the correlation between APIs and excipients, three different mixtures of the two major excipients were prepared (3:1, 1:1, 1:3, w/w). Three different samples were prepared at each concentration level (75, 88, 112 and 125% (w/w) of the nominal value) with each excipient mixture. Since blue pills contain two active compounds, the calibration sample set was prepared independently to each one, maintaining the second API at the nominal value. Other seven samples with different concentrations inside the calibration range were also prepared to be used as validation samples (in each calibration set).

The shaking time needed to reach sample homogenization was studied. Known amounts of powdered production samples and lactose monohydrate were introduced into the turbula shaker and were shaken for a total time of 40 min; an NIR spectrum was recorded every 5 min and the root mean squared difference between successive spectra was computed. The minimum was reached between 20 and 25 min. Hence, a shaking time of 22 min was established for the preparation of all laboratory samples.

2.4. NIR procedure

The goal was to record the spectrum of the same sample in two different solid presentations: compressed and powdered. Hence, powdered production samples were mixed with active compounds and/or excipients to over and under dose the samples following the design described above. After homogenization, every sample was poured into a 10 mm internal diameter glass Petri plate and the NIR spectrum acquired. Immediately, 300 mg of the powdered mixture was compressed to 739 MPa and the NIR spectrum of the tablet recorded. Previously, the amount of powder necessary to ensure that the thickness of compressed tablet was enough to avoid light transmission had been evaluated and estimated to be

Table 1

Effect of the spectral pretreatment in the difference between powdered and compressed spectra, computed according to Eq. (2). b_i refers to the differences between powdered and compressed spectra of a sample. B_m is a measure of instrumental reproducibility.

	Abs	SNV	1D ^a	2D ^b	2D + SNV ^c	SNV + 2D ^b
b_1	583.5	59.8	58.5	56.9	24.4	22.4
b_2	1184.9	60.9	57.1	79.0	41.1	31.9
b_3	173.0	74.0	60.1	87.2	31.0	35.7
b_4	160.7	69.2	61.4	111.3	55.6	45.0
b_5	638.1	31.1	117.5	79.2	20.2	32.0
B_m	0.4	4.5	25.9	6.2	10.5	6.2

Wavelengths removed from calculation (see text).

^a 1314 nm and 1432 nm.

^b 1314, 1432 and 1528 nm.

^c 1164, 1314, 1460 and 1528 nm.

around 250 mg. Given the press diameter, 2.5 mm thick tablets were produced. Measurements were made on diffuse reflectance mode, using the RCA module. The spectrum of each sample, in the 1100–2500 nm range, was recorded three times as the average of 32 automatic scans; the powder was removed between each recording and the tablet rotated. The average spectrum was computed and used in following calculations.

Following the same procedure, the spectra of 37 production intact tablets (20 white and 17 blue) were acquired and the APIs content determined by HPLC. These spectra were split up in calibration and validation sets. For that purpose a PCA was computed and calibration samples selected in order to cover the maximum of variability.

2.5. HPLC reference method

The reference method was developed from a previous work [16] just changing acetonitrile by methanol and increasing the proportion of organic solvent in the mobile phase to obtain acceptable retention times. The final chromatographic conditions were: (a) NH_4NO_3 (pH 5.7 ± 0.1 ; 0.07 M)–MeOH (10:90, v/v) mobile phase. (b) An elution temperature of 25 °C (the column was introduced into thermostated chamber). (c) $\lambda = 280$ nm. (d) 20 μL injection volume. Under these conditions MPA's retention time was 3.2 min and VE's retention time was 7.4 min. All solutions were filtered through a nylon membrane (0.45 mm).

2.6. Quantification

Six different calibration models were developed, one for each active compound, kind of tablet and sample presentation. PLS1 algorithm, constructed by leave-one-out cross-validation procedure was used in all cases. For each wavelength range, the number of latent factors was chosen as the lowest producing a Standard Error of Calibration (SEC) close to 1% of the average analyte concentration (value chosen as an approximate value of the precision of the reference values) and a slope and intercept of the found vs reference plot close to one and zero, respectively.

3. Results and discussion

The very different scattering properties of the intact production samples and the powdered doped samples used to enlarge the calibration range is one of the inherent problems involved in using a mixed calibration sample set. That can be overcome by powdering the commercial product, but reduces considerably the sampling throughout and makes difficult its application in quality control of production batches. A method, to be really applicable, must analyze the samples with the minimum pretreatment, and ideally without any. Taken this into account, mixed (intact production-powdered dosed samples) were already proposed some years ago

[12,17]. However, when the API contribution to the sample spectra is low, because of a low content or a low absorptivity, and since the sensitivity of NIR is not very high, a precise determination may become troublesome. In order to increase the precision, we have evaluated different spectral pretreatments to find which one better reduces the scattering differences between powdered and compressed samples; also, we have studied the effect of compressing powdered calibration samples with a usual press that can be found in many laboratories. The underlying hypothesis is that the compression of calibration samples would decrease the scattering differences between production and calibration samples and that this should drive to a slight increase of the effective optical path. As a result, an enhancing of precision should be expected.

3.1. Effect of spectral pretreatments

To evaluate the capability of different pretreatments to remove the spectral differences due to the physical presentation (i.e. the scattering properties), several production samples were powdered, the NIR spectrum of the powder was acquired, then compressed and finally the NIR spectra of the samples were acquired again. Hence, the spectra of the “same” (understood as same chemical composition) sample in the two different physical forms were obtained. That procedure was repeated five times.

The first parameter used to evaluate similarity between spectra was the correlation coefficient, but the correlation was very high in all cases. Furthermore, this parameter measures the similarity between spectral profiles, but does not reflect “quantitative” information between spectra with the same profile but different intensity. This quantitative information was obtained from the sum of the squared relative differences at every wavelength Eq. (3), which is used to compute the b value of each sample. In order to have a target value to be used as a comparative reference of the lowest value that can be expected after each pretreatment, a similar parameter was computed, B_m (according to Eq. (4)) just comparing the differences in spectra for the same sample in different days. In fact, B_m was computed as the mean value of five production samples. These samples were stored in a desiccator before and between spectral acquisitions to prevent alterations of spectra due to humidity absorption. The results showed (Table 1) that any pretreatment made the spectra of powdered and compressed samples exactly identical and that SNV + 2D is the pretreatment that minimizes the differences, although 2D + SNV performed in a very similar way. It must be noted that derivatives transform some signal values to near 0, which can have a wicked effect on the quotient. Consequently, some wavelength (as indicated in Table 1) should be taken out. It was surprising that the B_m value for SNV spectra was higher than the B_m for the raw data. This can be explained by the presence of broad spectral ranges with signal values near 0. In those intervals, quotient's values $((X_{\text{day 1}}^{\text{production}} - X_{\text{day 2}}^{\text{production}})/X_{\text{day 1}}^{\text{production}})$ were clearly higher than average. Since it is an artifact produced by the

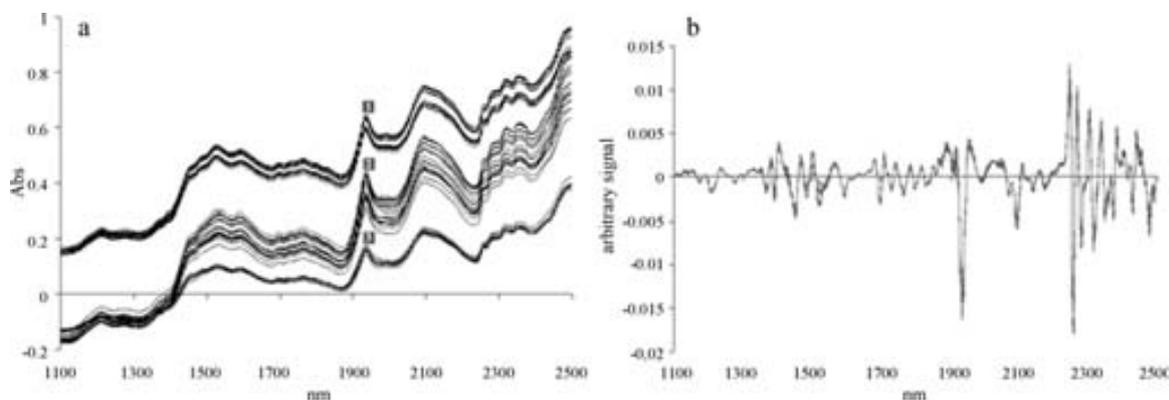


Fig. 1. (a) Raw spectra of production (1), powdered (2) and compressed (3) samples. (b) The same spectra after SNV + 2D.

treatment itself, those bands were not removed. Other artifacts produced by SNV, non linearity and band variability shift, have been already reported [18,19]. In the case of derivatives, only individual wavelengths had exaggerated values of the quotient, so their effect was suppressed just taking those wavelengths out of calculation, as indicated in Table 1.

$$b_m = \sqrt{\sum_{l=1}^n \left(\frac{X_l^{\text{compressed}} - X_l^{\text{powdered}}}{X_l^{\text{powdered}}} \right)^2} \quad (3)$$

$$B_m = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \left(\frac{X_{\text{day 1}}^{\text{production}} - X_{\text{day 2}}^{\text{production}}}{X_{\text{day 1}}^{\text{production}}} \right)^2} \quad (4)$$

where $X^{\text{compacted}}$ is the signal of the compacted sample at each wavelength and X^{powdered} refers to the same parameter in powdered samples. Fig. 1 shows (a) the raw spectra of white tablets' samples from production, compressed and powdered, and (b) the same spectra after the above mentioned SNV + 2D pretreatment. The differences in scattering properties are clearly observed in the raw spectra. Production samples show a small but significant difference between two groups of spectra, corresponding to different production batches. That difference can be attributed to a different compaction pressure [20]. Spectra of laboratory compacted samples are practically parallel to the spectra of production samples, and also this difference can be attributed to the differences in press pressure. Powdered samples show a higher dispersion and a change in the spectral slope, produced for the very different scattering properties. On the other hand, it must be pointed out that although SNV + 2D is the pretreatment that minimizes differences between spectra, some significant differences are found towards water absorption bands (1440 and 1940 nm). Even though spectra were recorded as soon as possible, the whole process (milling, doping, homogenization, spectra recording, compressing, ...) needed several hours; it seems clear that during that time the sample absorbed some humidity from the laboratory environment, just introducing a sort of "artificial" differentiation between samples. Due to that, the spectral wavelength ranges of 1400–1500 and 1900–2000 nm were deleted in some of the subsequent calculations.

3.2. Compressing effect

The relationship between compaction pressure and scattering properties of pharmaceutical samples has been studied by different authors [21,22]. It has been proved that increasing pressure, reduces the sample scattering and consequently, increases the effective pathlength or, expressing the same concept in other

words, the analyzed effective mass of the sample increases. A practical consequence of this (assuming the validity of Eq. (2)) should be an increase of sensitivity. In order to prove this hypothesis, some production samples were grinded; NIR spectra of the powders were recorded, the samples were compressed and their NIR spectra were acquired again. Hence, the spectrum of exactly the same sample was acquired in both physical presentations. To remove the effect of the different "slope", in order to enable the visual evaluation of overlapped spectra, the 2nd derivative of both spectra was computed. Absolute value of both spectra was plotted overlapped (Fig. 2). As can be seen, the signal is greater for compressed samples all along the spectra in a systematical way. A comparison between peak maxima of both, compressed and powdered samples in Fig. 2, shows that the increment of intensity is independent of wavelength, so it can be attributed to an increase of effective optical path length of 2.0 ± 0.1 . Similar results were found in all assayed samples.

3.3. API determination

Quantitative models have been developed using SNV + 2D as spectral pretreatment. Several wavelength ranges were assayed, namely: the whole spectra, the whole spectra removing water bands (each one or both), and the short range 1100–1300 nm. Although the latter could be considered too narrow, it must be pointed out that both APIs show a characteristic band in that region, whereas the absorption bands of excipients are less intense in this region than at longer wavelengths. In order to illustrate this fact,

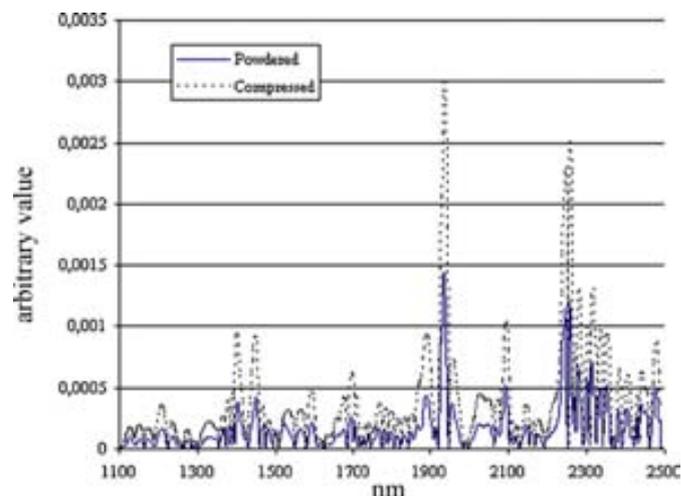


Fig. 2. Absolute values of 2D spectra of a powdered and compressed blue tablet.

Table 2

Figures of merit found with the best models for the determination of VE in white tablets using powdered and compressed samples. The wavelength range for compressed samples calibration model was from 1100 to 1300. For powdered samples spectral range was 1100–1400, 1500–1900 and 2000–2450 nm.

	Compressed		Powdered		
	Cal	Pred	Cal	Pred	
PLS factors		6		6	
Number of samples	21		21		16
Slope	0.99 ± 0.03		1.04 ± 0.08		0.91 ± 0.10
Intercept (mg/100 mg)	0.02 ± 0.04		-0.07 ± 0.14		0.14 ± 0.15
SEC/SEP (mg/100 mg)	0.027		0.042		0.056

Table 3

Figures of merit found with the best models for the determination of VE in blue tablets using powdered and compressed samples. In all cases, the spectral range was 1100–1400, 1500–1900 and 2000–2450 nm.

	Compressed		Powdered		
	Cal	Pred	Cal	Pred	
PLS factors		5		5	
Number of samples	18		18		13
Slope	0.97 ± 0.04		0.93 ± 0.10		0.98 ± 0.10
Intercept (mg/100 mg)	0.05 ± 0.07		0.09 ± 0.16		0.03 ± 0.25
SEC/SEP (mg/100 mg)	0.042		0.039		0.062

Table 4

Figures of merit found with the best models for the determination of MPA in blue tablets using powdered and compressed samples. In all cases, the spectral range was 1100–1400, 1500–1900 and 2000–2450 nm.

	Compressed		Powdered		
	Cal	Pred	Cal	Pred	
PLS factors		3		3	
Number of samples	17		19		16
Slope	1.00 ± 0.01		0.98 ± 0.03		1.10 ± 0.09
Intercept (mg/100 mg)	0.03 ± 0.10		0.12 ± 0.24		-0.84 ± 0.72
SEC/SEP (mg/100 mg)	0.101		0.204		0.260

a binary sample spectrum (API and major excipient) was computed, assuming an equivalence between the concentration and absorbance ratio, pre-treated with SNV followed by 2D. VE concentration was fixed at its nominal value (1.6%) and major excipients (98.4%); the ratio between the area (sum of absolute intensities) for API and for the sample at 200 nm intervals was computed (Fig. 3). Even though it can be just considered a rough estimation, it clearly shows that the participation of API to the total sample absorbance is higher between 1100 and 1300 nm.

Figures of merit of the developed calibration models are shown in Tables 2–4. To simplify, only results for the best calibration models are shown, although it must be pointed out that in some cases rather similar results were found by using different

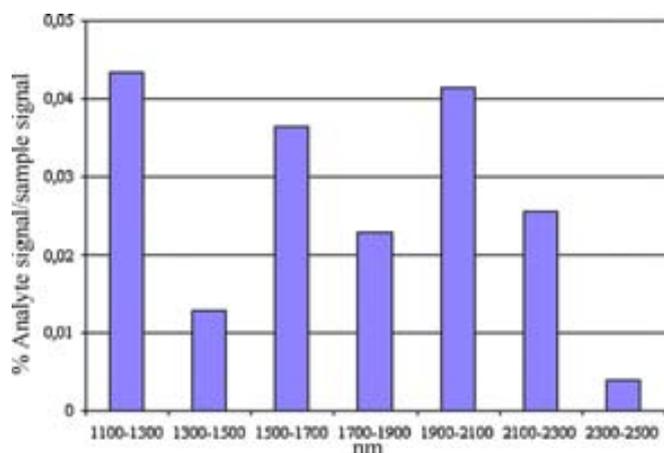


Fig. 3. Relative spectral contribution of VE (at nominal concentration) on a major excipient matrix.

wavelength ranges with no statistically significant differences between them.

It must be pointed out that reasonably good models can be obtained in all cases and that VE needs 5–6 factors to be modeled, while MPA needs only 3. That difference can be clearly attributed to the difference in concentration between both APIs. However, the most relevant fact extracted from these tables is that best precision (lower SEP values, narrower confidence interval for intercept and slope) is always reached using compressed calibration samples. This is coherent with the situation described above: an expected higher sensitivity to the models built with compressed doped samples, what drives to a lower dispersion of the prediction values.

Tables 5–6 show the results obtained for the production samples of the prediction set. No significant difference between NIR and HPLC values were obtained (paired *t* test)

Table 5

Determination of VE in individual commercial white samples. Nominal value: 2 mg VE/tablet. All results expressed in mg VE/tablet.

Mass (mg)	HPLC	NIR	Δ^a
119.3	1.91	1.98	0.07
118.7	1.89	1.91	0.02
118.8	1.91	1.87	-0.04
118.8	1.90	1.96	0.06
119.7	1.91	1.88	-0.03
119.6	1.93	1.89	-0.04
120.1	1.91	1.88	-0.03
120.8	1.91	1.93	0.02
120.9	1.91	1.91	0.00
		t_{exp}	0.23
		mean	0.00
		sd	0.04

^a NIR mass – HPLC mass.
 t_{crit} : 2.31; α = 0.05; n = 9.

Table 6
Determination of MPA in individual commercial blue samples. Nominal values: 2 mg VE and 10 mg MPA/tablet. All results expressed in mg API/tablet.

Mass (mg)	HPLC	NIR	Δ^a
VE			
117.0	1.84	1.87	0.03
117.9	1.85	1.87	0.02
117.5	1.86	1.84	-0.02
119.8	1.91	1.88	-0.03
117.7	1.88	1.83	-0.05
118.0	1.89	1.87	-0.02
119.7	1.92	1.89	-0.03
119.2	1.93	1.91	-0.02
		t_{exp}	0.30
		Mean	-0.01
		sd	0.03
MPA			
117.0	9.36	9.30	-0.06
117.9	9.43	9.34	-0.09
117.5	9.44	9.50	-0.06
119.8	9.66	9.72	0.06
117.7	9.51	9.51	0.00
118.0	9.48	9.37	-0.11
119.7	9.73	9.66	-0.07
119.2	9.74	9.85	0.11
		t_{exp}	0.41
		Mean	-0.03
		sd	0.08

^a NIR mass – HPLC mass.

t_{crit} : 2.36; α = 0.05; n = 8.

4. Conclusions

Although no pretreatment was found to be able to completely remove the spectral differences between powdered and compressed samples, SNV followed by 2D has been demonstrated to be the spectral pretreatment that better minimizes them.

In the whole wavelength range, the spectrum of a compressed sample shows higher band intensities than that of a powdered one. This is consistent with the reduction of light scattering and, consequently, the increase of the effective path length and the mass fraction measured in compressed samples. As expected, compression makes the spectra of calibration samples more similar to those in production and increases effectively the sensitivity, improving the precision in the determination of both APIs.

It has also been demonstrated that hormones can be determined in intact tablet by near infrared diffuse reflectance spectroscopy with an accuracy and precision comparable to a standard HPLC procedure.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Innovation (MICINN) for funding this research within the framework of Project CTQ2007-62528.

References

- [1] J. Luypaert, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis, *Talanta* 72 (2007) 865–883.
- [2] M. Andersson, O. Svensson, S. Folestad, M. Josefson, K. Wahlund, NIR spectroscopy on moving solids using a scanning grating spectrometer-impact on multivariate process analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 75 (2005) 1–11.
- [3] M. Fuentes, I. Gonzalez-Martin, J.M. Hernandez-Hierro, C. Hidalgo, B. Govaerts, J. Etchevers, K.D. Sayre, L. Dendooven, The natural abundance of ¹³C with different agricultural management by NIRS with fibre optic probe technology, *Talanta* 79 (2009) 32–37.
- [4] A. Peinado, J. Hammond, A. Scott, Development, validation and transfer of a Near Infrared method to determine in-line the end point of a fluidised drying process for commercial production batches of an approved oral solid dose pharmaceutical product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 13–20.
- [5] R. Zornoza, C. Guerrero, J. Mataix-Solera, K.M. Scow, V. Arcenegui, J. Mataix-Beneyto, Near infrared spectroscopy for determination of various physical, chemical and biochemical properties in Mediterranean soils, *Soil Biol. Biochem.* 40 (2008) 1923–1930.
- [6] H. Wu, M.A. Khan, Quality-by-Design (QbD): an integrated process analytical technology (PAT) approach for real-time monitoring and mapping the state of a pharmaceutical coprecipitation process, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1516–1534.
- [7] D.J. Dahm, K.D. Dahm, Representative layer theory for diffuse reflectance, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 647–654.
- [8] D.A. Burns, E.W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2001.
- [9] D. Sun, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 1st ed., Academic Press, Salt Lake City, 2009.
- [10] N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.R. Smith, Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets, *Analyst (Cambridge, U.K.)* 126 (2001) 2207–2211.
- [11] M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 97 (2007) 1236–1245.
- [12] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, N. Pou, Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses, *Analyst (Cambridge, U.K.)* 126 (2001) 1129–1134.
- [13] P. Chalus, Y. Roggo, S. Walter, M. Ulmschneider, Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets, *Talanta* 66 (2005) 1294–1302.
- [14] E. Ziemons, J. Mantanus, P. Lebrun, E. Rozet, B. Evrard, P. Hubert, Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 510–516.
- [15] M. Blanco, A. Peguero, Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 59–65.
- [16] A. Segall, F. Hormaechea, M. Vitale, V. Perez, M.T. Pizzorno, Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of estradiol valerate and medroxyprogesterone acetate in a tablet formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 803–808.
- [17] M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalá, API determination by NIR spectroscopy across pharmaceutical production process, *AAPS PharmSciTech* 9 (2008) 1130–1135.
- [18] T. Fearn, C. Riccioli, A. Garrido-Varo, J.E. Guerrero-Ginel, On the geometry of SNV and MSC, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2009) 22–26.
- [19] T. Fearn, Interaction between Standard Normal Variate and derivatives, *NIR News* 19 (2008) 16–17.
- [20] M. Blanco, M. Alcalá, Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353–359.
- [21] M. Otsuka, H. Tanabe, K. Osaki, K. Otsuka, Y. Ozaki, Chemoinformetrical evaluation of dissolution property of indomethacin tablets by near-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 788–801.
- [22] W. Kessler, D. Oelkrug, R. Kessler, Using scattering and absorption spectra as MCR-hard model constraints for diffuse reflectance measurements of tablets, *Anal. Chim. Acta* 642 (2009) 127–134.

NIR reflectance determination of warfarin in a solid preparation commercialized at different API mass proportions

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, **5**, 3858

J. Arruabarrena, J. Coello and S. MasPOCH*

Due to the need of accurate control of their therapeutic doses, warfarin-containing medicines are marketed in preparations with low, but different warfarin contents. A single near infrared reflectance procedure is proposed for warfarin determination in four different doses of a commercial preparation, with PLS as multivariate calibration tool and with an active pharmaceutical ingredient proportion ranging from one to five per cent of mass tablet. A mixed calibration sample set, composed of commercial samples and laboratory compacted tablets was prepared. In order to achieve suitable accuracy and precision, the difference in scattering between laboratory and commercial tablets was reduced by studying the effect of the compaction pressure. Also a spectral pre-treatment was applied, consisting of a second derivative followed by the Standard Normal Variate (SNV) normalization of the derivative spectra. The wavelength range 1480–1560 nm had to be deleted since a shift of an absorption band of lactose was detected after tablet compaction under laboratory conditions. No significant differences were found between the NIR prediction and HPLC reference data of the validation sample set.

Received 22nd March 2013

Accepted 10th May 2013

DOI: 10.1039/c3ay40488a

www.rsc.org/methods

1 Introduction

Near-infrared spectroscopy is currently a key quality assurance technique in many industrial fields, particularly in the pharmaceutical field.^{1,2} This is a direct result of the major advantages of NIR over other analytical techniques which can be summarized by easy sample preparation without any sample pre-treatment, possibility of obtaining results in almost real time (process control), and the prediction of several chemical and physical sample parameters from one single spectrum. Consequently, it is not surprising that NIR has been essential in the development and consolidation of FDA's Process Analytical Technology (PAT) initiative.³

In the development of an NIR quantitative method for an Active Pharmaceutical Ingredient (API) determination, and due to the narrow concentration range of production samples, laboratory prepared calibration samples are needed to expand the concentration range of the analyte and to produce a robust calibration model. A straightforward and well-known strategy is to prepare the calibration samples using ground production samples, over and under dosing a carefully weighed portion of these powdered samples with excipients and API.^{4,5} An appropriate design to reduce the correlation between analyte and excipient concentrations must be followed.^{4,6}

Absorption and scattering of radiation are the two basic events that occur when a solid medium is illuminated by an NIR light source. Absorption is mainly dependent on chemical composition and scattering is mainly related to physical properties (particle size, refraction index, sample surface, particle distribution,...).⁷

To encompass both composition and physical production differences, the use of a mixed calibration sample set, composed of a set of production samples, selected from different batch productions, and powdered laboratory samples has been recommended, and can be considered the most used procedure nowadays. The use of spectral pre-treatments to reduce scattering differences between laboratory and production samples and between samples from different batches is mandatory.

However, the dual dependence of the NIR spectrum on the chemical and physical properties of the analysed sample may pose severe analytical problems when the target is the accurate and precise determination of an analyte at low mass proportion in a solid sample. Because of the inherent low sensitivity of NIR spectroscopy, when the analyte concentration is on the borderline of a major component concentration ($\approx 1\%$ w/w) a precise determination may be troublesome.⁸ Transmission geometry has been suggested to be powerful for the quantitation of low content tablet as it is less sensitive to sample inhomogeneity.^{9,10} It seems clear that the reduction of the scattering differences between laboratory samples and commercial

Department de Química, Unitat Química Analítica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Fax: +34 935812477; Tel: +34 935811017. E-mail: santiago.masPOCH@uab.cat

samples should improve the model performances. Recently, it has been reported¹¹ that the compression of the powdered laboratory samples produces a slight but significant improvement in precision.

It is known that NIR spectra of compressed tablets contain information about the compaction pressure as was demonstrated by Guo *et al.*,¹² and it can be used to estimate the compaction pressure by means of a PCA projection.¹³ Also tablets compacted at different pressure have been used to develop a robust in line NIR procedure of tablet production.¹⁴ Consequently, in order to reduce the scattering differences between production and laboratory tablets, the pressure used to compact them should also be taken into account.

Warfarin is a widespread medicine since it was first commercialized in the late fifties. It is a synthetic derivative of dicoumarol and works as an antagonist of vitamin K, acting on the liver to decrease the quantity of a few key proteins in blood that allow blood to clot. It is usually prescribed to patients with thrombosis or embolism risk. Due to the risk of bleeding, the daily dose must be under strict control.¹⁵ A usual strategy to make the adjustment of doses of anticoagulant drugs possible, involves the commercialization of preparations with different API content.

In this work an NIR calibration model was developed for the intact tablets of Aldo-Cumar® (AC); this medicine is available in four doses of 1, 3, 5, and 10 mg per tablet, corresponding to mass proportions of 1, 3, 5 and 4% (w/w), respectively. As far as we know, non-destructive spectroscopic techniques have only previously been used to characterize the solid-state of warfarin, not for quantification purposes.¹⁶

A mixed calibration sample set has been used with PLS as calibration method, and, in order to increase precision, not only have the laboratory samples been compacted, but also the effect of the compacting pressure has been studied. It must be pointed out that during the preparation of calibration samples a shift of an absorption band of lactose was detected. However, a diffraction X-ray analysis did not confirm a change in the crystalline structure of lactose.

2 Materials and method

2.1 Materials

Sodium warfarin (WarfNa) clathrate is in the same crystalline form as it is present in the commercial samples (Aldrich) and α -D-lactose (Acros) and PH-101 microcrystalline cellulose (Fluka) as major excipients were used to prepare calibration samples. Pure warfarin (Chem Service, 99.5% purity) was used as analytical standard in the HPLC method, and acetonitrile (ACN) (Fluka, HPLC grade) and H₃PO₄ 50% (Panreac, Barcelona, Spain) to prepare the mobile phase.

2.2 Instruments and software

Near infrared spectra were recorded on an NIRSystems 5000 spectrophotometer (FOSS, NIRSystems, Laurel, MD, USA) equipped with a Rapid-Content Analyzer (RCA) module. The HPLC reference method was performed by using an Agilent

1100 (Santa Clara, CA, USA), coupled to a G1315B DAD detector ($\lambda = 280$ nm) and a 25 cm long, 4.6 mm internal diameter SymmetryShield RP18 column. A Turbula T2C shaker mixer from WAB (Basel, Switzerland) was used for blending laboratory samples. Laboratory compressed tablets were prepared on a Perkin-Elmer 15.001 (Waltham, MA, USA) press, with a cross-section of 132.7 mm². Multivariate models were constructed with the aid of Unscrambler X (Trondheim, Norway).

2.3 Commercial samples

Aldo-Cumar (Laboratorio Aldo-Unión, Esplugues de Llobregat, Spain) samples were directly purchased in different pharmaceutical stores. Each package contains a total of 40 uncoated tablets. The preparation is available in four doses of one (AC-1), three (AC-3), five (AC-5), and ten (AC-10) mg of WarfNa per tablet. The first three have the same shape (round), size (8.5 mm diameter) and mass (≈ 100 mg) and a different colour to differentiate them. AC-10 tablets have an approximate mass of 250 mg, a diameter of 12 mm and no dye added. Labels claim states that α -D-lactose is present at a concentration of 60% in all doses. Microcrystalline cellulose (MCC) is used as the second major excipient.

2.4 Laboratory samples

The preparation of the laboratory samples involved an under and overdosing procedure,^{4,5} following a design with two goals: a WarfNa concentration range covering the nominal value of the four doses and the minimization of correlation between the concentrations of API and major excipients (lactose and MCC).

Expressed as % of mass proportion, the WarfNa content in the four doses ranges from 1 to 5%. In order to encompass this concentration range, 22 samples, divided into 11 API concentration levels (from 0.5% to 7% w/w), approximately evenly spaced, were prepared by mixing the appropriate amounts of powdered commercial AC-1, AC-3 or AC-5 samples, WarfNa, a weight of lactose to reach the 65% or 55% of the final weight, and filling up to the 100% with the other major excipient, MCC. Each powdered sample was shaken for 22 min in a Turbula shaker, and 300 mg compacted at a pressure of 210 MPa.

2.5 NIR procedure and API determination

The spectra of 72 production intact tablets (18 from each dose) and the 22 laboratory samples were recorded three times by each face, as the average of 32 automatic scans in the 1100–2500 nm range, with a spectral resolution of 2 nm. The tablet was rotated after each spectrum recording. The average of the six spectra was computed and used in the following calculations. The actual WarfNa content was determined by HPLC.

The spectra of commercial samples were split up into calibration and validation sets. For that purpose a PCA was computed (after D2 [second derivative] + SNV [Standard Normal Variate] pre-treatment) and calibration selected in order to cover the maximum of spectral variability, including the variability of the production line by including commercial samples from different batches.

The driving idea on the development of the quantitation models of WarfNa was to construct as few models as possible, allowing, in an ideal case, the quantitation of samples from four doses with a unique model. Hence, three different calibration models were built; (a) one model for AC-1, AC-3, AC-5 (since these three doses showed great spectral similarity); (b) a model only for AC-10 dose, and (c) a joint model for all four doses.

2.6 HPLC reference method

The reference method was developed from the procedure described in previous work.^{17,18} The final chromatographic conditions were: (a) H_3PO_4 (pH 3.0 ± 0.1 ; 0.001 M)–ACN (50 : 50, v/v) mobile phase; (b) An elution temperature of 25 °C (the column was introduced into thermostatic chamber); (c) $\lambda = 280$ nm; (d) 10 μL injection volume. Under these conditions retention time of warfarin was 11.0 min. All solutions were filtered through a nylon membrane (0.45 μm). An analytical warfarin standard was used in the construction of HPLC calibration curves. Furthermore, the acidic mobile phase allowed the removal of the WarfNa cation in the analysis of the samples and no differences were observed in chromatographic behaviour between warfarin and WarfNa.

2.7 X-ray diffraction (PXRD)

The XRD data were collected on an XPert de Philips diffractometer with a Bragg–Brentano geometry using a Cu tube at an operating voltage and amperage of 50 kV and 40 mA, respectively. The samples were scanned at a step rate of 0.03° from 5° to 60°, resulting in row vectors of 1834 data points for each sample.

3 Results and discussion

Since NIR spectra recorded in diffuse reflectance mode contains chemical and physical information about the solid sample, the calibration sample set should ideally encompass both the expected chemical and physical variation. The chemical problem can be tackled by under and over dosing ground commercial tablets; the physical variation in production samples can be included by including selected samples from different batches. Furthermore, differences in scattering properties can be reduced by using different spectral pre-treatments, where the combination of 2nd derivative (D2), followed by a spectral normalization (Standard Normal Variate, SNV) have been shown to produce the best performance, at least in some pharmaceutical analyses of solid forms.¹¹ However, since scattering of solid tablets also depends on the compaction pressure,¹² a previous analysis of the effect of pressure must be performed. The underlying idea is quite simple: even though mathematical pre-treatments reduce the variation in scattering (*i.e.*, the difference in physical properties), the more work done on reducing these physical differences, the better the precision finally obtained, which can be critical for low API concentration samples.

3.1 Compaction pressure study

Some production samples were ground, and different portions of this powder compacted at different pressures. The NIR spectra of our laboratory made tablets were recorded and a PCA computed. The spectra of five commercial samples by dose were recorded, and projected on the space of the previous computed PCA (Fig. 1).

It is clearly seen that samples compacted at different pressures (squares) are systematically sorted along PC1. The projected spectra of AC1, AC3 and AC5 appeared between samples compressed at 140 and 280 MPa, while AC-10 tablets appeared closer to the sample compressed at 140 MPa, at a slightly lower PC1 score. These facts can be interpreted by assuming that the compression pressures of AC-1, AC-3 and AC-5 are very similar between them (quite normal since they have the same size and shape), and that AC-10 tablets are more loosely compressed (also quite predictable because of its relatively larger size). As a compromise, a compaction pressure 210 MPa (close to the AC1, AC3, AC5 value) was chosen for the preparation of calibration samples.

3.2 Spectral changes due to compression

A comparison of commercial and laboratory compressed tablets revealed a shift of absorption bands in the 1480 to 1560 nm spectral range when the samples are compressed (Fig. 2(i)) after the chosen pretreatment (second derivative followed by SNV; the same results are found when only second derivative is applied). The same shift was found between the spectrum of a commercial sample and that of the same tablet, ground and compacted under laboratory conditions. Thus, it can be interpreted that the compression is responsible for the spectral change.

A comparison of the spectra of API and major excipients suggested that the compound in which the spectra changed after being compacted was lactose. In order to confirm this hypothesis, the spectra of powdered and compressed (at different pressures) lactose were compared (Fig. 2(ii)). It is clear

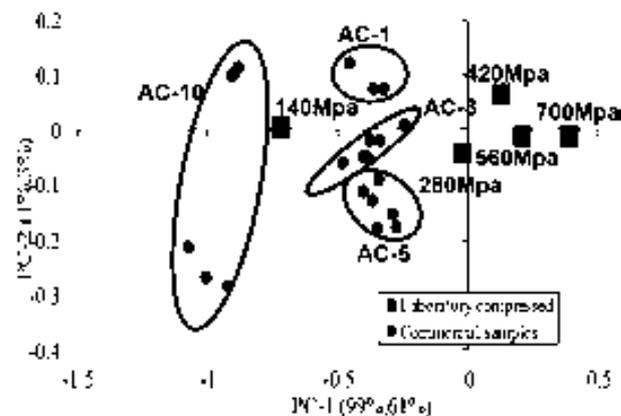


Fig. 1 Projection of the SNV spectra of production samples in the PCA space of ground production samples compressed at different pressures. The first percentage in the parenthesis is the explained variance for the PCA model, and the second the explained variance for projected samples.

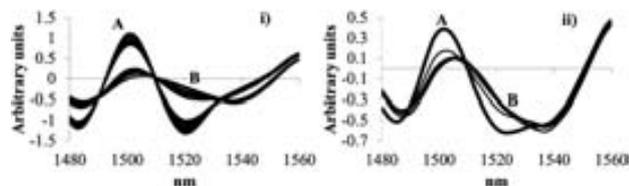


Fig. 2 (i) Spectra of intact commercial (A) and laboratory-prepared samples (B) and (ii) spectra of lactose powdered (A) and compressed at different pressures (140 to 700 MPa) (B) after 2D + SNV pre-treatment.

that the shift on absorption band of lactose fits with the shift of laboratory prepared samples due to compaction. Changes of NIR spectrum of lactose with crystalline form and humidity have been reported,¹⁹ however, none of these spectral changes fit with the band shift found in this work. Changes in lactose NIR spectrum have been previously observed and attributed to changes in pressure,²⁰ but have not been studied further.

It has been demonstrated that compression can produce a shift in the absorption band position due to the change in the crystalline form of some excipients.²¹ Assuming that something similar could happen to lactose, the XRD spectra of powdered and compacted lactose were recorded, but no difference was detected. So, the fundamental reason of this shift still remains a subject for further research. From a practical point of view, and for the quantitative purpose of that work, the main conclusion was that the wavelength between 1480 and 1560 nm must be excluded in order to reduce inter-sample variability, not due to a different concentration of API.

3.3 API determination

As the 1480–1560 nm range, the values over 2400 nm were also excluded because of the high noise in this spectral region.

Since the compaction pressure (and hence scattering properties) of AC-10 is different from AC1, AC3 and AC5, three calibration models were constructed; namely, one for the four doses; another just for AC1, AC3 and AC5; and a specific one for AC-10. The composition of the calibration sample set and figures of merit for the three models are shown in Table 1. Since results are very similar in terms of SEC and SECV with no significant statistical differences between them, the single model for the 4 doses was chosen and assayed on the validation sample set, consisting of only production samples, which yielded a value of the Residual Predictive Deviation (RPD),²² of 9.8.

Before applying this model to the validation sample set, its characteristics were examined in more detail.

As has been mentioned previously, each concentration level of laboratory samples was prepared with a sample of lactose above the nominal concentration and the other below. In order to detect any systematic effect, the differences between the true and predicted in each group (upper and lower lactose concentration) were evaluated using a *t* test, with no significant differences being found (data not shown).

As an auxiliary criterion to assess the model selectivity, the European Pharmacopoeia²³ suggests that “For PLS or PCR calibrations, the (...) loadings can be plotted and the regions of large coefficients compared with the spectrum of the analyte”.

Following this idea, Fig. 3 compares the loading of the first latent variable of the PLS model, which explains 84.4% of the *Y*-variance with the second derivative of WarfNa spectrum. It made the high relationship between both graphs visually clear, with a correlation coefficient of 0.68.

Eleven samples per dose were included in the prediction sample set, coming from at least two batches per dose. The distribution (mean and standard deviation) for tablet masses, and NIR and HPLC values are shown in Table 2. This clearly shows the excellent agreement between the mean values and precision between NIR and HPLC values. Also the slope (0.99 ± 0.02) and intercept (0.34 ± 0.50) of the straight line of NIR found *vs.* HPLC values contains the target values of 1 and 0, respectively, with a SEP of 1.41 mg API per g tablet. An *F* test was performed ($\alpha = 0.05$) and SEP and SEC values were found to be not significantly different. The graphical plot of this data is shown in Fig. 4. The paired *t* tests (between HPLC and NIR found API content in individual tablets for each dose) show that

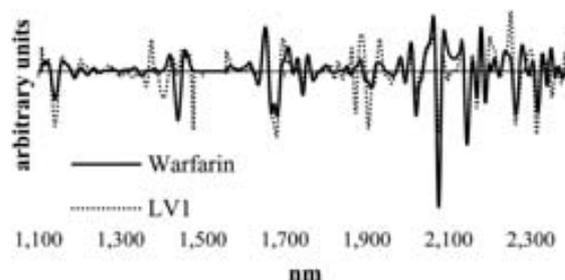


Fig. 3 Normalized (in order to allow visual inspection) loading vector of the first latent variable of the PLS model and second derivative of the spectrum of sodium warfarin.

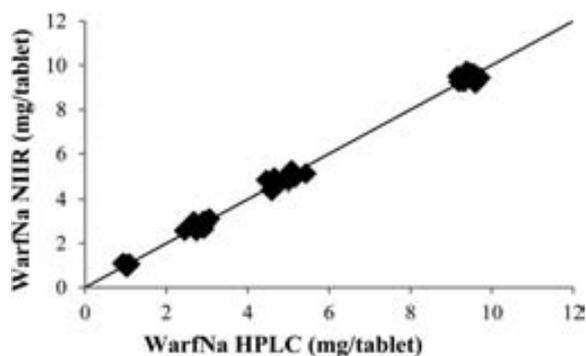
Table 1 Calibration figures of merit of all the developed models

	All doses	All doses except AC-10	Only AC-10
Lab samples	22	22	17
Production samples	27	20	7
Latent variables	4	4	4
Slope	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.98 ± 0.03
Intercept (mg g^{-1})	0.34 ± 0.50	0.43 ± 0.61	0.51 ± 0.86
SEC (mg g^{-1})	1.57	1.88	1.34
SECV (mg g^{-1})	2.11	2.41	1.82

Table 2 Comparison of found API mass in individual tablets with HPLC reference value (mean \pm standard deviation)

Batches	<i>n</i>	Mass ^a	NIR ^a	HPLC ^a	<i>t</i> _{exp} ^b	
AC-1	3	11	102 \pm 2	1.01 \pm 0.05	1.03 \pm 0.05	0.76
AC-3	3	11	101 \pm 1	2.85 \pm 0.19	2.83 \pm 0.18	0.25
AC-5	4	11	104 \pm 5	4.86 \pm 0.23	4.91 \pm 0.29	0.81
AC-10	2	11	249 \pm 5	9.44 \pm 0.18	9.44 \pm 0.19	0.02

^a All results expressed in mg. ^b *t*_{crit}: 2.23; α = 0.05; *n* = 11.

**Fig. 4** Predicted API content for production samples by NIR spectroscopy plotted against HPLC reference API content. The target line (slope 1 and intercept 0) is included.

there are no significant differences between the individual results of NIR and HPLC methods.

Repeatability and intermediate precision were evaluated according to the EMA guideline; the repeatability was based on the RSD% of six consecutive measurements and intermediate precision on RSD% of measurements on three different days.²⁴ Results are shown in Table 3. RSD% under repeatability conditions are in the order of 1%, while those for inter-day reproducibility is in the order of 2%.

4 Conclusions

A quantitative, non-destructive NIR spectroscopic method has been developed for the determination of WarfNa in different doses of the commercial preparation Aldo-Cumar. The procedure is simple, precise and accurate, even for doses containing only 1% of API mass proportion, thus demonstrating the advantages of a carefully designed calibration sample set, prepared with the aim of reducing, as much as possible, the

Table 3 Repeatability (*n* = 6 measurements) and intermediate precision (*m* = 3 days) expressed as relative standard deviation (%RSD)

	Repeatability	Intermediate precision
AC-1	0.87	1.89
AC-3	0.99	1.94
AC-5	1.03	0.89
AC-10	1.31	2.40

difference in scattering between laboratory prepared and production tablets. In that sense, the careful selection of the compacting pressure has to be considered an important step in the preparation of the calibration samples set. It is also important to design the calibration sample set in such a way that the correlation between the concentration of API and the concentration of any other component present in the sample is reduced to a minimum.

The reason why one absorption band of lactose is shifted with compaction still remains unexplained, but cannot be attributed to a change in crystalline form and does not fit with the previously reported changes of water content.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Innovation for funding this research within the framework of Project CTQ2007-62528.

Notes and references

- Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond and N. Jent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **44**, 683.
- E. Rasanen and N. Sandler, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, **59**, 147.
- D. C. Hinz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 1036.
- M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho and N. Pou, *Analyst*, 2001, **126**, 1129.
- M. Blanco, M. A. Romero and M. Alcalà, *Talanta*, 2004, **64**, 597.
- D. Xiang, J. Berry, S. Buntz, P. Gargiulo, J. Cheney, Y. Joshi, B. Wabuyele, H. Wu, M. Hamed and A. S. Hussain, *J. Pharm. Sci.*, 2009, **98**, 1155.
- E. W. Ciurczak and J. K. Drennen, *Pract. Spectrosc.*, 2001, **25**, 349.
- P. Chalus, Y. Roggo, S. Walter and M. Ulmschneider, *Talanta*, 2005, **66**, 1294.
- M. Alcalá, J. Leon, J. Roperero, M. Blanco and R. J. Romanach, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 5318.
- C. P. Meza, M. A. Santos and R. J. Romanach, *AAPS PharmSciTech*, 2006, **7**, E29.
- J. Arruabarrena, J. Coello and S. Maspocho, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **60**, 59.
- J. Guo, G. W. Skinner, W. W. Harcum, J. P. Malone and L. G. Weyer, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999, **25**, 1267.
- M. Blanco, M. Alcalá, J. M. Gonzalez and E. Torras, *J. Pharm. Sci.*, 2006, **95**, 2137.
- K. Järvinen, W. Hoehe, M. Järvinen, S. Poutiainen, M. Juuti and S. Borchert, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, **48**, 680.
- M. Makris, J. J. van Veen and R. Maclean, *J. Thromb. Thrombolysis*, 2010, **29**, 171.
- B. J. Westenberg, C. D. Ellison, A. S. Fussner, S. Jenney, R. E. Kolinski, T. G. Lipe, R. C. Lyon, T. W. Moore, L. K. Revelle, A. P. Smith, J. A. Spencer, K. D. Story, D. Y. Toler, A. M. Wokovich and L. F. Buhse, *Int. J. Pharm.*, 2005, **306**, 56.

- 17 D. De Orsi, L. Gagliardi, L. Turchetto and D. Tonelli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 891.
- 18 R. Ceresole, M. A. Rosasco, C. C. Forastieri and A. I. Segall, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2008, **31**, 179.
- 19 A. Gombas, I. Antal, P. Szabo-Revesz, S. Marton and I. Eros, *Int. J. Pharm.*, 2003, **256**, 25.
- 20 F. Franch-Lage, J. M. Amigo, E. Skibsted, S. Maspoch and J. Coello, *Int. J. Pharm.*, 2011, **411**, 27.
- 21 H. Shinzawa, K. Awa and Y. Ozaki, *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2011, **19**, 15.
- 22 P. Williams, *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, ed. K. Norris and P. Williams, 2001, ch. 8, p. 164.
- 23 Council of Europe, *European Pharmacopoeia: Supplement 2.2.40*, Council of Europe, Strasbourg, 6th edn, 2007, Near-infrared spectrophotometry.
- 24 European Medicine Agency, CPMP/ICH/381/95-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2006, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf, March 2013.



Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets



J. Arruabarrena, J. Coello, S. MasPOCH *

Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2013
Received in revised form 17 January 2014
Accepted 20 January 2014
Available online 4 February 2014

Keywords:

Raman
Pharmaceutical analysis
Warfarin
Scored tablets

ABSTRACT

Due to the side effects of overdosing, the therapeutic dose of warfarin preparations must be very strictly controlled. In order to make it easier for the patient to take the required dose, two different strategies can be followed: The medicine can be commercialized in different dosages and/or tablets can be scored in order to make them easy to split. The splitting of the tablets introduces the question of how to control that the fractions contain the desirable amount of warfarin. The regulations regarding the content uniformity of dosage unit for scored tablets have changed considerably in the last 10 years, and they are still evolving. Warfarin is commercialized under the trademark of Aldocumar in four different preparations, containing 1, 3, 5 and 10 mg sodium warfarin per tablet. All these tablets are also scored, thus suggesting the possibility of splitting. A quantitative Raman method has been developed for the determination of warfarin in tablets and in the potential fragments, taking into account the score lines on the tablet surface. This method is suggested as an auxiliary procedure to verify the uniformity of API distribution in dividable tablets. A combination of a second derivative and standard normal variate (SNV) was used as spectral pre-treatments, and partial least squares (PLS) as the regression algorithm. The relative standard deviation in API content among portions was found to be less than 5%. An HPLC procedure has been used as a reference analytical method.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tablets intended for oral administration are the most common pharmaceutical form, and most of them bear score mark. The presence of a score mark suggests that the tablet can be subdivided; even the role of the break-mark is not the splitting of the tablet for smaller doses. Its functions can be: (a) adjust the dose, which is the most important reason, especially for pediatric and geriatric patients, and for low international normalized ratio (INR) drugs, (b) ease swallowing and/or (c) save money (Van Santen et al., 2002).

In 2005 the European Medicines Agency (EMA) adopted a revision of the *guideline on summary of product characteristics* in which was written so that, in the case of tablets designed with score line, information should be given on whether or not reproducible dividing of the tablets has been shown (European Commission, 2005). The main question is how to demonstrate that each potential portion of the tablet (usually halves or quarters) actually contains the expected amount of API. In this regard, two points have to be considered. Probably the most important is to ensure a correct physical division i.e., the tablet should be easily split and the mass of the fragments should correspond to the expected mass (half or

quarter of the total tablet mass). A second step would be to demonstrate that the amount of API in each portion is as expected (half or quarter of the total mass of API in the tablet). The balance between these two criteria has led to changes in the pharmacopoeia regulations. It is also clear that the total amount of API has to be taken into account, and a tablet with 500 mg of API, corresponding to a mass proportion of 50%, is not the same as a medicine containing 1 mg of API with a 1% of mass proportion. Clearly the regulations for medicines with a low API content need to be much stricter.

The criteria regarding dividable tablets and their equivalence with regular tablets have changed in the last decade, and are still evolving. In October 2001, an accuracy standard for subdivision of tablets was implemented for the first time by the European Pharmacopoeia (European Pharmacopoeia, 2002). It was stated that “for tablets for which subdivision is authorized, it is demonstrated to the satisfaction of the competent authority that the subdivided parts comply with either Test A for uniformity of content of single-dose preparations (2.9.6) or with the test for Uniformity of mass (2.9.5), as appropriate”. Thus, there appears to be ambiguity on the choice of the test. In June 2004 the situation was clarified “Uniformity of content test prevails if tablets with a content of active substance of tablet less than 2 mg or less than 2% of the total mass (. . .) uniformity of mass test prevails in all other instances.” (European Pharmacopoeia, 2005). In December 2005 a profound change occurred

* Corresponding author. Tel.: +34 935811011; fax: +34 935812379.
E-mail address: santiago.masPOCH@uab.es (S. MasPOCH).

(European Pharmacopoeia, 2006) the Uniformity of Content test was eliminated, and it was stated that in the case that the score mark is intended to comply with the posology (e.g. approved half-doses), the efficacy of the break-mark must be assessed during the development of the product in respect of uniformity of weight. Since then, European Pharmacopoeia has remained unchanged in regard of subdivision of tablets.

Despite that subdivision of tablets has still not been mentioned in current US Pharmacopoeia (US Pharmacopoeia, 2013), efforts has been made towards it. Thus, 2009 *Stimuli* (Green et al., 2009a) declared that the accuracy of division was the most important quality attribute, and that it could be tested either by uniformity of mass or uniformity of content. Also, it proposes the requirement of a uniformity test for every score-lined preparation, whether required by the posology or not.

Very recently, Guidance for Industry by FDA (CDER, 2013) proposes a philosophy change in the quality assurance. It states that “The split tablet portions should meet the same finished-product testing requirement as for a whole-tablet product with equivalent strength”, requiring new tests such as friability, loss of mass in splitting, dissolution or stability tests. Also, uniformity of content of single dose is required for preparations below 25% w/w, or 25 mg of API and uniformity of mass for the remainder of the preparations.

Thus, although from the regulatory point of view only the uniformity of weight is still mandatory, it is quite clear that new analytical procedures to determine the API in different parts of a tablet in an easy and rapid way are needed. This determination can be critical for low content preparations.

The incorporation of Raman spectroscopy into quality control of pharmaceutical industries has followed the path of near infrared spectroscopy (NIR), but with a certain delay. The main problem has been the low reproducibility derived from the small laser spot area. In the classical set up of backscattering Raman spectroscopy, the illuminated area by the laser is too small to acquire representative spectra from particulate pharmaceutical sample, and leading to a classical sub-sampling issue. Hence, different strategies have been developed in order to acquire representative spectra from bulk pharmaceutical preparations. The most straightforward one is the acquisition of spectra at different places of the sample and their averaging (Kontoyannis, 1995; Szostak and Mazurek, 2002), although the sampling of large areas (such as a whole tablet) is very time-consuming. Recently, the development of large diameter Raman probes (Johansson et al., 2005) (up to several millimeter) has enabled a representative spectra of solid pharmaceutical preparation to be acquired in few seconds and, consequently, Raman applications in pharmaceutical analysis are growing rapidly, in some cases as a technique complementary to NIR (De Beer et al., 2009). Well-known advantages of Raman radiation is that it allows reliable information in aqueous media (Doub et al., 2007) or from encapsulated samples to be obtained (Niemczyk et al., 1998).

Furthermore, the signal arising from the Raman phenomenon is very well-suited to pharmaceutical analysis, because most of the active pharmaceutical ingredients (API) contain aromatic or conjugated chemical groups, which are strong Raman scatterers. Conversely, most excipients are aliphatic and exhibit weaker Raman intensity (Strachan et al., 2007). Hence, Raman permits the spectra of many samples with little matrix interference to be acquired, allowing straightforward data analysis (this fact is also linked to the narrow peaks of Raman spectroscopy that allow visual interpretation of spectra, unlike NIR spectroscopy).

Preparation of calibration samples for Raman quantitative purposes has been scarcely discussed in literature, mainly because the development of a calibration model is much more straightforward than in NIR spectroscopy; the peaks are much narrower, so the overlapping of bands is much less significant. Hence, a univariate calibration is usually sufficient to achieve reliable results when a

peak of the analyte is found not to be overlapped by the contribution of other components of the mixture. Thus, the usual strategy to prepare a stable regression model involves the preparation of laboratory made samples by mixing API and excipients (Taylor and Zografi, 1998) and measuring the intensity of an API peak. The use of a multivariate regression procedure such as partial least squares (PLS) has shown to improve prediction (Everall et al., 1994).

Warfarin is an antagonist of vitamin K that acts decreasing the blood concentration of certain key proteins that ease blood clotting and is prescribed to patients with thrombosis or embolism risk. In order to reduce the overdose risk, patients take daily exact doses (Baglin et al., 2006). Hence, warfarin tablets bear score-marks very often and some warfarin formulations have been used to perform mass uniformity tests of halves or quarters of tablets (Hill et al., 2009; Polli et al., 2003).

The aim of this work is the development of a feasible Raman method (in terms of time required and precision of the method) to quantify sodium warfarin in the individual fractions of the four doses (one, three, five and ten milligram per tablet) of a commercial preparation (Aldocumar), as an easy way to ensure the homogeneity of content, not only between tablets, but also between the potential tablet fractions.

2. Material and methods

2.1. Materials

Sodium warfarin (WarfNa), the active pharmaceutical ingredient of Aldocumar, in the same crystalline form as is present in the commercial samples, chlatrate (Aldrich), alpha-D-lactose (Acros), and PH-101 microcrystalline cellulose (MCC, Fluka). The latter are the major excipients of the commercial preparation and were used to prepare the calibration samples. The HPLC method was developed using warfarin (Chem Service, 99.5% purity) as analytical standard, ACN (Fluka, HPLC grade) and H₃PO₄ 50% (Panreac, Barcelona, Spain).

2.2. Instruments and software

Raman spectra were recorded on a Brüker MultiRam spectrometer (Brüker, Billerica, MA, USA) equipped with a nitrogen cooled Ge detector and a 1064 nm Nd:YAG laser source (500 μm spot size). Opus 6.5 (Brüker, Billerica, MA, USA) was used to control the instrument and export data.

HPLC reference method was performed by using an Agilent 1100 (Santa Clara, CA, USA), coupled to a G1315B DAD detector (λ = 280 nm) and a 25 cm long, 4.6 mm internal diameter *Symmetry-Shield* RP18 column. A Turbula T2C shaker mixer from WAB (Basel, Switzerland) was used for blending doped samples. Laboratory compressed tablets were prepared on a PerkinElmer 15.001 (Waltham, MA, USA) press, with a cross-section of 132.7 mm². Multivariate models were constructed with the aid of Unscrambler X (Trondheim, Norway).

2.3. Commercial samples

Aldocumar commercial preparations are available in four doses of, one (AC-1), three (AC-3), five (AC-5) and ten (AC-10) milligram of sodium warfarin per tablet. The first three have the same round shape and size (diameter of 8.5 mm) and are score-lined to obtain half fractions. AC-10 is larger than previous ones (12 mm), but also round, and is score-lined to be divided into quarters. The label claims that lactose is the major excipient, accounting for 60% w/w of the tablet mass in the four doses. The other main excipient is MCC. Samples from four batches were available for AC-3, AC-5 and AC-10,

and only from two batches for AC-1. All samples were directly purchased in different pharmaceutical stores.

2.4. Laboratory samples

Laboratory samples were prepared by over and under-dosing production samples, a strategy widely used in NIR spectroscopy (Blanco et al., 2000). A number of tablets of AC-1, AC-3 and AC-5 were ground. An exactly known amount of these powders was mixed with the appropriate amount of API, lactose and MCC, in order to reach a sample mass of approximately 300 mg. The mix was then shaken for 22 min in the Turbula shaker and finally compacted at a pressure of 210 MPa.

Thus, 22 samples, divided in 11 API concentration levels (from 0.5% to 7% (w/w)), with two samples per API level, were prepared. Samples of each API level were prepared with a final mass proportion of lactose of 65% and 55%, respectively (above and below the nominal value of 60%), and filled up to 100% with the other major excipient, MCC.

2.5. Spectral acquisition

A xyz stage was used for the point-by-point spectral acquisition of both laboratory and commercial samples, with the largest available spot size using the xyz stage; 500 μm . In the case of laboratory samples, 16 spectra were acquired from each face (in a rectangular grid, maximizing the separation among the points in order to acquire data as representative as possible), sampling ca. the 2.5% of the surface of each laboratory sample. Eight points per fraction part were acquired from commercial samples, covering ca. 5% of the sample surface. Hence, 16 spectra were acquired for AC-1, AC-3 and AC-5 tablets and 32 for AC-10.

Spectra were recorded from 3600 up to 50 cm^{-1} with a spectral resolution of 16 cm^{-1} and 32 accumulations of each point. The software of the instrument interpolates between two adjacent points, so a practical resolution of 8 cm^{-1} was actually used. The time needed for acquiring the spectrum of a point was close to 15 s. This short time allowed recording the whole grid of a sample in a time as short as 4 min for AC-1, AC-3 and AC-5, and 8 min for AC-10. Hence, spectral resolution and acquisition time were compromised in order to achieve representative spectra in a reasonable time.

2.6. Multivariate calibration procedure

The calibration sample set was composed of the 22 laboratory made samples plus 25 commercial tablets, approximately 6 tablets per dose, coming from two batches, except for AC-1, where only one batch was used. The prediction sample set was composed of 45 commercial samples from different batches, 4–6 tablets by batch and dosage, (only one batch for AC-1). The exact composition of both sample sets is shown in Table 1.

The spectra of the prediction samples were recorded 2 months (19 samples) and 4 months (26 samples) later than those used to build up the calibration model. Spectral data from the fingerprint zone (1700–654 cm^{-1}) was used. A spectral pre-treatment based on the 2^o derivative (Savitzky–Golay, 2^o order polynomial, five points

of windows size) followed by a normalization (standard normal variate, SNV) was used. SNV was applied only in the spectral range used to develop the calibration model. PLS models were constructed by a cross-validation, leave-one-out procedure.

2.7. HPLC reference method

The HPLC procedure used was obtained from two previous references (Ceresole et al., 2007; De Orsi et al., 1998), changing the flow rate and injection volume. The final chromatographic conditions were: (i) H_3PO_4 (pH 3.0 ± 0.1 ; 0.001 M)-ACN (50:50, v/v) mobile phase. (ii) An elution temperature of 25 $^\circ\text{C}$ (the column was introduced into thermostated chamber). (iii) $\lambda = 280 \text{ nm}$. (iv) 10 μL injection volume and (v) 1.5 mL/min flow rate. Under these conditions the retention time for warfarin was 11.0 min. All solutions were filtered through a nylon membrane (0.45 mm).

3. Results and discussion

As has been already discussed in the introduction, for dividable tablets the current regulatory bodies emphasize the weight uniformity between portions. The test required by the European Pharmacopoeia (European Pharmacopoeia, 2013b) establishes conformity criteria for the masses of the fragments (half tablet), and about the way tablets have to be split: by hand (i.e. as a patient would do). Textually: “Take 30 tablets at random, break them by hand and, (...), take 1 part for the test and reject the other part(s) . . . The tablets comply with the test if not more than 1 individual mass is outside the limits of 85% to 115% of the average mass. The tablets fail to comply with the test if more than 1 individual mass is outside these limits, or if 1 individual mass is outside the limits of 75% to 125% of the average mass”.

This test is complemented in a recently published Guidance for Industry of FDA (CDER, 2013), which refers to the loss of mass due to the fragmentations. Significantly, fragmentations in different portions (not only halves) are considered. Only 15 tablets are used in this test, and the key point is that the maximum loss of weight accepted is 3.0%, the difference between the sums of fragments in relation to the original weight of the tablet.

Bearing in mind both criteria, 30 tablets of both AC-1 and AC-10 were accurately weighed, hand-broken, and fractions (halves for AC-1 and quarters for AC-10) were individually weighed. The results are shown in Table 2. As can be seen, both dosages meet the uniformity of mass requirements from the two agencies. This is a significant progress as regards to previous works (Green et al., 2009b), where it was found that these requirements were not achieved for preparations of the same API.

3.1. Effect of spectral pre-treatment

The average spectra of ten individual production tablets per dose are shown in Fig. 1(A). As can be seen, the spectrum of AC-3 shows a linear baseline shift. Since the only difference between the AC-1, 3 and 5 doses (according to the information leaflet) are the dyes used to differentially color these three presentations, this baseline shift was attributed to the dye of the AC-3, E-131.

In order to allow a joint determination of the four doses and to remove the spectral differences not due to the different content of API, the 2nd order derivative of all spectra was computed, followed by a standard normal variate normalization (SNV) (Fearn et al., 2009). Fig. 1(B) depicts the working wavenumber range of the same spectra, showing that baseline trends have been perfectly corrected.

3.2. Compaction pressure of calibration samples

The effect of the compaction pressure on the intensity of Raman peaks of the calibration samples was evaluated. For this purpose,

Table 1
Commercial samples and their distribution in calibration and prediction sets. Capital letters refer to the batch code (independent for each dose) and between bracket, number of samples.

	AC-1	AC-3	AC-5	AC-10
Cal	A(5)	A(3)+B(3)	A(5)+B(1)	A(1)+B(4)
Pred I (2 months from cal)	–	C(7)	C(5)	C(5)
Pred II (4 months from cal)	D(8)	D(5)	D(7)	D(5)

Table 2
Uniformity of weight data.

	n	Whole tablet weight		1st fraction's weight		Individuals outside 85–115% range	Individuals outside 75–125% range	Loss of mass >3.0% ^a
		Average	SD	Average	SD			
AC-1 (halves)	30	101.4	1.1	51.0	3.7	1	0	0
AC-10 (quarters)	30	249.7	2.2	63.7	3.3	0	0	0

All results expressed in milligram.

^a The sum of mass of fractions is at least 3.0% w/w below the mass of the whole tablet.

several tablets of AC-1 were ground, the powder was well mixed, and different aliquots compacted at different pressures (five levels, from 140 to 700 MPa). The Raman spectra of a 16-point grid was acquired for each sample, pre-treated as stated above, and averaged to get a representative single spectrum. The overlapping of these spectra visually did not show any difference after 2D+SNV pretreatment (spectra shown in supplementary Fig. 1 and PCA in supplementary Fig. 2). Also the Raman intensities of several peaks were plotted against the compaction pressure, and no tendency was detected (r fall in all cases in the range 0.03–0.2). A PCA was also computed, but it did not show any clustering of spectra as a function of compression pressure. This is a notable difference compared to NIR, where spectra of tablets are clearly sorted as a function of compression pressure (Blanco and Alcalá, 2006) and can be attributed to the fact that Raman scattering is produced by the sample surface, the penetration into the sample being much lower than NIR radiation (Matousek and Parker, 2007). However, it must be pointed out that the spectra of intact commercial tablets were slightly different to those of the powdered-compressed samples, which could be attributed to a small, but significant difference, in particle size due to the grinding or to the different texture of the surface between commercial and laboratory samples.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.027>.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.027>.

3.3. Raman analysis

The aim of this work is to demonstrate that Raman spectroscopy can be used as a complementary analytical tool to show that the API mass proportion in the different fragments do not differ significantly from the nominal value. It should be fast enough to be considered in routine analysis.

In fact, with the mass tests performed above, we have shown that the mass of the fragments do not differ significantly from the expected values. If we assume that API is uniformly distributed, the mass test would be sufficient. But the uniformity of distribution has to be demonstrated, not just assumed. It can be reasonably accepted if previously blend uniformity would be validated, but it is not a simple issue when the mass proportion of the API is low. Also, the risk of segregation or agglomeration in the compaction step cannot be neglected.

The methodology followed to develop the Raman procedure has been:

- Spectra were visually inspected, and the few showing an evident deviation suppressed (50 from a total of 1500 spectra). They were then pre-treated to reduce the baseline drifts, normalized and averaged, yielding one spectrum per tablet (commercial or laboratory-prepared).
- Different calibration procedures were assayed (univariate, PLS, different spectral ranges . . .) by using the average spectrum of each tablet and the HPLC reference values.
- Once a good global model was found, it was applied to spectra from different potential fragments (halves for AC-1, AC-3 and AC-5 and quarters for AC-10).

3.4. Univariate calibration

The spectra of pure API, major excipients and production samples are shown overlapped in Fig. 2. As can be seen, the peak at 1603 cm^{-1} is only due to the API. This was foreseeable, since the excipients do not contain aromatic rings. Although the peak has a relatively low intensity (API concentration is very low) the feasibility of a univariate calibration was evaluated.

The plot of peak intensity at 1603 cm^{-1} vs. API mass proportion (milligram sodium warfarin/gram sample) shows (Supplementary

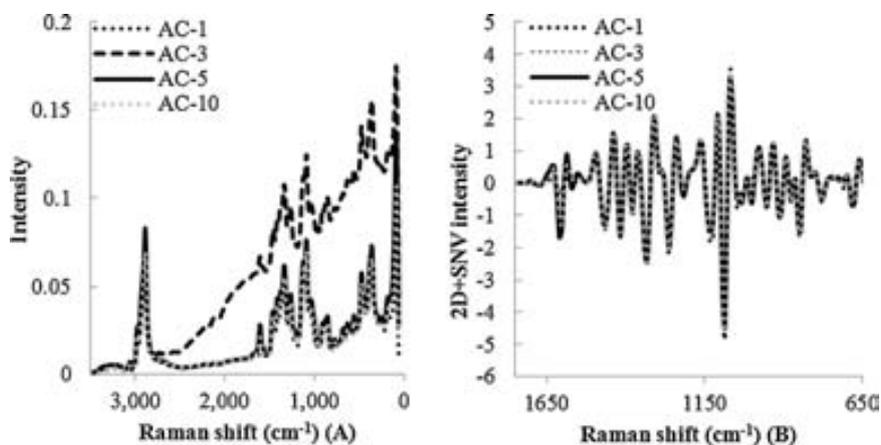


Fig. 1. (A) Raw spectra of the four doses of Aldocumar. (B) Spectra of the four doses after the 2D+SNV pretreatment in the chosen spectral range ($1703\text{--}654\text{ cm}^{-1}$).

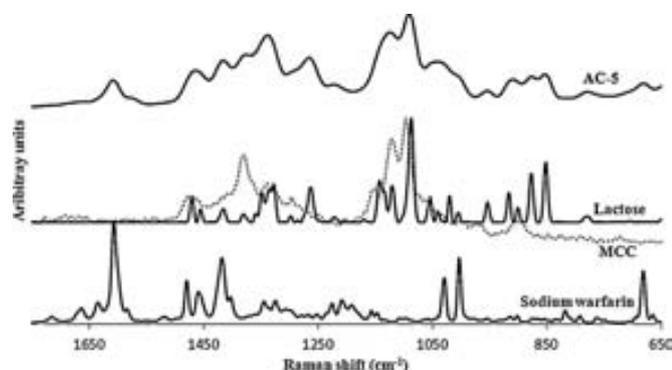


Fig. 2. Spectra of API, the two major excipients and a sample of AC-5. Intensity of the most intense peak normalized to unit.

Fig. 3) that there is an almost linear relationship between intensity and concentration, but a clear change of slope can be observed at a concentration of 25–30 mg/g, preventing the application of a single model for all four doses. Hence, the use of a multivariate calibration procedure based on PLS (Martens, 1991) was assayed.

Supplementary material related to this article found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.027>.

3.5. PLS calibration model

One of the key points in developing a multivariate calibration model is to ensure its ruggedness i.e. the stability of the model or, in other words, its capacity to correctly predict samples recorded some time after the development of the model.

One of the main drawbacks of Raman spectroscopy when applied for quantitative purposes is the relatively poor between-day reproducibility, mainly due to the reproducibility of the laser source (Kim et al., 2006). Although this problem has been reduced with modern instruments, it still exists. Fig. 3 depicts the PCA of the commercial samples used in this study. PC1 (69% variance) groups samples in two large clusters, with spectra recorded 4 months later clearly differentiate from the other spectra. That could be just a batch effect or, more probably, due to the elapsed time and a small but significant change in laser power. PC2 (23% variance), sorts spectra accordingly with API concentration

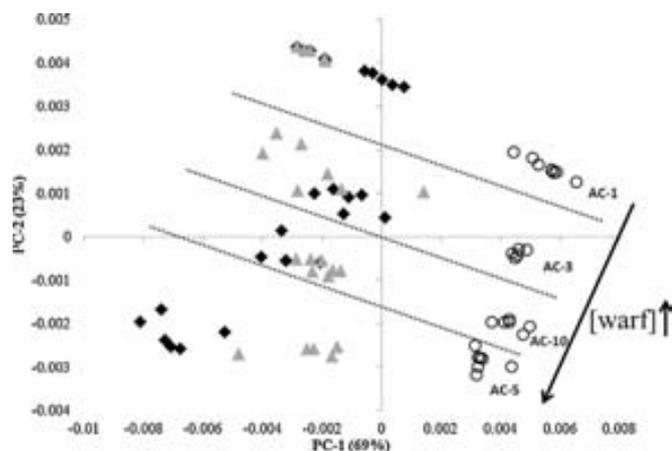


Fig. 3. PCA of the commercial samples spectra (2D + standard normal variate, wavenumber range $1700\text{--}654\text{ cm}^{-1}$). Calibration samples are represented by “◆”. Prediction samples analyzed by: “▲” (samples analyzed two months after calibration set) and “○” (samples analyzed four months after calibration set). Nominal mass proportions are 10, 30, 40 and 50 mg/g for AC-1, AC-3, AC-10 and AC-5, respectively.

Table 3

Figures of merit of the calibration model and its validation of the determination of the whole content of production samples.

	Calibration samples	Prediction samples
Lab samples	25	–
Production samples	22	42
LV	2	
Explained variance (%)	99.09	
Slope	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.02
Intercept (mg/g)	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.7
SEC/P (mg/g)	1.58	1.80
SECV (mg/g)	1.72	–

The PLS model was initially developed by using only the laboratory prepared calibration samples. Even though a relatively good calibration model was obtained (RMSEC = 2.07 mg/g, slope of the straight line, HPLC vs. Raman values = 0.99), the prediction of commercial samples showed a small but significant deviation (HPLC vs. Raman predicted slope = 0.92; bias = -0.55 mg/g ; SEP = 2.17 mg/g). This is not surprising; it is a very common situation in NIR spectroscopy, where the different scattering properties of commercial and laboratory samples compels the use of a mixed calibration sample set composed of commercial and laboratory-prepared tablets. The latter are used to span the concentration range of API, while the former introduces the physical variability (Blanco et al., 2000).

Consequently, a calibration sample set was formed by the laboratory made tablets and spectra from commercial tablets from two different batches. All these spectra were recorded with just a few days of difference. The prediction sample set was formed by commercial tablets from two other batches and its spectra were recorded two and four months later. The figures of merit of the final model are detailed in Table 3. As can be seen, the confidence intervals of slope and intercept of the regression line found vs. reference values encompass 1 and 0, respectively. Also, a t paired test was performed between HPLC and Raman found API content in individual tablets for each dose, and no significant differences were found (data not shown), thus demonstrating the accuracy of the proposed method.

As an auxiliary criterion to assess that the multivariate calibration procedure is actually determining the API and not a correlated compound, the European Pharmacopoeia states that “For PLS or PCR calibrations, (. . .) loadings can be plotted and the regions

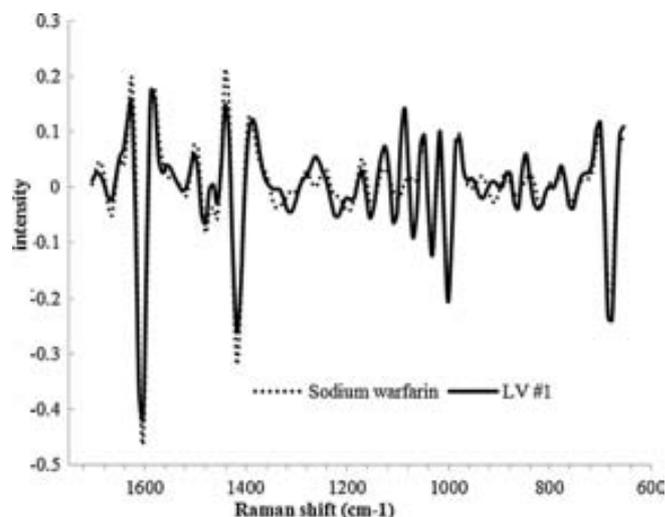


Fig. 4. Overlapped representation of the loadings vector of the first PLS LV and the spectrum of sodium warfarin (2D-SNV).

Table 4

Repeatability ($n=6$) and inter-day reproducibility ($n=3$) expressed as relative standard deviation (RSD%).

	Repeatability	Intermediate precision
AC-1	3.94	2.28
AC-3	1.60	2.03
AC-5	2.40	3.70
AC-10	1.74	0.73

of large coefficients compared with the spectrum of the analyte" (European Pharmacopoeia, 2013a).

This plot is shown in Fig. 4. The high similarity between both spectra is clear, with $r^2=0.93$.

From the data in Table 3 and Fig. 4 it is clear that the model is determining API and is able to overcome the physical differences between commercial and laboratory made samples and the effect of time lapses between spectral recordings, with reasonably good accuracy and precision. Laboratory samples had been prepared at two different lactose concentration levels, 5% w/w below and above the nominal value. A t test was then performed, and no significant differences were found between the lower and upper lactose concentration samples. This suggests that a certain amount of variability in the concentration of the major excipient would not affect the accuracy of the API determination.

Repeatability and intermediate precision were evaluated. The repeatability was based on the RSD% of six consecutive measurements, and intermediate precision on RSD% of measurements on three different days (ICH, 2005) (one tablet by dosage). Results are shown in Table 4. Both parameters are in the range 1–4%.

3.6. Determination of warfarin in individual fractions

Once a reliable model was developed, it was applied to the average spectra of the potential individual fractions: halves for AC-1, AC-3 and AC-5 (since their score line permits the split in halves), and quarters for AC-10. To estimate the amount of API present, the masses of each potential fraction of the same tablet were considered equal.

Figs. 5 and 6 show the histograms obtained for the samples of the prediction set, the spectra of which were recorded in four months after calibration samples. In any case the relative standard deviation between halves or quarters in a dosage were greater than 5%, and all samples were in the average range values $\pm 15\%$. In this sense, we can say that all the studied samples would meet the criteria for uniformity of content of single-dose preparations, if applicable to portions of a tablet.

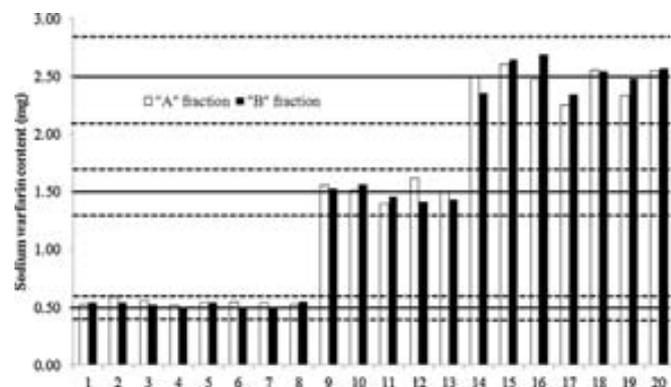


Fig. 5. Predicted API content for the AC-1 (1–8), AC-3 (9–13) and AC-5 (14–20) tablets in the individual halves of the prediction samples. Solid lines indicate the average content of each half and the dashed lines indicate the $\pm 15\%$ limits.

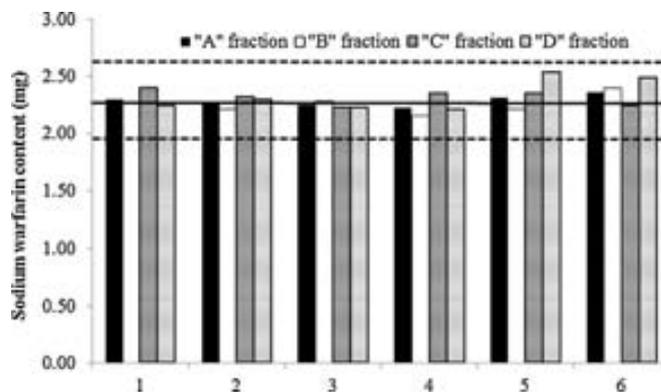


Fig. 6. Predicted API content for AC-10 tablets in the individual quarters of the prediction samples. Solid line indicates the average content of each quarter and the dashed lines indicate the $\pm 15\%$ limits.

3.7. Effect of reducing the number of spectra

Results shown above demonstrate that the procedure proposed in this study could be useful to confirm the uniformity of distribution of API in a tablet, or at least to ensure that the total amount of API in a potential portion corresponds to the expected value. This is clearly a more rapid analytical procedure than the standard HPLC procedure. However, applications in routine analysis or in the framework of a PAT control of the manufacturing process, requires methods that are as rapid as possible. The key point to ensuring a correct quantitation is the sampling area. It is clear that the larger the area of the laser spot, the more representative is the information collected. This is an issue limited by the available instrumentation, and also by the number of points analyzed. In our case we have used 8 points for potential fragment. The evolution of the precision as a function of the number of points averaged (Fig. 7) shows that in this case, just collecting 4 spectra by portion could be enough, reducing the time needed for the quality control by half. The abnormal high precision found in AC-1 can be attributed to the fact that only samples from one batch were analyzed.

4. Conclusions

A rapid, simple and reliable method was developed for the determination of warfarin, a drug which needs strict control in its solid preparations. The method can be applied to the determination of the total API amount in a tablet, and, more important, to its determination in the potential fractions produced by the subdivision of the break-scored tablets. The same calibration model can be applied to tablets from the same manufacturer, and containing different amount of API.

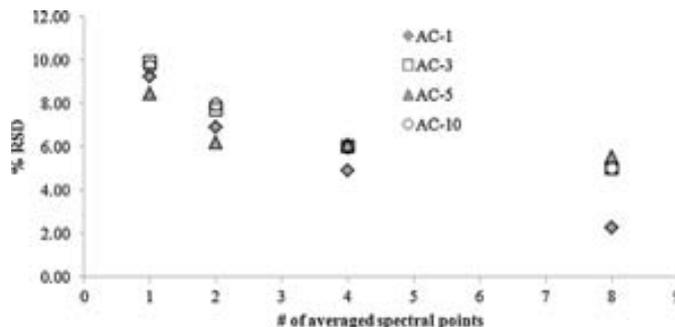


Fig. 7. % Relative standard deviation (RSD) of the predicted API concentration with respect of the number of averaged spectral points for its calculation.

Although the estimation of API content in the potential portions of break-scored tablet is not currently mandatory, it is clear that there is a need to fully ensure that the patient takes the prescribed dose and that, sooner or later, regulatory bodies will adopt a decision in this regard. For this reason, the method and working methodology proposed in this study can be very useful in a routine quality control as a complementary analytical tool to assess that the actual amount of API in any portion of a tablet really correspond to the expected value. This can be especially critical for these formulations containing a low amount of API.

Acknowledgments

The authors are grateful to Generalitat of Catalonia for funding this research within the framework of project 2009-SGR1470.

References

- Baglin, T., Keeling, D., Watson, H., 2006. Guidelines on oral anticoagulation (warfarin): 2005 update. *British Journal of Haematology* 132, 277–285.
- 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. *Analytica Chimica Acta* 557, 353–359.
- Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., 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. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368, 534–539.
- CDER, C.f.D.E.a.R, 2013. In: Services, H.a.H. (Ed.), *Guidance for Industry: Tablet Scoring: Nomenclature, Labeling, and Data for Evaluation*. Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- Ceresole, R., Rosasco, M., Forastieri, C., Segall, A., 2007. HPLC determination of acenocoumarol and its major thermal degradation product. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31, 179–187.
- De Beer, T., Verduyck, P., Burggraef, A., Quinten, T., Ouyang, J., Zhang, X., Vervaeke, C., Remon, J.P., Baeyens, W., 2009. In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 3430–3446.
- De Orsi, D., Gagliardi, L., Turchetto, L., Tonelli, D., 1998. HPLC determination of warfarin and acenocoumarol in raw materials and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17, 891–895.
- Doub, W.H., Adams, W.P., Spencer, J.A., Buhse, L.F., Nelson, M.P., Treado, P.J., 2007. Raman chemical imaging for ingredient-specific particle size characterization of aqueous suspension nasal spray formulations: a progress report. *Pharmaceutical Research* 24, 934–945.
- European Commission, 2005. *A Guideline on Summary of Product Characteristics*. European Pharmacopoeia, 2002. Monograph 0478, European Pharmacopoeia Supplement 4.1. Council of Europe, Strasbourg, pp. 2433–2436.
- European Pharmacopoeia, 2005. Monograph 0478, European Pharmacopoeia 5.0. Council of Europe, Strasbourg, pp. 626–628.
- European Pharmacopoeia, 2006. Monograph 0478, European Pharmacopoeia Supplement 5.5. Council of Europe, Strasbourg, pp. 4166–4168.
- European Pharmacopoeia, 2013a. 2.2.24. Infrared Absorption Spectrophotometry, European Pharmacopoeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, pp. 38–39.
- European Pharmacopoeia, 2013b. Monograph 0478. Council of Europe, Strasbourg.
- Everall, N., Chalmers, J., Ferwerda, R., Van der Maas, J., Hendra, P., 1994. Measurement of poly (aryl ether ether ketone) crystallinity in isotropic and uniaxial samples using Fourier transform-Raman spectroscopy: a comparison of univariate and partial least-squares calibrations. *Journal of Raman Spectroscopy* 25, 43–51.
- Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A., Guerrero-Ginel, J.E., 2009. On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 96, 22–26.
- Green, G., Berg, C., Polli, E.J., Barends, D.M., 2009a. Pharmacopoeial standards for the subdivision characteristics of scored tablets. *Pharmaceutical Forum* 35.
- Green, G., Berg, C., Valdez, N., Kaplan, A., 2009b. Accuracy and ease of splitting scored Coumadin, Lanoxin and Toprol XL Tablets. Poster Presentation. AAPS, Los Angeles.
- Hill, S.W., Varker, A.S., Karlage, K., Myrdal, P.B., 2009. Analysis of drug content and weight uniformity for half-tablets of 6 commonly split medications. *Journal of Managed Care Pharmacy* 15, 253–261.
- ICH, 2005. Q2 (R1). *Validation of analytical procedures: text and methodology*.
- Johansson, J., Pettersson, S., Folestad, S., 2005. Characterization of different laser irradiation methods for quantitative Raman tablet assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 510–516.
- Kim, M., Chung, H., Woo, Y., Kemper, M., 2006. New reliable Raman collection system using the wide area illumination (WAI) scheme combined with the synchronous intensity correction standard for the analysis of pharmaceutical tablets. *Analytica Chimica Acta* 579, 209–216.
- Kontoyannis, C.G., 1995. Quantitative determination of CaCO₃ and glycine in antacid tablets by Laser Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13, 73–76.
- Martens, H., Naes, T., 1991. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, New York.
- Matousek, P., Parker, A., 2007. Non-invasive probing of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 38, 563–567.
- Niemczyk, T.M., Delgado-Lopez, M.M., Allen, F.S., 1998. Quantitative determination of bucindolol concentration in intact gel capsules using Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* 70, 2762–2765.
- Polli, J.E., Kim, S., Martin, B.R., 2003. Weight uniformity of split tablets required by a Veterans Affairs policy. *Journal of Managed Care Pharmacy* 9, 401.
- Strachan, C.J., Rades, T., Gordon, K.C., Rantanen, J., 2007. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59, 179–192.
- Szostak, R., Mazurek, S., 2002. Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Analyst* 127, 144–148.
- Taylor, L.S., Zografi, G., 1998. The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research* 15, 755–761.
- US Pharmacopoeia, 2013. *US Pharmacopoeia Convention*, 37th ed. US Pharmacopoeia, Rockville, MD.
- Van Santen, E., Barends, D., Frijlink, H., 2002. Breaking of scored tablets: a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53, 139–145.

NIR SPECTROSCOPIC METHOD FOR THE IN-LINE MOISTURE ASSESSMENT DURING DRYING IN A SIX-SEGMENTED FLUID BED DRYER OF A CONTINUOUS TABLET PRODUCTION LINE: VALIDATION OF QUANTIFYING ABILITIES AND UNCERTAINTY ASSESSMENT

Margot Fonteyne¹, Julen Arruabarrena², Jacques de Beer³, Mario Hellings⁴, Tom Van Den Kerkhof⁴, Anneleen Burggraeve⁴, Chris Vervae⁵, Jean Paul Remon⁵, Thomas De Beer¹

1 Laboratory of Pharmaceutical PAT, Ghent University, Harelbekestraat 72, Ghent, Belgium

2 Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, UAB, Barcelona, Spain

3 Laboratory of Drug Analysis, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

4 Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, Analytical Development, Beerse, Belgium

5 Laboratory of Pharmaceutical Technology, Ghent University, Harelbekestraat 72, Ghent, Belgium

Margot.Fonteyne@Ugent.be, Thomas.DeBeer@Ugent.be

ABSTRACT

This study focuses on the thorough validation of an in-line NIR based moisture quantification method in the six-segmented fluid bed dryer of a continuous from-powder-to-tablet manufacturing line (ConsiGmaTM-25, GEA Pharma Systems nv, Wommelgem, Belgium). The moisture assessment ability of an FT-NIR spectrometer (MatrixTM-F Duplex, Bruker Optics Ltd, UK) equipped with a fiber-optic Lighthouse ProbeTM (LHP, GEA Pharma Systems nv, Wommelgem, Belgium) was investigated. Although NIR spectroscopy is a widely used technique for in-process moisture determination, a minority of NIR spectroscopy methods is thoroughly validated.

A moisture quantification PLS model was developed. Twenty calibration experiments were conducted, during which spectra were collected at-line and then regressed versus the corresponding residual moisture values obtained via Karl Fischer measurements. The developed NIR moisture quantification model was then validated by calculating the accuracy profiles on the basis of the analysis results of independent in-line validation experiments. Furthermore, as the aim of the NIR method is to replace the destructive, time-consuming Karl Fischer titration, it was statistically demonstrated that the new NIR method performs at least as good as the Karl Fischer reference method.

INTRODUCTION

In 2004, the Food and Drug Administration (FDA) launched their 'Process Analytical Technology (PAT)-Guidance for Industry' [1]. One of the goals of this guidance is to encourage the pharmaceutical industry to imply innovative methods for quality assurance, based on measurements during processing and enhancing in-depth process understanding. It is stated that the use of PAT-tools and -principles will lead to an increased process knowledge which should allow better process control. Real-time process information can be used to overcome the limitations of time-defined process end points, which are commonly used in pharmaceutical industry. In case of fluid bed drying for example, it is not opportune to dry longer than necessary. Thanks to these industrial drivers, recent technological advances in process analyzers make real-time measurement of critical process parameters and quality attributes possible. To allow in-line monitoring, analyzers should be non-destructive, fast and mountable in the process. Furthermore, the analyzer should be capable of collecting data without sample-pretreatment. Therefore, Near Infrared (NIR) Spectroscopy has found already for a long time its way to the pharmaceutical industry.

NIR has been reported to be a powerful tool for water determination. It has found multiple applications for the quantitative determination of moisture content during the manufacturing of pharmaceutical solid dosage forms [2]. Several authors reported the in-line, on-line and at-line use of NIR spectroscopy to determine the moisture content of pharmaceutical products during granulation and drying [3-18]. These authors developed multivariate calibration models, e.g. Partial Least Squares (PLS)-models, for the prediction of moisture content, using either Loss on Drying or Karl Fischer titration as reference method. They validated their models by means of validation parameters, such as the Standard Error of Calibration (SEC), the Standard Error of Prediction (SEP) as well as the Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC), the RMSE of Cross Validation (RMSECV), the RMSE of Prediction (RMSEP) and the R^2 . Among these, the best measure for the predictive power of the model is the RMSEP, since this includes the evaluation of an external test-set.

However, all these validation parameters do not guarantee that future measures will be inside the predefined acceptance limits [19]. Hubert et al. presented a validation strategy allowing to evaluate the proportion of expected future measures that will fall inside the acceptance limits. The acceptance limit is the accepted difference between the 'measured value' and the unknown true value [20-22]. This validation strategy is based on the use of accuracy profiles and is in full compliance with the regulatory quality guidelines. Mantanus et al. constructed for example a PLS model, which predicted the moisture content in pellets by means of NIR spectroscopy [23]. They concluded that the SEC and SEP were not sufficient to validate the method and therefore applied the accuracy profile approach. More case studies for the application of accuracy profiles to mainly off-line NIR spectroscopic methods have been reported by De Bleye et al. [19]. Raman spectroscopic methods for the determination of medroxyprogesterone in pharmaceutical suspensions [24] and metoprolol tartrate during hot-melt extrusion [25] have been validated using accuracy profiles as well.

The aim of this study was to validate a method for the in-line moisture determination of granules via NIR spectroscopy in the six-segmented fluid bed dryer of a fully continuous from powder-to-tablet production line. An NIR system equipped with a fiber-optic Lighthouse Probe™ implemented in the dryer was used. The granulates were produced via high shear twin screw wet granulation. The validation of the NIR based moisture assessment was based on the use of accuracy profiles as presented by the SFSTP (La Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) [20-22]. Furthermore, from the validation measurements performed to apply the accuracy profile validation strategy, the measurement uncertainty was estimated as described by Feinberg et al. [26, 27]. As the final aim was to evaluate whether the in-line NIR method is able to replace the off-line Karl Fischer method, the proposed method must perform at least as good as the reference method. Therefore, a comparison of the performance (precision and bias) of both methods was made via the approach proposed by [28, 29].

EXPERIMENTAL

Materials

All continuous granulation and fluid-bed drying experiments were performed with the same powder premix. Anhydrous theophylline (Farma-Quimica sur SL, Malaga, Spain) (30%, w/w) was granulated with lactose monohydrate 200 M (Caldic, Hemiksem, Belgium). Polyvinylpyrrolidone (Kollidon 30®, BASF, Burgbernheim, Germany) was used as a binder and added to the dry powder mixture at a concentration of 2.5% (w/w). Distilled water was used as granulation liquid.

NIR equipment

An FT-NIR spectrometer (MatrixTM-F Duplex, Bruker Optics Ltd, UK) equipped with a fiber optic Lighthouse ProbeTM (LHP, GEA Pharma Systems nv, Wommelgem, Belgium) was used for this study. The Lighthouse ProbeTM (LHP) was mounted in cell 2 of the fluid bed dryer (see description of the continuous system below). For all spectra a resolution of 8 cm⁻¹ was applied and each spectrum was the average of 32 scans. This resulted in one spectrum collected every 20 seconds. The applied spectral range was 10,000 to 4,500cm⁻¹.

Karl Fischer moisture determination

The residual moisture content of the granules after drying was determined by volumetric Karl Fischer titration using a V30 volumetric Karl Fischer titrator (Mettler Toledo, USA). Methanol (Hydranal, Sigma Aldrich, Germany) was used as solvent. Before titration, granules were stirred and dissolved during three minutes. Measurements were done in triplicate.

Continuous granulation and drying

For continuous granulation and drying, the ConsiGmaTM-25 unit (GEA Pharma Systems, ColletteTM, Wommelgem, Belgium) was used. It consists of three major parts: a continuous twin screw high shear granulator, a six-segmented fluid bed dryer and a discharge system [30]. The six-segmented dryer is equipped with two probe interfacing places, namely in cell 2 and cell 5. PAT-probes can be mounted in these cells, hence enabling in-line measurements. For both calibration and validation experiments (see below), the granulator settings were kept constant. The raw material premix was fed at a rate of 17.5 kg/h, a screw speed of 950 rpm was applied and the barrel temperature was kept constant at 25°C. The distilled water was added with a rate of 32 g/min. The same airflow was applied in the fluid bed dryer for all experiments: 360 m³/h.

Development of the NIR moisture determination calibration model

For the development of the calibration model, granules with five different moisture levels were prepared (Figure 1). To obtain these granules, five granulation runs were performed in which the applied drying air temperature was varied between 35°C and 80°C. The cell filling time was kept constant at 180 s and granules were dried during 600s. The granules, for which the highest moisture content was aimed, were only dried for 300s. Each moisture level experiment was repeated four times, spread over two days (hence resulting in a total of 5 x 4 = 20 calibration experiments). After each calibration experiment, five NIR spectra were immediately collected at-line. Simultaneously, three samples were collected for Karl Fischer measurements. These measurements were performed immediately. Nevertheless, since only one Karl Fischer titrator was available, the second and third Karl Fischer measurement had a certain 'lag time' before they were measured. Spectra were Standard Normal Variate (SNV) corrected prior to further analysis and the three Karl Fischer measurements were averaged in order to obtain one moisture content value for each calibration experiment that was then correlated to the five corresponding collected NIR spectra from that run. Taking the 20 calibration experiments into account, the obtained KF moisture contents varied between 3.4% and 7.21%.

Validation of the in-line NIR moisture assessment method

For the validation experiments the drying cells were filled during 300s and a total drying time of 900s was applied. The temperature of the drying air was changed between 35°C and 75°C in order to obtain three different moisture content (Figure 2). The low level had an average moisture content of 3.67%,

the medium moisture content was 4.79% and the highest moisture content was 6.13% (determined by KF). Each level was performed in triplicate and repeated on four different days. A total of four blocks of three experiments resulted in twelve experiments per moisture level. The validation experiments were repeated on four different days in order to evaluate the intermediate precision. Karl Fischer measurements were performed after each validation experiment, as was done for the calibration experiments.

NIR spectra were collected in-line during drying. One spectrum was collected each 20 seconds, hence providing real-time spectral information. Each collected NIR spectrum was fed into the PLS model calibration model resulting in a predicted moisture content each time an NIR spectrum was collected during processing. After each validation experiment, five at-line spectra were collected (and also fed into the calibration model resulting in predicted moisture contents) as well as three samples for Karl Fischer titration.

Due to process variation it was not possible to obtain the exactly equal moisture contents when repeating the validation runs. (e.g. the low level moisture content validation experiment of day 1 resulted in a slightly different moisture content compared to the low level moisture content experiment of day 2). Therefore, at each validation moisture level all the NIR predicted moisture content values were normalized as follows (see Table 1):

$$y_{inor} = \frac{y_{ipred} * mean}{y_{iref}}$$

With

y_{inor} = normalized NIR predicted moisture content of validation experiment i

y_{ipred} = moisture content as predicted by the NIR calibration model

$mean$ = mean Karl Fischer moisture content at each moisture level: 3.67%, 4.76% or 6.13%, respectively

y_{iref} = moisture content as obtained via the Karl Fischer titration for validation experiment i

In order to evaluate the in-line collected spectra, Principal Component Analysis was performed on all in-line spectra per experiment. Scatter plots of the first and second component were used in order to detect and exclude outliers. With this information the last ‘valid’ spectrum of each run was selected. In this manner a set of 36 in-line spectra were constructed as validation test-set.

Multivariate data-analysis and modeling

Principal Component Analysis (PCA) and Partial least squares (PLS) calibration models were developed using a multivariate data analysis software package (Simca P+ 12.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Validation of the in-line moisture assessment method

The validation strategy introduced by Hubert et al. [20-22] proposed to review the objectives of the validation according to the intended use of the analytical procedure: to ensure that the difference between the “measured value” (y_i) and the unknown “true value” (μT), is at least lower than an acceptance limit (λ):

$$|y_i - \mu T| < \lambda$$

In this paper, λ is set at 20% for the in-line determination of the moisture content of granules during drying. Thus, as the aim of validation is to determine if an analytical procedure can be guaranteed as acceptable, it must be assured that the probability that a measurement will fall outside the acceptance limits is less or equal to the maximum risk (5%) that the analyst is able to take during routine use:

$$\Pr (|y_i - \mu T| < \lambda) \geq \beta$$

If so, the analytical procedure can be considered as acceptable. In this study, the wished proportion of measurements inside the acceptance limits (β) was set at 95%. It is clear that the classical determinations of trueness, precision, linearity etc.. as they are described in the ICH Q2 are not sufficient to decide whether the objectives of an analytical procedure are guaranteed. The adapted decision tool therefore is the accuracy profile of the analytical procedure, which is constructed from the total error (bias + standard deviation) of the procedure. This is obtained by computing the β -expectation tolerance interval at each concentration level and allows evaluating the proportion of expected future measurements that will fall inside the acceptance limits. This enables to control the risk associated to the use of the method. Using the data collected for the development of the accuracy profile, the measurement uncertainty was estimated as described by Feinberg et al [26, 27]. During validation, the within day and between day variability were taken into account (Figure 2).

Comparison of the NIR method with the KF reference method

The final aim of the present work is to replace the slow and destructive Karl Fischer reference method for the quantitative moisture assessment during drying by a fast and non-destructive alternative in-line analysis method. Therefore, it is necessary to demonstrate that the envisaged method does not have worse performance characteristics than the reference method. Therefore, a comparison of the two fundamental performance parameters, precision and bias, was performed as described by [28, 29]. The approach for method comparison proposed in those papers, calculates the number of measurements needed to assure the preset probability ($1-\beta$) of not adopting an alternative method with unacceptable performance (α and β error are under control). This may require a higher number of measurements than a laboratory can perform. This was the case in our study (15 measurement days required) due to practical, time and cost reasons. Therefore, a user-defined number of measurements was used and only the α error (risk to reject the null hypothesis, when it should be accepted) was under control. On the other hand, it was possible to calculate the β error [31]. The comparison of the precision parameters (repeatability and intermediate precision) between both methods was done using F-tests. Bias was compared using the interval hypothesis t-test instead of the point hypothesis t-test, as it is more relevant to test whether bias between two methods is not too large (for this study, smaller than or equal to 0.5%) instead of testing that the bias between methods is zero [32]. From a chemical point of view, there is always a bias. Furthermore, the traditional null and alternative hypotheses were exchanged (thus the α and β error are exchanged too) for the interval hypothesis testing. This is, since it is more important to control the risk to wrongly accept there is no bias while in fact here is, instead of wrongly accepting there is bias, while there is none. For this study the 'new' α risk (= risk to wrongly accept that there is no bias) was chosen at 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of a NIR based calibration model

Hundred spectra were obtained during the calibration experiments and used to build the calibration model (5 moisture levels * 4 repetitions * 5 spectra/experiment = 100 spectra, see Figure 1). All spectra were centered and SNV-corrected after which a principal component analysis (PCA) was performed, using the full spectral region from 10000 to 4500 cm^{-1} . The first principal component, capturing a variance of 90.58%, represented moisture content. The loadings of the first principal component clearly indicated the spectral region between 5350 cm^{-1} and 4775 cm^{-1} enclosed the most variance, which is indeed where the water bands are expected. Hence, the 5350 to 4775 cm^{-1} spectral region was selected, centered and SNV-corrected to build a PLS calibration model for the prediction of moisture content. This PLS-model consisted of two principal components, resulting in an R^2 of 99.7%, a Q^2 of 96.4% and an RMSEE of 0.2342% and an RMSECV of 0.2331%.

Validation of the in-line moisture assessment method

Using the above developed PLS moisture calibration model, the moisture content at the end of each drying validation experiment was predicted based on the last valid in-line collected spectrum (Table 1, y_{ipred}) and normalized (Table 1, y_{inor}). Based on these results, the trueness, precision, accuracy (Table 2) and accuracy profile (Figure 3) were calculated for each validated residual moisture level. It can be noticed from the accuracy profile that the β -expectation tolerance intervals do not exceed the acceptance limits of 20 % over the validated concentration range. Ninety-five times out of 100, the future in-line measurements will be included within the acceptance limits of 20%. Thus, using this validation strategy, the accuracy profile is used to *decide* whether the in-line NIR method can be declared valid or not. The validation data calculated in Table 2 help to make a *diagnosis*.

From the data used for the calculation of the accuracy profile, the measurement uncertainty was estimated [26]. The uncertainty results are presented in Table 3. The expanded uncertainty defines an interval around the mean value in which the unknown 'true value' is retrieved with a probability of 95%. From the relative expanded uncertainties, it can be seen that for each examined moisture level, the interval in which there is a probability of 95% that the true value, estimated by the measured value, occurs, is larger than 5%.

Comparison of alternative in-line NIR method with Karl Fischer reference method

The NIR as well as the Karl Fischer validation data used for the comparison of both methods at the lowest examined residual moisture content level are mentioned in Table 4. In a first step, the different types of variances at this low level were calculated (Table 5). These variances were used for the calculation of the F-tests for the evaluation of the different precision parameters (Table 6). From these tests, it can be concluded that the repeatability as well as the intermediate precision are at least as good as those of the KF reference method. The α error of these F-tests (risk to wrongly reject the conclusion that the precision parameters of the NIR based prediction method are better or equal to the precision parameters of the KF reference method) was set at 5%. For the evaluation of the bias, the estimated bias d (grand mean of alternative validation data – grand mean of reference validation data = 0.12%), was calculated together with its 95% upper confidence limit (UCL = 0.317%) and lower confidence limit (LCL = -0.077%). If UCL is smaller or equal or LCL is higher or equal to the acceptable bias (0.5%), the bias is acceptable since there is probability smaller than 5% that the absolute bias as estimated by d is larger than 0.5%. Using the interval hypothesis, the risk to wrongly accept that there is no bias ('new' α error) was kept at 5%. The probability to reject wrongly a non biased method was calculated as 2.40% ('new' β error).

CONCLUSION

The results show that the developed fast and non-destructive in-line NIR method is a reliable alternative for the traditionally used destructive and time-consuming KF method for the in-line moisture determination of granules in the six-segmented fluid bed dryer of a continuous from-powder-to-tablet production line. The NIR spectra were collected in-line by means of a Lighthouse Probe™, connected to a Brüker-system. The accuracy profile, calculated during the validation of the in-line NIR method, assures that at least 95% of future routine experiments will be included within the preset acceptance limits (20%), which suits with the aim of the developed analytical procedure. Moreover, the data used in this validation approach were also used to estimate the uncertainty of the bias as well as the expanded uncertainty at each concentration level. Finally, the new NIR method has at least as good performance characteristics (precision and bias) as the KF method.

ACKNOWLEDGEMENTS

Johnson & Johnson Belgium is gratefully acknowledged for the lend of the Lighthouse Probe™ as well as the Brüker spectrometer. Pharm. Sofie De Plecker is thanked for her technical assistance.

REFERENCES

- [1] FDA-Administration, Guidance for Industry - PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, in, 2004.
- [2] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes, *International Journal of Pharmaceutics*, 417 (2011) 32-47.
- [3] W. Paul Findlay, G.R. Peck, K.R. Morris, Determination of fluidized bed granulation end point using near-infrared spectroscopy and phenomenological analysis, *J. Pharm. Sci.*, 94 (2005) 604-612.
- [4] J. Rantanen, M. Kansakoski, J. Suhonen, J. Tenhunen, S. Lehtonen, T. Rajalahti, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, Next Generation Fluidized Bed Granulator Automation, *AAPS PharmSciTech*, 1 (2000) article 10.
- [5] J. Rantanen, A. Jorgensen, E. Rasanen, P. Luukkonen, S. Airaksinen, J. Raiman, K. Hänninen, O. Antikainen, J. Yliruusi, Process Analysis of Fluidized Bed Granulation, *AAPS PharmSciTech*, 2 (2001) article 21.
- [6] F.J.S. Nieuwmeyer, M. Damen, A. Gerich, F. Rusmini, K. van der Voort, H. Vromans, Granule characterization during fluid bed drying by development of a near infrared method to determine water content and median granule size, *Pharmaceutical Research*, 24 (2007) 1854-1861.
- [7] M. Alcalà, M. Blanco, M. Bautista, J.M. González, On-line monitoring of a granulation process by NIR spectroscopy, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 336-345.
- [8] J. Rantanen, S. Lehtola, P. Ramet, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, On-line monitoring of moisture content in an instrumented fluidized bed granulator with a multi-channel NIR moisture sensor, *Powder Technology*, 99 (1998) 163-170.
- [9] J. Rantanen, O. Antikainen, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, Use of the near-infrared reflectance method for measurement of moisture content during granulation, *Pharmaceutical Development and Technology*, 5 (2000) 209-217.
- [10] R.A. Mattes, In-line process analysis of residual moisture in a fluid bed granulator-dryer using NIR spectroscopy, *Spectroscopy*, January (2005).
- [11] J.G. White, On-line moisture detection for a microwave vacuum dryer, *Pharmaceutical Research*, 11 (1994) 728-732.
- [12] R.L. Green, G. Thureau, N.C. Pixley, A. Mateos, R.A. Reed, J.P. Higgins, In-line monitoring of moisture content in fluid bed dryers using near-IR spectroscopy with consideration of sampling effects on method accuracy, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 4515-4522.

- [13] P. Frake, D. Greenhalgh, S.M. Grierson, J.M. Hempenstall, D.R. Rudd, Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infra-red spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, 151 (1997) 75-80.
- [14] L. Chablani, T.M. K, M. Amit, R. Patrick, S.W. C, Inline Real-Time Near-Infrared Granule Moisture Measurements of a Continuous Granulation-Drying-Milling Process, *AAPS PharmSciTech*, 12 (2011) 1050-1055.
- [15] A. Hartung, M. Knoell, U. Schmidt, P. Langguth, Role of continuous moisture profile monitoring by inline NIR spectroscopy during fluid bed granulation of an Enalapril formulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 37 (2011) 274-280.
- [16] A. Burggraeve, A.F.T. Silva, T. Van Den Kerkhof, M. Hellings, C. Vervaet, J. Paul Remon, Y. Vander Heyden, T. De Beer, Development of a fluid bed granulation process control strategy based on real-time process and product measurements, *Talanta*, 100 (2012) 293-302.
- [17] M. Fonteyne, S. Soares, J. Vercruyse, E. Peeters, A. Burggraeve, C. Vervaet, J.P. Remon, N. Sandler, T. De Beer, Prediction of quality attributes of continuously produced granules using complementary pat tools, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82 (2012) 429-436.
- [18] A. Peinado, J. Hammond, A. Scott, Development, validation and transfer of a Near Infrared method to determine in-line the end point of a fluidised drying process for commercial production batches of an approved oral solid dose pharmaceutical product, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (2011) 13-20.
- [19] C. De Bleye, P.F. Chavez, J. Mantanus, R. Marini, P. Hubert, E. Rozet, E. Ziemons, Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 (2012) 125-132.
- [20] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Validation of quantitative analytical procedure, Harmonization of approaches, *STP Pharma Pratiques*, 13 (2003) 101-138.
- [21] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, Quantative analytical procedures: Harmonization of the approaches Part II: Statistics, *STP Pharma Pratiques*, 16 (2006) 28-58.
- [22] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, Quantitative analytical procedures validation: harmonization of the approaches Part III. Examples of application, *STP Pharma Pratiques* 16 (2006) 87-121.
- [23] J. Mantanus, E. Ziemons, P. Lebrun, E. Rozet, R. Klinkenberg, B. Streel, B. Evrard, P. Hubert, Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development and validation, *Analytica Chimica Acta*, 642 (2009) 186-192.
- [24] T. De Beer, W. Baeyens, A. Vermeire, D. Broes, J.P. Remon, C. Vervaet, Raman spectroscopic method for the determination of medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspensions: validation of quantifying abilities, uncertainty assessment and comparison with the high performance liquid chromatography reference method, *Analytica Chimica Acta*, 589 (2007) 192-199.
- [25] L. Saerens, N. Segher, C. Vervaet, J.P. Remon, T. De Beer, Thorough validation of an in-line Raman spectroscopic method for continuous API quantification during pharmaceutical hot-melt extrusion., *Analytica Chimica Acta*, *submitted*.
- [26] M. Feinberg, B. Boulanger, W. Dewé, P. Hubert, New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, *Anal Bioanal Chem*, 380 (2004) 502-514.
- [27] M. Feinberg, M. Laurentie, A global approach to method validation and measurement uncertainty, *Accred Qual Assur*, 11 (2006) 3-9.
- [28] S. Kuttatharmmakul, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Comparison of alternative measurement methods, *Analytica Chimica Acta*, 391 (1999) 203-225.
- [29] S. Kuttatharmmakul, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Comparison of alternative measurement methods: determination of the minimal number of measurements required for the evaluation of the

bias by means of interval hypothesis testing, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 52 (2000) 61-73.

[30] M. Fonteyne, J. Vercruyssen, D.C. Díaz, D. Gildemyn, C. Vervaet, J.P. Remon, T.D. Beer, Real-time assessment of critical quality attributes of a continuous granulation process, *Pharmaceutical Development and Technology*, 18 (2013) 85-97.

[31] A.N.M. Nguyet, A.M. van Nederkassel, L. Tallieu, S. Kuttatharmmakul, E. Hund, Y. Hu, J. Smeyers-Verbeke, Y.V. Heyden, Statistical method comparison: short- and long-column liquid chromatography assays of ketoconazole and formaldehyde in shampoo, *Analytica Chimica Acta*, 516 (2004) 87-106.

[32] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, W. Penninckx, Y. Vanderheyden, P. Vankeerberghen, D.L. Massart, REAPPRAISAL OF HYPOTHESIS-TESTING FOR METHOD VALIDATION - DETECTION OF SYSTEMATIC-ERROR BY COMPARING THE MEANS OF 2 METHODS OR OF 2 LABORATORIES, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 4491-4499.

Figure 1. Overview of the performed calibration experiments. Levels with different moisture contents and repetitions.

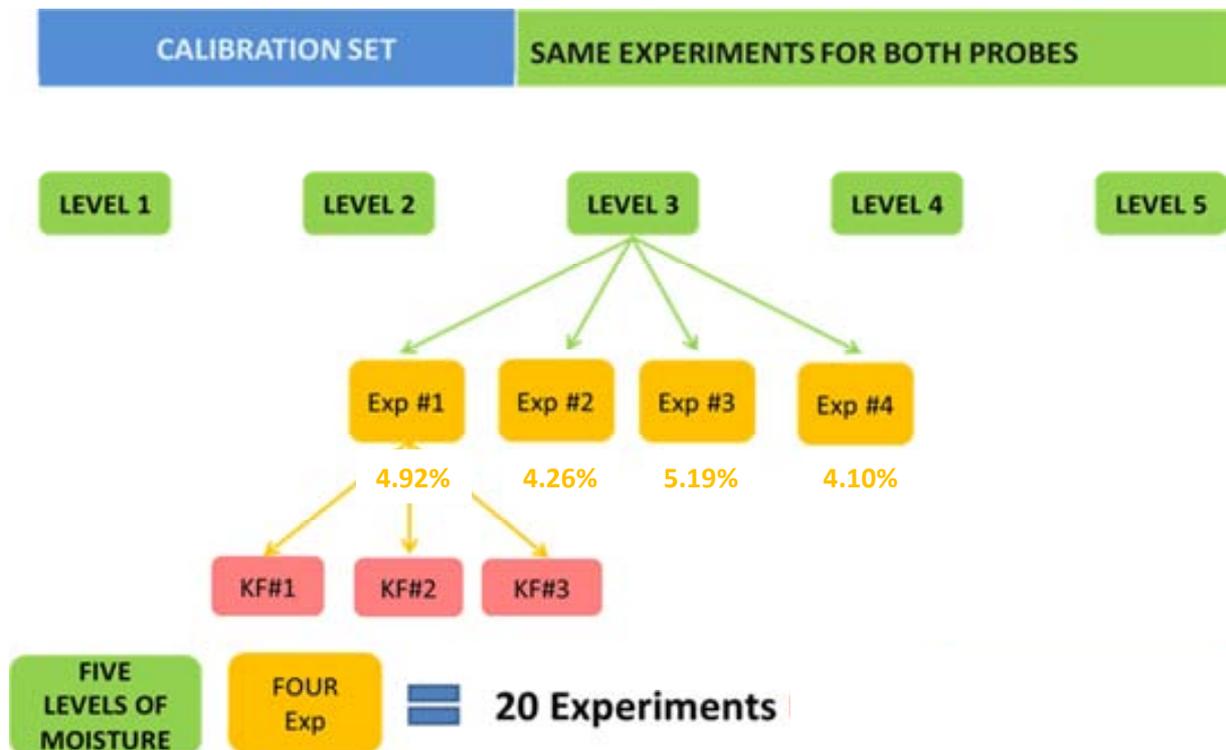


Figure 2. Overview of the performed validation experiments . Levels with different moisture contents and repetitions.

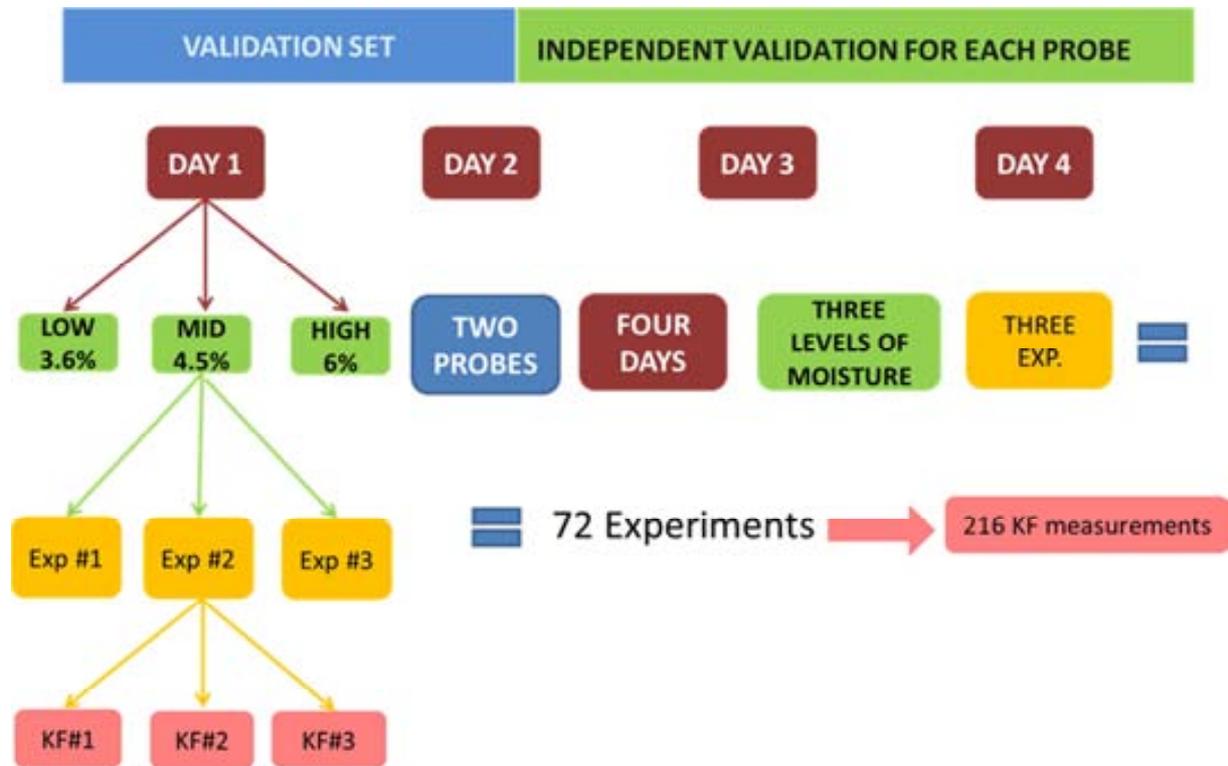


Table 1. The moisture content obtained after each validation experiment by means of Karl Fischer (y_{iref}), the value predicted by the PLS-calibration model (y_{ipred}) and the normalized value (y_{inor}).

Experiment	y_{iref}	y_{ipred}	y_{inor}
Low Day 1	3,51	3,56	3,73
Low Day 1	3,53	3,43	3,57
Low Day 1	3,73	3,49	3,43
Low Day 2	3,63	3,50	3,54
Low Day 2	3,58	3,46	3,54
Low Day 2	3,57	3,45	3,55
Low Day 3	3,78	3,48	3,38
Low Day 3	3,54	3,38	3,50
Low Day 3	3,73	3,45	3,40
Low Day 4	3,72	3,83	3,78
Low Day 4	3,79	3,78	3,66
Low Day 4	3,95	3,81	3,55
Mid Day 1	4,74	4,80	4,85
Mid Day 1	4,81	4,74	4,71
Mid Day 1	4,77	4,77	4,78
Mid Day 2	5,07	4,94	4,66
Mid Day 2	5,14	4,87	4,53
Mid Day 2	4,87	4,62	4,54
Mid Day 3	4,28	4,03	4,50
Mid Day 3	4,89	4,33	4,24
Mid Day 3	4,75	4,29	4,32

Mid Day 4	4,15	3,85	4,44
Mid Day 4	5,19	4,94	4,56
Mid Day 4	4,77	4,69	4,71
High Day 1	5,71	5,69	6,11
High Day 1	5,85	5,81	6,08
High Day 1	5,69	5,38	5,80
High Day 2	6,7	6,44	5,89
High Day 2	6,5	6,23	5,87
High Day 2	6,44	6,07	5,77
High Day 3	5,7	5,91	6,36
High Day 3	6,28	5,98	5,83
High Day 3	6,09	6,15	6,19
High Day 4	6,09	6,10	6,14
High Day 4	6,16	6,12	6,09
High Day 4	6,33	6,14	5,94

Table 2 Calculated in-line NIR method validation parameters.

Trueness

Level	Relative bias	Recovery
Low	-3.25 %	96.75 %
Mid	-4.50 %	95.50 %
High	-1.99 %	98.01 %

Precision

Level	Repeatability	Intermediate precision
Low	2.78%	3.55 %
Mid	2.30%	4.24 %
High	2.85%	3.05 %

Accuracy

Level	Absolute total error	Relative total error	Relative β -expectation tolerance limits
Low	0.245 %	6.68 %	[-11.94; 5.43] %
Mid	0.409 %	8.54 %	[-16.81; 7.81] %
High	0.305 %	4.98 %	[-9.11; 5.12] %

Figure 3 Accuracy profile

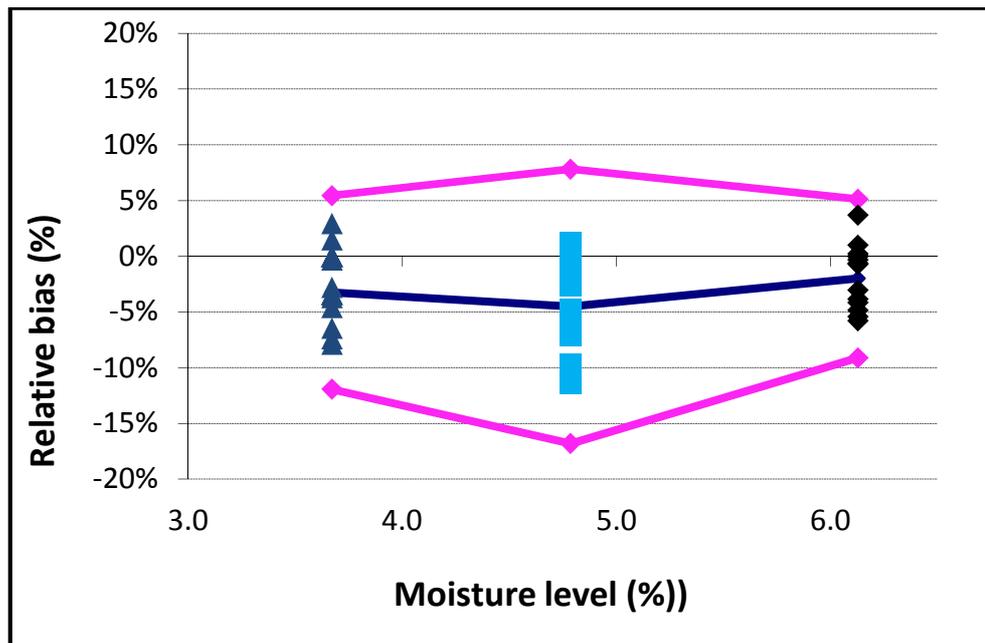


Table 3. Point estimates of the different uncertainties related to moisture content at each moisture content level of the accuracy profile

Level	Uncertainty of the bias (%)	Uncertainty (%)	Expanded uncertainty (%)	Relative expanded uncertainty (%)
Low	0.048	0.135	0.270	7.35
Mid	0.087	0.212	0.424	8.87
High	0.060	0.193	0.386	6.29

Table 4. KF reference data and NIR validation data used for method comparison

			KF	predicted by NIR calibration model
day 1	low (3,6%)	exp 1	3,51	3,56
day 1	low (3,6%)	exp 2	3,53	3,43
day 1	low (3,6%)	exp 3	3,73	3,49
day 1	mid (4,5%)	exp 1	4,74	4,80
day 1	mid (4,5%)	exp 2	4,81	4,74
day 1	mid (4,5%)	exp 3	4,77	4,77
day 1	high (6,0%)	exp 1	5,71	5,69
day 1	high (6,0%)	exp 2	5,85	5,81
day 1	high (6,0%)	exp 3	5,69	5,38
day 2	low (3,6%)	exp 1	3,63	3,50
day 2	low (3,6%)	exp 2	3,58	3,46
day 2	low (3,6%)	exp 3	3,57	3,45
day 2	mid (4,5%)	exp 1	5,07	4,94
day 2	mid (4,5%)	exp 2	5,14	4,87
day 2	mid (4,5%)	exp 3	4,87	4,62
day 2	high (6,0%)	exp 1	6,7	6,44
day 2	high (6,0%)	exp 2	6,5	6,23
day 2	high (6,0%)	exp 3	6,44	6,07
day 3	low (3,6%)	exp 1	3,78	3,48
day 3	low (3,6%)	exp 2	3,54	3,38
day 3	low (3,6%)	exp 3	3,73	3,45
day 3	mid (4,5%)	exp 1	4,28	4,03
day 3	mid (4,5%)	exp 2	4,89	4,33
day 3	mid (4,5%)	exp 3	4,75	4,29
day 3	high (6,0%)	exp 1	5,7	5,91
day 3	high (6,0%)	exp 2	6,28	5,98
day 3	high (6,0%)	exp 3	6,09	6,15
day 4	low (3,6%)	exp 1	3,72	3,83
day 4	low (3,6%)	exp 2	3,79	3,78
day 4	low (3,6%)	exp 3	3,95	3,81
day 4	mid (4,5%)	exp 1	5,19	4,94
day 4	mid (4,5%)	exp 2	4,77	4,69
day 4	mid (4,5%)	exp 3	4,15	3,85
day 4	high (6,0%)	exp 1	6,09	6,10
day 4	high (6,0%)	exp 2	6,16	6,12
day 4	high (6,0%)	exp 3	6,33	6,14

Table 5. Overview of the different types of variances of the in-line NIR and KF validation used for method comparison

Variance estimates	KF method	NIR method
Repeatability variance (s_r^2)	0.0114	0.0021
(Operator + day) variance (s_{OD}^2)	0.0078	0.0289
(Operator + day) intermediate precision	0.0193	0.0310
Variance of the day means	0.0116	0.0296

Table 6. Overview of the F-test results for the comparison of the repeatability and intermediate precision between the in-line NIR and KF reference method

Evaluated precision comparison	Calculated F-value	Tabulated F-value	Conclusion
Repeatability	0.186	3.44	Repeatability of the in-line NIR method is acceptable
Time + operator different intermediate precision	1.61	4.35	Operator + time-different intermediate precision of the in-line NIR method is acceptable