

## **2. Metodología experimental**

---

## 2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen, por un lado, la instrumentación y los programas de cálculo utilizados a lo largo del desarrollo de esta tesis y, por otro, aquellos aspectos generales que pueden afectar al espectro NIR.

## 2.2. INSTRUMENTACIÓN

-Espectrofotómetro NIRSystem 5000, con detector de reflectancia, equipado con un módulo de sonda de fibra óptica AP6645 ANO3P. El software del equipo, NSAS versión 3.52, incorpora los programas para el control y diagnóstico del instrumento, la adquisición de los espectros NIR y su posterior tratamiento.

-Espectrofotómetro NIRSystem 6500, con detector de reflectancia, equipado con un módulo de sonda de fibra óptica AP6641 ANO4P o un módulo RCA (Rapid-Content Analyser). El instrumento está dirigido por el software Vision versión 2.22, el cual incorpora también programas para el control y diagnóstico del instrumento y para la adquisición y tratamiento de los espectros NIR.

-Espectrofotómetro Diode-Array Hewlett Packard HP8452A. El instrumento está gobernado por un ordenador IBM PC-XT a través de una interfase HP-IB. El software del equipo, HP89530 MS-DOS UV/Vis, incorpora programas para controlar el instrumento y para la obtención y tratamiento de los espectros. El espectro de absorbancia se registra utilizando cubetas de cuarzo de 1cm de camino óptico.

-Agitador Turbula<sup>®</sup> Type T2C de WAB utilizado para homogeneizar las muestras preparadas en el laboratorio.

-Agitador magnético con placa calefactora, Agimatic-N de P Selecta

-Centrifugadora modelo Digicen de Alresa

-Baño de ultrasonidos de P Selecta

-Molinillo de cuchillas Turmix Mill

-Tamizador C.I.S.A. con mallas comprendidas entre 75 y 1000  $\mu\text{m}$ .

### **2.3. PROGRAMAS DE CÁLCULO**

-Programa de multicomponentes MC, desarrollado por el grupo de Quimiometría Aplicada de la unidad de Química Analítica de la Universidad Autónoma de Barcelona, que permite determinar las concentraciones de los componentes de una mezcla realizando un ajuste por mínimos cuadrados del espectro de la mezcla a partir de los espectros UV-Visible de cada uno de los componentes puros.

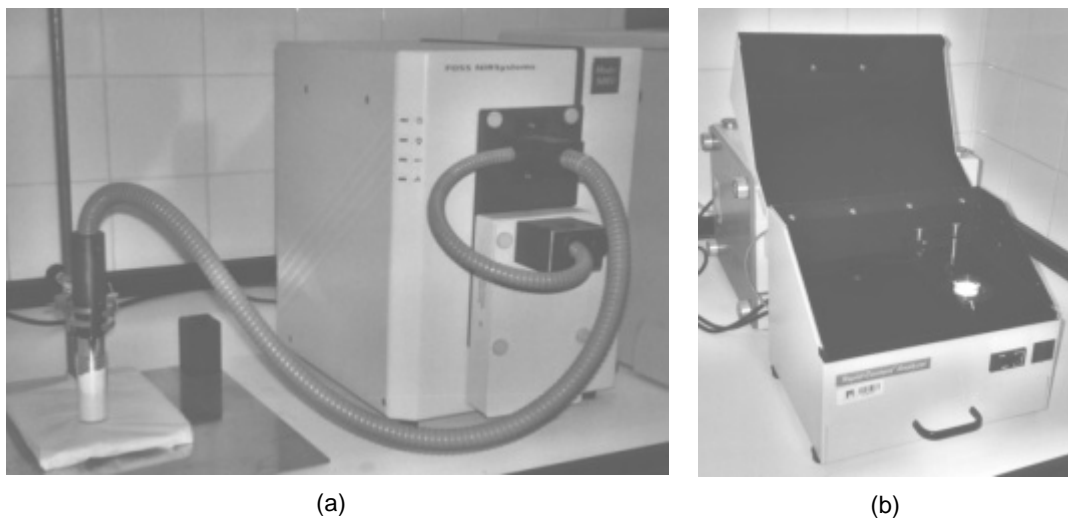
-Programa UNSCRAMBLER de CAMO A/S, desde la versión 7.01 hasta la 7.6, el cual incorpora algoritmos para realizar PCAs, efectuar diferentes técnicas de calibración (ILS, PCR, PLSR) y desarrollar procesos de clasificación con datos espectroscópicos registrados. También se pueden realizar diferentes pretratamientos espectrales (suavizado, derivadas, MSC,...) y operaciones aritméticas con los espectros.

-Programas NSAS versión 3.52 y Vision versión 2.22 utilizados para el control de los espectrofotómetros NIRSystem descritos en el apartado anterior y para llevar a cabo el análisis cualitativo de las muestras.

### **2.4. MÓDULOS UTILIZADOS EN EL REGISTRO DEL ESPECTRO NIR**

Para poder llevar a cabo el registro del espectro NIR se han utilizado a lo largo de esta tesis dos tipos de módulos acoplados al espectrofotómetro: la sonda de fibra óptica (figura 2.1a) y el módulo RCA (figura 2.1b).

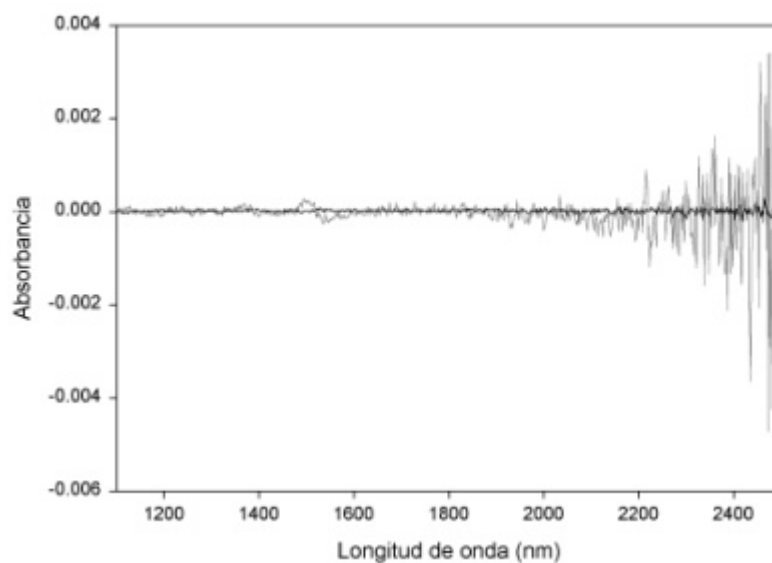
La utilización de la sonda de fibra óptica permite minimizar la manipulación de la muestra por parte del analista, pudiendo incluso medirla directamente en su contenedor habitual. Gracias a esto, se ha convertido en una herramienta muy útil para análisis químico on-line. El principio de la fibra óptica se basa en la transferencia de la luz del espectrofotómetro a la muestra vía fibra óptica y el retorno al espectrofotómetro después de la interacción con la muestra. El principal inconveniente es la pérdida de energía radiante durante el transporte a través de la fibra, provocando un aumento del ruido de la señal que puede tener importancia en el análisis cualitativo y cuantitativo.



**Figura 2.1.** Espectrofotómetro NIRSystem con el módulo de sonda de fibra óptica (a) y con el módulo RCA (b).

El módulo RCA permite la medida tanto de muestras sólidas como líquidas. La disposición circular de los seis detectores, que forman un ángulo de  $45^\circ$  con la horizontal, permite incrementar la sensibilidad instrumental, además de mejorar sustancialmente la relación señal/ruido a partir de 2200nm respecto a la fibra óptica.

En la figura 2.2 se muestra como varía el espectro del ruido en función del módulo con el que se trabaja. Se puede observar que el espectro obtenido con el módulo RCA es menos ruidoso que el obtenido con el módulo de sonda de fibra óptica, especialmente a partir de 2200nm. Esto obliga a que siempre que se trabaje con el módulo de sonda de fibra óptica sea recomendable eliminar la región del espectro comprendida entre 2200 y 2500nm.



**Figura 2.2.** Espectro de ruido obtenido con el módulo de sonda de fibra óptica (gris) y con el módulo RCA (negro).

## 2.5. ESTUDIOS PRELIMINARES CON EL MÓDULO DE RCA

Para el análisis de productos sólidos granulados mediante el módulo RCA es necesario la utilización de una cubeta, que se ubicará en el compartimiento de muestra, tal y como se muestra en la figura 2.3. Uno de los problemas que se planteó fue el efecto que puede causar el grosor de muestra depositado en la cubeta a la distorsión espectral. El espesor mínimo de muestra que no causa distorsión espectral depende de la naturaleza física y química de la misma. En la bibliografía se recoge que para excipientes farmacéuticos es necesario un grosor superior a 10mm<sup>1</sup>. Sin embargo, otros autores opinan que es preciso un grosor entre 0-5mm dependiendo del tamaño de partícula y del grado de compactación<sup>2</sup> o entre 1-2cm dependiendo de la densidad y absortividad del material<sup>3</sup> e incluso que un espesor de 0.75mm<sup>4</sup> ya es suficiente.

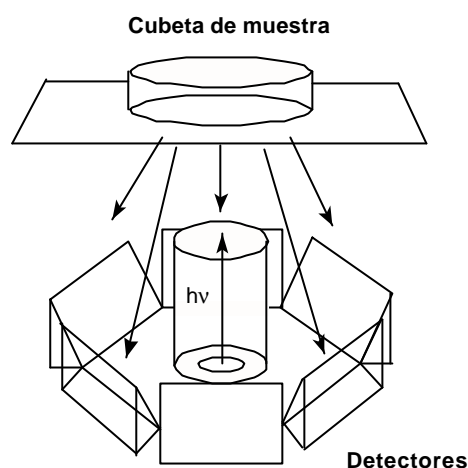
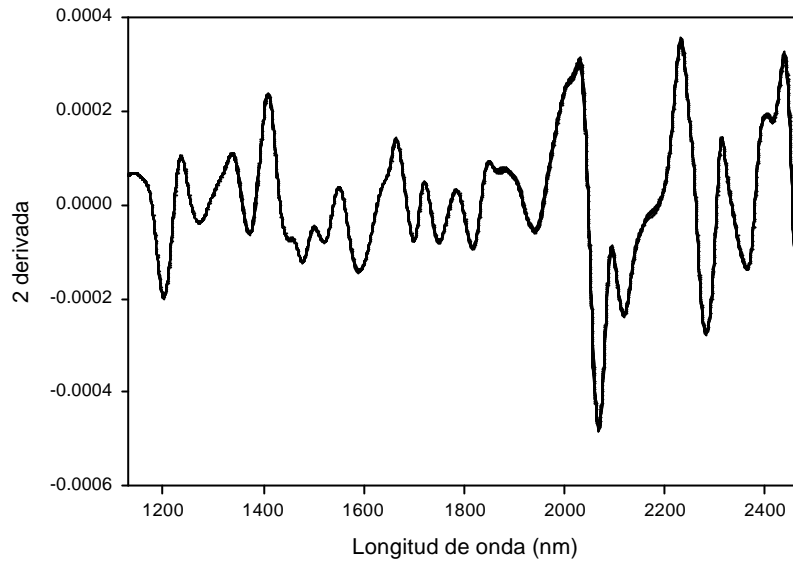


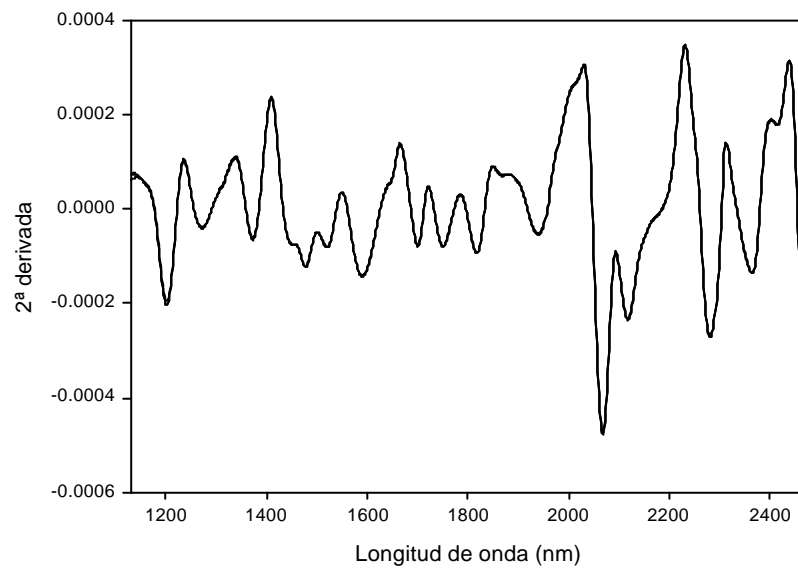
Figura 2.3. Esquema del módulo RCA.

Se estudió como podía influir la cantidad de producto en la reproducibilidad espectral. Para ello se utilizó un excipiente farmacéutico, el sorbitol, con un diámetro medio de partícula  $D_{50}$  de 500  $\mu\text{m}$ <sup>b</sup>. Se registraron 15 espectros a tres grosores diferentes de producto. El primer grosor correspondía a 2mm aproximadamente, el segundo a 5mm y el tercero a 9mm. Entre espectros consecutivos se llenaba y vaciaba la cubeta, y cada tres espectros se registraba un espectro referencia (cubeta vacía). En la figura 2.4 se muestran los 15 espectros correspondientes al primer grosor. De esta figura se desprende cómo varía el espectro al registrar siempre la misma cantidad de producto, teniendo, en principio, también el mismo grosor. En la figura 2.5 se presenta la superposición del espectro promedio de los 15 espectros para cada uno de los diferentes grosores. Como se puede observar la variabilidad espectral es mucho menor que la existente entre los replicados del mismo grosor, lo que confirma que no existen diferencias significativas entre los tres grosores ensayados. Por tanto, en este caso concreto, es suficiente tener un grosor mínimo de producto de 2mm.

<sup>b</sup> El diámetro medio de partícula es el tamaño que divide la distribución de los tamaños de partícula en dos mitades, una con el 50% de masa superior y otra con el 50% de masa inferior<sup>2</sup>. Por esta razón, generalmente se representa con el símbolo  $D_{50}$



**Figura 2.4.** Superposición de la segunda derivada de 15 espectros del excipiente farmacéutico sorbitol.



**Figura 2.5.** Superposición de la segunda derivada de los espectros medios obtenidos para los tres grosores de muestra.

Lo que se observa gráficamente también se puede calcular numéricamente mediante el cálculo de la varianza espectral total media. Para ello se calcula en primer lugar la varianza media a cada longitud de onda  $j$  mediante la siguiente expresión:

$$\text{Varianza}_j = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n-1} \quad (2.1)$$

donde  $x_{ij}$  es la intensidad de la segunda derivada del espectro de la muestra  $i$  a la longitud de onda  $j$ ,  $\bar{x}_j$  es el valor medio de absorbancia de los espectros a la longitud de onda  $j$  y  $n$  el número de espectros. A continuación se calcula la varianza espectral total media mediante la expresión:

$$\text{Varianza total} = \frac{\sum_{j=1}^k \text{varianza}_j}{k} \quad (2.2)$$

donde  $k$  es el número de longitudes de onda.

Si se calcula el valor de la varianza espectral total media para los 15 espectros, en segunda derivada, a los tres grosores diferentes y se hace lo mismo para los espectros medios correspondientes a los tres grosores distintos (tabla 2.1), se observa que el valor obtenido para la varianza espectral correspondiente a los espectros medios a los tres grosores distintos es menor que el obtenido para los diferentes espectros a un mismo grosor, lo que confirma lo observado espectralmente.

**Tabla 2.1.** Valores obtenidos en el cálculo de la varianza espectral total media para los espectros individuales a cada uno de los tres grosores y para los espectros medios a los tres grosores.

	15 espectros grosor 1	15 espectros grosor 2	15 espectros grosor 3	Espectro medio a los 3 grosores
Varianza espectral total media	$6.0 \times 10^{-12}$	$7.9 \times 10^{-12}$	$5.8 \times 10^{-12}$	$2.2 \times 10^{-12}$



## 2.6. UTILIZACIÓN DEL AIRE ACONDICIONADO

La temperatura es un parámetro que debe controlarse en espectrofotometría NIR, especialmente en medidas de líquidos. En análisis de sólidos debe tenerse en cuenta sobretodo cuando la muestra presenta bandas de agua, ya que éstas son muy sensibles a variaciones de temperatura. Una diferencia de grados puede provocar cambios sustanciales en el espectro<sup>6</sup>, por lo que es aconsejable tener el instrumento en una habitación con temperatura controlada. *A priori*, esto parece sencillo mediante la utilización de un aparato de aire acondicionado. Sin embargo, su utilización puede causar ruido en el espectro debido a las fluctuaciones en el vapor de agua atmosférico<sup>7</sup>.

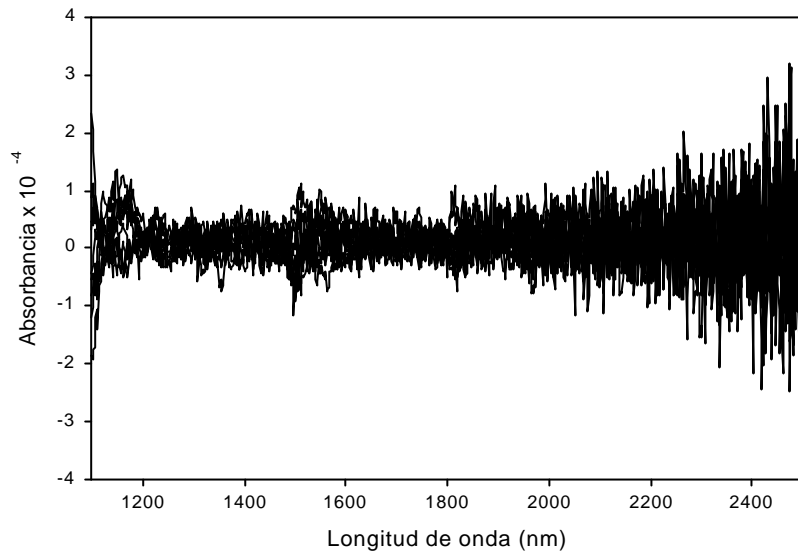
Se realizó un estudio para analizar qué consecuencias podía tener la utilización del aire acondicionado durante el registro de los espectros NIR con el módulo de RCA. Para ello se realizó un test de ruido del espectrofotómetro NIR con y en ausencia del aire. Cuando se realiza un test de ruido se llevan a cabo 10 espectros de ruido (se registra la referencia y a continuación el espectro de la referencia) y se evalúan tres parámetros:

-PP (peak to peak): es la distancia entre el pico máximo y el mínimo en unidades de milliabsorbancia.

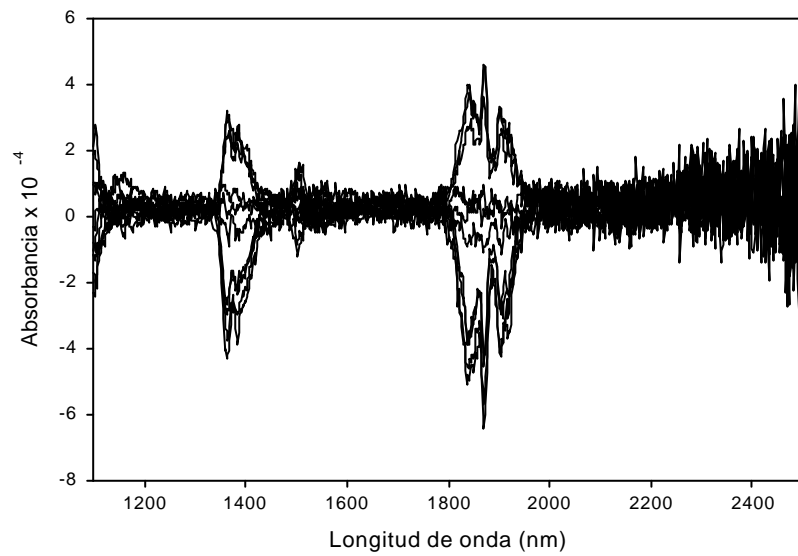
-RMS (root mean square): se puede entender como una media entre las diferencias entre el máximo y el mínimo a lo largo del espectro y puede servir como un reflejo más exacto del ruido a lo largo del espectro.

-Bias: es la diferencia con el 0 de absorbancia.

Si se observan los 10 espectros de ruido, con y sin aire acondicionado (figura 2.6 y figura 2.7 respectivamente), se pueden notar las diferencias existentes entre ambas situaciones, especialmente en las bandas alrededor de 1400nm y de 1900nm, que son las correspondientes a las bandas del agua. Además los parámetros de evaluación del test de ruido varían considerablemente entre trabajar con o sin aire acondicionado, hasta el punto que con el aire no se cumplen las especificaciones del instrumento (tabla 2.2). Por tanto, parece lógico pensar que durante el registro de espectros es necesario que el aparato de aire acondicionado no esté en funcionamiento. Para mantener la temperatura de la habitación donde se encuentra ubicado el instrumento NIR más o menos constante, lo que se hará es tenerlo encendido entre medidas sucesivas, pero mantenerlo apagado en el momento de registrar el espectro NIR.



**Figura 2.6.** Superposición de los 10 espectros de ruido sin aire acondicionado.



**Figura 2.7.** Superposición de los 10 espectros de ruido con aire acondicionado.

**Tabla 2.2.** Parámetros obtenidos al realizar el test de ruido con y sin aire acondicionado.

Test	Especificación	Sin aire acondicionado	Con aire acondicionado
P-P	<0.400	<0.400	0.499<x<0.628
RMS	<0.040	<0.040	0.049<x<0.086
Bias	<0.100	<0.100	<0.100

## 2.7. BIBLIOGRAFÍA

1. W.L.Yoon, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst*, **123**, 1029, 1998.
2. B.F. MacDonald, K.A. Prebble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 1077, 1993.
3. E.W. Ciurczak, *Pharm. Technol.*, 140, 1991.
4. O. Berntsson, L-G. Danielsson, S. Folestad, *Anal. Chim. Acta*, **364**, 243, 1998.
5. C. Washington, *Particle Size Analysis in Pharmaceuticals and other Industries: Theory and Practice*, Ellis Horwood, Chichester, 1992.
6. S.R. Delwiche, K.H. Norris, R.E. Pitt, *Appl. Spectrosc.*, **46**, 782, 1992.
7. A.M.C. Davies, A. Grant, *Appl. Spectrosc.*, **41**, 1248, 1987.

### **3. Desarrollo y validación de un método en el infrarrojo próximo para el análisis de un preparado farmacéutico<sup>a</sup>**

---

---

<sup>a</sup> Trabajo publicado bajo el título "Development and validation of a near infrared method for the analytical control of a pharmaceutical preparation in three steps of the manufacturing process" en *Fresenius J. Anal. Chem.*, **368**, 534-539, 2000.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La problemática de un laboratorio de control en la industria farmacéutica es muy compleja, ya que continuamente recibe muestras de tipología, naturaleza y composición muy diferente que deben ser analizadas. Las metodologías convencionales de análisis requieren la preparación previa de la muestra, lo que supone la mayor parte del tiempo invertido en el análisis, acumula la mayor parte de los errores que se producen en todo el proceso de control y están asociadas a un consumo importante de reactivos y disolventes. Esto provoca que se preste mayor atención a nuevas metodologías que sean al mismo tiempo rápidas, fiables y, si es posible, capaces de lograr el control exhaustivo del proceso de producción, determinando más de un parámetro simultáneamente. En este contexto no es de extrañar el éxito que ha conseguido la espectroscopia en el infrarrojo próximo<sup>1,2</sup>. La posibilidad de realizar medidas directas de muestras sólidas, con mínima o nula manipulación de la misma, la convierte en una técnica ampliamente aceptada en los laboratorios de control, por su capacidad de realizar análisis rápidos y precisos, no solamente en el producto final, sino también en diferentes etapas del proceso de producción. Desde un punto de vista práctico, otro aspecto positivo es la posibilidad de acoplar una sonda de fibra óptica al espectrofotómetro NIR<sup>3-5</sup>, que permite medir la muestra a una cierta distancia y, por tanto, muy útil para análisis químico on-line.

Dado que normalmente un único instrumento debe controlar una gran variedad de productos y de parámetros analíticos, es necesario que previamente a la cuantificación del parámetro deseado se realice una etapa de identificación de la muestra, disminuyendo así la posibilidad de error debido a un incorrecto o incompleto etiquetaje. Esta etapa se puede realizar a partir del espectro NIR del compuesto, utilizando una biblioteca espectral previamente establecida<sup>3,6,7</sup>. Una vez el producto es identificado positivamente, el analito es cuantificado, utilizando la ecuación de calibración apropiada. El gran solapamiento de las bandas en la región del infrarrojo cercano requiere trabajar con técnicas de calibración multivariable<sup>8</sup>, siendo la más utilizada la regresión parcial por mínimos cuadrados.

Para que un nuevo método de análisis de un preparado farmacéutico pueda ser aceptado, éste debe ir acompañado obligatoriamente de su validación. En general, la validación de métodos de análisis está perfectamente regulada. En el ámbito de la industria farmacéutica existen distintas normativas para llevarlas a cabo<sup>9,10</sup>, aunque a nivel internacional la normativa más extendida y aceptada es la de la International Conference on

Harmonisation (ICH)<sup>11</sup>. Sin embargo, uno de los problemas más importantes para el químico, es que las normativas existentes están estrictamente dirigidas a la validación de métodos cromatográficos. La falta de normativas oficiales para otro tipo de métodos hace que sus validaciones se conviertan en un proceso sin reglas preestablecidas, obligando a que los laboratorios farmacéuticos adapten las normativas generales a las necesidades particulares. Así pues, diferentes autores han propuesto distintos enfoques para las validaciones de los métodos NIR<sup>4,12-14</sup>.

En este capítulo se determina el principio activo en tres fases de producción de un preparado farmacéutico: fase mezcla, núcleo y comprimido laqueado. El objetivo final ha sido establecer y validar un único modelo de calibración que permita el análisis de las diferentes fases de producción sin la necesidad de preparar calibraciones individuales para cada una de ellas y, así, simplificar el proceso de análisis de control utilizando un único sistema de medida para todo tipo de muestra.

## **3.2. EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. Instrumentación y software**

El registro de los espectros NIR se ha llevado a cabo con el espectrofotómetro NIRSystem 5000 equipado con el módulo de fibra óptica, el cual está controlado por el software NSAS versión 3.52.

El registro de los espectros UV-Visible utilizados en el método de referencia se ha efectuado con el espectrofotómetro Diode-Array Hewlett Packard HP8452A.

El desarrollo del método cualitativo se ha realizado mediante el programa IQ<sup>2</sup> versión 1.20 de Perstorp Analytical (NIRSystems), mientras que la cuantificación se ha efectuado mediante el programa UNSCRAMBLER versión 7.01. El programa de multicomponentes MC, desarrollado por nuestro grupo de investigación, se ha utilizado para determinar las concentraciones de referencia a partir del análisis UV-Visible.

Para molturar las muestras de producción se ha usado un molinillo de cuchillas Turmix Mill y para homogeneizar las muestras sólidas preparadas en el laboratorio se ha empleado un agitador TURBULA tipo T2C de WAB.

### 3.2.2. Descripción de las muestras de producción

El preparado farmacéutico estudiado, Spasmoclyl<sup>®</sup> 40 mg. se presenta en forma de comprimido laqueado, con un contenido nominal de principio activo, bromuro de otilonio, de 400mg/g. Éste es un antiespasmódico, antisecretor gástrico, que actúa reduciendo los espasmos de la musculatura lisa y la secreción glandular (figura 3.1).

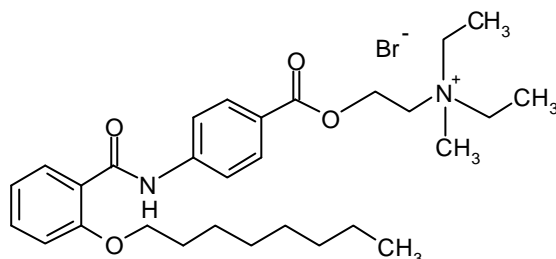


Figura 3.1. Bromuro de otilonio.

Las muestras analizadas pertenecen a tres etapas del proceso de fabricación: fase mezcla (presentada en forma de granulado y que ya contiene todos los componentes del fármaco), núcleo (mezcla directamente compactada) y comprimido laqueado (fármaco comercial que se obtiene a partir de los núcleos a los que se ha aplicado una fina película de laca. En este trabajo todas estas muestras se han denominado genéricamente “muestras de producción”.

En la tabla 3.1 se muestra la composición del preparado en la fase mezcla y núcleo. El contenido nominal de principio activo en los comprimidos laqueados es inferior (400mg/g) debido al recubrimiento de la laca

Se disponía de 34 muestras del preparado farmacéutico pertenecientes a 14 lotes de producción. Seis correspondían a la fase mezcla, 20 a la fase núcleo y 8 a la fase comprimido laqueado. También se disponía de 21 muestras de bromuro de otilonio, 24 de celulosa microcristalina, 15 de almidón de maíz, 15 de carboximetilalmidón y 12 de palmitoestearato de glicerol.

**Tabla 3.1.** Composición de la fase mezcla del preparado farmacéutico.

Componente	mg/g
Bromuro de otilonio	408
Celulosa microcristalina	347
Almidón de maíz	123
Carboximetilalmidón	102
Palmitoestearato de glicerol	20

### 3.2.3. Preparación de las muestras de laboratorio

Para extender el estrecho margen de concentración que presentaban las muestras de producción fue necesario preparar muestras en el laboratorio, las cuales se obtuvieron a partir de la infra- o sobre-dosificación de muestras de distintos lotes de producción con pequeñas cantidades de excipientes o de principio activo. Para reducir la correlación entre el contenido de analito y de excipientes, las muestras infradosificadas se prepararon a partir de la adición aleatoria de dos mezclas diferentes de excipientes. El contenido de principio activo se varió de forma regular en un intervalo de concentraciones de aproximadamente el  $\pm 20\%$  del valor nominal.

Las muestras se homogeneizaron en la túbula, agitándolas durante media hora. Posteriormente se registraba un espectro NIR. El proceso de homogeneización era repetido durante 10 minutos, registrándose un segundo espectro. Si los dos espectros obtenidos eran idénticos, la muestra se consideraba homogénea. En caso contrario, el proceso se repetía hasta conseguir que los dos espectros fuesen iguales.

### 3.2.4. Método de referencia UV-Visible

Alrededor de 0.1g del preparado, previamente molturado, se disolvían en aproximadamente 80ml de metanol. La disolución se sometía a agitación magnética durante 15 minutos y en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Posteriormente la solución se llevaba a 100ml con el mismo disolvente. Una alícuota de la misma se centrifugaba a



3000rpm durante 5 minutos y 5 ml del sobrenadante se diluían a 50 ml con metanol. Finalmente se registraba el espectro de la solución final entre 190 y 820nm, frente a un blanco de metanol.

Se utilizó la regresión lineal múltiple para cuantificar las muestras a partir de su espectro de 1ª derivada en el intervalo 250-330nm, utilizando como estándar el espectro de primera derivada del bromuro de otilonio (figura 3.2a). Previamente se comprobó que en el intervalo utilizado para la cuantificación, los excipientes del fármaco no presentan absorción (figura 3.2b).

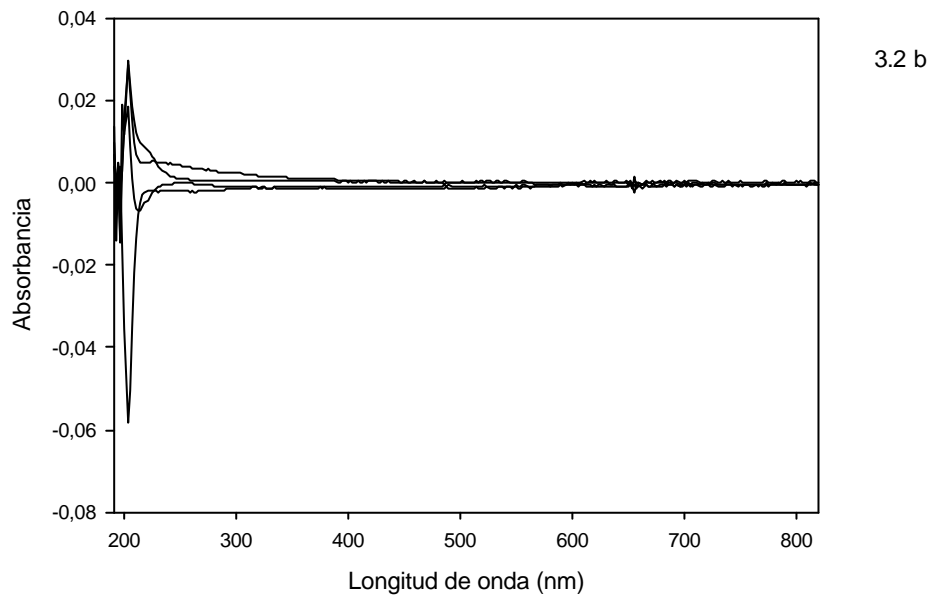
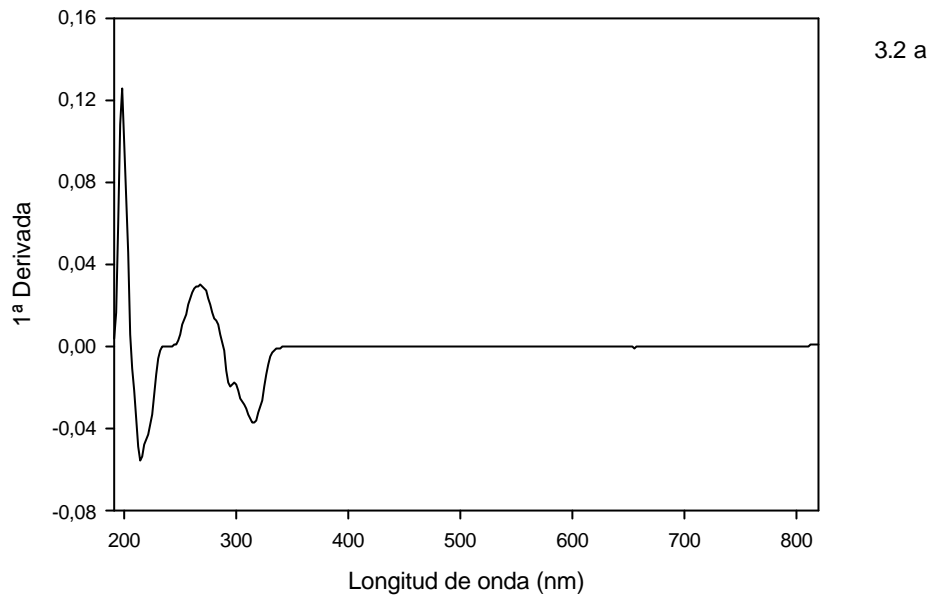
Para la preparación del espectro estándar del bromuro de otilonio se realizaron dos pesadas diferentes, así como diversas diluciones, para minimizar cualquier error debido a la manipulación de la muestra.

### **3.2.5. Registro de los espectros NIR**

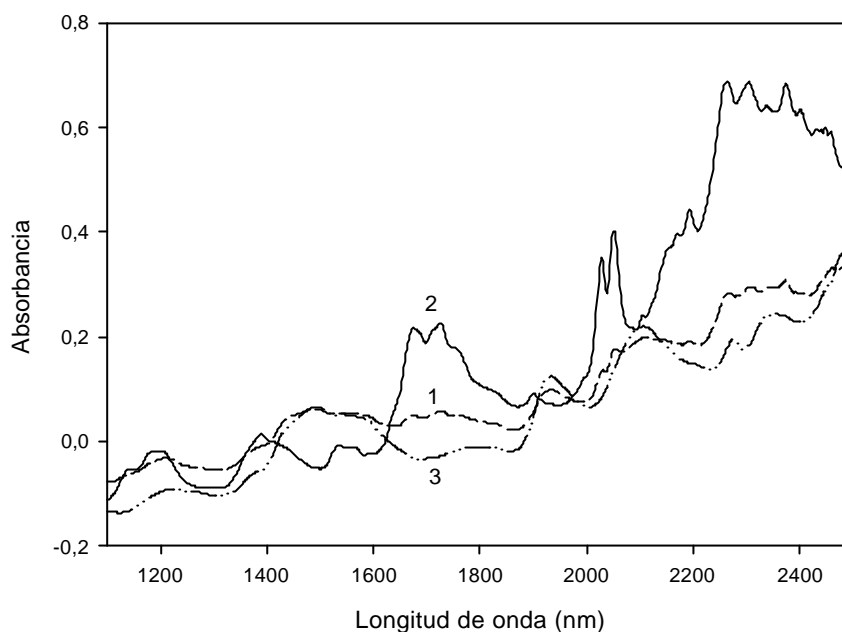
Dado que el fármaco se analizaba en diferentes fases de producción y los espectros pueden verse afectados por los distintos tamaños de partícula, las muestras se molturaban para su análisis. Para ello, 10 g de muestra (de cualquiera de las tres fases) se molturaban en un molinillo durante 30 segundos, tamizando posteriormente la muestra pulverizada para asegurar que más del 90% de la misma tuviera un tamaño de partícula inferior a 250 micras.

La muestra molturada se analiza directamente, sin realizar ningún otro tratamiento, utilizando la sonda de fibra óptica. Cada espectro registrado es el promedio de 32 scans en el intervalo de longitudes de onda de 1100 a 2498nm. De cada muestra se registran tres espectros, removiéndola antes de cada medida, utilizando, en los cálculos posteriores, el espectro promedio de los tres replicados.

En la figura 3.3 se muestra el espectro promedio de absorbancia de una muestra de producción molturada, del principio activo y del excipiente mayoritario.



**Figura 3.2.** (a) Espectro de 1ª derivada del bromuro de otilonio (b) Espectro de absorbancia de los excipientes del fármaco.



**Figura 3.3.** Espectros NIR de absorción de (1) muestra de Spasmocetyl® 40mg, (2) bromuro de otilonio y (3) celulosa microcristalina.

### 3.2.6. Procesado de los datos

Se utilizó como pretratamiento espectral la derivación. Tanto la primera como la segunda derivada se calcularon usando el software NSAS con un segmento de 10 y 20 respectivamente.

#### 3.2.6.1. Proceso de identificación

La identificación de muestras problema se realizó utilizando como parámetro de discriminación el coeficiente de correlación<sup>15,16</sup>. Para ello, se compara su espectro con el espectro medio de cada uno de los productos incluidos en la biblioteca de referencia y se identifica como aquel producto que proporciona un coeficiente de correlación mayor. Un valor de +1 indica similitud perfecta entre el espectro de la muestra problema y el espectro de la muestra de la biblioteca. Sin embargo, el ruido aleatorio asociado a las medidas hace que este valor pueda no llegar a alcanzarse y, por tanto, hay que definir un valor umbral de identificación.

### 3.2.6.2. Análisis cuantitativo

Todos los modelos de calibración se obtuvieron utilizando el algoritmo PLS<sup>8</sup> y se construyeron por cross-validation, usando tantos segmentos como muestras contenía el conjunto de calibración. El número de componentes principales se determinó como el mínimo por el que el sumatorio del cuadrado de los residuales (PRESS) no difería significativamente del valor mínimo del PRESS<sup>17</sup>.

Para mostrar la calidad de los resultados se utilizó el error estándar relativo de predicción RSEP (%)<sup>18</sup>.

## 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era desarrollar un procedimiento de análisis de un producto farmacéutico en diferentes fases del proceso de producción, donde a partir de una única medida espectral se realizaba simultáneamente el análisis cualitativo (identificación) y cuantitativo.

### 3.3.1. Desarrollo del método de identificación

Se construyó una biblioteca con 117 espectros que representaban 6 productos distintos: el preparado farmacéutico y sus cinco componentes puros. Para cada producto se registraron un mínimo de 12 espectros pertenecientes al menos a 4 lotes de producción, para incluir de esta forma la variabilidad debida al proceso de producción. Se utilizó el intervalo espectral 1134-2200, con espectros en 2ª derivada para aumentar así la diferenciación entre los espectros de las distintas muestras y reducir la variabilidad espectral debida a la dispersión.

La biblioteca creada no presentaba ninguna conflictividad interna, identificando correctamente todos los espectros incluidos en la autovalidación de la misma. En un primer momento se estableció como valor umbral de identificación positiva un coeficiente de correlación superior a 0.95. En el caso de que una muestra superase este umbral para más de un producto contenido en la biblioteca, se identificaría positivamente como aquel producto con el que presenta un coeficiente de correlación mayor.

En las tablas 3.2 y 3.3 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos al analizar tres muestras de producción (una para cada fase del proceso de producción) y muestras de los componentes puros, respecto a los distintos productos introducidos en la biblioteca. Como se puede observar, cada uno de los productos analizados se identifica correctamente con un coeficiente de correlación superior a 0.99 y con coeficientes respecto al resto de componentes de la biblioteca suficientemente diferenciados para que no se produzcan confusiones.

**Tabla 3.2.** Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de una muestra de producción de cada una de las tres fases de producción. (1) Muestra identificada. (2) Producto incluido en la biblioteca.

(2)	(1) Spasmocetyl Fase mezcla	Spasmocetyl Fase núcleo	Spasmocetyl Fase núcleo laqueado
Spasmocetyl (Spa)	<b>0.999</b>	<b>0.996</b>	<b>0.997</b>
Bromuro de otilonio (BrOtil)	0.479	0.440	0.447
Celulosa microcristalina (Cel)	0.749	0.779	0.774
Almidón de maíz (Alm)	0.743	0.791	0.782
Carboximetilalmidón (Carb)	0.798	0.820	0.816
Palmitoestearato glicerol (Palm)	0.327	0.313	0.309

**Tabla 3.3.** Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de muestras de los componentes puros de la formulación. (1) Muestra identificada. (2) Producto incluido en la biblioteca.

(2)	(1) BrOtil	Cel	Alm	Carb	Palm
Spa	0.479	0.746	0.744	0.782	0.295
BrOtil	<b>0.998</b>	-0.189	0.091	-0.050	0.134
Cel	-0.194	<b>1.000</b>	0.927	0.932	0.187
Alm	-0.098	0.928	<b>1.000</b>	0.941	0.155
Carb	-0.028	0.919	0.945	<b>0.998</b>	0.208
Palm	0.153	0.197	0.176	0.215	<b>0.996</b>

### 3.3.2. Validación del método de identificación

Una vez establecido el método, se validó la biblioteca realizando un estudio de repetitividad y de reproducibilidad a lo largo del tiempo.

El estudio de la repetitividad se efectuó registrando 12 espectros de la misma muestra para cada fase de producción, un mismo día por un mismo operador. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.4, donde se observa que el coeficiente de correlación es prácticamente la unidad en todos los análisis.

El estudio de la reproducibilidad a lo largo del tiempo se realizó analizando 10 muestras producidas a lo largo de los tres meses posteriores al desarrollo del método. Todos los coeficientes de correlación obtenidos se encuentran entre 0.990 y 1.000, tal y como se observa en la tabla 3.5.

A pesar de que en un primer momento el valor umbral se fijó en 0.95, dado que durante el proceso de validación ninguna muestra de producción presentaba un coeficiente de correlación inferior a 0.99, éste se fijó finalmente en 0.99.

**Tabla 3.4.** Coeficientes de correlación respecto a Spasmocetyl obtenidos en 12 análisis de tres lotes de producción.

Medida	Muestra fase mezcla	Muestra fase núcleo	Muestra fase núcleo laqueado
1	0.995	0.999	0.993
2	0.994	0.998	0.993
3	0.996	0.997	0.993
4	0.997	0.997	0.993
5	0.997	0.997	0.992
6	0.995	0.997	0.992
7	0.994	0.998	0.992
8	0.993	0.997	0.992
9	0.992	0.997	0.992
10	0.998	0.997	0.992
11	0.994	0.997	0.992
12	0.998	0.996	0.992

**Tabla 3.5.** Coeficientes de correlación respecto a Spasmoclyl obtenidos en la identificación de distintos lotes de producción.

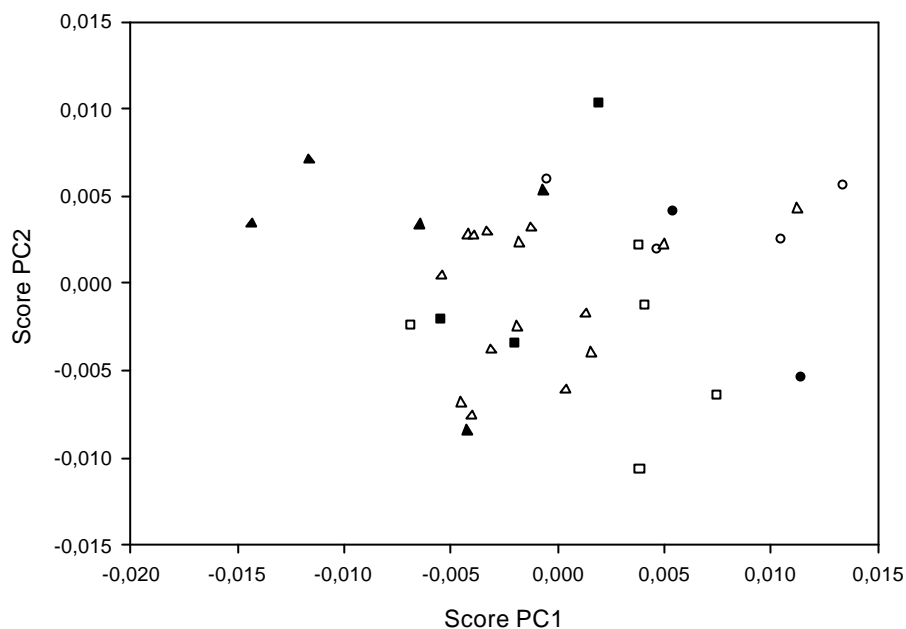
Muestra	Coefficiente correlación
1	0.999
2	0.999
3	1.000
4	0.995
5	0.996
6	0.999
7	0.993
8	0.999
9	0.990
10	1.000

### 3.3.3. Desarrollo del método de cuantificación

En el análisis de productos farmacéuticos, uno de los principales problemas es la disponibilidad de un conjunto de muestras que cubran un intervalo de concentración adecuado para establecer una ecuación de calibración fiable, puesto que todos los lotes de fabricación tienen un contenido de principio activo y excipientes muy constante y próximo al valor nominal. En este trabajo, el intervalo de concentración se extendió mediante la utilización de muestras de laboratorio, las cuales se obtuvieron por infra y sobredosificación de muestras pertenecientes a diferentes lotes de producción con pequeñas cantidades de excipientes y principio activo, respectivamente<sup>5</sup>. El conjunto de calibración estaba formado por muestras de laboratorio, que cubrían perfectamente el intervalo de concentraciones deseado, y por muestras de producción, que introducían la variabilidad del proceso de producción.

La selección de las muestras de producción se ha de llevar a cabo de manera que se tenga en cuenta la máxima variabilidad con un número pequeño de muestras. Con esta finalidad se realizó un análisis en componentes principales (PCA) de los espectros en 2ª derivada de todas las muestras de producción disponibles. En la figura 3.4 se muestra la representación de los scores de las muestras de producción para el primer y segundo

componente principal (PC), lo que explica el 84% de la variabilidad espectral, indicando las muestras escogidas para el conjunto de calibración. Al seleccionar estas muestras se tuvo en cuenta que pertenecieran a las diferentes fases del proceso de fabricación, ya que, a pesar de que fueron molturadas, en su espectro NIR todavía se podía diferenciar su origen, tal y como se muestra en la figura 3.5.



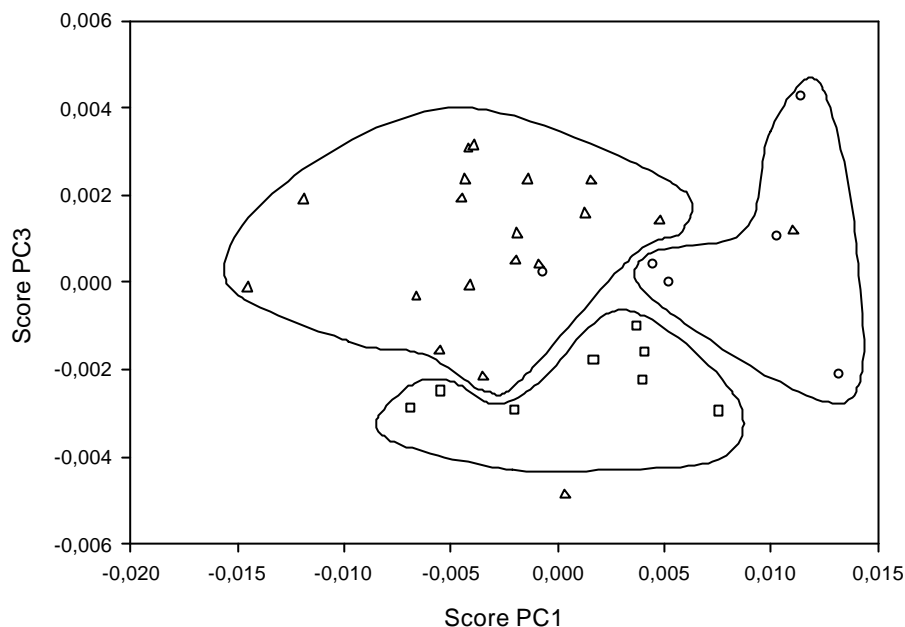
**Figura 3.4.** Representación del primer score frente al segundo en el análisis en componentes principales de las muestras de producción. (●, ○) Fase mezcla. (▲, △) Fase núcleo. (■, □) Fase núcleo laqueado. (●, ▲, ■) Muestras de calibración. (○, △, □) Muestras de predicción.

Una vez fueron escogidos los conjuntos de calibración y predicción, se construyeron diferentes modelos PLS utilizando distintos modos espectrales e intervalos de longitudes de onda.

Se encontró que la precisión de los modelos ensayados estaba influenciada por el contenido de agua. Así pues, los mejores resultados se obtuvieron usando un intervalo estrecho de longitudes de onda (1600 -1800nm), donde el analito presenta absorción y las bandas de agua quedan excluidas. En esta situación, los tres modos espectrales



estudiados, absorbancia, primera y segunda derivada, producían resultados muy similares, con RSEP(%) que variaban entre 0.9 y 1.3, y con un número de componentes principales PLS de 4, 3 y 2, respectivamente. Finalmente, se escogió el modelo de calibración que utilizaba la primera derivada como el más adecuado para análisis de rutina.



**Figura 3.5.** Representación del primer score frente al tercero en el análisis en componentes principales de las muestras de producción. (○) Fase mezcla. (△) Fase núcleo. (□) Fase núcleo laqueado.

### 3.3.4. Validación del método de cuantificación

Según la guía ICH<sup>11</sup>, en la validación de un método se han de considerar estudios de precisión, exactitud, intervalo de concentración, linealidad y robustez. Sin embargo, su aplicación a un método NIR presenta algunos aspectos discutibles, especialmente en lo referente a linealidad, exactitud y robustez.

La aplicación de la regresión PLS para realizar la determinación de un principio activo obliga a establecer *a priori* el intervalo de concentraciones que se quiere cubrir, por lo que este parámetro no fue objeto de estudio.

### 3.3.4.1. Precisión

Normalmente la precisión se determina evaluando tres parámetros: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. En este caso, dado que el método se va a utilizar como análisis de control de calidad interno, no es necesario realizar el estudio de reproducibilidad.

La repetitividad se determinó realizando 12 análisis de la misma muestra para cada fase de producción, el mismo día y por el mismo operador. Como se observa en la tabla 3.6, para todas las muestras el coeficiente de variación (CV) era inferior a 0.6%, claramente inferior al límite habitualmente aceptado (1%)<sup>19</sup>.

**Tabla 3.6.** Resultados (mg/g) encontrados en el estudio de la repetitividad.

Medida	Muestra fase mezcla	Muestra fase núcleo	Muestra fase núcleo laqueado
1	404	406	400
2	405	409	400
3	402	409	401
4	402	407	401
5	404	408	401
6	403	406	397
7	405	408	395
8	404	403	396
9	403	406	398
10	406	404	397
11	407	404	396
12	406	405	396
	Media: 404	Media: 406	Media: 398
	CV: 0.4%	CV: 0.5%	CV: 0.6%

Para estimar la precisión intralaboratorio, denominada precisión intermedia por la ICH<sup>11</sup>, se analizaron tres muestras de producción (una de cada fase) tres días distintos por dos operadores diferentes. En la tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que el coeficiente de variación es algo superior al obtenido en el estudio de la repetitividad, debido a la introducción de nuevas fuentes de variación en el análisis.

La varianza debida a las fuentes de variación día y operador fueron evaluadas conjuntamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías<sup>20</sup>, a partir del cual se concluyó que ninguna de las dos variables provocaba errores sistemáticos.

**Tabla 3.7.** Resultados (mg/g) encontrados en el estudio de precisión intermedia.

Muestra	Operador	Día 1	Día 2	Día 3	
Fase mezcla	1	403	406	402	s = 3.1
	2	410	407	403	CV = 0.8
Fase núcleo	1	406	410	404	s = 2.0
	2	408	406	407	CV = 0.5
Fase núcleo laqueado	1	397	400	395	s = 2.1
	2	400	398	396	CV = 0.5

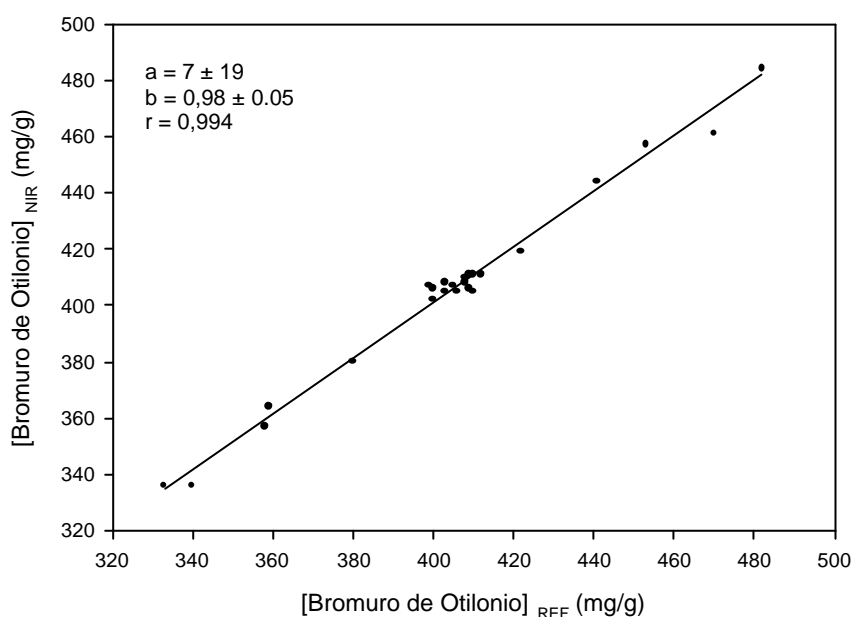
#### 3.3.4.2. Exactitud y linealidad

En la validación de un proceso analítico univariable, la linealidad y la exactitud son evaluadas independientemente. De acuerdo con la guía ICH “la linealidad debe ser evaluada por inspección visual del gráfico de la señal analítica en función de la concentración de analito”. Además, la guía indica que “un análisis de las desviaciones de los datos respecto a la línea de regresión puede ser también útil para evaluar la linealidad”.

La exactitud se debe establecer en todo el intervalo de concentraciones del método analítico (al menos el  $\pm 20\%$  del valor nominal, para el análisis de un principio activo). Se puede determinar por aplicación del método analítico a un analito con una pureza conocida o por comparación con un segundo método bien caracterizado.

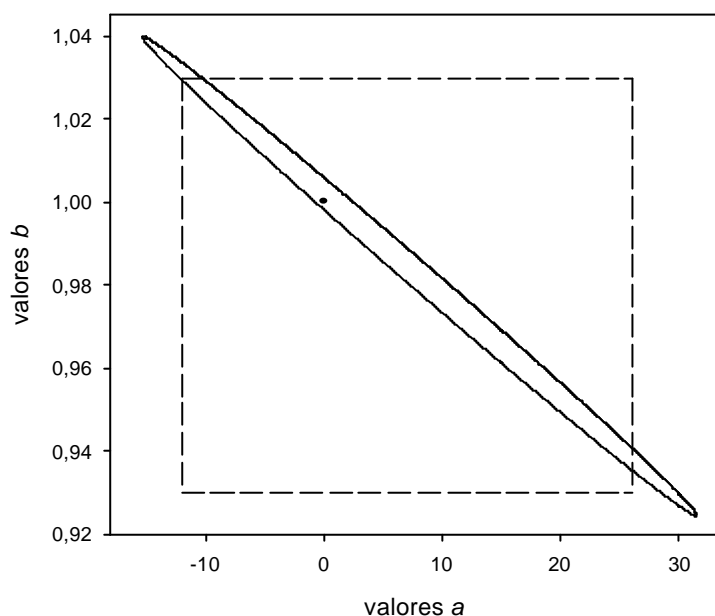
En un procedimiento multivariable NIR esta evaluación separada no es posible. Por una parte, no existe una señal analítica específica para ser representada y, por otra, el intervalo de concentración se establece previamente, durante el proceso de calibración. Nuestra propuesta fue evaluar conjuntamente exactitud y linealidad utilizando el mismo conjunto de muestras, constituido tanto por muestras de producción como de laboratorio, ampliando de esta manera el estrecho intervalo de concentración de las primeras. Estas muestras se analizaron tanto por el método NIR como por el método de referencia, y se representaron los resultados NIR frente a los valores de referencia. Si los dos métodos son comparables esta representación debe ser una línea recta con pendiente unidad y ordenada en el origen cero.

En primer lugar se tiene que probar la linealidad. La figura 3.6 muestra la representación del valor de concentración obtenido por el método NIR frente al obtenido por el método de referencia, para el conjunto de muestras de evaluación. La inspección visual indica la existencia de una relación lineal, y si la representación es realmente una línea recta, los residuales se deben distribuir aleatoriamente alrededor del cero. Esto se comprobó aplicando la prueba de rachas de Wald-Wolfowitz<sup>20</sup>.



**Figura 3.6.** Representación de los resultados NIR frente a los valores de referencia en el intervalo de concentración estudiado. La pendiente y ordenada en el origen se muestran con un intervalo de confianza del 95%.

Comprobada la linealidad, se evaluó la exactitud analizando la pendiente y la ordenada en el origen de la recta. A pesar de que un análisis independiente de la pendiente y la ordenada en el origen es normalmente aceptado, desde un punto de vista estadístico los dos parámetros están correlacionados y se debería estimar la región de confianza para una evaluación conjunta de ambos (*joint confidence region*)<sup>21</sup>. Como se puede ver en la figura 3.7, esta región tiene la forma de una elipse con el centro en el punto (7, 0.98). Su inclinación con respecto a los ejes es debida a la correlación negativa entre el término constante ( $a$ ) y la pendiente ( $b$ ). Como el punto (0, 1) se encuentra con un 95% de confianza dentro de la región obtenida en la evaluación conjunta de la ordenada en el origen y la pendiente, se puede aceptar simultáneamente que la pendiente es 1 y la ordenada en el origen 0. En la figura también se muestran los límites de confianza individuales para ambos parámetros. Como se puede observar, el test individual y el conjunto pueden diferir en los resultados, siendo la estimación conjunta mucho más restrictiva que la individual.



**Figura 3.7.** Región con el 95% de confianza para la evaluación de la ordenada en el origen y la pendiente. Elipse evaluación conjunta; rectángulo de puntos evaluación individual.

### 3.3.4.3. Robustez

La robustez de un método analítico se evalúa determinando el efecto que producen pequeños cambios en las condiciones de trabajo<sup>11</sup>. Sin embargo, este no es el caso de las calibraciones NIR multivariadas, donde el modelo de calibración se desarrolla en un periodo predeterminado y se asume que funcionará bien continuamente. Para ello, el instrumento se somete a controles diarios, realizando los diferentes tests recomendados por el vendedor e incluidos en el software que controla el instrumento. Así pues, en el contexto de la espectroscopia NIR, robustez significa “estabilidad del modelo de calibración a lo largo del tiempo”, confundándose, en cierta manera, con solidez. De esta manera, se analizaron 10 muestras, producidas a lo largo de los tres meses posteriores al desarrollo del modelo de calibración, tanto por el método NIR como por el método de referencia. Los resultados (tabla 3.8) se compararon mediante un test t de diferencias<sup>20</sup>, no encontrándose diferencias significativas entre ambos métodos.

**Tabla 3.8.** Valores obtenidos (mg/g) por el método NIR y de referencia en la cuantificación de bromuro de otilonio en muestras de producción.

Muestra	Método de referencia	Método NIR
1	401	405
2	406	408
3	403	402
4	404	396
5	403	404
6	403	409
7	395	398
8	405	403
9	393	397
10	405	406

### 3.4. CONCLUSIONES

Con una selección correcta de las muestras de calibración y la utilización de la regresión parcial por mínimos cuadrados como método de calibración, la espectroscopia NIR por reflectancia difusa se puede utilizar como herramienta analítica para el control de calidad de un preparado farmacéutico en las diferentes etapas del proceso de fabricación.

El procedimiento analítico incluye la identificación de una muestra desconocida y la cuantificación del principio activo en el fármaco, utilizando la misma información espectral.

En este trabajo se ha propuesto una adaptación de la guía de validación ICH a la validación de un método NIR. La metodología propuesta se puede aplicar satisfactoriamente a cualquier producto farmacéutico analizado por espectroscopia NIR de reflectancia difusa, utilizando un procedimiento de calibración multivariable. La validación del método confirma su idoneidad como método de control en rutina.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

1. P. Corti, E. Dreassi, S. Lonardi, *Il farmaco*, **48**(1), 3, 1993.
2. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, *Analyst*, **123**, 135R, 1998.
3. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, E. Russo, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 183, 1994.
4. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. MasPOCH, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 551, 1999.
5. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, *Analyst*, **122**, 761, 1997.
6. N.K. Shah, P.J. Gemperline, *Anal. Chem.*, **62**, 465, 1990.
7. K.B. Bradfield, R.A. Forbes, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **5**, 41, 1997.
8. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
9. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center of Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration (FDA), 1994.

10. U.S.Pharmacopeia 23, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1982-1984, 1994.
11. International Conference on Harmonization (ICH). Harmonized Tripartite Guidelines: Validation of Analytical Procedures Methodology, 1996.
12. A.D. Trafford, R.D. Jee, A.C. Moffat and P. Graham, *Analyst*, **124**,1077, 1999.
13. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga and S. Maspoch, *Analyst*, **124**, 1089, 1999.
14. A.C. Moffat, A.D. Trafford, R.D. Jee and P. Graham, *Analyst*, **125**,1341,2000.
15. J. Workman Jr., P.R. Mobley, B.R. Kowalski y R. Bro, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **31**, 73, 1996.
16. M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. González, D. Serrano, *J. Pharm Biomed. Anal.*, **22**, 139, 2000.
17. D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
18. M. Otto, W. Wegscheider, *Anal. Chem.*, **57**, 63, 1985.
19. M.E. Swartz, I.S. Krull, *Pharm. Techn.*, **22**, 104, 1998.
20. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, Ellis Horwood, Londres, 1988.
21. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.



**4. Desarrollo de un método cualitativo en el infrarrojo próximo para el análisis de un preparado farmacéutico**

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la utilización de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica ha ido en aumento en los últimos tiempos debido, básicamente, al número de ventajas que ésta presenta frente a las metodologías convencionales.

Cabe distinguir dos grandes tipos de aplicación: análisis cualitativo (identificación de un compuesto o de un preparado) y análisis cuantitativo (normalmente determinación del principio activo, aunque se ha aplicado a la cuantificación de muy distintos parámetros). Desde un punto de vista normativo su aplicación al análisis cualitativo está perfectamente consolidada, habiendo sido recogido en distintas farmacopeas, entre ellas la *European Pharmacopoeia*<sup>1</sup>. Por el contrario, el desarrollo normativo de los métodos cuantitativos está menos avanzado, a pesar del gran número de ejemplos descritos en la bibliografía<sup>2</sup>.

La identificación de una sustancia por observación visual de su espectro NIR es, generalmente, difícil, ya que éste está constituido por bandas muy anchas que normalmente están superpuestas, por lo que es necesario utilizar los denominados métodos quimiométricos de reconocimiento de pautas<sup>3</sup>, cuyo objetivo es caracterizar la muestra a partir de un adecuado tratamiento matemático-estadístico del espectro. En esencia, el procedimiento a seguir para realizar la identificación con estos métodos es, en primer lugar, obtener un conjunto de señales analíticas de un producto y crear lo que se denomina una biblioteca y, en segundo lugar, registrar la señal de la muestra problema y compararla con las de la biblioteca, usando criterios matemáticos que permitan expresar de una forma paramétrica la similitud entre los espectros comparados. Si el nivel de similitud supera un cierto límite, se considera que los espectros son idénticos y, por tanto, se identifica la muestra como el producto incluido en la biblioteca. Una forma matemática muy utilizada en espectroscopia NIR para expresar el concepto de similitud es el coeficiente de correlación<sup>4,5</sup>, que presenta como ventajas el ser independiente del tamaño de la biblioteca y no ser sensible a las variaciones en la concentración.

La industria farmacéutica debe garantizar la correcta dosificación, manufactura y estabilidad del producto, debiendo, para ello, controlar exhaustivamente las materias primas y cada una de las etapas que componen la fabricación del producto, determinando la humedad, densidad, viscosidad, tamaño de partícula, etc. con el objetivo de detectar y poder corregir desviaciones en el proceso de fabricación. Este control puede realizarse determinando el valor numérico de todos los parámetros mediante métodos cuantitativos de

análisis o comparando el espectro NIR de la muestra con un conjunto de espectros de muestras que cumplan las especificaciones establecidas y que representen todas las fuentes de variabilidad natural de la fabricación. Esta opción constituye lo que se conoce como cualificación y permite comprobar si la muestra está dentro de la variabilidad normal o hay desviaciones en la fabricación que obligan a realizar un análisis completo de la muestra. Los métodos más utilizados son distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda<sup>6</sup>, distancia de Mahalanobis<sup>7,8</sup> y varianza residual en el espacio de los componentes principales<sup>9</sup>.

Dentro del control de calidad en la industria farmacéutica, uno de los aspectos más importantes es el control del enantiomerismo que, desde el desastre de la talidomina en la década de los sesenta, está totalmente legislado<sup>10-12</sup>. Los estereoisómeros son compuestos de igual fórmula molecular (isómeros) que difieren entre sí sólo en la forma en que los átomos están orientados en el espacio. Los enantiómeros son los estereoisómeros de un compuesto quiral (que no puede superponerse a su imagen especular). La mezcla de enantiómeros a la misma concentración se conoce con el nombre de racémico. Los enantiómeros de un compuesto presentan las mismas propiedades físico-químicas en un entorno aquiral, pero sin embargo se comportan de forma distinta en un entorno quiral. Los organismos vivos son inherentemente quirales. Las enzimas, receptores celulares y todas las especies bioquímicas que intervienen en el metabolismo presentan una estereoquímica definida y, por tanto, los enantiómeros de una sustancia presentarán un comportamiento distinto en el organismo humano. Así pues, el enantiómero con la actividad biológica buscada se denomina eutómero, mientras que el otro enantiómero, que en principio no la posee, se denomina distómero. Sin embargo, se pueden distinguir varias situaciones<sup>13</sup>:

- El distómero es tóxico.
- Es distómero es inactivo o menos activo.
- Los dos enantiómeros poseen una actividad biológica distinta.
- La combinación de ambos enantiómeros es beneficiosa, ya sea porque poseen efectos terapéuticos complementarios o bien porque el distómero reduce los efectos secundarios del eutómero.

Por tanto, cuando uno de los componentes de un preparado farmacéutico pueda presentar diferentes formas enantioméricas, es muy importante realizar un estudio que permita detectar la presencia de la forma enantiomérica no deseada. En este contexto la

espectroscopia NIR se puede presentar como una buena opción, tal y como se muestra en la bibliografía<sup>14,15</sup>.

En este capítulo se desarrolla un método cualitativo capaz de identificar un preparado farmacéutico y cada uno de sus componentes puros. Además se estudia la selectividad de dicho método frente a pequeñas desviaciones en el nivel de concentración de alguno de los componentes del fármaco y frente a la presencia de la forma racémica del principio activo.

## **4.2. EXPERIMENTAL**

### **4.2.1. Instrumentación y software**

El registro de los espectros se ha llevado a cabo con el espectrofotómetro NIRSystem 6500 equipado con el módulo de fibra óptica, el cual está controlado por el software Vision versión 2.22. Este software también se empleó para realizar el análisis de los espectros de las muestras.

Para molturar las muestras de producción se ha utilizado un molinillo de cuchillas Turmix Mill y para homogeneizar las muestras sólidas preparadas en el laboratorio se ha usado un agitador TURBULA tipo T2C de WAB.

### **4.2.2. Descripción de las muestras de producción**

El preparado farmacéutico estudiado se presenta en forma de comprimido laqueado, con la composición que se muestra en la tabla 4.1, cuyo principio activo es un compuesto en su forma enantioméricamente pura.

Se disponía de 30 muestras del preparado farmacéutico, 6 del principio activo, 6 del excipiente 1, 6 del excipiente 2 y 6 del excipiente 3.

**Tabla 4.1.** Composición del preparado farmacéutico.

Componente	mg/g
Principio Activo	141
Excipiente 1	530
Excipiente 2	185
Excipiente 3	104
Excipiente 4	20
Laca	20

### 4.2.3. Preparación de las muestras de laboratorio

Para llevar a cabo el estudio de la selectividad del método de identificación desarrollado frente a pequeñas desviaciones del nivel de concentración de alguno de los componentes del fármaco, se prepararon diferentes muestras de ensayo a partir de muestras de producción molturadas a las que se les añadía una pequeña cantidad o de excipientes o de principio activo. El nivel de principio activo se varió en un +5, +10, +15, +20 y +25% en concentración respecto a su valor nominal. Sin embargo, el nivel de los excipientes se varió en un +10 y +20% en concentración respecto a sus valores nominales, y solamente para los tres excipientes mayoritarios (excipiente 1, 2 y 3).

Para realizar el estudio de la selectividad del método de identificación desarrollado frente a pequeñas impurezas de la forma racémica del principio activo, se prepararon 15 muestras sintéticas de composición muy parecida a las muestras de producción (se obvió el excipiente minoritario y la laca) y cuyo principio activo se presenta en su forma enantioméricamente pura, y 4 muestras sintéticas de composición también igual a las muestras de producción pero cuyo principio activo se impurificó en un 10, 15, 25 y 50% con su forma racémica. En este caso no era posible utilizar muestras de producción reales, ya que la empresa no podía fabricar lotes de producción que presentaran una impurificación por la forma racémica del principio activo.

Todas las muestras preparadas en el laboratorio se homogeneizaron en la túbula, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo anterior, punto 3.2.3.

#### **4.2.4. Registro de los espectros NIR**

Todas las muestras de producción se molturaban antes de registrar el espectro NIR. Para ello, aproximadamente 15g de muestra se molturaban durante 30 segundos en un molinillo, tamizando posteriormente la muestra pulverizada para asegurar que más del 90% de la misma tuviera un tamaño de partícula inferior a 250 micras. Por el contrario, las muestras de los componentes puros se medían directamente.

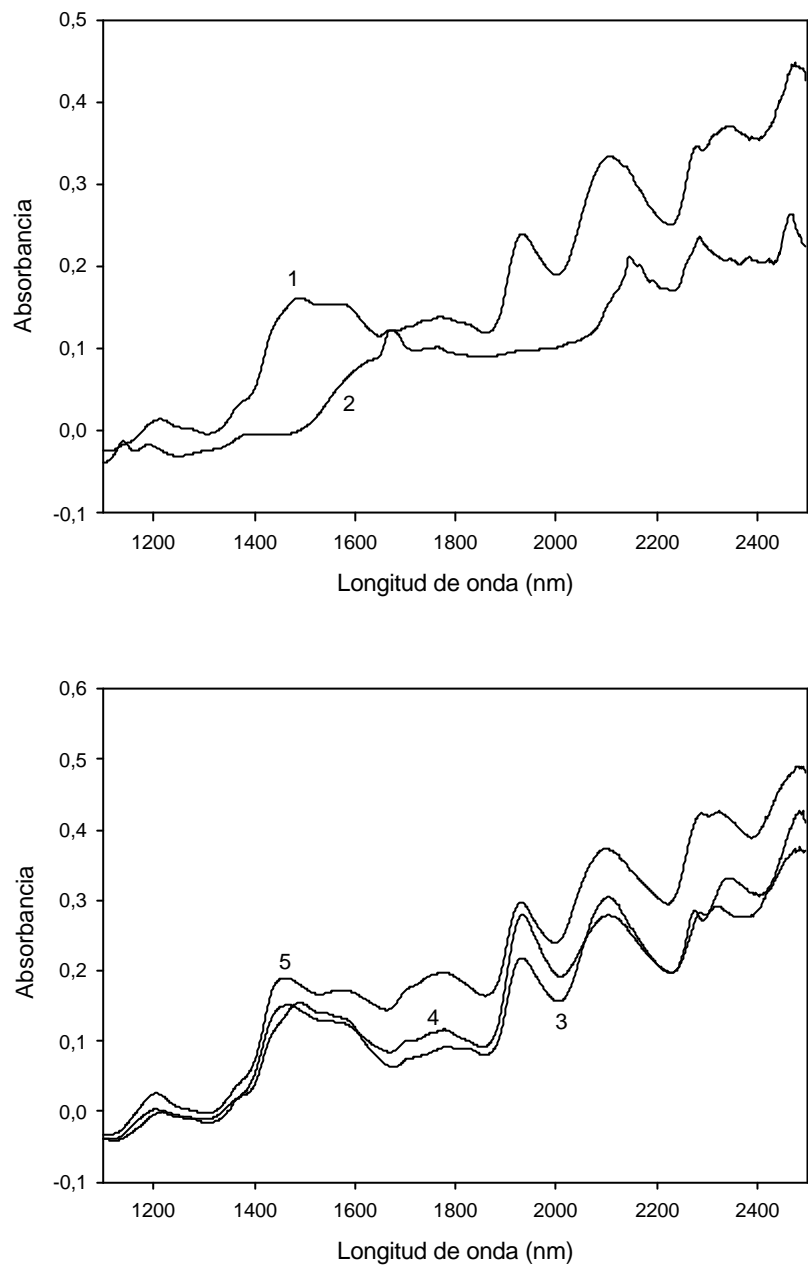
Cada muestra se registraba por triplicado en el intervalo espectral 1100-2498nm, utilizando un promedio de 32 scans para cada espectro. Para llevar a cabo la medida, la sonda de fibra óptica se introducía directamente en el contenedor de los comprimidos pulverizados, removiendo la muestra con la espátula entre cada una de las tres medidas realizadas. Para cálculos posteriores se usaba el espectro promedio de los tres replicados.

En la figura 4.1 se muestra el espectro promedio de absorbancia de una muestra de producción molturada y de los componentes puros del fármaco (principio activo y tres excipientes mayoritarios).

#### **4.2.5. Procesado de los datos**

Las bibliotecas se construyeron con espectros de 2ª derivada para aumentar la diferenciación entre los espectros de las distintas muestras y reducir la variabilidad espectral debida a la dispersión. El espectro de 2ª derivada se calculó utilizando el software Vision con un segmento de tamaño 10.

Se probaron cuatro métodos de identificación: coeficiente de correlación, distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda, distancia de Mahalanobis y varianza residual en el espacio de los componentes principales.



**Figura 4.1.** Espectros NIR de absorbancia de (1) muestra de producción, (2) principio activo, (3) excipiente 1, (4) excipiente 2 y (5) excipiente 3.

## **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.3.1. Desarrollo del método de identificación para muestras de producción.**

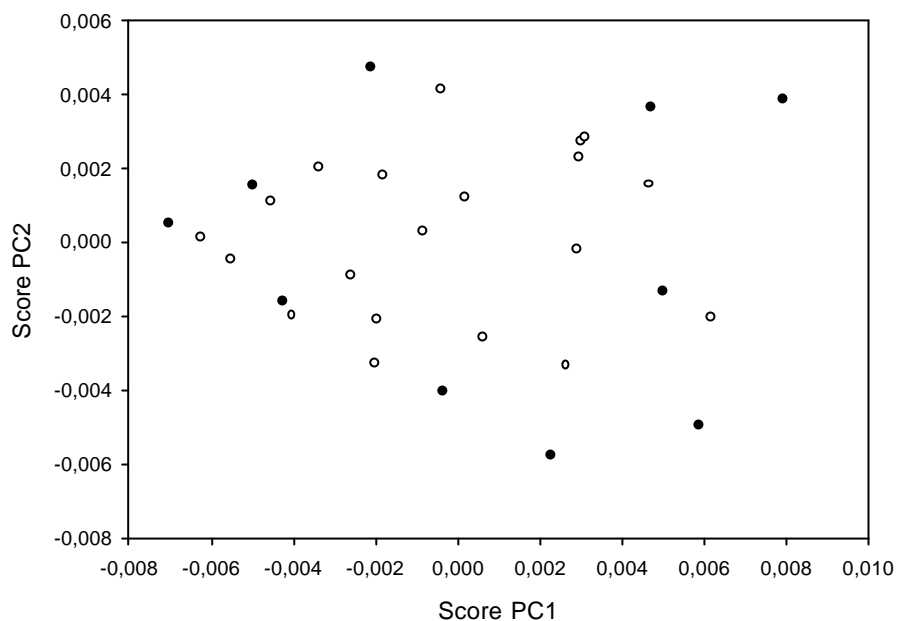
En el desarrollo de una biblioteca se deben tener en cuenta diversos parámetros: selección de las muestras que se utilizarán para construirla, método de identificación, pretratamiento espectral, intervalo espectral, valor del umbral, etc. Y además, cuando los métodos de identificación que se utilizan requieren de un PCA previo (distancia de Mahalanobis y varianza residual en el espacio de los componentes principales), también hay que tener en cuenta otros parámetros como es el número de componentes principales o el valor de la varianza explicada.

En este caso se construyó una biblioteca con 34 espectros que representaban 5 productos distintos: el preparado farmacéutico, el principio activo y los tres excipientes mayoritarios. Se utilizó el intervalo espectral 1130-2200nm, con espectros en 2ª derivada y empleando como método de identificación el coeficiente de correlación. De las 30 muestras de producción de las que se disponía se utilizaron 10 para desarrollar la biblioteca y 20 para validarla. La selección de las muestras de producción se realizó a partir de un análisis en componentes principales (PCA), escogiendo las muestras que presentaban la máxima variabilidad en la gráfica del primer score frente al segundo (figura 4.2).

La biblioteca creada no presentaba ninguna conflictividad interna, identificando correctamente todos los espectros incluidos en la autovalidación de la misma.

Todas las muestras de producción analizadas, tanto las que se utilizaron para desarrollar la biblioteca como las restantes, presentaban un coeficiente de correlación entre 0.998 y 1. Para el análisis de muestras problema se estableció como valor umbral de identificación positiva un coeficiente de correlación superior a 0.99. Como se ha comentado en el capítulo anterior, en el caso de que una muestra superase este umbral para más de un producto contenido en la biblioteca, se identificaría positivamente como aquel producto con el que presenta un coeficiente de correlación mayor.





**Figura 4.2.** Representación del primer score frente al segundo en el análisis en componentes principales de las muestras de producción. (●) Muestras incluidas en la biblioteca. (○) Muestras de validación de la biblioteca.

La idoneidad del método de identificación se determinó en primer lugar comprobando que la biblioteca desarrollada era capaz de identificar correctamente una muestra de producción y de discriminarla frente a otros materiales presentes en la formulación del producto. En la tabla 4.2 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos cuando se analiza una muestra de producción y muestras de los componentes puros, respecto a los distintos productos introducidos en la biblioteca. Se observa que cada uno de los productos analizados se identifica correctamente. Los coeficientes de correlación están suficientemente diferenciados entre ellos, evitando así que se produzcan confusiones.

También se realizó un estudio de la repetitividad y de la precisión intermedia del proceso de identificación. Para ello se efectuaron, en primer lugar, 12 análisis de una misma muestra de producción el mismo día y por el mismo operador. Y en segundo lugar se registraron dos muestras de producción tres días diferentes por 2 analistas distintos. En todos los casos las muestras fueron identificadas correctamente, con coeficientes de correlación entre 0.999 y 1.000.

**Tabla 4.2.** Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de una muestra de producción y muestras de los componentes puros de la formulación. (1) Muestra identificada. (2) Producto incluido en la biblioteca.

(2)	(1) Producción	Principio Activo	Excipiente 1	Excipiente 2	Excipiente 3
Producción	<b>0.999</b>	0.213	0.931	0.875	0.873
Principio activo	0.223	<b>1.000</b>	-0.091	-0.074	-0.090
Excipiente 1	0.925	-0.094	<b>1.000</b>	0.911	0.896
Excipiente 2	0.866	-0.072	0.913	<b>1.000</b>	0.943
Excipiente 3	0.869	-0.093	0.898	0.943	<b>1.000</b>

#### 4.3.2. Selectividad del método de identificación a pequeños cambios en la composición del fármaco

Una vez desarrollado el método de identificación, se procedió a estudiar si éste era capaz de detectar pequeñas desviaciones en el nivel de concentración de alguno de los componentes del fármaco. Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras en el laboratorio a partir de muestras de producción molturadas a las que se les añadía una pequeña cantidad de principio activo o de alguno de los excipientes. Así como el nivel de principio activo se varió en un +5, +10, +15, +20 y +25% en concentración respecto a su valor nominal, el nivel de los excipientes sólo se varió en un +10 y +20% en concentración respecto a sus valores nominales, y solamente para los tres excipientes mayoritarios (excipiente 1, 2 y 3). Según la Ley del Medicamento<sup>16</sup> un excipiente es *aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a las sustancias medicinales (principios activos) o a sus asociaciones para servirles de vehículo, posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas del medicamento y su biodisponibilidad*. Por tanto, los excipientes constituyen componentes habituales e imprescindibles en las formulaciones galénicas de los medicamentos, a pesar de que no poseen actividad terapéutica<sup>17</sup>. Por este motivo solamente se han estudiado dos casos de variación de sus composiciones en el fármaco. Sin embargo, dado que el principio

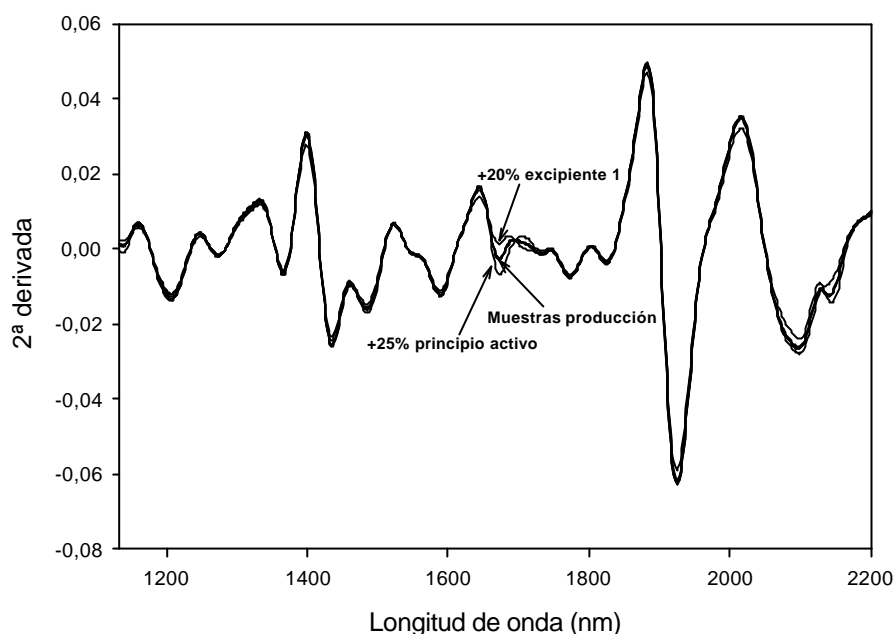
activo sí que presenta actividad farmacológica<sup>16</sup> y un aumento en su nivel de concentración puede provocar diversos tipos de problemas (toxicidad, agravamiento de sus efectos secundarios o aparición de nuevos efectos secundarios), se han estudiado cinco casos de variación en su composición.

Se analizaron todas las muestras preparadas en el laboratorio con el método de identificación desarrollado. Como se puede ver en la tabla 4.3, con el umbral inicial de 0.99, todas las muestras son identificadas como muestras de producción, sin que el método sea capaz de discernir que la composición de estas muestras no corresponde exactamente a la composición del preparado farmacéutico.

**Tabla 4.3.** Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de las muestras preparadas en el laboratorio cuya composición no corresponde con la composición del fármaco.

Muestra	Identificada como	Coefficiente correlación
+5% principio activo	Producción	0.998
+10% principio activo	Producción	0.997
+15% principio activo	Producción	0.997
+20% principio activo	Producción	0.997
+25% principio activo	Producción	0.994
+10% excipiente 1	Producción	0.997
+20% excipiente 1	Producción	0.994
+10% excipiente 2	Producción	0.998
+20% excipiente 2	Producción	0.997
+10% excipiente 3	Producción	0.998
+20% excipiente 3	Producción	0.998

Una de las ventajas que presenta el método del coeficiente de correlación es la poca sensibilidad a los cambios de absorbancia, por lo que no se ve afectado por variaciones en la concentración o pequeñas fluctuaciones en la producción. Esto se traduce en que, tal y como ocurre en nuestro caso, cuando las variaciones espectrales debidas a una variación en la composición del fármaco son pequeñas (figura 4.3), el método no sea lo suficientemente selectivo para detectarlas.



**Figura 4.3.** Espectros de 2ª derivada de muestras de producción, de una muestra con un 25% más de principio activo respecto a su valor nominal y de una muestra con un 20% más del excipiente mayoritario respecto a su valor nominal.

### 4.3.3. Aumento de la selectividad de la biblioteca

Para aumentar la selectividad de una biblioteca es posible desarrollar lo que se denomina *biblioteca en dos etapas o en cascada*<sup>15</sup>. En éstas se realiza una primera etapa de identificación, en la que se discrimina entre los productos espectralmente más diferentes, normalmente mediante el método del coeficiente de correlación. Posteriormente, a los espectros cuya identificación inequívoca es ambigua se les aplica un segundo método que proporciona una mayor capacidad discriminante.

De esta forma se construyó una biblioteca en dos etapas. En la primera etapa se utilizaba la biblioteca desarrollada anteriormente, donde se discriminaba entre el preparado farmacéutico y los componentes puros del mismo. Si el espectro del producto desconocido era identificado como el preparado farmacéutico, se aplicaba un segundo método de

identificación que permitiría discriminar aquellas muestras cuya composición no correspondiese exactamente con la del preparado.

Para el desarrollo de la segunda etapa se ensayaron tres métodos de identificación: distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda, distancia de Mahalanobis y varianza residual en el espacio de los componentes. Se utilizaron las mismas muestras de producción que en la primera etapa. El valor del umbral se determinó a partir del análisis de las muestras de producción no incluidas en la biblioteca y a partir de los estudios de repetitividad y precisión intermedia.

El método de identificación que proporcionaba mejores resultados era el de varianza residual (tablas 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7). Si se utilizaban 2 componentes principales en el PCA y se fijaba el valor umbral en 0.90, el método era capaz de distinguir casi todas las muestras cuyas composiciones no correspondían exactamente a la composición del fármaco. Únicamente en tres casos el método proporcionaba falsos positivos (+10, +20% excipiente 3 y +10% excipiente 2). Un aumento en la concentración de uno de los componentes del preparado farmacéutico implica una disminución del resto. Como se puede observar en la tabla 4.7, en las muestras que el método no es capaz de detectar como distintas a las muestras de producción, la variación en la composición de los componentes que se infradosifican es pequeña, inclusive la composición del principio activo, que es el que espectralmente presenta mayores diferencias con el resto de componentes (figura 4.1).

**Tabla 4.4.** Valores de la varianza residual en el análisis de las muestras de producción. (\*) Muestras incluidas en la biblioteca.

<b>Muestra</b>	<b>Identificada como</b>	<b>Valor varianza residual</b>
1*	Producción	0.486
2*	Producción	0.553
3*	Producción	0.602
4*	Producción	0.634
5*	Producción	0.547
6*	Producción	0.514
7*	Producción	0.546
8*	Producción	0.628
9*	Producción	0.445
10*	Producción	0.488
11	Producción	0.773
12	Producción	0.718
13	Producción	0.650
14	Producción	0.647
15	Producción	0.691
16	Producción	0.707
17	Producción	0.584
18	Producción	0.695
19	Producción	0.666
20	Producción	0.694
21	Producción	0.664
22	Producción	0.706
23	Producción	0.689
24	Producción	0.609
25	Producción	0.755
26	Producción	0.712
27	Producción	0.685
28	Producción	0.768
29	Producción	0.751
30	Producción	0.798

**Tabla 4.5.** Valores de la varianza residual en 12 análisis de una misma muestra de producción.

<b>Medida</b>	<b>Identificada como</b>	<b>Valor varianza residual</b>
1	Producción	0.795
2	Producción	0.765
3	Producción	0.745
4	Producción	0.825
5	Producción	0.817
6	Producción	0.786
7	Producción	0.752
8	Producción	0.850
9	Producción	0.836
10	Producción	0.796
11	Producción	0.761
12	Producción	0.818

**Tabla 4.6.** Valores de la varianza residual en el análisis de dos muestras de producción realizado por operadores distintos en días diferentes. En todos los casos la muestra es identificada como muestra de producción.

<b>Muestra</b>	<b>Operador</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>
1	1	0.776	0.781	0.827
	2	0.823	0.837	0.848
2	1	0.780	0.876	0.885
	2	0.853	0.803	0.849

**Tabla 4.7.** Valores de la varianza residual en el análisis de las muestras preparadas en el laboratorio cuya composición no corresponde con la composición del fármaco. Variación en la concentración respecto a su valor nominal.

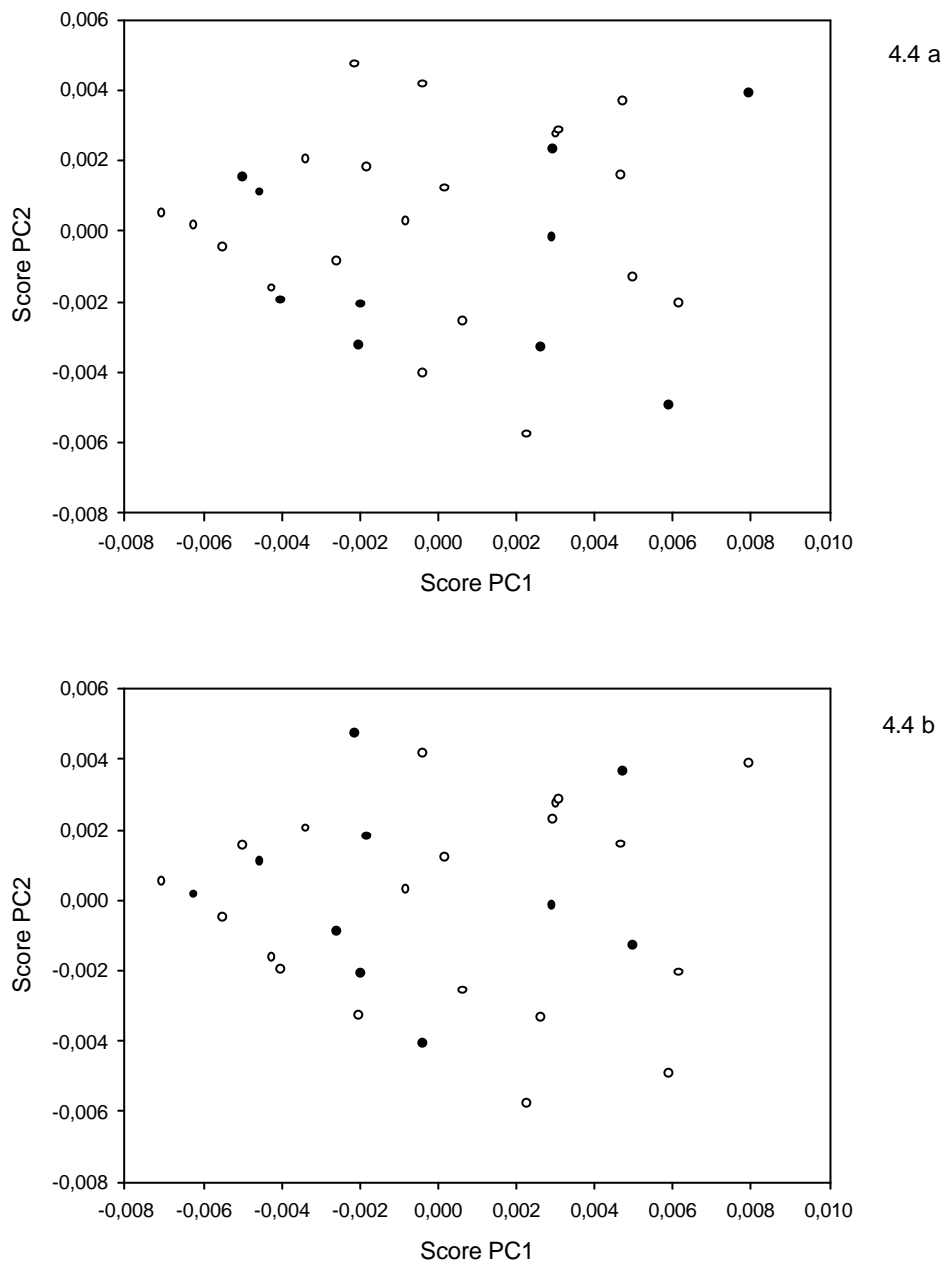
Muestra				Identificada como	Valor varianza residual
Variación concentración					
P.A.	Exc. 1	Exc. 2	Exc. 3		
+5.0%	-0.8%	-0.8%	-0.8%	-	0.918
+10.0%	-1.6%	-1.6%	-1.6%	-	0.958
+15.0%	-2.4%	-2.4%	-2.4%	-	0.971
+20.0%	-3.2%	-3.2%	-3.2%	-	0.978
+25.0%	-4.2%	-4.2%	-4.2%	-	0.995
-11.3%	+10.0%	-11.3%	-11.3%	-	0.955
-22.6%	+20.0%	-22.6%	-22.6%	-	0.995
<b>-2.3%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>+10.0%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>Producción</b>	<b>0.820</b>
-4.5%	-4.5%	+20.0%	-4.5%	-	0.912
<b>-1.2%</b>	<b>-1.2%</b>	<b>-1.2%</b>	<b>+10.0%</b>	<b>Producción</b>	<b>0.818</b>
<b>-2.3%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>+20.0%</b>	<b>Producción</b>	<b>0.835</b>

P.A.: principio activo; Exc.: excipiente

Para intentar aumentar la selectividad de la biblioteca se ensayaron dos nuevas selecciones de muestras, utilizando como criterios la distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda y la distancia de Mahalanobis en el espacio de los componentes principales, posibilidad que permite el software Vision. En la figura 4.4 se indican las muestras seleccionadas según estos criterios. Sin embargo, el hecho de cambiar las muestras de producción de la biblioteca no mejoró su capacidad discriminante, como era de esperar.

De la misma forma, se ensayaron diferentes intervalos espectrales. Al trabajar en la región espectral 1130-1450 y 1600-2200nm, tal y como se hace en la referencia 5, evitando la zona de la anomalía de Wood<sup>18</sup>, con el método de identificación de la distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda y utilizando como valor umbral 4.3, fijado de la misma manera que se ha descrito anteriormente, se consiguió que la biblioteca fuera capaz también de distinguir la muestra con un +20% del excipiente 3 (tabla 4.8).





**Figura 4.4.** Representación del primer score frente al segundo en el PCA de las muestras de producción. (●) Muestras incluidas en la biblioteca. (○) Muestras de validación de la biblioteca. (a) Muestras escogidas por distancia máxima. (b) Muestras escogidas por distancia de Mahalanobis.

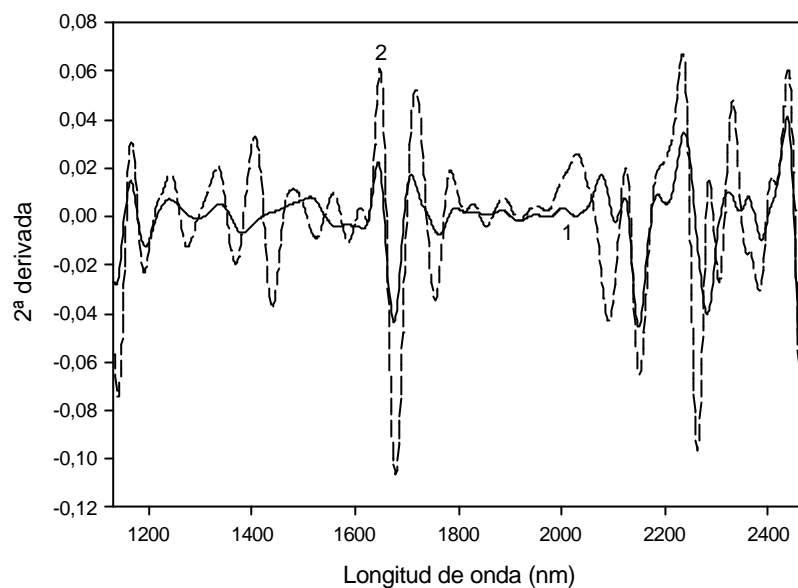
**Tabla 4.8.** Valores de la distancia máxima en el análisis de las muestras preparadas en el laboratorio cuya composición no corresponde con la composición del fármaco. Variación en la concentración respecto a su valor nominal.

Muestra				Identificada como	Valor distancia máxima
Variación concentración					
P.A.	Exc. 1	Exc. 2	Exc. 3		
+5.0%	-0.8%	-0.8%	-0.8%	-	9.46
+10.0%	-1.6%	-1.6%	-1.6%	-	10.32
+15.0%	-2.4%	-2.4%	-2.4%	-	8.88
+20.0%	-3.2%	-3.2%	-3.2%	-	10.60
+25.0%	-4.2%	-4.2%	-4.2%	-	14.41
-11.3%	+10.0%	-11.3%	-11.3%	-	7.91
-22.6%	+20.0%	-22.6%	-22.6%	-	16.88
<b>-2.3%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>+10.0%</b>	<b>-2.3%</b>	<b>Producción</b>	4.17
-4.5%	-4.5%	+20.0%	-4.5%	-	5.68
<b>-1.2%</b>	<b>-1.2%</b>	<b>-1.2%</b>	<b>+10.0%</b>	<b>Producción</b>	3.79
-2.3%	-2.3%	-2.3%	+20.0%	-	4.46

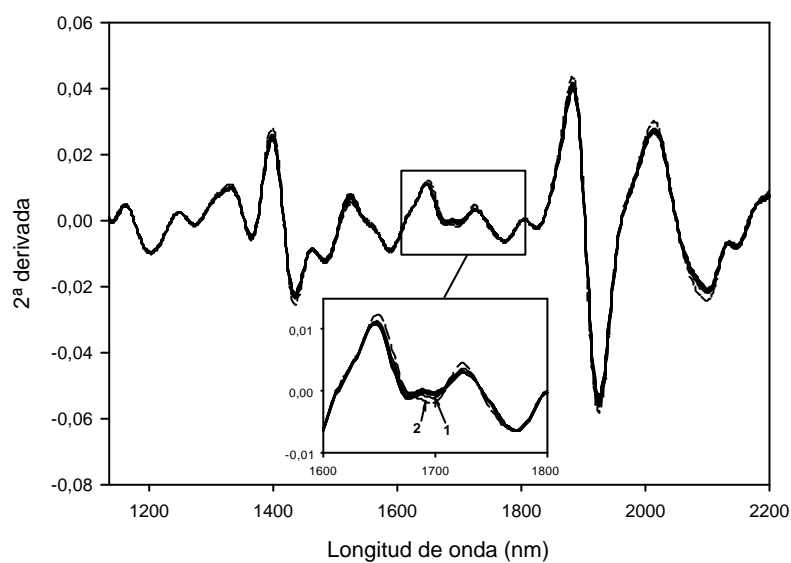
P.A.: principio activo; Exc.: excipiente

#### 4.3.4. Desarrollo de un método de identificación selectivo frente a la presencia de la forma racémica del principio activo

Las sustancias quirales pueden tener estructuras cristalinas diferentes, en función de que esté presente el enantiómero puro o su forma racémica<sup>19</sup>. Los enantiómeros puros cristalizan en grupo espacial no centrosimétrico, mientras que el 90% de los racémicos cristalizan en un grupo espacial centrosimétrico. Diferentes estructuras cristalinas producen distintos espectros NIR, con lo que sería posible desarrollar una biblioteca que fuera capaz de detectar la presencia de la forma racémica del principio activo en un preparado farmacéutico cuyo principio activo es enantioméricamente puro. En la figura 4.5 se puede observar la diferencia espectral existente entre el enantiómero dextrorrotatorio del principio activo y su forma racémica. Por el contrario, en la figura 4.6 se muestra la pequeña variación espectral que se produce al impurificar las muestras sintéticas con pequeñas cantidades de la forma racémica del principio activo.



**Figura 4.5.** Espectros de 2ª derivada de (1) muestra del enantiómero dextrorrotatorio del principio activo y (2) muestra de la forma racémica del principio activo.



**Figura 4.6.** Espectros de 2ª derivada de las muestras sintéticas. (1) Muestra sintética cuyo principio activo se ha impurificado con un 25% de su forma racémica. (2) Muestra sintética cuyo principio activo se ha impurificado con un 50% de su forma racémica.

Para realizar este estudio, se creó una biblioteca que contenía espectros de 10 de las 15 muestras sintéticas preparadas en el laboratorio, cuya composición era muy parecida a las muestras de producción. Se utilizó como pretratamiento espectral la 2ª derivada y se ensayaron diferentes métodos de identificación e intervalos espectrales. Los mejores resultados se obtuvieron con el método de la distancia máxima en el espacio de las longitudes de onda, en el intervalo espectral entre 1130 y 2200nm. El valor umbral se fijó en 4.2, a partir del análisis de las 5 muestras sintéticas restantes. En la tabla 4.9 se observa que el método desarrollado era capaz de distinguir las muestras sintéticas cuyo principio activo se encontraba impurificado en más de un 15% de su forma racémica.

La zona espectral donde se apreciaban las mayores diferencias entre los espectros del enantiómero dextrorrotatorio del principio activo y de su forma racémica era la comprendida entre 1600 y 1800nm, como se muestra en la figura 4.5. Al trabajar en este intervalo espectral con el método de la varianza residual, utilizando 3 componentes principales en el PCA, se podía fijar el valor umbral en 0.80 (tabla 4.10). De esta manera, el método desarrollado era incluso capaz de distinguir la muestra sintética cuyo principio activo se encontraba impurificado con un 10% de su forma racémica. Sin embargo, un valor umbral de 0.80 es demasiado bajo, pudiendo dar lugar a falsos negativos. Por otro lado, tal y como se muestra en la tabla 4.6, el factor día y operador puede introducir una variabilidad en los resultados obtenidos que, en este caso, no ha sido contemplada, y que se traduce en un aumento del valor umbral. En consecuencia, en la detección de la muestra impurificada con un 10% de la forma racémica nos encontramos en el límite.

**Tabla 4.9.** Valores de la distancia máxima en el análisis de las 15 muestras sintéticas preparadas en el laboratorio y de las 4 muestras cuyo principio activo se ha impurificado con su forma racémica. (\*) Muestras incluidas en la biblioteca.

<b>Muestra</b>	<b>Identificada como</b>	<b>Valor distancia</b>
Sintética 1*	Sintética	1.9
Sintética 2*	Sintética	2.0
Sintética 3*	Sintética	1.9
Sintética 4*	Sintética	1.8
Sintética 5*	Sintética	1.8
Sintética 6*	Sintética	2.1
Sintética 7*	Sintética	1.9
Sintética 8*	Sintética	1.9
Sintética 9*	Sintética	1.6
Sintética 10*	Sintética	1.8
Sintética 11	Sintética	3.4
Sintética 12	Sintética	2.4
Sintética 13	Sintética	4.1
Sintética 14	Sintética	3.8
Sintética 15	Sintética	3.9
10% forma racémica	Sintética	3.7
15% forma racémica	-	5.6
25% forma racémica	-	9.3
50% forma racémica	-	22.2

**Tabla 4.10.** Valores de la varianza residual en el análisis de las 15 muestras sintéticas preparadas en el laboratorio y de las 4 muestras cuyo principio activo se ha impurificado con su forma racémica. (\*) Muestras incluidas en la biblioteca.

Muestra	Identificada como	Valor varianza residual
Sintética 1*	Sintética	0.510
Sintética 2*	Sintética	0.520
Sintética 3*	Sintética	0.628
Sintética 4*	Sintética	0.501
Sintética 5*	Sintética	0.651
Sintética 6*	Sintética	0.484
Sintética 7*	Sintética	0.559
Sintética 8*	Sintética	0.479
Sintética 9*	Sintética	0.405
Sintética 10*	Sintética	0.485
Sintética 11	Sintética	0.762
Sintética 12	Sintética	0.604
Sintética 13	Sintética	0.793
Sintética 14	Sintética	0.651
Sintética 15	Sintética	0.754
10% forma racémica	Sintética	0.870
15% forma racémica	-	0.968
25% forma racémica	-	0.986
50% forma racémica	-	1.000

#### 4.4. CONCLUSIONES

La utilización de bibliotecas de espectros NIR para la identificación de productos farmacéuticos es una buena alternativa a los métodos tradicionales de análisis, permitiendo la identificación de los diversos productos mediante un único proceso y aumentando la objetividad del mismo, ya que como resultado del análisis se obtiene un valor numérico.

Además, el uso de bibliotecas en cascada o en dos etapas, permite aumentar la capacidad discriminante del proceso de identificación. De esta manera, en la primera etapa

se identifican los distintos productos y en la segunda se diferencian los productos más relacionados. Este tipo de bibliotecas ha permitido desarrollar métodos de identificación que son capaces de detectar pequeñas alteraciones en la composición del preparado farmacéutico, ya sea por un exceso del principio activo o de los excipientes. Asimismo, al trabajar con un principio activo enantioméricamente puro, se ha conseguido desarrollar una biblioteca capaz de detectar presencias superiores a un 15% de su forma racémica.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. *European Pharmacopoeia*, Council of Europe, Strasbourg, 3ª edición, 43-44, 1997.
2. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C de la Pezuela, *Analyst*, **123**, 135R, 1998.
3. D.L. Massart, B.G.M. Vandegiste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
4. J. Workman Jr., P.R. Mobley, B.R. Kowalski y R. Bro, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **31**, 73, 1996.
5. M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. González, D. Serrano, *J. Pharm Biomed. Anal.*, **22**, 139, 2000.
6. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C de la Pezuela, E. Russo, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 183, 1994
7. H.L. Mark, *Anal. Chem.*, **59**, 790, 1987.
8. D.A. Tunnell, *Anal. Proc.*, **27**, 59, 1990.
9. Vision v. 2.00 software manual; NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, 1998.
10. U.S. Food and Drug Administration, *Chirality*, **4**, 338, 1992.
11. *The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Vol. 3C: Medicinal Products for human use*, European Commission, Directorate General III-Industry Pharmaceuticals and Cosmetics, Brussels, 1998.
12. J.J. Blumenstein, *Chiral Drugs: Regular Aspects en Chirality in Industry II*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
13. R.A. Sheldom, *Chirotechnology*, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
14. B.R. Buchanan, E.W. Ciurczak, A.Q. Grunke, D.E. Honigs, *Spectroscopy*, **3**, 54, 1988.

15. M. Blanco, M.A. Romero, *Analyst*, **126**, 2212, 2001.
16. Ley del Medicamento, Biblioteca de Textos Legales, 2ª Ed. E. Cibreros, Madrid, 1998.
17. C. Faulí, *Tratado de Farmacia Galénica*, Ed. Luzán 5, S.A., Madrid, 1993
18. M. Malyj, J.E. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **40**, 52, 1986.
19. H.G. Brittain, *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.