



Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

La espectroscopia NIR en la determinación de
propiedades físicas y composición química de
intermedios de producción y productos acabados.

Anna Peguero Gutiérrez

Director: Dr. Marcelo Blanco Romia

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2010

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per Anna Peguero Gutiérrez

Anna Peguero Gutiérrez

Vist-i-plau,

Dr. Marcelo Blanco Romía

Bellaterra, 28 de Maig de 2010.

El final de un proyecto de esta envergadura no se logra sin las aportaciones, grandes o pequeñas, de las personas que te rodean, quizás estas líneas sirvan para agradecer su grano de arena a esta tesis.

En primer lugar, quisiera agradecer al profesor Marcelo Blanco la oportunidad de participar en este proyecto y abrirme las puertas al grupo de *Quimiometría Aplicada*, donde he tenido la oportunidad de formarme como investigadora. Quisiera hacer extensivo el agradecimiento a todos los profesores integrantes del grupo Santi, Jordi, Hortensia y al reciente lector Manel quienes han querido compartir conmigo su conocimiento.

Dar las gracias a aquellos compañeros de laboratorio que estaban aquí cuando llegué, quienes me enseñaron a dar los primeros pasos quimiométricos y a los que llegaron con posterioridad, quienes te hacen darte cuenta de qué durante este tiempo has aprendido alguna cosa, ya que eres capaz de responderles a las mismas preguntas que tú te habías planteado antes.

Agradecer a Propamsa y en especial a Marta Porcel la colaboración tanto por el suministro de las muestras de los primeros estudios de esta tesis, como por el conocimiento aportado en el desarrollo de los trabajos. A Kern Pharma, especialmente a Magda Giménez, Toni Castillo y Ana Gaspar por haber colaborado tan amablemente a resolver mis dudas en el campo farmacéutico.

Finalmente, agradecer a la Universitat Autònoma de Barcelona la concesión de una beca PIF y permitir formarme como investigadora y al Ministerio de Ciencia e Innovación por el financiamiento de los proyectos en los que he colaborado: “Metodologías basadas en espectroscopía NIR para el control analítico de procesos », BQU2003-04247 y “La Espectroscopía NIR : Una herramienta para la Tecnología de Procesos (PAT) ”, CTQ2006-12923.

A mis padres, a Guille y a Roger por todo lo que ellos saben.

Anna

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
OBJETIVOS.....	1
INTRODUCCIÓN	
1 Espectroscopia NIR.....	7
1.1 Introducción.....	7
1.2 Fundamentos de la radiación NIR.....	8
1.3 Instrumentación.....	13
1.3.1 La fuente de radiación.....	13
1.3.2 Sistema de selección de longitudes de onda.....	14
1.3.3 Compartimento de la muestra.....	17
1.3.4 Detector.....	19
1.4 Aplicaciones NIR en la industria.....	20
Referencias.....	23
2 Quimiometría.....	29
2.1 Introducción.....	29
2.2 Etapas del proceso de modelado.....	30
2.3 Diseño de experimentos.....	37
2.4 Análisis cualitativo.....	39
2.4.1 Análisis en componentes principales (PCA).....	40
2.4.2 Análisis de agrupaciones (clusters).....	41
2.5 Análisis cuantitativo.....	44
2.5.1 Regresión lineal múltiple (MLR).....	44
2.5.2 Regresión en componentes principales (PCR).....	45
2.5.3 Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS).....	46
2.5.4 Redes neuronales artificiales (ANN).....	47
2.5.5 Elección del número de componentes principales y evaluación del modelo.....	52
Referencias.....	55

ÍNDICE

3. Algunas actividades industriales.....	63
3.1 Introducción.....	63
3.2 La industria del cemento.....	64
3.2.1 De la cal al cemento Portland.....	64
3.2.2 Los morteros.....	65
3.3 La industria farmacéutica.....	68
3.3.1 Introducción a la tecnología analítica de procesos.....	69
3.3.2 Proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos.....	70
Referencias.....	75

METODOLOGÍA

4. Metodología.....	83
4.1 Introducción.....	83
4.2 Descripción y preparación de muestra.....	84
4.2.1 Muestras de la industria cementera.....	84
4.2.2 Muestras de la industria farmacéutica.....	89
4.3 Instrumentación y métodos de referencia.....	98
4.3.1 Espectroscopia NIR.....	98
4.3.2 Cromatografía HPLC.....	99
4.3.3 Espectroscopia UV.....	99
4.3.4 Mezclador para sólidos.....	99
4.3.5 Tamizadora.....	99
4.3.6 Métodos de referencia.....	99
4.4 Programas para la adquisición y el tratamiento quimiométrico de los datos.....	102
4.5 Construcción de modelos cualitativos y cuantitativos.....	103
Referencias.....	107

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Aplicaciones en la industria del cemento.....	113
5.1 Determinación de aditivos orgánicos en matrices inorgánicas.....	113
5.1.1 Diseño de experimentos.....	113
5.1.2 Cuantificación de aditivos mediante PLS.....	115
5.2 Determinación de curvas de distribución de tamaño de partícula en áridos de uso industrial.....	119
5.2.1 Evaluación cualitativa de las muestras de árido.....	120
5.2.2 Modelos de calibración PLS2.....	122
5.2.3 Modelos de calibración ANN.....	124
5.2.4 Comparación de los resultados de PLS2 y ANN.....	125
6. Aplicaciones en la industria farmacéutica.....	131
6.1 Influencia de parámetros físicos en el desarrollo de modelos de calibración...133	
6.1.1 Influencia del tamaño de partícula en el espectro NIR. Determinación de API en granulados.....	133
6.1.2 Influencia de la forma galénica y la presión de compactación en el espectro NIR. Determinación de API en núcleos.....	135
6.1.3 Influencia de la capa de lacado en el espectro NIR. Determinación de API en comprimidos recubiertos.....	140
6.2 Determinación de API y excipientes sin método de referencia.....	143
6.2.1 Influencia de las diferentes etapas del proceso productivo sobre el espectro NIR.....	143
6.2.2 Construcción de los conjuntos y modelos de calibración a partir del espectro proceso.....	145
6.2.3 Evaluación de errores sistemáticos en la predicción de muestras.....	160
Referencias.....	163

CONCLUSIONES

7. Conclusiones.....	169
----------------------	-----

ÍNDICE

ANEXOS

8. Artículos aceptados.....	175
8.1 Determination of organic additives in mortars by near-IR spectroscopy. A novel approach to designing a sample set with high-variability components...	177
8.2 An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: Comparison of PLS2 and ANN models.....	187
8.3 Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy.....	195
9. Artículos pendientes de aceptación.....	205
9.1 NIR determination of actives in pharmaceuticals without a reference method.....	207
9.2 Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method.....	225

RESUMEN

Conseguir una elevada calidad en el producto acabado es un reto cada día más importante en la industria moderna. Para asegurar esta calidad los productos antes de salir al mercado, deben cumplir especificaciones estrictas establecidas tanto por organismos reguladores como por el propio mercado. Las exigencias de calidad que requiere la industria implican un amplio y exhaustivo control de múltiples parámetros relacionados no solo con el producto final, sino también con cualquier etapa del proceso de obtención del producto. Para el cumplimiento de estas crecientes demandas es necesario desarrollar nuevas metodologías analíticas capaces de afrontar estos retos de forma rápida y eficaz; la espectroscopia NIR constituye una de las más recientes y está alcanzando una notable implantación en diferentes campos de la actividad industrial. La rapidez en proporcionar la información de interés, la versatilidad de su aplicación a muy diferentes tipos de muestras y la calidad de los resultados que proporciona son algunas de sus características más relevantes.

El desarrollo de nuevas metodologías de análisis basadas en la espectroscopia NIR es el principal objetivo de esta tesis y bajo esta premisa se han desarrollado los siguientes trabajos:

- Dentro de la industria del cemento se han realizado 2 estudios, ambos con el objetivo de otorgar un valor añadido al producto final.

- 1) Se ha llevado a cabo el desarrollo de modelos de cuantificación para aditivos en morteros. La dosificación por exceso o por defecto de estos aditivos comporta, normalmente, una pérdida de las propiedades deseables del producto final.

Con el objetivo de recoger la variabilidad natural de las muestras se ha desarrollado un diseño de muestras original basado en la figura del antiprisma de base hexagonal, donde se han tenido en cuenta el rango de concentración de los analitos y la variabilidad propia de cada aditivo. Para incorporar la variabilidad de los diferentes clases de un mismo aditivo, se usó el diseño D-óptimo que proporcionó las diferentes combinaciones entre clases de aditivos Ad1 y Ad2. Se ha obtenido un modelo de calibración *Partial Least Squares* (PLS) para cada aditivo, ambos presentan una correcta capacidad predictiva donde ordenada de

origen y pendiente de las rectas de predicción comprenden el 0 y el 1, respectivamente. Los métodos desarrollados han sido validados con un conjunto de muestras externas.

- 2) La determinación de la distribución del tamaño de partículas de un sólido puede ser crucial para asegurar la calidad del producto final. Un exceso de partículas finas y/o gruesas o una distribución de tamaños con un alto grado de dispersión pueden hacer considerar al material como no apto para el fin previsto.

En este estudio, se han evaluado dos técnicas quimiométricas (PLS2, *Partial Least Squares 2* y ANN, *Artificial Neural Network*) para la predicción de n variables simultáneamente, lo que facilitará la rápida obtención de curvas de distribución de partícula.

Se han estudiado 2 perfiles diferentes de distribución de partículas con diferente número de puntos en la curva (número de tamices utilizado en la determinación). Se han construido 2 modelos de calibración (PLS2 y ANN) para cada curva con el objeto de obtener la mejor calidad de ajuste en términos de coeficiente de correlación entre la curva de referencia y la predicha por el modelo quimiométricos y obtener los mejores errores de predicción en términos del error estándar relativo de predicción (RSEP). Los 4 modelos de calibración proporcionan resultados estadísticamente iguales, en cuanto al RSE de las predicciones, demostrando la posibilidad de obtener curvas de distribución de tamaño de partícula a partir de datos NIR y modelos de calibración PLS2 y ANN. El uso de ANN como técnica de modelado no lineal no mejora estadísticamente los resultados.

- En el campo farmacéutico los estudios se han basado en la determinación de principios activos en las diferentes etapas del proceso de fabricación y en el producto acabado. El principal nexo de unión de los siguientes trabajos es la construcción de modelos de calibración sin usar método de referencia para obtener la variable dependiente.

- 1) Numerosos factores físicos y químicos influyen de manera importante en la calidad de un fármaco y para asegurar la calidad del producto final es

necesario realizar un completo y amplio control de ellos durante el proceso. En este trabajo se ha realizado un estudio de determinación de API a lo largo del proceso de fabricación estudiando las diferentes variables que pueden afectar al proceso (tamaño de partícula, forma galénica, presión de compactación y grosor de la capa de lacado) y se han propuesto diferentes estrategias que tienen por objeto construir modelos de calibración simples y adecuados para la cuantificación de principio activo en las diferentes etapas del proceso productivo.

- 2) En este trabajo, se ha desarrollado una nueva metodología para incorporar la variabilidad del proceso productivo reflejada en el espectro NIR al conjunto de calibración. Dicha metodología se basa en la obtención del *espectro proceso* calculado como diferencia entre el espectro de un comprimido de producción y el de una muestra de laboratorio en polvo de la misma composición. El conjunto de diferencias calculadas para varios comprimidos constituyen un conjunto de vectores matemáticos que definen la variabilidad del proceso (*process variability matrix*). Esta matriz de variabilidad se ha adicionado a un conjunto de espectros NIR de diferentes mezclas en polvo, que cubren el rango deseado de concentración del principio activo, para dar lugar a la matriz de espectros del conjunto de calibración. El contenido en API de estas mezclas en polvo se ha establecido por pesada de los componentes. Se ha aplicado el algoritmo PLS al conjunto de calibración para obtener el modelo; los resultados obtenidos en la predicción de comprimidos muestran valores de la raíz del error cuadrático medio (RMSE) inferiores al 1,5%.
- 3) Este estudio se plantea con el objetivo de aplicar la metodología desarrollada en el anterior trabajo a la determinación del principio activo y todos los excipientes de un comprimido farmacéutico. Para ello, se preparan un conjunto de muestras de laboratorio a partir de un diseño de muestras que asegure a) una baja correlación entre las concentraciones de los analitos y b) un rango de concentraciones adecuado para cada analito. La matriz de variabilidad del proceso (*process variability matrix*) se obtiene a partir del espectro de una

muestra de referencia que contiene las concentraciones nominales de principio activo y excipientes. La adición de la matriz de variabilidad del proceso a la matriz de espectros NIR de muestras en polvo de laboratorio proporciona un conjunto de espectros que cubre el dominio experimental de los comprimidos de producción. A partir de esta nueva matriz se han construido 5 modelos PLS, uno para cuantificar el principio activo y el resto para la cuantificación de los cuatro excipientes que completan la formulación. Los resultados obtenidos en predicción muestran valores de la raíz del error cuadrático medio (RMSEP) de alrededor del 1.0%.

La memoria proporciona un conjunto de herramientas analíticas basadas en la espectroscopía NIR con el objetivo de ser aplicadas y resolver problemas analíticos de la industria actual.

ABSTRACT

Achieving a high quality of the final product is a challenge increasingly important in modern industry. The products, before going to market, must fulfil strict specifications established by both regulatory agency and the market itself.

Quality requirements involve a broad and comprehensive control of multiple parameters related not only with the final product but also with any step of the manufacturing process. To fulfil these growing demands is necessary to develop new analytical methodologies facing these challenges quickly and effectively; NIR spectroscopy is one of the most recent and is achieving a significant presence in various fields of industrial activity. The rapidity to provide interesting information, the versatility of its application to different types of samples and the quality of the results are some of the most important characteristics.

The main objective of this thesis is the development of new analytical methodologies based on NIR spectroscopy, under this premise has been developed the following works:

- In the cement industry have been conducted two studies, both in order to added value to the final product.

1) The development of quantification models for additives in mortars has been completed. Using too high or too low additive rates usually results in the loss of desirable properties in the end product.

In order to ensure that the calibration set would contain natural variability in the samples, we used an experimental design to select a representative set of samples. This novel design is based on a hexagonal antiprism that encompasses the concentration ranges spanned by the analytes and the variability inherent in each additive. The D-optimality criterion was used to obtain various combinations between Ad1 and Ad2 additive classes. The PLS calibration models thus constructed for each additive provided accurate predictions; thus, the intercept and slope of the plots of predicted values *versus* reference values for each additive were close to 0 and 1, respectively, and their confidence ranges included the respective value. The ensuing analytical methods were validated by using an external sample set.

- 2) The particle size distribution and average particle size of a solid can be crucial with a view to assuring its quality as an end product. An excess of fine and/or coarse particles or a distribution of sizes with a high degree of dispersion can be considered as material unfit for its intended purpose.

In this work, we used the chemometrical techniques Partial Least Squares 2 (PLS2) and Artificial Neural Networks (ANN) to simultaneously predict several variables in order to facilitate the rapid construction of particle size distribution curves.

Samples were passed through sieves of variable pore size in order to separate several size fractions that were used to construct two types of particle distribution curves. PLS2 and ANN were used to develop two calibration models each in order to assess the goodness of fit of the results and the accuracy of the predictions via correlation coefficients and relative standard errors of prediction (RSEP), respectively. The four calibration models studied provided statistically identical results as regards RSEP. Therefore, the combined use of NIR spectroscopy and PLS2 or ANN calibration models allows particle size distributions to be accurately determined. Using ANN for non-linear modelling of the results provided no statistical improvement over PLS2.

- In the pharmaceutical field, the studies have been based on the determination of active ingredients at different stages of the manufacturing process and final product. The main link of the following works is the construction of calibration models without using reference method for determining the dependent variable.

- 1) The quality of pharmaceutical drugs is strongly influenced by a number of physical and chemical factors that require careful control during their production in order to ensure that the end product will meet the specifications. In this work, the authors determined an active pharmaceutical ingredient (API) throughout its production process. The authors have evaluated the influence of particle size, galenic form, compaction pressure and coating thickness on NIR spectra. Taking account prior factors we constructed simple and accurate calibration methods to quantify API at different stages of drug production process.

All calibration models have been obtained using only laboratory samples. Based on the results, NIR calibration models for the API determination can be obtained only using the values of weighting of the balance.

- 2) In this work, we developed a new method for incorporating the variability introduced by the production process in the spectra for the calibration set. The method uses the difference between the spectrum for a tablet and that for a powder mixture of identical composition for this purpose. The body of differences thus calculated for several tablets constitutes a set of mathematical vectors that define the overall variability of the process: the *process variability matrix*, which is added to a set of NIR spectra for several powder mixtures (prepared in laboratory) spanning the desired content range for the active pharmaceutical ingredient (API) in order to obtain the spectral matrix for the calibration set. The API content of the lab powder mixtures is established by weighing of their components. The calibration model is constructed by applying the partial least-squares (PLS) algorithm to the results for the calibration set. This methodology has been applied successfully on API determination in commercial pharmaceutical tablets. In this way, tablet contents can be predicted with a root mean square error (RMSE) less than 1.5%.

- 3) The objective of this study was to apply the developed methodology in the previous work. In this case, the methodology was used to determine active pharmaceutical ingredient and all excipients of pharmaceutical tablet. A set of laboratory samples were prepared from sample design, which assures both a) a low correlation between concentrations b) an appropriate concentration range for each analyte. The *process variability matrix* was obtained from several *process spectra*, which was calculated by difference between the NIR spectra for production tablets and those for laboratory samples containing the nominal concentrations of API and excipients. Adding the matrix of process spectra to that of NIR spectra for powder samples prepared by weighing of their components provides a spectral set encompassing the experimental domain of the production tablets. The combined matrix of process and sample spectra was used here to construct 5 PLS models in order to quantify the API and the four

ABSTRACT

excipients in the studied formulation. The predicted values thus obtained were quite accurate, as reflected in their root mean square error of prediction (RMSEP), which never exceeded 1.0%.

The memory provides a set of analytical tools based on NIR spectroscopy in order to be applied and solve analytical problems in the modern industry.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Un reto cada vez más importante para la industria moderna es la obtención de productos con una elevada calidad. Para asegurar esta calidad, es necesario que los productos cumplan con la normativa establecida antes de salir al mercado. Los métodos tradicionales que permiten asegurar la calidad de un producto consumen un tiempo considerable, son laboriosos y a menudo producen residuos con el consiguiente encarecimiento del coste del producto. La industria moderna necesita, y cada vez con mas urgencia, métodos de análisis simples, rápidos, fiables y con un bajo coste por análisis, es quizá por ello que la espectroscopía NIR se ofrece como técnica idónea para el control de la calidad.

El objetivo general de la tesis ha sido el desarrollo y aplicación de nuevas metodologías analíticas basadas en medidas en el infrarrojo cercano que junto con métodos quimiométricos de análisis multivariante permitan determinaciones más simples y de calidad. Las aplicaciones desarrolladas se enfocarán a la determinación de parámetros físicos y químicos en intermedios de producción y sobre el producto acabado. Los métodos a desarrollar deben aportar soluciones reales a la industria para poder ser implantadas posteriormente en los respectivos laboratorios de calidad.

El objetivo general enunciado, puede desglosarse en los siguientes objetivos más detallados.

- 1) Desarrollo y aplicación de nuevas metodologías en la construcción de conjuntos de calibración.
- 2) Evaluación de la influencia de parámetros físicos y químicos en el espectro NIR.
- 3) Desarrollo de modelos quimiométricos para la determinación de propiedades analíticas de interés.
- 4) Aplicación de los modelos desarrollados a muestras procedentes o implicadas en el proceso de producción.

INTRODUCCIÓN

1

Espectroscopia NIR

1.1 Introducción

1.2 Fundamentos de la radiación NIR

1.3 Instrumentación

1.4 Aplicaciones NIR en la industria

1 Espectroscopía NIR

1.1 Introducción.

El descubrimiento de la región espectral de infrarrojo cercano se atribuye a Sir William Herschel [1], cuando en 1800 haciendo pasar la luz solar por un prisma tomó la temperatura de la región contigua a la zona rojiza del espectro visible. El termómetro demostró la existencia de una forma de luz invisible más allá del color rojo. El desarrollo y aplicación de métodos espectroscópicos para la resolución de problemas analíticos se demoró algunos años, debido a las características espectrales de lo que se conoce hoy en día como región NIR (Near InfraRed). No fue hasta 1881 cuando Abney y Festing [2] documentaron los primeros espectros NIR de líquidos orgánicos en el intervalo espectral de 700 a 1200 nm. Las primeras aplicaciones analíticas se desarrollaron en la década de los 50 en el siglo XX, como consecuencia de la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales. En 1954, Wilbur Kaye [3], presentó su trabajo en el cual se registraron espectros de diferentes líquidos orgánicos entre 700 y 3500 nm, asignando los grupos funcionales de la molécula a las diferentes bandas.

El primer impulso importante no fue hasta la década de los 60, cuando Karl Norris [4-5] empezó a usar esta técnica para el estudio de matrices complejas de origen vegetal. Sus trabajos se orientaron en el campo agroalimentario e impulsaron el interés por la espectroscopía NIR.

Los avances en el campo de la electrónica y la óptica proporcionaron, a partir del año 1970, la aparición de nuevos instrumentos que permitirían el registro de espectros completos, con una mayor rapidez y reproducibilidad [6-7]. Otro avance clave en el desarrollo de la técnica fue en el campo de la informática; la posibilidad de usar ordenadores con más y mejor capacidad de cálculo permitió obtener y almacenar una gran cantidad de información espectral, que a la vez podía ser tratada con las técnicas quimiométricas implementadas en los equipos, extrayendo así la información analítica relevante.

Introducción

1.2 Fundamentos de la radiación NIR.

La región del infrarrojo comprende el intervalo espectral de $780\text{-}10^6$ nm. Según el fenómeno espectroscópico que provoca la absorción de energía por parte de la materia, podemos dividir esta región en tres zonas: 1) infrarrojo cercano $780\text{-}2500$ nm (NIR), 2) medio $2500\text{-}4\cdot 10^4$ nm (MIR) y 3) lejano $4\cdot 10^4\text{-}10^6$ nm (FIR). La absorción en el infrarrojo lejano se debe a las rotaciones moleculares, mientras que en el medio proviene de las vibraciones moleculares fundamentales. En el infrarrojo cercano se debe a los armónicos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales de las moléculas.

Una molécula absorbe radiación infrarroja cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de radiación iguala a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular y como consecuencia se absorbe la radiación [8].

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

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

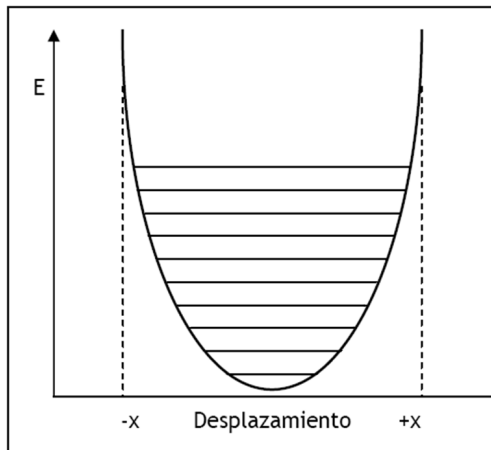


Figura 1.1. Energía potencial en el modelo de oscilador armónico.

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

$$E = \frac{1}{2} k x^2 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

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

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

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

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

Las ecuaciones de mecánica clásica no describen completamente el comportamiento de partículas atómicas, ya que no recogen la naturaleza cuantizada de las energías

Introducción

vibracionales moleculares, ni de otras energías atómicas y moleculares. La solución a la ecuación de Schrödinger para una partícula confinada en un pozo de potencial es un conjunto discreto de niveles energéticos permitidos. Para cada molécula, existen niveles discretos de energía y las únicas transiciones posibles son entre niveles energéticos consecutivos.

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

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

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

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

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

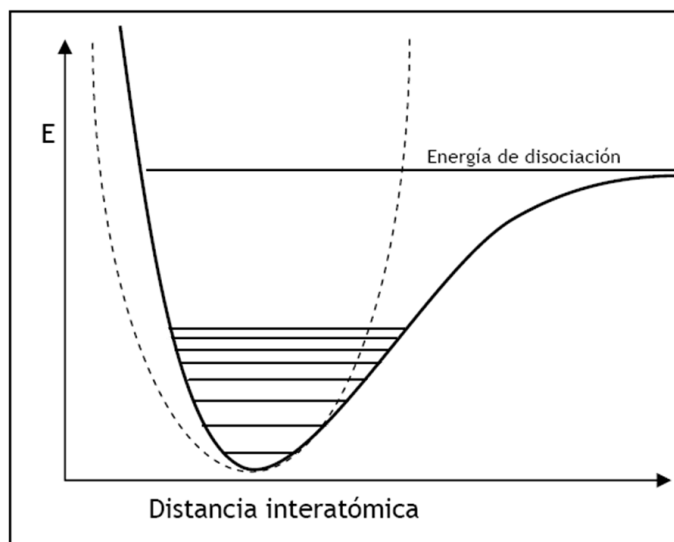


Figura 1.2. Energía potencial en el modelo del oscilador armónico (- -) y no armónico (—).

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

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

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

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

El origen de las bandas en el infrarrojo cercano es el mismo que para las bandas de infrarrojo medio: una molécula absorberá radiación NIR si la energía de la radiación se

Introducción

corresponde a la diferencia energética entre 2 niveles vibracionales y además, se produce un cambio en el momento dipolar de la molécula. A diferencia del infrarrojo medio, en la zona NIR no aparecen las bandas de las vibraciones fundamentales ($\Delta n = \pm 1$) sino que aparecen las absorciones debidas a los sobretonos y a las bandas de combinación. Las bandas debidas a los sobretonos, corresponden a transiciones energéticas en las cuales $\Delta n > \pm 1$, aunque en la práctica, y dependiendo del tipo de enlace, tan sólo el primer sobretono ($\Delta n = \pm 2$) y el segundo ($\Delta n = \pm 3$) presentan una probabilidad susceptible de ser observada. Las bandas de combinación sólo se producen en moléculas poliatómicas y son debidas a cambios simultáneos en la energía de dos o más modos de vibración. La interacción entre ambos da lugar a las bandas de combinación, las frecuencias de las cuales son combinaciones lineales de las frecuencias fundamentales que interaccionan.

$$v_{\text{comb}} = m_1 v_1 \pm m_2 v_2 \pm m_3 v_3 \pm \dots \quad \text{Ecuación 1.6}$$

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

Las transiciones no fundamentales son mucho menos probables que las correspondientes a transiciones entre niveles consecutivos, por lo que las bandas NIR son de intensidad menor que las que aparecen en la zona IR, además de ser anchas y no tan bien definidas como resultado del solapamiento de sobretonos y bandas de combinación [9].

Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos con diferencias de peso molecular importantes, de manera que se aumenta la anarmonicidad del enlace. Algunos ejemplos son C-H, N-H, O-H o S-H.

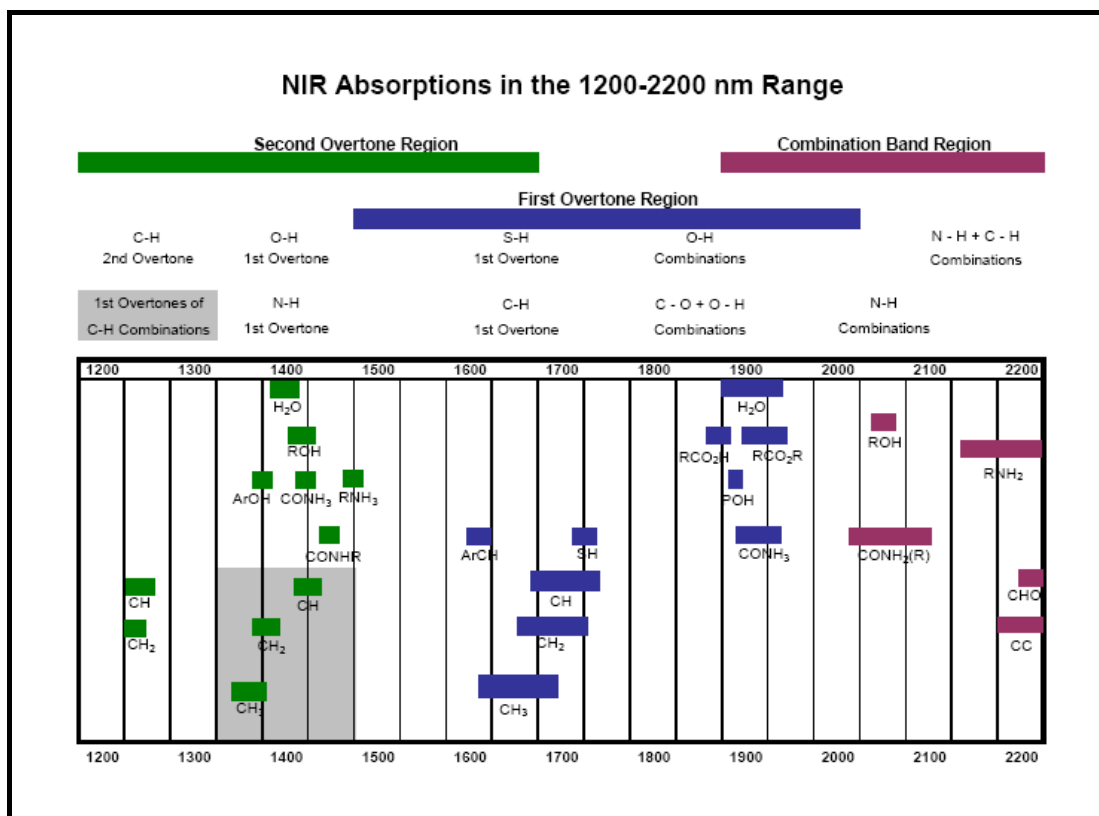


Figura 1.3. Asignación de bandas NIR a grupos orgánicos.

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

1.3 Instrumentación.

El esquema básico de un espectrofotómetro NIR consta de: fuente de radiación, selector de longitudes de onda, el compartimento de la muestra y el detector.

1.3.1 La fuente de radiación.

Es un dispositivo capaz de generar el haz de luz necesario para irradiar la muestra. La fuente de radiación más usada es la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo, capaz de proporcionar un espectro continuo en la región de 320 nm a 2500 nm. Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los denominados LED's

Introducción

(*Light Emitting Diodes*), que dependiendo de su composición puede llegar a emitir hasta 1600 nm. Las lámparas halógenas requieren de un sistema de selección de longitudes de onda, sin embargo los LED's no.

1.3.2 Sistemas de selección de longitudes de onda.

Disponer de un sistema adecuado de selección de longitudes de onda es un factor importante para poder obtener un buen nivel de sensibilidad. Un buen sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de:

- Proporcionar un ancho de banda preciso y exacto para la longitud de onda analítica.
- Proporcionar señales altas a fin de conseguir una relación señal/ruido satisfactoria.

En función del dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, los instrumentos NIR pueden ser clasificados en sistemas dispersivos o no dispersivos.

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

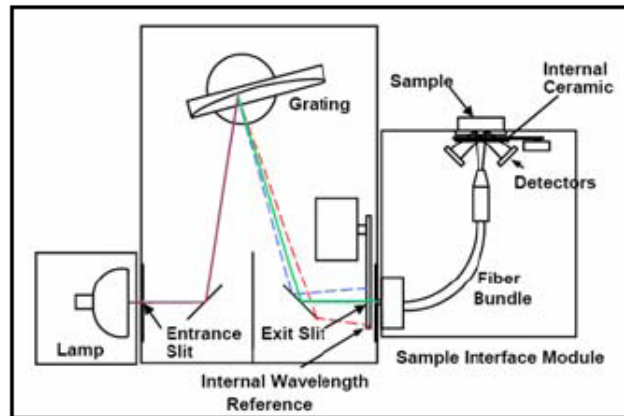


Figura 1.4. Sistema de selección de longitudes de onda con red de difracción.

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

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

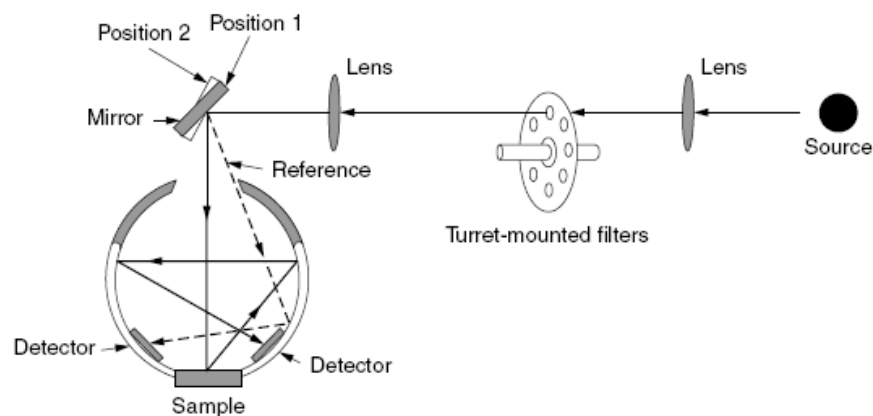


Figura 1.5. Sistema de filtros para la selección de longitudes de onda [9].

Introducción

Los filtros optoacústicos (AOTF) aprovechan el cambio de índice de refracción del material con el que están contruidos (TeO_2) cuando éste es atravesado por una onda acústica y dotando al material de capacidad para difractar ciertas longitudes de onda de un haz incidente.

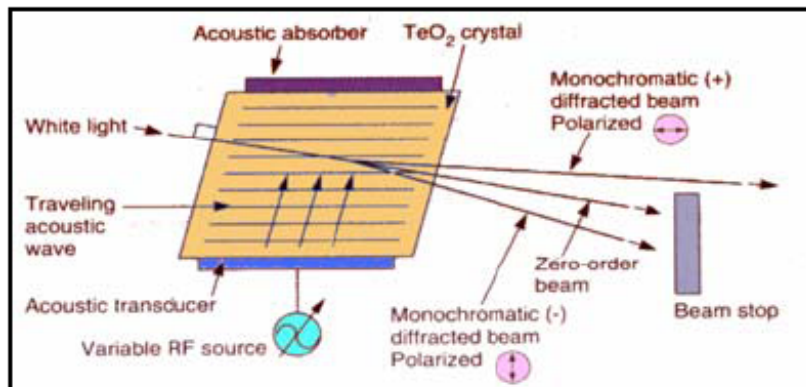


Figura 1.6. Sistema de filtros optoacústico para la selección de longitudes de onda [10].

Los instrumentos de transformada de Fourier dividen la luz en dos haces cuyas longitudes de trayectoria se pueden variar periódicamente para dar modelos de interferencia mediante un espejo móvil. Variando la posición de estos espejos se pueden crear interferencias constructivas o destructivas. Recombinando los dos haces se obtiene una señal; el interferograma. Mediante la transformada de Fourier se convierte el interferograma (representación de la señal en dominio tiempo) en el espectro (representación en el dominio de frecuencias).

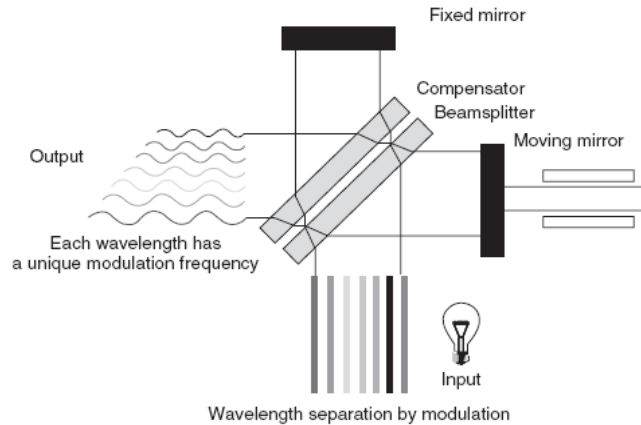


Figura 1.7. Generación de un haz de luz NIR mediante interferómetro [11].

1.3.3 Compartimento de la muestra.

Una de las grandes ventajas de la espectroscopía NIR es la versatilidad y adaptabilidad que presenta para analizar muestras de distinta naturaleza. La ausencia de pretratamiento de la muestra para el registro del espectro, permite disponer de gran cantidad de accesorios adaptables a cada situación.

Existen 3 tipos de registros de espectros NIR: transmitancia, reflectancia y transflectancia. La figura 1.8 muestra los esquemas de los 3 tipos de configuraciones de registro de espectros.

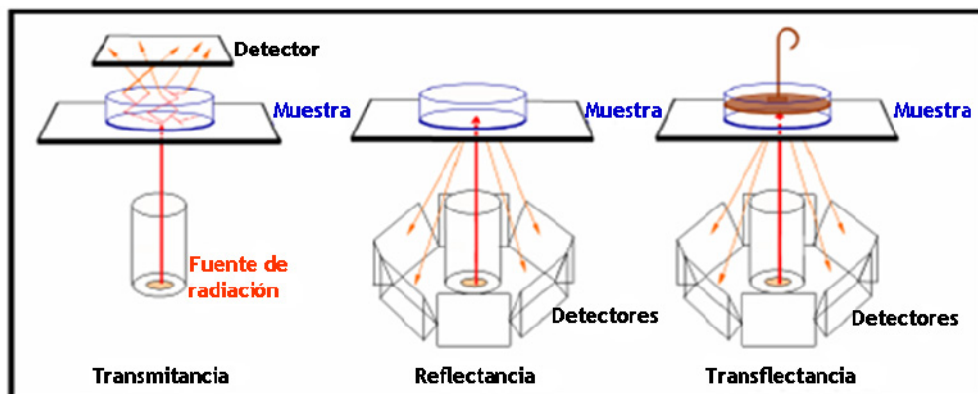


Figura 1.8. Esquema de las 3 configuraciones de registro de espectros NIR.

Introducción

En modo transmitancia se pueden registrar gases, líquidos, semilíquidos y sólidos. En este modo el haz de luz atraviesa la muestra hasta el detector. En las medidas por reflectancia (sólidos y semisólidos), el haz de luz es reflejado por la propia muestra y el haz reflejado es recogido por el detector. Finalmente, un caso intermedio lo ocupa las medidas por transflectancia (líquidos y semilíquidos), donde el haz de luz atraviesa la muestra, se refleja en un reflector que está en contacto con la misma y finalmente llega al detector.

- Modo transmitancia.

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

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{P_0}{P} = abc \quad \text{Ecuación 1.7}$$

donde A es la absorbancia de la muestra, T la transmitancia, P_0 la intensidad de la radiación incidente, P la intensidad de la radiación transmitida, a la absorptividad molar, b el camino óptico y c la concentración.

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

- Modo reflectancia.

La reflexión de la radiación puede ser especular o difusa. La reflectancia especular descrita por las leyes de Fresnel no aporta información sobre la composición de la muestra, por lo que solo contribuye al ruido. La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión.

Cuando los materiales son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación con la longitud de onda, predomina la reflectancia difusa.

Debido a la complejidad del proceso de reflectancia difusa, no existen teorías rigurosas, sino aproximaciones entre las cuales la más importante es la de Kubelka-Munk [12]. Otra expresión empleada con mucha frecuencia es una aplicación empírica de la relación entre la concentración y la reflectancia relativa, similar a la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c \quad \text{Ecuación 1.8}$$

donde A es la absorbancia aparente, R la reflectancia relativa ($R = \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{referencia}}}$), a' la constante de proporcionalidad y c la concentración.

- Modo transflectancia.

La muestra, generalmente líquida o semilíquida, se coloca en una cubeta junto con el reflector. El haz de radiación incidente entra en contacto con la muestra y la atraviesa, se refleja en el reflector y retorna de nuevo atravesando la muestra, finalmente la radiación es captada por el detector.

1.3.4 Detector.

Los detectores más habituales utilizados en Espectroscopia NIR están contruidos con semiconductores como InGaAs, PbS, InAs, InSb, Si.... El detector más ampliamente utilizado es el de PbS, que posee sensibilidad adecuada entre 900 y 2600 nm. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de Arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), operativo de 600 a 1900 nm [13].

Introducción

1.4 Aplicaciones NIR en la industria.

El interés creciente que está despertando la espectroscopía NIR en el sector industrial se puede considerar consecuencia directa de las ventajas que ofrece esta técnica analítica para el control de la calidad del producto acabado.

- Es una técnica no destructiva ni invasiva. Permite el análisis in-line y on-line.
- Se pueden analizar muestras sólidas, líquidas y gaseosas.
- La preparación de la muestra es prácticamente nula y el análisis es rápido.
- El análisis por muestra tiene un coste muy reducido.
- No necesidad de usar disolventes y por lo tanto la no generación de residuos.
- Se obtiene tanto información química como física de la muestra.
- A partir de un único conjunto de espectros se pueden establecer calibraciones paralelas para realizar determinaciones multiparamétricas.

El amplio abanico de muestras que pueden ser analizadas por NIR junto con los avances tecnológicos, ha hecho que el número de aplicaciones NIR en los diferentes campos haya crecido considerablemente en los últimos años.

En las siguientes líneas se hace una revisión general de la aplicabilidad de la espectroscopía NIR dentro del campo industrial.

Las primeras aplicaciones de la espectroscopía NIR fueron en el campo agroalimentario [14,15] y se dirigieron hacia la determinación de la humedad, el contenido en fibras, grasas y proteínas en cereales. La leche y sus productos derivados también han sido objeto de análisis mediante espectroscopía NIR determinándose la proteína, la humedad, la grasa, la lactosa, el lactato y las cenizas [16].

El NIR en modo transmitancia o transflectancia se ha usado para determinar diferentes constituyentes en bebidas, como por ejemplo el grado de alcohol en cerveza, vino o licores destilados, el contenido en azúcar, el grado de acidez en zumos o el contenido en cafeína en café y té [16].

En las refinerías petroleras es cada vez más importante reducir los costes del proceso. Larrechi *et al.* discuten algunas consideraciones a tener en cuenta en la aplicación de la espectroscopia NIR en la determinación de propiedades de interés en la industria petroquímica [17]. Los autores, presentan dos ejemplos de aplicaciones: 1) determinación de hidrocarburos y densidad en muestras de nafta y 2) determinación de etileno y viscosidad en copolímeros polipropilénicos. En los trabajos de Blanco *et al.* se realiza una clasificación de los diferentes orígenes geográficos del crudo del petróleo [18] y la determinación, en betunes, de propiedades físicas como la viscosidad a diferentes temperaturas y la composición química [19].

Un sector de gran auge en los últimos años es el del medio ambiente. El desarrollo de instrumentos portátiles permite llevar a cabo medidas in-situ. Stallard *et al.* desarrollaron una metodología mediante espectroscopia NIR para la determinación del grado de contaminación del suelo por aceites de motor [20].

La industria textil también se ha beneficiado de las ventajas de la espectroscopia NIR. El trabajo desarrollado por Cleve *et al.* presentan una variedad de aplicaciones de la espectroscopia NIR en la industria textil como son: la identificación de textiles, la determinación de humedad y el control del proceso [21].

El carácter no-invasivo de la espectroscopia NIR permite hacer diagnósticos sin necesidad de biopsias o cirugías. Rempel *et al.* presentan una reseña con 70 referencias bibliográficas, referentes al uso de la espectroscopia NIR y la imagen química en el campo médico, haciendo especial énfasis en los avances hechos en los últimos años [22]. Se presentan aplicaciones ex-vivo e in-vivo que permiten ilustrar el potencial de esta técnica espectroscópica.

Dentro del campo de la cosmética también encontramos aplicaciones NIR como por ejemplo el trabajo de Blanco *et al.* donde tienen como objetivo el control de la calidad de una base cosmética consistente en una mezcla de parafinas [23].

Introducción

La fabricación de productos farmacéuticos es un sector industrial muy regulado tanto por organismos nacionales como por instituciones internacionales como son la European Medicines Agency (EMA) [24] y la International Conference on Harmonisation (ICH) [25]. La espectroscopia NIR es una técnica analítica que cumple muchas de las condiciones para su fácil y rápida aplicación en el control en la industria farmacéutica, ya que permite no sólo la identificación de las materias primas, previo a su uso para la fabricación de los fármacos, sino también la determinación de la riqueza de los mismos y de parámetros físicos del preparado. Son cada vez más las compañías farmacéuticas que emplean la espectroscopia NIR como herramienta de análisis y alternativa a las técnicas habituales que generalmente son más laboriosas. Blanco *et al.* han publicado una revisión del uso de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica [26]. El trabajo incluye la discusión de un gran número de referencias relacionadas con el análisis cualitativo (identificación de materias primas y productos finales, estudios de homogeneidad, polimorfismo e isomería óptica) y cuantitativo (determinación de parámetros físicos, contenidos de humedad, principios activos y excipientes).

La imagen química es un área del conocimiento relativamente nueva. El uso de imágenes químicas es un nuevo enfoque analítico que permite la identificación espacial y la determinación cuantitativa de las especies químicas en una muestra. En términos muy sencillos se puede considerar como un mapa de un producto químico.

Mediante la combinación de espectroscopia infrarroja tradicional con las propiedades de imágenes microscópicas y macroscópicas, una sola medición rápida permite a los analistas obtener información espacial y espectral con gran facilidad y sin estudios previos. La posibilidad de registrar un espectro en un amplio intervalo de longitudes de onda para cada píxel de la imagen de una muestra está permitiendo el desarrollo de nuevas metodologías robustas y fiables para obtener la información más relevante de los datos NIR [27-29].

REFERENCIAS

1. W. Herschel. Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. (1800), 90, 255.
2. W. Abney, E. R. Festing. On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. (1881), 172, 887.
3. W. Kaye. Near-infrared spectroscopy: I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochimica Acta*. (1954), 6, 257.
4. I. Ben-Gera, K. H. Norris. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *J. Food Sci.* (1964), 7, 240.
5. G. S. Birth, K. H. Norris. An instrument using light transmittance for non-destructive measurement of fruit maturity. *Food Technol.* (1958), 12, 592.
6. D. Noble. Illuminating near-IR. *Anal. Chem.* (1995), 67, 735A.
7. C. M. Henry. Near-IR gets the job done. *Anal. Chem.* (1999), 71, 625A.
8. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. Principios de análisis instrumental. (2001), 5ª ed., McGraw-Hill.
9. E. W. Ciurczack. Basic principles of Near-Infrared Spectroscopy. En Handbook of Near Infrared Spectroscopy Analysis. (2008). 3ª ed. D. A. Burns y E. W. Ciurczack (eds), Taylor and Francis Group.
10. E. Stark, K. Luchter. Diversity in NIR instrumentation. Proceedings of the 11th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. *NIR Publications*, (2004), 13.
11. M. B. Simpson. Near-infrared spectroscopy for process analytical chemistry: theory, technology and implementation. En Process Analytical Technology. (2005), 1ª ed. K. A. Bakeev (ed). Blackwell Publishing. Oxford. UK.

Introducción

12. P. Kubelka, E. Munk. Ein beitrage zur optik der farbanstriche. *Z. Tech. Phys.* (1931), 12, 593.
13. E. W. Ciurczack. Commercial NIR Instruments. En *Handbook of Near Infrared Spectroscopy Analysis*. (2008) 3^a ed. D. A. Burns, E. W. Ciurczack (eds), Taylor and Francis Group.
14. I. Ben-Gera, K. H. Norris. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *J. Food Sci.* (1964), 7, 240.
15. G. S. Birth, K. H. Norris. An instrument using light transmittance for non-destructive measurement of fruit maturity. *Food Technol.* (1958), 12, 592.
16. R. Frankhuizen. NIR analysis of dairy products. En *Handbook of Near-Infrared analysis*. (2008) 3^a ed. D. A. Burns y E. W. Ciurczak (Eds), Taylor and Francis Group.
17. S. Macho, M. S. Larrechi. Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration for the quantitative determination of certain properties in the petrochemical industry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* (2002), 21, 799.
18. M. Blanco, S. Maspocho, I. Villarroya, X. Peralta, J. M. González, J. Torres. Geographical origin classification of petroleum crudes from near-infrared spectra of bitumens. *Appl. Spectrosc.* (2001), 55, 834.
19. M. Blanco, S. Maspocho, I. Villarroya, X. Peralta, J. M. González, J. Torres. Determination of physico-chemical parameters for bitumens using near-infrared spectroscopy. *Anal. Chim Acta.* (2001), 434, 133.
20. B. R. Stallard, M. J. Garcia, S. Kaushik. Near-IR reflectance spectroscopy for the determination of motor oil contamination in sandy loam. *Appl. Spectrosc.* (1996), 50, 334.
21. E. Cleve, E. Bach, E. Schollmeyer. Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry. *Anal. Chim. Acta.* (2000), 420, 163.
22. S. P. Rempel, H. H. Mantsch. Biomedical applications of near-infrared spectroscopy: A review. *Can. J. Anal. Sci. Spectros.* (1999), 44, 171.

23. M. Blanco, M. Alcalà, J. Planells, R. Mulero. Quality control of cosmetic mixtures by NIR spectroscopy. *Anal. Bional. Chem.* (2007), 389, 1577.
24. Guideline on the use of Near Infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations. (Draft 2009).
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/1776009endraft.pdf>
25. Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2(R1) (2005).
<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
26. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst*, (1998) 123, 135R.
27. W. H. A. M. van den Broek, E. P. P. A. Derks, E. W. van de Ven, D. Wienke, P. Geladi, L. M. C. Buydens. Plastic identification by remote sensing spectroscopic NIR imaging using kernel partial least squares (KPLS). *Chem. Intell. Lab. Syst.* (1996), 35, 187.
28. J. M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. MasPOCH, J. Coello, M. Blanco. Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* (2008), 27, 696.
29. P. Menesatti, A. Zanella, S. D'Andrea, C. Costa, G. Paglia, F. Pallotino. Supervised multivariate analysis of hyper-spectral NIR images to evaluate the starch index of apples. *Food Bioprocess Tech.* (2009), 2, 308.

2

Quimiometría

2.1 Introducción

2.2 Etapas del proceso de modelado

2.3 Diseño de experimentos

2.4 Análisis cualitativo

2.5 Análisis cuantitativo

2 Quimiometría.

2.1 Introducción.

Las raíces de la quimiometría deben buscarse en el año 1969 cuando Kowalski, Jurs y Isenhour publicaron una serie de trabajos sobre la aplicación de máquinas de aprendizaje lineal para clasificar espectros de masa de baja resolución [1-7]. Siguiendo estas primeras iniciativas, otros grupos empezaron a trabajar en problemas similares de clasificación. Grupos como el liderado por Wold que trabajaron con algoritmos de clasificación como SIMCA [8-11], o Massart en el campo de la optimización de métodos cromatográficos [12-13]. En el año 1972 aparece por primera vez el nombre de quimiometría en un trabajo de Svante Wold [14]. Paralelamente, Kowalski usó el nombre de “*Laboratory of Chemometrics*” para su grupo de investigación.

Las técnicas instrumentales, y especialmente las espectroscópicas, generan una gran cantidad de datos relativos a las muestras analizadas en breves intervalos de tiempo. Pero ello, no quiere decir que cuantos más datos se obtengan más información se tiene del sistema. Tal y como dijeron Beebe y Kowalski en 1987 [15], *sólo cuando los datos son interpretados y utilizables se convierten en valiosos para los químicos y para la sociedad en general; entonces los datos se convierten en información*. En este punto es donde la *quimiometría* juega un papel decisivo, la cual puede ser definida como *la parte de la química que, utilizando métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal a) diseña o selecciona procedimientos de medida óptimos y b) proporciona la máxima información relevante de los datos analíticos* [16].

La quimiometría abarca diversos objetivos como el filtrado de señales (pretratamientos aplicados a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal), métodos de reconocimiento de pautas (técnicas multivariadas mediante las que se pueden establecer agrupaciones de muestras en función de su similitud y métodos de clasificación de nuevas muestras) y métodos de calibración (técnicas multivariadas mediante las cuales se busca una relación cuantitativa entre la señal analítica y alguna

Introducción

propiedad de la muestra). Son muchas las técnicas quimiométricas que se pueden utilizar para llevar a cabo estos objetivos. En este capítulo se van a describir algunas de ellas, haciendo especial énfasis en aquellas que han sido utilizadas en esta memoria y en las que, aunque no se hayan utilizado, su explicación ayudará a una mejor comprensión de las que si lo han sido.

2.2 Etapas del proceso de modelado.

Se define como modelo multivariable a la relación matemática que se establece entre las variables analíticas (por ejemplo, un espectro NIR) con las propiedades físicas o químicas (presión, tamaño de partícula, concentración...) de uno o varios analitos de una muestra. Los modelos multivariables se diferencian de los univariados en que estos últimos, relacionan una única variable con la propiedad a determinar, mientras que los multivariables relacionan varias variables X con una o varias variables Y .

El principal objetivo de los métodos multivariables es establecer modelos, de clasificación o de calibración, los cuales sean capaces de predecir las propiedades modeladas de muestras desconocidas. A continuación se detallan los pasos que se seguirán en la construcción de un modelo multivariable [17].

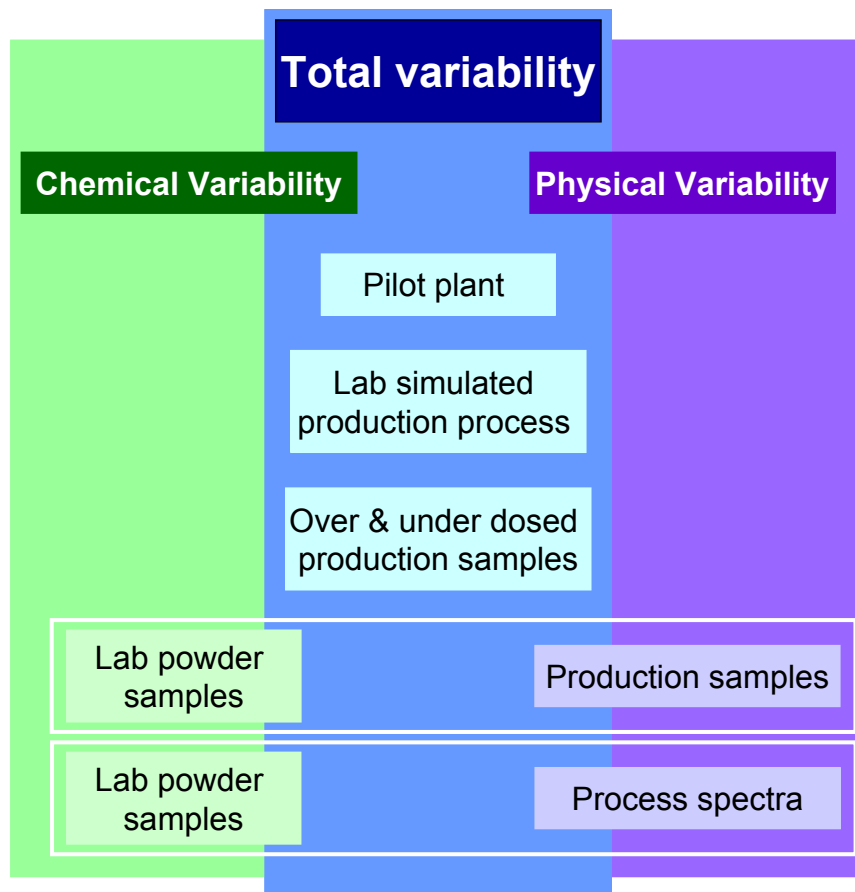
1. Selección de un conjunto de calibración o entrenamiento.

Obtención de un conjunto limitado de muestras de las cuales se conoce la propiedad a determinar. El conjunto debe ser representativo de toda la variabilidad química y física de la muestra con la finalidad de obtener métodos analíticos robustos. En modelos cualitativos deberán recoger variabilidad del tipo: tamaño de partícula, densidad, proveedor..., en cambio, para modelos cuantitativos además de la variabilidad mencionada deberán cubrir el rango del parámetro a determinar, como por ejemplo, la concentración de analito. La construcción o selección de un adecuado conjunto de calibración, es quizá, el paso más crítico de la construcción de un modelo de calibración, ya que de ello dependerán los resultados de predicción.

En el capítulo de Blanco et al. [17] se recogen las diferentes estrategias que se han usado en el campo farmacéutico, aunque son extrapolables al resto de campos industriales, para construir un buen conjunto de calibración, teniendo en cuenta la variabilidad del proceso productivo y el rango de concentraciones de la propiedad a determinar.

- a) Las *muestras de planta piloto* tienen propiedades físicas similares a las de un proceso productivo pero además contienen el rango de concentraciones deseado. De modo similar se pueden preparar muestras en el laboratorio siguiendo el procedimiento del proceso de producción (granulación, compactación y recubrimiento).
- b) *Muestras dopadas*, las muestras en polvo de producción pueden doparse con cantidades conocidas de API (*overdosed*) o bien con una mezcla de excipientes (*underdosed*) con el objetivo de obtener el rango deseado de concentraciones de principio activo.
- c) Las *muestras sintéticas de laboratorio* se preparan pesando cantidades conocidas de principio activo y excipientes en el rango deseado de principio activo. Como estas muestras no contienen la variabilidad del proceso de producción es necesario añadir un número suficiente de muestras de producción para que aporten esta variabilidad.

La figura 2.1 recoge la preparación de los diferentes tipos de muestras del conjunto de calibración mencionados en las líneas anteriores y el tipo de variabilidad que recogen. En la figura, se ha añadido una estrategia adicional para construir un conjunto de calibración a partir de muestras sintéticas de laboratorio en polvo (lab powder samples) a las cuales se les ha añadido la variabilidad del proceso mediante el *espectro proceso (process spectra)*, esta estrategia es una de las novedades que se presentan en esta tesis y se describirá ampliamente en las secciones de experimental y resultados.



2.1 Esquema de las diferentes estrategias para construir un conjunto de calibración representativo de las muestras de producción.

2. Métodos de referencia.

El desarrollo de modelos cuantitativos requiere el conocimiento previo de las variables que van a ser determinadas. Para ello se utilizan los métodos de referencia que deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ellos dependerá la calidad del modelo a desarrollar.

3. Registro de la información analítica.

En esta tesis la información química se extraerá de los espectros NIR. Todas las muestras (calibración y predicción) deberán registrarse en el mismo equipo siguiendo el mismo protocolo de análisis. Previo al registro de cualquier muestra es necesario tomar un espectro de la placa cerámica que se utilizará como espectro de

referencia. Los espectros NIR se caracterizan por tener bandas anchas y solapadas, es por ello, que es necesario un posterior tratamiento matemático de los datos para obtener la información de interés.

4. *Pretratamiento de los datos.*

Una vez obtenidos los espectros NIR de las muestras seleccionadas, puede ser necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido y por ende acrecentar la señal correspondiente al analito de interés.

No todos los pretratamientos consiguen ambos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental. Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

- Promedio de espectros: el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce el ruido espectral, ya que éste es considerado aleatorio.
- Centrado de los datos: se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta en cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables se encuentran ahora referidos a este centro.

$$x'_{i,m} = x_{i,m} - x_m \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde $x'_{i,m}$ es el dato centrado, $x_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del centrado y x_m es la media de la columna m .

- Autoescalado de los datos: posteriormente al centrado de cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la columna.

$$x'_{i,m} = \frac{x_{i,m} - x_m}{s_m} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde $x'_{i,m}$ es el dato autoescalado, $x_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del autoescalado, x_m es la media de la columna m y s_m es la desviación estándar de la columna.

Introducción

- Suavizado: existen filtros que permiten minimizar el ruido espectral mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) [18] o por Transformada de Fourier [19].
- Derivadas: la baja diferenciación que normalmente presentan los espectros NIR puede ser mejorada derivando los espectros, lo cual permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda.

Los métodos de derivación más utilizados son el de Norris [20] y el de Savitzky-Golay [18], el cual incluye un suavizado previo a la derivación.

- Variable normal estándar (SNV, Standard Normal Variate): se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (*scattering*) producido por ejemplo, por las diferencias en el tamaño de partícula de muestras sólidas [21].

$$x_{i,m}^{SNV} = \frac{x_{i,m} - \bar{x}_i}{s_i} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde $x_{i,m}^{SNV}$ es el valor de la absorbancia de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) una vez aplicado el pretratamiento, $x_{i,m}$ es el valor de la absorbancia original de la fila i (espectro i) y la columna m (variable m), \bar{x}_i es la absorbancia media del espectro i y s_i es la desviación estándar de la fila i (espectro i).

- Corrección del efecto multiplicativo de dispersión (MSC, Multiplicative Scattering Correction): tiene la misma utilidad que el SNV, sin embargo el pretratamiento espectral depende del conjunto de muestras al que se aplica [22].

- Corrección de la señal ortogonal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*): permite eliminar toda aquella información contenida en los espectros que no está correlacionada con la propiedad a determinar. Su aplicación permite obtener modelos de calibración más simples [23].
- Análisis en componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*): La mayoría de técnicas espectroscópicas tienen una alta correlación espectral entre las longitudes de onda (variables linealmente dependientes). Esta característica es un inconveniente en el desarrollo de métodos cualitativos o cuantitativos basados en cálculos multivariantes, ya que es necesario que las variables que se van a usar sean linealmente independientes.

El análisis en componentes principales es uno de los métodos de reducción de variables más utilizado, ya que permite condensar, sin pérdidas relevantes, el gran volumen de información que proporcionan los datos espectroscópicos a la vez que elimina la correlación espectral.

Consideremos la matriz X de datos, donde cada fila corresponde al espectro de cada muestra m y cada columna a la absorbancia a una longitud de onda k . Matemáticamente, las m muestras representan puntos en el espacio de dimensión k . Normalmente, se dispone de un número elevado de muestras m y de un número elevado de longitudes de onda k . Con lo que la matriz X está formada por $m \times k$ valores de absorbancia.

El objetivo del PCA es reducir la dimensionalidad de la matriz X calculando un número inferior de nuevos ejes que expliquen la información original. Estos nuevos ejes se llaman Componentes Principales (PC , *Principal Components*). La característica principal de los PC 's es que el primero recoge la máxima variabilidad del conjunto de

Introducción

muestras, el segundo recoge una variabilidad inferior al primero y es ortogonal a éste y así sucesivamente hasta que se explica la máxima información relevante. En la figura 2.2 se muestra un grupo de muestras en sus ejes originales y en los nuevos PC's.

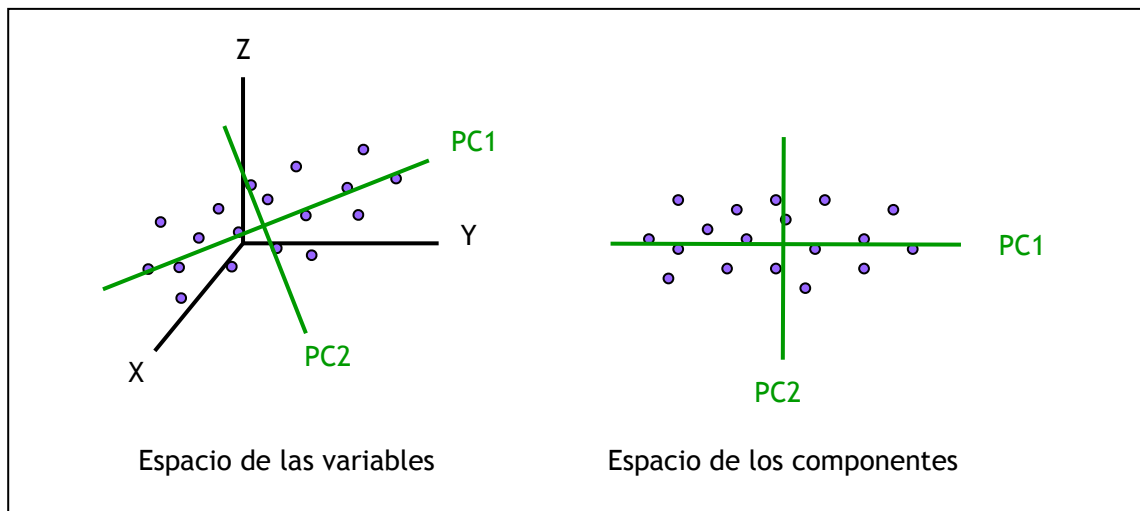


Figura 2.2. Representación gráfica de la reducción de la dimensionalidad llevada a cabo por un PCA desde un sistema de 3 variables a uno de 2 componentes principales.

Numéricamente, la matriz de datos X se descompone en el producto de 2 matrices: una de *scores*, T , y una de *loadings*, P , quedando un residual representado por la matriz E .

$$X = TP^t + E \quad \text{Ecuación 2.4}$$

T son las coordenadas de cada punto en el nuevo espacio definido por los PC's y P son los cosenos de los ángulos formados entre los ejes originales y los nuevos PC's. El conjunto de datos X queda definido por un nuevo conjunto de variables (PC's) no correlacionadas entre sí y en un nuevo sistema de ejes ortogonales. Uno de los gráficos que se obtiene es el llamado gráfico de *scores*, el cual es un conjunto de puntos (muestras) representado en un nombre reducido de ejes.

Un aspecto fundamental en un PCA es la elección del número de componentes principales que contienen la información relevante del sistema en estudio. Se han descrito diferentes procedimientos para la estimación del número de componentes principales significativos. El más habitual es representar la varianza explicada (o varianza residual) en función del número de PC's y escoger el número mínimo para el cual no se encuentra mejora significativa. Esta elección puede hacerse por simple visualización del gráfico o bien, aplicando un test F al cociente de las varianzas. En cualquier caso, el número de componentes escogido debe tener sentido químico y debe ser coherente con lo que se observa en el gráfico.

5. *Construcción del modelo quimiométrico.*

El cálculo del modelo quimiométrico seleccionado (cualitativo o cuantitativo) se realiza con un conjunto de muestras llamadas de calibración. Durante el desarrollo del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo (pretratamiento, intervalo espectral, umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros).

6. *Evaluación del modelo quimiométrico.*

La evaluación del modelo se lleva a cabo mediante la aplicación de éste a un conjunto de muestras conocidas (para modelos cualitativos se conoce su identidad y para cuantitativos se conoce el valor de la propiedad a determinar). Este nuevo conjunto de muestras debe ser independiente al anterior. Si los resultados de predicción no son satisfactorios, el modelo debe ser recalculado [24].

2.3 Diseño de experimentos.

El objetivo clásico del diseño de experimentos (DoE, *Design of Experiments*) es la obtención de modelos estadísticos para evaluar si determinados factores influyen en la variable de interés. El diseño de experimentos se usa por ejemplo para la optimización

Introducción

de un proceso industrial o de una formulación de un producto. En la presente tesis se ha utilizado el diseño de experimentos como una herramienta para crear un grupo representativo de muestras de laboratorio utilizables en la construcción de modelos de calibración. Este conjunto de muestras deberá cumplir los requisitos de cubrir el rango de valores esperables evitando al mismo tiempo la colinealidad entre ellos y contener toda la variabilidad esperada de cada componente [25].

Los conceptos básicos del diseño de experimentos factor, nivel y tratamiento son igualmente válidos para el uso que se va hacer para el diseño de muestras.

El **factor** será cualquier fuente de variación que pueda generar variabilidad al conjunto de calibración, serán las variables de interés, estos factores podrán ser cualitativos o cuantitativos. Los **niveles** de un factor son los tipos o grados específicos del factor que se tendrán en cuenta en la realización del experimento. Por ejemplo, si consideramos como factor la concentración de principio activo en una formulación farmacéutica, los niveles de este factor serán los diferentes valores de concentración del principio activo. Los **tratamientos** serán las posibles combinaciones entre los diferentes niveles de cada uno de los factores, es decir el número de muestras que se deben preparar en el laboratorio.

El uso del diseño de experimentos para la construcción de conjuntos de calibración ha sido utilizado en anteriores ocasiones con éxito [26-29]. En las líneas siguientes se muestran algunos diseños que se han usado para este fin [30-31].

- Diseños factoriales completos: son aquellos diseños en los que se investiga todas las posibles combinaciones entre niveles de los diferentes factores y sus posibles interacciones. En experimentación, los diseños más utilizados son los diseños factoriales a 2 niveles (2^k), donde k es el número de factores a controlar. Estos métodos presentan el inconveniente de que el número de experimentos a realizar crece enormemente al aumentar el número de parámetros.

- Diseño centrados compuestos (CCD, Central Composite Design): es un diseño factorial al cual se le han añadido puntos axiales y centrales.
- Diseño factoriales fraccionados: La realización de un diseño de este tipo supone la elección de una sola fracción (1/2, 1/4, 1/8...) de las experiencias propuestas por un factorial completo con los mismos factores y niveles. Para los diseños fraccionados se mantiene la nomenclatura 2^{k-p} donde 2 es el número de niveles, k el de factores y p el grado de fraccionamiento. Con este tipo de diseño solo tenemos en cuenta las interacciones de primer orden.
- Diseño de Plackett-Burman: son un caso particular de los diseños factoriales fraccionados en los que se estudian $k = N-1$ variables, donde k es el número de factores y N el número de experimentos y múltiplo de 4. La matriz del diseño y la estructura de las confusiones es complicada pero las ventajas del método se ponen de manifiesto en el momento que en nuestro sistema se puede suponer que la variación de un factor entre 2 niveles es lineal y que, además, no existen interacciones entre los factores.
- Diseño de cuadrados latinos: son diseños factoriales fraccionados que proporcionan matrices ortogonales y en las que no se evalúan las interacciones entre factores.
- Diseños de Dohler [32]: son diseños equirradiales o geométricos consisten en puntos igualmente espaciados sobre una circunferencia o una esfera. Permiten el uso de varios niveles en función de la influencia de cada factor.
- Diseños D-óptimos: El más conocido de los diseños óptimos es el que sigue el criterio D-optimality, éste trata de encontrar la combinación de puntos de un diseño de entre una lista de puntos candidatos que maximice el determinante $(X^T X)^{-1}$, donde X es la matriz de información, con esto se consigue que el diseño sea lo más cercano a la idealidad posible, es decir a la ortogonalidad y la rotabilidad. Los diseños óptimos permiten crear un conjunto de calibración con

Introducción

un número elevado de factores y de niveles y además no es necesario que todos los factores tengan igual número de niveles.

2.4 Análisis cualitativo.

Los métodos de reconocimiento de pautas (PRM, *Pattern Recognition Methods*) son un conjunto de técnicas quimiométricas que permiten realizar análisis cualitativos de un modo rápido y simple [33].

Los PRM's son métodos basados en la comparación de cuan semejante es la muestra a analizar con otra tomada como referencia. Matemáticamente, esta comparación se realiza según criterios de correlación o distancia. Los PRM's se pueden clasificar según sean supervisados o no supervisados. En los métodos supervisados se tiene en cuenta la pertenencia de los objetos a distintas categorías, que pueden ser conocidas o supuestas, mientras que en los métodos no supervisados no se conoce o se ignora deliberadamente la existencia de categorías [34]. En esta memoria se han utilizado únicamente métodos no supervisados, los cuales se encuentran detallados a continuación.

2.4.1 Análisis en componentes principales (PCA).

Dentro del apartado 2.2.2 *Etapas del proceso del proceso de modelado en 4. Pretratamiento de los datos* se hace una descripción más amplia de los mecanismos de actuación del PCA.

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

La interpretación de los resultados obtenidos con el PCA para una clasificación es puramente subjetiva y se lleva acabo a partir de la representación de los *scores* de las

muestras de un componente principal frente a los scores de otro(s) componente(s). Si existe una relación entre las muestras, en el gráfico de los *scores*, los puntos aparecerán agrupados; mientras que si las muestras no se asemejan entre si, los puntos aparecerán dispersos entre si [33].

2.4.2 Análisis de agrupamientos (*clusters*).

Bajo el nombre de análisis de agrupamientos se engloban las técnicas de análisis de datos cuya finalidad es descubrir los agrupamientos naturales existentes en una tabla de datos experimentales. Este tipo de análisis constituye el nivel cero de los PRM's y dado su carácter no supervisado es difícil evaluar su rendimiento. Por el contrario, el análisis por agrupamientos es muy eficaz en la investigación científica por la capacidad de generar hipótesis de trabajo. Desde este punto de vista conviene recordar que un algoritmo es inmune a los prejuicios del investigador que examina los datos experimentales y es capaz de manejar las tablas ingentes de datos que genera la actual instrumentación química [35].

Es necesario introducir el concepto de **disimilaridad**, el cual es clave en el análisis de agrupamientos porque formaliza operativamente la idea de objetos (variables) parecidas. La disimilaridad es una cantidad, $d(i,j)$, que asocia cada par de objetos (el i -ésimo y el j -ésimo) en base a la matriz Z y es una medida de lo distintas que son sus respectivas filas. La matriz de disimilaridades entre objetos será por lo tanto cuadrada y simétrica.

Las medidas de disimilaridad se realizan mediante el cálculo de distancias entre los objetos o variables. Existen diferentes expresiones matemáticas para calcular estas distancias:

- **Distancia Euclídea:** es la más difundida de las distancias y esta definida mediante la siguiente ecuación:

$$d(z_i, z_j) = \sqrt{(z_{i1} - z_{j1})^2 + \dots + (z_{in} - z_{jn})^2} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Introducción

- Distancia de Manhattan: La distancia de Manhattan entre 2 vectores p y q en un espacio vectorial real n -dimensional con un sistema de coordenadas cartesianas fijo, es la suma de las longitudes de las proyecciones del segmento de línea entre los puntos sobre el sistema de ejes. Más formalmente,

$$d_1(p, q) = \|p - q\|_1 = \sum_{i=1}^n |p_i - q_i| \quad \text{Ecuación 2.6}$$

donde $p = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ y $q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ son vectores.

- Distancia de Mahalanobis: la distancia de Mahalanobis entre 2 variables aleatorias con la misma distribución de probabilidad se define mediante la siguiente ecuación:

$$d(p, q) = \sqrt{(p - q)^T S^{-1} (p - q)} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde $p = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ y $q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ son vectores y S es la matriz de covarianza.

La distancia de Mahalanobis se diferencia de la distancia euclídea en que tiene en cuenta la correlación entre las variables aleatorias mediante la matriz de covarianza S .

El análisis de cluster puede realizarse mediante métodos **jerarquizados** y **no jerarquizados**. Los **no jerarquizados** se basan en métodos de partición donde todos los grupos se constituyen al mismo tiempo de modo que no es posible establecer ningún tipo de jerarquía entre una partición y otra. En la mayoría de los métodos no jerárquicos el número de agrupamientos ha de ser dado de antemano, de modo que el algoritmo busca la mejor agrupación posible en base a optimizar alguna función criterio que describe la bondad del agrupamiento establecido. Los métodos **jerárquicos** producen una sucesión encajada de particiones para todos los posibles agrupamientos. Cada método jerárquico depende de optimizar una función objetivo, de modo que en cada etapa del proceso busca qué agrupamiento debe ser dividido en dos (proceso

divisivo) o qué dos agrupamientos han de ser unidos para formar uno sólo (proceso aglomerativo). Los métodos aglomerativos son los más difundidos y algunos de ellos se citan a continuación [35].

- Unión simple (single linkage): La disimilaridad entre dos agrupamientos C_K y C_H se define como la menor de las disimilaridades entre los pares de objetos (i,j) i de C_K y j de C_H .

$$d(C_H, C_K) = \min\{d(i, j) / i \in C_H, j \in C_K\} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

- Unión completa (complete linkage): La disimilaridad entre dos agrupamientos C_K y C_H se define como la mayor de las disimilaridades entre los pares de objetos (i,j) i de C_K y j de C_H .

$$d(C_H, C_K) = \max\{d(i, j) / i \in C_H, j \in C_K\} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

- Unión media (average linkage): La disimilaridad entre dos agrupamientos C_K y C_H con $|C_K|$ y $|C_H|$ número de objetos respectivamente, se define como la media de las disimilaridades entre los pares de objetos (i,j) i de C_K y j de C_H .

$$d(C_H, C_K) = \frac{1}{|C_H||C_K|} \sum_{i \in C_H, j \in C_K} d(i, j) \quad \text{Ecuación 2.10}$$

- Unión de centroides (centroid linkage): La disimilaridad entre dos agrupamientos C_K y C_H se define como la distancia euclídea entre sus centroides.

$$d(C_H, C_K) = d(\bar{x}(H), \bar{x}(K)) \quad \text{Ecuación 2.11}$$

- Método Ward: La disimilaridad entre dos agrupamientos C_K y C_H se define como la distancia euclídea entre sus centroides ponderada por un factor.

$$d(C_H, C_K) = \sqrt{\frac{2|C_H||C_K|}{|C_H| + |C_K|}} d_2(\bar{x}(H), \bar{x}(K)) \quad \text{Ecuación 2.12}$$

Introducción

La manera más habitual de representar los datos es mediante un **dendograma** o árbol que consiste en la elaboración de una clasificación jerárquica donde los grupos grandes se dividen en otros más pequeños.

2.5 Análisis cuantitativo.

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas. La espectroscopia NIR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como *Métodos de Calibración Multivariantes*. En la figura 2.3 se muestra una clasificación general de los mismos [36-38].

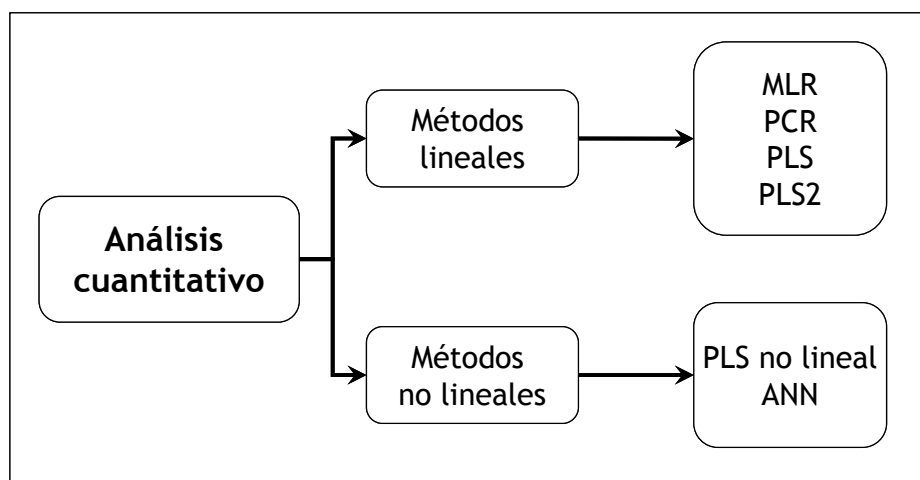


Figura 2.3. Clasificación general de los métodos de calibración multivariantes.

2.5.1 Regresión lineal múltiple (MLR).

Es un método de análisis cuantitativo que requiere de una selección previa de las variables significativas a partir de las cuales se construye la ecuación de regresión. La regresión lineal múltiple (*MLR, Multiple Linear Regression*) establece una relación lineal

entre la señal (longitudes de onda discretas) y la propiedad a determinar mediante un ajuste de mínimos cuadrados.

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

El desarrollo de modelos MLR requiere una adecuada selección de las longitudes de onda que son utilizadas para su cálculo. Dicha tarea es compleja ya que en muchas ocasiones la variación de la concentración a determinar, no puede ser asignada a unas longitudes de onda discretas y es por ello que su uso en espectroscopia NIR es reducido. Además, la selección de un excesivo número de longitudes de onda puede acarrear problemas de colinealidad, al existir diferentes variables independientes altamente correlacionadas que aportan la misma información [39-40].

2.5.2 Regresión en componentes principales (PCR).

Es un método cuantitativo el cual previamente se ha realizado una reducción de variables basándose en un PCA. De este modo, se consigue condensar la información inicial en un número de variables inferior al original. Este método es un caso particular de la regresión lineal múltiple (MLR) en el cual se utilizan los *scores* obtenidos de un PCA como variables independientes.

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

$$X = TP^T + E \quad \text{Ecuación 2.13}$$

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

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

Introducción

$$T = XP \quad \text{Ecuación 2.14}$$

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

$$Y = TB + E \quad \text{Ecuación 2.15}$$

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

$$\hat{B} = (T^T T)^{-1} T^T Y \quad \text{Ecuación 2.16}$$

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

$$T^* = X^*P \quad \text{Ecuación 2.17}$$

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

$$Y = T^* \hat{B} \quad \text{Ecuación 2.18}$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos X , pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar [41].

2.5.3 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

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

$$X = TP^T + E \quad \text{Ecuación 2.19}$$

$$Y = UQ^T + F \quad \text{Ecuación 2.20}$$

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

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

$$\hat{U} = bT \quad \text{Ecuación 2.21}$$

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

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

$$Y = T^* \hat{B} Q^T + F \quad \text{Ecuación 2.22}$$

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

En el caso de calcular una sola propiedad a determinar de la matriz Y el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se puede considerar una simplificación del algoritmo global conocido como PLS2, en el cual se realiza la determinación simultánea de n variables.

2.5.4 Redes neuronales artificiales (ANN).

Las redes neuronales artificiales (ANN, *Artificial Neural Networks*) constituyen una de las alternativas más generales y sistemáticas a los procedimientos de calibración multivariable, habiendo demostrado ser especialmente útiles cuando la relación entre el parámetro a determinar y las variables medidas es de naturaleza compleja y, sobretodo, no lineal [42].

Esencialmente, se pueden definir como un sistema iterativo de cálculo, que toma su nombre al intentar reproducir de forma simple y sencilla el sistema de conexiones que existe entre las neuronas del cerebro humano [42].

Introducción

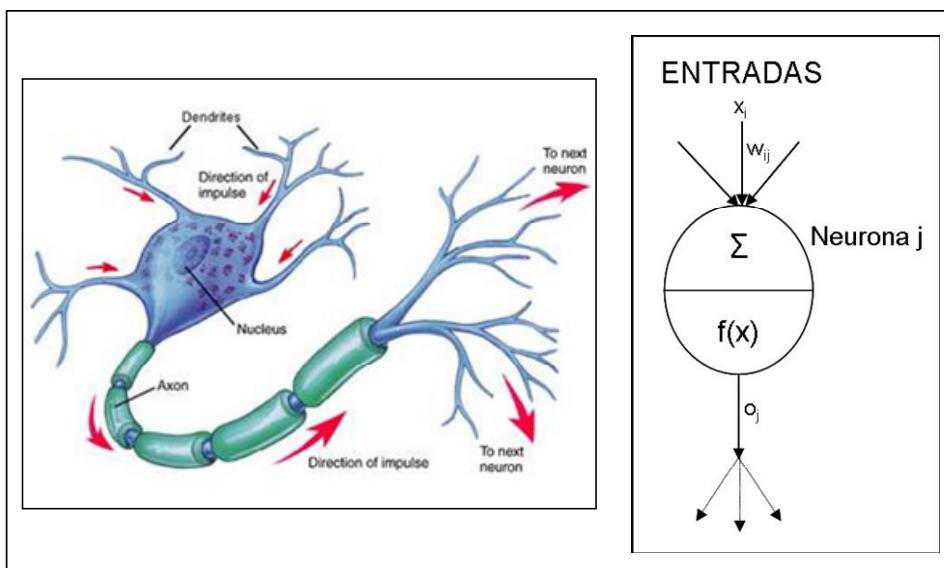


Figura 2.4. Dibujo de una neurona humana (izquierda) y una neurona artificial (derecha).

En las redes neuronales artificiales, la neurona artificial (denominada simplemente neurona o nodo) intenta simular la neurona biológica. La sinapsis se representa por una conexión entre dos neuronas, y la fuerza sináptica por un peso asociado a esta conexión (un número real). Las señales de entrada pasan a las neuronas donde se realiza su suma ponderada. A continuación se transforman pasando a través de una función de transferencia hacia la salida. La propagación de la señal viene determinada por las conexiones entre las neuronas y por sus pesos asociados.

La manera como están conectadas entre si las neuronas individuales es lo que define la red, la estructura de las cuales se acostumbra a plantear en términos de capas o niveles. De esta manera, se puede definir una *capa de entrada* como aquella en la que los datos se presentan a la red y una *capa de salida*, que es a partir de la cual se obtienen las respuestas, denominando al resto de capas como *capas ocultas*. La estructura en que los nodos están unidos y el número de nodos que hay en cada capa es lo que se denomina *arquitectura* de la red neuronal.

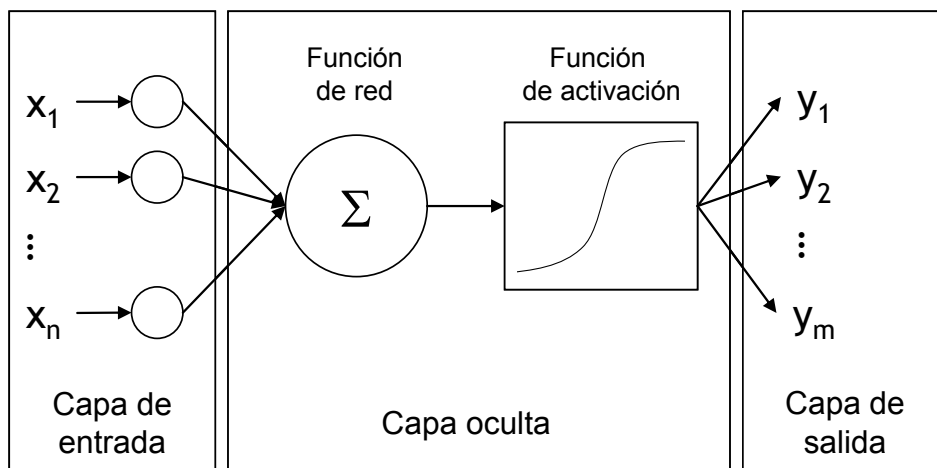


Figura 2.5. Representación de una arquitectura típica con tres capas de neuronas.

Un proceso llevado a cabo con ANN consta de dos etapas: la de *aprendizaje (learning)* y la de *respuesta*. La primera es la etapa crucial en la puesta a punto del método, ya que la red neuronal “aprende” a partir de los ejemplos que se le presentan adaptando los pesos de las conexiones en respuesta a las señales que le llegan de la capa de entrada. El aprendizaje puede ser *supervisado*, si existe un respuesta correcta a la que el método debe aproximarse, *no supervisado*, si no se conoce la respuesta que el método debe proporcionar, o *por refuerzo* si el aprendizaje no se basa en una respuesta correcta, sino únicamente en una indicación sobre si es buena o no, en función de lo que se produce, un refuerzo o inhibición de las conexiones. Para cada clase de aprendizaje existe una *regla de aprendizaje* que indica como deben adaptarse los pesos en respuesta a los ejemplos de los que está aprendiendo.

La etapa de respuesta se refiere a cómo la red procesa globalmente las señales que llegan a su capa de entrada y proporciona la respuesta en la capa de salida. La respuesta se integra continuamente en el proceso de aprendizaje comparándose con la respuesta deseada, creando así una función de error.

Existen diferentes tipos de redes neuronales y se utilizan unas u otras dependiendo del tipo de problema que se desee resolver. Todas ellas se definen por los tres elementos ya

Introducción

citados: los elementos de cálculo (neuronas), la arquitectura de la red (distribución y conexión entre las neuronas) y la regla de entrenamiento utilizada.

La función de red o de propagación es la responsable de calcular la entrada total de la información en la neurona como combinación de todas las entradas. La función más utilizada es la función lineal de base (LBF, *Linear Basis Function*), que consiste en el sumatorio ponderado de todas las entradas. Se trata de una función de primer orden.

Dada una unidad de procesado j , y n unidades conectadas a ésta, si definimos X como el vector de entradas (que coincide con las salidas de las unidades de la capa anterior) y W_j como el vector de pesos de las conexiones correspondientes, se podría definir la función de propagación como:

$$\text{net}_j(X, W_j) = \sum_{i=1}^n x_i w_{ij} \quad \text{Ecuación 2.23}$$

Al representar los pesos utilizamos 2 subíndices para indicar que conectan 2 unidades, i y j , donde j se refiere a la unidad actual.

El valor de red, expresado por la función de base, resulta inmediatamente transformado a través de una función conocida como función de activación y es quién nos da la salida de la neurona.

Se suele distinguir entre 1) funciones de activación lineales, en las que la salida es proporcional a la entrada, 2) funciones umbral, en las cuales la salida es un valor discreto (típicamente binario 0/1) que depende de si la estimulación total supera o no un determinado valor umbral, y 3) funciones no lineales, no proporcionales a la entrada.

La mayor parte de las aplicaciones al análisis químico de las redes neuronales se han basada en los sistemas multicapas denominados "*multilayer feedforward network*" (MLF). Estas redes utilizan la retropropagación (*back-propagation networks*), como mecanismo de aprendizaje. Este mecanismo tiene una clara aplicación al aprendizaje supervisado, es decir, a su habilidad para aprender a partir de una serie de datos con respuestas conocidas, y después predecir las respuestas de otra serie de datos [42].

En las redes por retropropagación, los datos de entrada X son introducidos a la red a través de la capa de entrada teniendo ésta tantas neuronas como datos a introducir (si los datos de entrada son espectros registrados a k longitudes de onda, esta capa de entrada tendría k neuronas, una neurona por cada longitud de onda). Cuando el número de variables X es elevado se debe hacer una selección de las mismas ya sea mediante un algoritmo genético o mucho más habitualmente utilizando como variables de entrada los scores de un análisis en componentes principales (PCA). Estos datos se relacionarán con los datos de salida Y (parámetros determinar) referidos como capa de salida (tendremos tantas neuronas en la capa de salida como parámetros a determinar), a través de una o varias capas ocultas. El número de neuronas en la capa oculta debe ser optimizado empíricamente. Si el número de neuronas es pequeño, la red no será capaz de modelar adecuadamente; mientras que si se usan demasiadas neuronas se puede producir un sobreajuste. Lo recomendable es realizar distintos modelos variando dicho número y escoger el que proporciona un menor error.

En el desarrollo de métodos de calibración utilizando redes la forma general de enfocar el proceso es similar a cualquier método de análisis multivariable. El primer paso es la definición del problema y la obtención de los datos experimentales. Puesto que es necesario un sistema supervisado para el entrenamiento de la red se deberán determinar tanto las medidas químicas (por ejemplo espectros) como las respuestas (propiedad física o química a la que corresponde el espectro).

En muchas ocasiones no se conoce a priori si la relación es lineal o no lineal. En principio, es posible utilizar una red para un sistema lineal llegando a conseguir resultados cuantitativos equivalentes a los de un método lineal. Sin embargo, el número de muestras que requiere una red es muy superior y el tiempo consumido para llegar al resultado será, seguramente, también mucho mayor [42].

Introducción

2.5.5 Elección del número de componentes principales y evaluación del modelo.

El desarrollo de cualquier modelo de calibración necesita de algún sistema que, a parte de saber si una calibración proporciona una capacidad predictiva apropiada, permita evaluar la conveniencia de utilizar más o menos componentes principales en una determinada calibración.

Habitualmente, se utiliza la validación cruzada (*cross validation*) como metodología para construir el modelo de calibración. Ésta utiliza muestras del bloque de calibración para comprobar el modelo. Mediante este método el conjunto de muestras se divide en varios bloques o segmentos. El modelo se construye tantas veces como número de segmentos se ha elegido, utilizando un segmento como bloque de datos para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deja un segmento fuera. Esto se realiza para cada factor, calculando el MSECv (Ecuación 2.24) para cada segmento y acumulándolo de forma que se consiga una buena estimación del poder predictivo de las muestras de calibrado. Cuando el número de segmentos es igual al número de muestras de calibrado, es decir, cuando cada segmento tiene una sola muestra, a este procedimiento se le suele llamar *leave-one-out* [42].

$$\text{MSECv} = \frac{\sum_{i=1}^{m_c} (\hat{y}_i - y_i^{\text{REF}})^2}{m_c} \quad \text{Ecuación 2.24}$$

donde m_c es el número de muestras de calibración, \hat{y}_i es el valor calculado por el modelo e y_i^{REF} el valor de referencia.

Cuanto mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluida en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo la complejidad del modelo aumenta. Es por ello, que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Uno de los criterios establecidos para esta selección es la elección del número de factores que suministre el menor error de predicción [43-44]. La determinación del número de

componentes en esta tesis se llevó a cabo utilizando como criterios de decisión el análisis de la ganancia en varianza explicada al añadir un nuevo componente al modelo y a través de la comparación de la representación gráfica del RMSE, error cuadrático medio (*Root Mean Square Error*), (Ecuación 2.25) o bien el RSE (Relative Standard Error) (Ecuación 2.26) frente al número de componentes tanto para calibración (RMSEC o RSEC), como para validación (RMSEP o RSEP). El RMSEC o el RSEC disminuye paulatinamente al aumentar el número de componentes, en cambio, el RMSEP o RSEP presenta un mínimo o bien una disminución relativa significativamente menor a partir del número óptimo de componentes.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{\text{NIR}} - Y_i^{\text{REF}})^2}{m}} \quad \text{Ecuación 2.25}$$

siendo m el número de muestras, Y^{REF} los valores de referencia e Y^{NIR} los valores predichos por el modelo. El RMSE puede ser considerado como el error medio obtenido en el proceso de modelado y está expresado en las mismas unidades que los datos de referencia.

$$\text{RSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{\text{NIR}} - Y_i^{\text{REF}})^2}{\sum_{i=1}^m Y_i^{\text{REF}^2}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.26}$$

donde Y^{REF} son los valores de referencia e Y^{NIR} son los valores predichos por el modelo.

El RSE adaptado a la predicción simultánea de n variables Y es:

$$\text{RSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (Y_{ij}^{\text{NIR}} - Y_{ij}^{\text{REF}})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m Y_{ij}^{\text{REF}^2}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.27}$$

Donde Y_{ij}^{NIR} es la propiedad predicha por el modelo NIR, Y_{ij}^{REF} es el valor de referencia de la propiedad a determinar, m es el número de muestras y n es el número de variables Y a determinar.

REFERENCIAS

1. P. C. Jurs, B. R. Kowalski, T. L. Isenhour. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - Molecular Formula Determination from Low Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* (1969), 41, 21.
2. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - Interpretation of Infrared Spectrometry Data. *Anal. Chem.* (1969), 41, 1945.
3. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems. Molecular Structure Parameters from Low Resolution Mass Spectrometry. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, (1969), p53.
4. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - on Pattern Classification in Analytical Data Treatment. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, (1969), p23.
5. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - Investigation of Convergence Rate and Predictive Ability of Adaptive Binary Pattern Classifiers. *Anal. Chem.* (1969), 41, 690-695.
6. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - Multicategory Pattern Classification by Least Squares. *Anal. Chem.* (1969), 41, 695.
7. B. R. Kowalski, P. C. Jurs, T. L. Isenhour, C. N. Reilley. Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems - Molecular Structure Parameters from Low Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* (1970), 42, 1387.
8. S. Wold. Computers and Studies of Kinetics. *Kemisk Tidskrift.* (1970), 82, 16.

Introducción

9. S.Wold, P. Ahlberg. Evaluation of Activation Parameters for a First Order Reaction from One Kinetic Experiment - Theory, Numerical Methods and Computer Program. *Acta Chemica Scandinavica*. (1970), 24, 618.
10. S. Wold. Analysis of Similarities and Dissimilarities between Chromatographic Liquid-Phases by Means of Pattern Cognition. *J. Chromatogr. Sci.* (1975), 13, 525.
11. S.Wold. Pattern-Recognition by Means of Disjoint Principal Components Models. *Pattern Recognition*. (1976), 8, 127.
12. D. L. Massart, H. Declercq. Application of Numerical Taxonomy Techniques to Choice of Optimal Sets of Solvents in Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* (1974), 46, 1988.
13. D. L. Massart, P. Lenders, M. Lauwerey. Selection of Preferred Liquid-Phases after Classification by Numerical Taxonomy Techniques. *J. Chromatogr. Sci.* (1974), 12, 617.
14. S. Wold. Spline Functions, a New Tool in Data-Analysis. *Kemisk Tidskrift*. (1972), 84, 34.
15. K.R. Beebe y B.R. Kowalski. An introduction to multivariate calibration analysis. *Anal. Chem.* (1987), 59, 1007A, 1012A, 1014A.
16. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L.Kaufmann. *Chemometrics: A textbook*. (1988) Elsevier, Amsterdam.
17. M. Blanco, M. Alcalà. Use of near-infrared spectroscopy for off-line measurements in the pharmaceutical industry. *En Process Analytical Technology*. (2005), 1^a ed. K. A. Bakeev (ed). Blackwell Publishing. Oxford. UK.
18. A. Savitzky, M.J.E. Golay. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* (1964), 36, 1627.
19. G. Horlick. Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. *Anal. Chem.* (1972), 44, 943.

20. K.H. Norris, P.C. Williams. Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. Influence of particle size. *Cereal Chemistry*. (1984), 61, 158.
21. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* (1989), 43, 772.
22. P. Geladi, D. McDougall, H. Martens. Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Appl. Spectrosc.* (1985), 39, 491.
23. S. Wold, H. Antti, F. Lindgren, J. Ohman. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* (1998), 44, 175.
24. K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz. *Chemometrics: A Practical Guide*. (1998). Ed. K.R. Beebe. John Wiley & Sons. Inc.
25. R. Kramer. *Chemometric techniques for quantitative analysis*. (1998), New Cork: Marcel Dekker.
26. J. Ferré, F. X. Rius. Constructing D-optimal designs from a list of candidate samples. *TrAC, Trends anal. Chem.* (1997), 16, 70.
27. S. J. Haswell, A. D. Walmsley. Chemometrics: the issues of measurement and modeling *Anal. Chim. Acta.* (1999), 400, 399.
28. M. A. Gil Libarona, F. A. Iñon. On the use of a small synthetic calibration set for the simultaneous spectrophotometric multivariate determination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in groundwater: chemical and spectral considerations. *Anal. Chim. Acta.* (2005), 536, 159.
29. J. Madan, A. K. Dwividi, S. Singh. Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta.* (2005), 538, 345.
30. D.C. Montgomery. *Design and analysis of experiments*. (2001). 5th edition, Wiley, New York.

Introducción

31. L. Fernandez-Ruano, X. Tomás. Diseño de experiencias. En Temas avanzados de quimiometría. (2007). M. Blanco, V. Cerdà Eds. Universitat de les Illes Balears. Palma.
32. D. C. Doehlert. *Appl. Stat.* (1970), 19, 231.
33. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. P. De Jong, J. Lewi, S.Smeyers-Verbeke. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. (1998). Ed. B.G.M. Vandeginste, S.C. Rutan Eds. Elsevier.
34. G. Ramis, M. C. García. Quimiometría. (2001). Ed. Síntesis S.A. Madrid.
35. M.C. Ortiz, L. Sarabia. Análisis de agrupaciones. En Temas avanzados de quimiometría. Eds. M. Blanco, y V. Cerdà. (2007). Universitat de les illes Balears. Palma.
36. E.V. Thomas, D.M. Haaland. Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. *Anal. Chem.* (1990), 62, 1091.
37. N. Draper, H. Smith. Applied Regression Analysis, (1981), 2nd Ed. Wiley. New York.
38. H. Martens, T. Næs. Multivariate Calibration. (1991), Wiley; New York.
39. D.E. Honigs, G.M. Hieftje, T. Hirschfeld. A new method for obtaining individual component spectra from those of complex mixtures. *Appl. Spectrosc.* (1984), 38, 317.
40. I.A. Cowe, J.W. McNicol, D.C. Cuthbertson. A designed experiment for the examination of techniques used in the analysis of near-infrared spectra. Part 2: Derivation and testing of regression models. *Analyst.* (1985), 110, 1233.
41. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. P. De Jong, J. Lewi, S. Smeyers-Verbeke. Principal Components. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. (1998). Ed. B.G.M. Vandeginste, S.C. Rutan. Elsevier.
42. J. Coello, S. MasPOCH. Calibración Multivariable. En Temas avanzados de quimiometría. M. Blanco, V. Cerdà Eds. (2007). Universitat de les illes Balears. Palma.

43. S. Wold. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*. (1978), 20, 397.
44. D.M. Haaland, E.V. Thomas. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* (1988). 60, 1193.

3

Algunas actividades industriales

3.1 Introducción

3.2 La industria del cemento

3.3 La industria farmacéutica

3. Algunas actividades industriales.

3.1 Introducción.

La industria, con el objetivo de reducir costes y acortar el tiempo de liberación de un producto, está apostando por nuevas técnicas analíticas que le permitan cumplir sus objetivos. La espectroscopía NIR permite desarrollar nuevas metodologías que simplifican enormemente los protocolos de análisis, obteniendo resultados exactos, precisos y comparables con los conseguidos por los métodos habituales. Las características de la técnica permiten analizar todo tipo de muestras con un mínimo o nulo pretratamiento, lo que agiliza considerablemente el tiempo del análisis. La reducción del número de etapas previas a la medida analítica, conduce a un aumento de la robustez del método.

La determinación de parámetros químicos de un producto es la forma más habitual de evaluar su calidad, pero a menudo nos olvidamos de que las muestras recogen también una variabilidad física (tamaño de partícula, densidad, presión de compactación...) que caracteriza la muestra y que además puede repercutir en el análisis que se va a realizar. El espectro NIR recoge tanto la información química como la física lo que nos permite determinar ambos tipos de propiedades a partir de un único análisis.

En esta tesis, se han desarrollado estudios NIR para ser aplicados en la industria del cemento y la farmacéutica. La industria del cemento se mantiene prácticamente inexplorada en cuanto a aplicaciones NIR, en la actualidad los pocos estudios que se encuentran, tienen como objetivo la determinación del grado de hidratación de pastas cementosas [1], lo que nos brinda una amplia gama de posibilidades donde la espectroscopía NIR podría aportar soluciones. En cambio, la espectroscopía NIR ha sido aplicada al campo farmacéutico en numerosas ocasiones, hasta el punto de ser considerada por EMA, el pasado año 2009, como una técnica útil para la identificación de materias primas, para el ensayo de contenido en intermedios y producto acabado y para el control de procesos farmacéuticos [2]. Es este creciente interés por la

Introducción

espectroscopía NIR por parte de la industria farmacéutica lo que nos ha hecho plantear alternativas reales a los métodos convencionales de análisis.

3.2 La industria del cemento.

3.2.1 *De la cal al cemento Portland* [3].

Los datos más antiguos sobre la utilización de la cal se encuentran en la misteriosa cultura de Anatolia, en Catal Hüyük (6000 a.C.), donde James Mellart, en su obra clásica “Earl est Civilizations of the Near East” describe que los pilares de las casas de la ciudad estaban recubiertos de una mezcla de cal.

Los egipcios fueron los primeros en usar escayola (sulfato de calcio hidratado) para unir los bloques de la pirámide de Keops. Aunque también son conocidas las tumbas pintadas al fresco de Tebas en el s. XV a.C., donde las paredes de las tumbas fueron lucidas con una mezcla de cal y yeso.

La civilización romana mejoró los procesos de fabricación de la cal y las técnicas de trabajo de los morteros, supo explotar todas las posibilidades de este material, lo popularizó y expandió la técnica por todo el imperio.

Vitruvio, un arquitecto romano del siglo I a. C., es la fuente más completa para el estudio de elementos constitutivos del mortero de cal. Por él sabemos, que la mezcla de materiales se hacía en la proporción de una unidad de cal por tres de árido. Nombra también el uso de aditivos como cenizas volcánicas o trozos de tejas pulverizados. La excepcional calidad de los morteros romanos pasó a la historia por su buena elaboración, por la perfecta calcinación de las rocas, por la homogeneidad de las dosificaciones y la cuidada ejecución del mortero han sido los secretos fundamentales y lo que ha permitido, que se conozca su legado dos mil años después.

Durante los siglos posteriores no se produjo ningún avance destacable en la fabricación de morteros. Es a partir del s. XVIII cuando se producen los conglomerados hidráulicos, es decir, conglomerados que son susceptibles a endurecerse con agua. Smeaton,

encargado de dirigir la construcción del faro de Eddyston (Plymouth) se propuso encontrar una cal capaz de resistir la acción del mar. Los ensayos realizados con piedra calcárea de Averthan dieron resultados positivos, los análisis químicos demostraron que la presencia de arcilla era uno de los factores que determinaba la hidráulidad (capacidad de endurecimiento tanto en el aire como en el agua). Hacia 1812, Vicat estudió las mezclas calcáreas y arcillosas y demostró definitivamente que las propiedades hidráulicas dependen de los componentes que se forman durante la cocción entre la cal y los constituyentes de la arcilla. Bajo la acción del calor, primero se produce una deshidratación de la arcilla, después la descomposición de la piedra calcárea y finalmente una combinación entre la cal, la sílice y los óxidos de aluminio. Dependiendo de la temperatura de cocción, la reacción es más o menos completa y los productos obtenidos más o menos hidráulicos.

No fue hasta 1824 cuando Aspidin consiguió el primer producto que recibió el nombre de cemento, lo hizo por cocción a temperaturas muy elevadas de una mezcla de cal apagada y arcilla. Joseph Aspadin bautizó su producto como “cemento Portland”, ya que afirmaba que era tan duro como las piedras de Portland.

Desde finales del s. XIX los principios generales de la fabricación del cemento “Portland” no han sufrido demasiados cambios. No obstante, han seguido una evolución técnica y científica muy importante.

3.2.2 Los morteros.

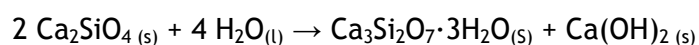
El mortero se define como un material conglomerado hecho con una mezcla de conglomerante (cal, cemento o mezcla de ambos), arena y agua y a menudo puede contener además algún aditivo. Esta mezcla se endurece pasado un cierto tiempo.

Se considera **cemento** [4] toda aquella sustancia o mezcla de sustancias que tienen propiedades adhesivas, en esta definición entran una gran variedad de sustancias como

Introducción

por ejemplo las resinas. En un sentido más preciso se denomina cemento a todo aquel agente aglutinante hidráulico.

Para la elaboración del cemento son necesarias materias primas que aporten principalmente cal (piedra calcárea) y sílice (arena), y ocasionalmente óxidos de hierro y alúmina. Estos materiales se trituran, se muelen y se mezclan íntimamente hasta una completa homogenización. La materia prima mezclada se introduce en hornos rotatorios donde se calcina a temperaturas alrededor de 1400° C. La reacción química libera dióxido de carbono y funde parcialmente los componentes para formar el *clinker* o escorias de cemento, el material se subdivide y se aglutina en fragmentos, la forma de los cuales se regulariza por efecto de la rotación del horno. Una vez frío, el *clinker* se muele conjuntamente con cierta cantidad de yeso (CaSO₄), que tiene como función regular el tiempo de endurecimiento del cemento, obteniéndose el polvo grisáceo que conocemos como cemento. Químicamente, los componentes principales son 26% de silicato dicálcico, Ca₂SiO₄, 51% de silicato tricálcico, Ca₃SiO₅ y un 11% de aluminato tricálcico, Ca₃Al₂O₆. Cuando se mezcla el cemento con el agua se obtiene una masa plástica que se endurece progresivamente, a medida que se forman los cristales entrelazados de aluminosilicatos hidratados, hasta llegar a una dureza similar a la de la piedra. Una reacción de hidratación representativa sería:



Este cemento se mezcla con árido o grava para formar el mortero y el hormigón, respectivamente.

Los **áridos** [5] son materiales granulares (pequeños trozos de roca) utilizados en la construcción y en diversas aplicaciones industriales.

La explotación de los áridos se realiza normalmente a cielo abierto. Existen diferentes formas de extracción de los áridos en función de su localización y el estado en que se encuentran, así se extraerán por vía seca si el yacimiento se encuentra sobre el nivel freático del agua o por vía húmeda si se encuentra por debajo o bien mediante

explosivos si el material esta consolidado. Posteriormente a la etapa de extracción, los áridos se trituran para disminuir el tamaño de partícula y finalmente, se lavan para eliminar el polvo o los restos de lodos. Los áridos se clasifican en función de su tamaño de partícula medio, y su uso para una u otra aplicación dependerá de éste.

La investigación histórica actual [3,6] revela la gran cantidad de materiales que se usaron como aditivos en diversas construcciones, la albúmina de huevo, queratinas y caseínas son polímeros orgánicos que ya los egipcios usaron como aglutinantes. Los romanos utilizaron leche de higuera, pasta de centeno, grasa de cerdo, leche cuajada, sangre o clara de huevo.

Actualmente, la evolución de los morteros se basa en la incorporación de aditivos sintéticos o mezclas de sintéticos y orgánicos, que se utilizan con el propósito de modificar el comportamiento del mortero en estado húmedo y/o inducir o mejorar determinadas propiedades del mortero fraguado.

Los aditivos más usuales se clasifican en función de la modificación de las propiedades del mortero, así encontramos [7]:

- 1) aditivos que modifican las propiedades del mortero fresco, como **plastificantes** y **fluidificantes** que permiten una reducción de la cantidad de agua utilizada sin reducir la trabajabilidad del mortero. **Aireantes** que aumentan la resistencia del mortero a los ciclos de temperatura (verano-invierno), incorporando burbujas de aire en el mortero las cuales actúan como cámaras de expansión.
- 2) Aditivos que modifican el endurecimiento del mortero. **Acelerantes**, adelantan el inicio de endurecimiento del mortero. **Retardantes**, ralentizan el proceso de endurecimiento del mortero.
- 3) Aditivos que modifican la resistencia a las acciones físicas y químicas. **Hidrofugantes**, destinados a reducir la penetración del agua a través del mortero, obturando pequeñas fisuras e impidiendo que el agua pase a través

Introducción

del mortero. **Anticongelantes**, actúan activando la hidratación del cemento y rebajando la temperatura de congelación del agua en el mortero.

- 4) Aditivos misceláneos. **Cohesivos**, aumentan la cohesión entre partículas de cemento. Estos aditivos suelen ser partículas extrafinas, generalmente resinas, que se sitúan en el interior de los microporos que dejan las partículas de cemento entre si. **Colorantes**, dan un color diferente del gris habitual del mortero. Estos pigmentos suelen ser óxidos metálicos como óxido de cobalto para dar una tonalidad azul o α óxido de hierro III para dar una tonalidad roja.

3.3 La industria farmacéutica

La industria farmacéutica es una actividad industrial altamente regulada por diferentes organismos tanto nacionales como internacionales cuyos controles de calidad obligan a realizar un alto número de determinaciones de características físicas y químicas de las materias primas, de los productos intermedios y principalmente sobre el producto acabado.

La determinación del contenido en API sobre el producto acabado, es un parámetro determinante para proceder a la liberación del lote de producción. Este análisis suele llevarse a cabo mediante técnicas instrumentales como HPLC, GC o UV-Vis, las cuales requieren protocolos de análisis que consumen mucho tiempo, son destructivas y producen una elevada cantidad de residuos. La determinación de propiedades físicas, tales como el tamaño de partícula de un granulado o la dureza de un comprimido, requiere de otro tipo de instrumentación menos sofisticado, pero no por ello dejan de ser metodologías tediosas y lentas.

El control de calidad constituye un elemento esencial en los procesos de producción farmacéutica. Garantizar la calidad de las formulaciones desarrolladas implica someter a los productos finales a una gran variedad de pruebas, que tienen un impacto negativo sobre la productividad y la competitividad.

En respuesta a este problema, la FDA (*Food and Drug Administration*) plantea una nueva filosofía de trabajo, la tecnología analítica de proceso (*PAT, Process Analytical Technology*).

3.3.1 Introducción a la tecnología analítica de procesos.

La tecnología analítica de procesos es una iniciativa de la FDA que nace con el objetivo de *“to enhance understanding and control the manufacturing process, which is consistent with our current drug quality system: quality cannot be tested into products; it should be built-in or should be by design”* [8].

Debemos preguntarnos que se entiende por *calidad* de un producto. ISO define calidad como: *“la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”* [9]. Es decir, un producto de calidad será aquel que cumpla con las especificaciones acordadas previamente con el cliente y/o definidas por la autoridad.

PAT propugna un control de la calidad continuo, en todas y cada una de las etapas de fabricación del producto, desde la recepción de las materias primas y de las diferentes etapas del proceso hasta el producto final, determinando los parámetros críticos de calidad en cada una de ellas y asegurando su cumplimiento antes de pasar a la etapa siguiente. Con esta metodología de trabajo, la calidad es una consecuencia inherente al proceso productivo, no se pueden producir sorpresas ni obtener productos que no cumplan los requisitos de calidad prefijados. Esta metodología de trabajo permite conocer los puntos críticos del proceso, mejorar su calidad y aumentar la productividad, eliminando rechazos y/o reprocesamientos.

La aplicación de la nueva filosofía de trabajo requiere el desarrollo y la utilización de técnicas analíticas rápidas y sencillas que permitan adquirir de forma rápida la información necesaria. Las técnicas espectroscópicas son especialmente apropiadas para ser utilizadas con esta filosofía, especialmente la espectroscopia de infrarrojo

Introducción

cercano (NIRS). De hecho, la espectroscopia NIR ha sido ampliamente utilizada con éxito en este contexto, como se refleja en el gran número de aplicaciones en la industria farmacéutica [10-19], donde su flexibilidad ha permitido la obtención de información analítica en multitud de matrices.

3.3.2 Proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos.

La vía oral es la forma más utilizada para administrar fármacos y entre las formas posológicas orales, los comprimidos son los más frecuentes [20]. En la Farmacopea Europea [21] se definen los comprimidos como “preparados sólidos que contienen una dosis única de uno o más principios activos y que se obtiene por compresión de volúmenes uniformes de partículas”

La fabricación de estos comprimidos farmacéuticos comprende un conjunto de etapas unitarias (ver figura 3.1), en los que la materia prima es sometida a una serie de tratamientos, principalmente físicos.

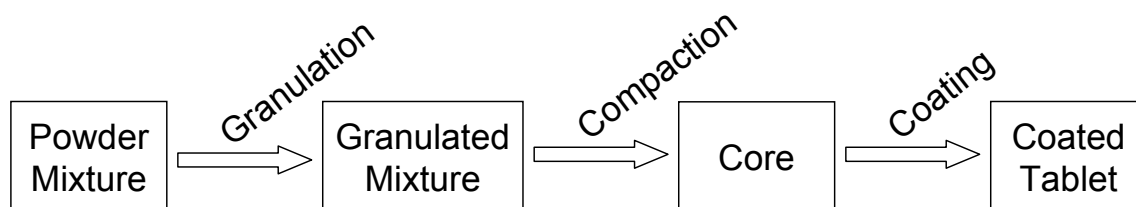


Figura 3.1. Etapas del proceso de fabricación de un comprimido farmacéutico.

La primera etapa de la fabricación de un comprimido farmacéutico es la mezcla de las materias primas, normalmente en estado pulverulento. Éstas se mezclan hasta obtener una distribución homogénea.

La mezcla en polvo inicial se granula con el objetivo de aumentar su tamaño de partícula. La granulación es el proceso por el cual las partículas primarias en polvo se preparan para adherirse y formar estructuras mayores con múltiples partículas, que se conocen como gránulos. El tamaño de los gránulos de este intermedio farmacéutico

suele hallarse entre 0.2 y 0.5 mm. Posteriormente a la granulación, los gránulos se mezclan con otros excipientes hasta completar la formulación. Existen diversas razones por las que es necesario llevar a cabo la granulación de las materias primas, en los siguientes puntos se enuncian las más importantes [22]:

- 1) Prevenir la segregación de los componentes de la mezcla en polvo. La segregación se produce principalmente por las diferencias de tamaño de partícula o densidad de los componentes de la mezcla, concentrándose las partículas más pequeñas o más densas en la base del envase. Es importante también controlar la distribución del tamaño de partícula, si la distribución es amplia durante el proceso de tableteado se obtendrán comprimidos con grandes variaciones de peso ya que las máquinas llenan por volumen y no por peso.
- 2) Mejorar las propiedades de deslizamiento de la mezcla. A menudo muchos polvos son cohesivos y no se deslizan bien. Un deslizamiento malo dará lugar a una variación amplia de peso dentro del producto final, debido al llenado variable de las matrices. Los gránulos producidos a partir de un sistema cohesivo serán mayores y con un diámetro más homogéneo, factores ambos que mejoran las propiedades de deslizamiento.
- 3) Mejorar las características de compactación de la mezcla. Algunos polvos son difíciles de compactar aunque se incluya un adhesivo en la mezcla, pero los gránulos de la misma formulación se compactarán más fácilmente y producirán comprimidos más fuertes. Este efecto se asocia a la distribución del adhesivo dentro del gránulo y depende del método utilizado para obtener el gránulo.

Los métodos de granulación pueden dividirse en dos tipos; por **vía seca** o por **vía húmeda**. En los métodos de granulación que se desarrollan en seco, las partículas de polvo se agregan a alta presión, donde se produce un fragmento grande conocido como

Introducción

tableton. Posteriormente, este producto se fragmenta usando una técnica de molienda adecuada para obtener el material granular que después se tamiza para obtener la fracción de tamaño deseado. La granulación por vía húmeda implica el amasado de una mezcla de partículas primarias de polvo usando un líquido de granulación. El líquido contiene un disolvente que debe ser volátil para que pueda eliminarse durante el secado. El líquido de granulación suele usarse con un adhesivo disuelto (aglutinante) que garantiza la adhesión de las partículas una vez que el granulado está seco. La masa húmeda se hace pasar por un tamiz para formar gránulos del tamaño deseado los cuales se secan a continuación. El paso posterior de tamizado rompe los aglomerados de gránulos y elimina el material demasiado fino [22].

La siguiente etapa del proceso de fabricación lleva a la compresión del producto granulado mediante la acción de dos punzones o troqueles a través de los cuales se aplica la fuerza compresiva al material que se encuentra en la matriz. La compactación [20] se define como la formación de una muestra porosa de una geometría definida mediante la compresión del polvo o granulado. El llenado de la matriz se realiza, normalmente, por un flujo gravitacional del granulado desde la tolva hasta la matriz. La matriz está cerrada en su extremo inferior por el punzón inferior. El punzón superior desciende y entra en la matriz y el granulado se comprime hasta formar el comprimido. Posteriormente, el comprimido es expulsado de la matriz. Los comprimidos deben compactarse a una presión adecuada de manera que sean suficientemente duros para que en su manipulación no se desmenucen y/o fracturen, pero a su vez sean suficientemente blandos para facilitar su disgregación en el organismo.

A menudo, la etapa final es el recubrimiento de los núcleos con el líquido de recubrimiento que contiene un polímero junto con otros componentes como pigmentos y plastificantes. Esta solución se vaporiza sobre el lecho rotatorio de mezcla de los comprimidos o sobre el lecho fluido. Las condiciones de secado permiten eliminar el disolvente dejando un depósito fino del material de recubrimiento alrededor de cada

núcleo de comprimido [23]. El recubrimiento tiene diversas funciones como preservarlo de las condiciones ambientales, enmascarar olores o sabores desagradables o conferir al comprimido propiedades de liberación controlada del fármaco.

REFERENCIAS

1. D. Gastaldi, F. Canonico, S. Irico, D. Pellerej, M. C. Paganini. Near-Infrared Spectroscopy investigation on the hydration degree of a cement paste. *J. Mater. Sci.* (2010), 45, 3169.
2. European medicines agency. Guideline on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations. Draft (2009).
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/1776009endraft.pdf>
3. <http://www.arquitectuba.com.ar/textos/De%20la%20cal%20al%20cemento%20portland.pdf>
4. G. Rayner-Canham. Química Inorgànica Descriptiva. (2000), 2ª ed., Editorial Addison Wesley Longman.
5. www.aridos.org
6. www.monografias.com/trabajos4/concreto/concreto.shtml
7. <http://www.ucn.cl/FacultadesInstitutos/laboratorio/TECNOLOGIA%209.htm>
8. Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance.
<http://www.fda.gov/Cder/OPS/PAT.htm>
9. ISO, Guide 25, General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories, (1990).
10. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. De la Pezuela. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst.* (1998), 123, 135R.
11. P. Merckle and K. A. Kovar. Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1998), 17, 365.

Introducción

12. A. Eustaquio, P. Graham, R. D. Jee, A. C. Moffat and A. D. Trafford. Quantitation of paracetamol in intact tablets using near infrared transmittance spectroscopy. *Analyst*, (1998), 123, 2303.
13. P. Corti, G. Ceramelli, E. Dreasi and S. Mattii. Near infrared transmittance analysis for the assay of solid pharmaceutical dosage forms. *Analyst*. (1999), 124, 755.
14. N. W. Broad, R. D. Jee, A. C. Moffat and M. R. Smith. Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets. *Analyst* (2001), 126, 2207.
15. M. Blanco, M. Alcalà. Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*. (2006), 557(1-2), 353-359.
16. M. Blanco, M. Alcalà. Simultaneous quantitation of five principles in pharmaceutical preparation: Development and validation of near infrared spectroscopic method. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2006), 27(2-3), 280-286.
17. C. P. Meza, M. A. Santos and R. J. Romañach. Quantitation of drug content in a low dosage by transmisión near infrared spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* (2006), 7, 29.
18. Y. Dou, N. Qu, B. Wang, Y. Z. Chi and Y. L. Ren. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *Eur. J. Pharm Sci.* (2007) 32, 193.
19. D. Xiang, M. Konigsberger, B. Wabuye, K. Hornung and J. Cheney. Development of robust quantitative methods by near-infrared spectroscopy for rapid pharmaceutical determination of content uniformity in complex tablet matrix. *Analyst*. (2009) 134, 1405.
20. G. Alderborn. Comprimidos y compactación. En *Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. (2004) 2ª edición. Ed. M. E. Aulton. Elsevier.

21. European Pharmacopoeia 5.0. En Dosage Forms. (2005) Volumen 1, 01/2005:0478.
5ª ed.
22. M. Summers, M. Aulton. Granulación. En Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. (2004) 2ª edición. Ed. M. E. Aulton. Elsevier.
23. J. Hogan. Recubrimiento de comprimidos y multipartículas. En Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. (2004) 2ª edición. Ed. M. E. Aulton. Elsevier.

METODOLOGÍA

4

Metodología

4.1 Introducción

4.2 Descripción y preparación de muestra

4.3 Instrumentación y métodos de referencia

4.4 Programas para la adquisición y el tratamiento
quimiométrico de los datos

4.5 Construcción de modelos cualitativos y cuantitativos

4. Metodología

4.1 Introducción.

El objetivo de esta tesis es desarrollar nuevas metodologías NIR que permitan realizar análisis cualitativos y cuantitativos para ser usados en rutina por la industria. Los trabajos presentados se han focalizado en 2 tipos de industrias, la del cemento y la farmacéutica, aunque las metodologías desarrolladas son válidas para cualquier tipo de industria.

La industria del cemento y los morteros garantiza la calidad del producto acabado mediante pruebas físicas sobre el producto húmedo o bien fraguado. Evalúan la trabajabilidad o la velocidad de fraguado sobre el mortero húmedo o bien la resistencia o la dureza sobre el producto fraguado, pero en ningún caso se analiza químicamente la mezcla. Las propiedades que determinarán la calidad del producto dependen del tipo y cantidad de aditivos añadidos y del tamaño de partícula del árido. En este campo, se han desarrollado diferentes metodologías NIR para cuantificar los aditivos en morteros industriales y determinar las curvas de distribución de tamaño de partícula de los áridos. En cambio, la industria farmacéutica está rigurosamente regulada tanto por organismos nacionales como internacionales y las metodologías que se han desarrollado han sido aplicadas con el objetivo de sustituir los métodos de análisis habituales durante el proceso de producción del fármaco y sobretodo sobre el producto acabado.

En los apartados que siguen a continuación, se describen las características más relevantes de las metodologías empleadas en el desarrollo de los nuevos métodos propuestos: los distintos tipos de muestras analizadas y las formas de preparación en el laboratorio, el registro de los espectros NIR, la obtención de la propiedad analítica de interés mediante los métodos de referencia y el procesamiento de los datos.

Metodología

4.2 Descripción y preparación de muestras.

Las muestras estudiadas pertenecen o bien a la industria cementera o a la farmacéutica, pese a que pertenecen a dos tipos de campos bien diferenciados, su objetivo es común, mejorar el conocimiento del proceso productivo y una mejor caracterización de las muestras.

La determinación de los parámetros de interés a partir del espectro NIR se ha realizado mediante modelos de calibración multivariante. La metodología seguida comprende varias etapas: 1) recopilar un conjunto de muestras representativas que incluyan tanto la variabilidad física como la química del proceso de fabricación del producto y que abarque un intervalo de valores del parámetro objetivo a estudiar suficientemente amplio 2) obtener el espectro NIR de dichas muestras 3) tratar matemáticamente los espectros con el objetivo de exaltar la propiedad a determinar 4) construir el modelo multivariante que permita determinar dicha propiedad y 5) validar el modelo desarrollado.

Quizá, el punto más crítico de los citados anteriormente sea el primero. Del conjunto de muestras escogido dependerá en gran medida el éxito de los modelos construidos. Es por ello, que a menudo se ha hecho uso del diseño de experimentos para crear un grupo representativo de muestras que cubran el rango de valores esperables evitando al mismo tiempo la colinealidad entre ellas [1] y conteniendo todas las variaciones esperadas para cada componente.

A continuación se hace una descripción más detallada de las muestras utilizadas y de la preparación de éstas en cada uno de los trabajos realizados.

4.2.1 Muestras de la industria cementera.

Los componentes mayoritarios de los morteros industriales (árido y cemento) son de origen natural. Esta naturaleza confiere a las muestras un plus de complejidad, ya que la variabilidad tanto química como física es muy elevada.

- Morteros.

El mortero en estudio está constituido por una mezcla de 4 componentes: Cemento y árido y dos aditivos orgánicos, Ad1 y Ad2. La composición de una mezcla de mortero es de un 30% de cemento y 70% de árido, estos 2 compuestos forman la base del mortero. Habitualmente, en este tipo de industria el porcentaje de aditivos añadidos se calcula sobre la suma de árido y cemento (100%), en consecuencia, la suma de todos los componentes es mayor al 100%. A partir de esta base se obtendrán 2 morteros diferentes PA y PB: el primero contiene, además del árido y el cemento, un 0.32% de Ad1 y un 1.54% de Ad2 (suma total 101.86%) y el segundo contiene un 0.35% de Ad1 y un 0.40% de Ad2 (suma total 100.75%).

Las muestras de producción se utilizaron para evaluar la capacidad predictiva de los modelos construidos.

El conjunto de muestras de laboratorio se obtuvo mediante la construcción de un diseño de experimentos, con el objetivo de incluir las fuentes de variabilidad de las materias primas de las muestras de producción con la mínima correlación en la composición de las mismas. En el diseño no se han considerado las interacciones entre factores.

El diseño se ha basado en la figura geométrica del antiprisma de base hexagonal, que se obtiene con la unión de dos hexágonos situados a distinto nivel y rotados 30° uno respecto al otro.

El diseño se ha planteado para mezclas con tres factores cuantitativos o de concentración (X, Y y Z). En un plano XY se construye un hexágono donde cada vértice corresponde a una mezcla de composición x_i y y_j de los compuestos X e Y (ver figura 4.1 a). Con este primer hexágono tenemos 3 niveles de concentración para X, 4 niveles para Y y 1 nivel para Z (nivel -1) (figura 4.1c, línea de puntos y rayas). Se añade un segundo hexágono (figura 4.1b, línea continua) del mismo tamaño en un nuevo nivel de Z (nivel -0.33) (figura 4.1c, línea continua), este hexágono se rota 30° respecto al primero,

Metodología

aumentando el rango explorado (5 niveles de X, 5 de Y y 2 de Z). Con estos dos hexágonos se construye el primer antiprisma de base hexagonal (figura 4.2a). Con el objetivo de aumentar los niveles de Z se coloca un segundo antiprisma hexagonal encima del anterior con lo que doblamos los niveles de Z (figura 4.2b).

Para cubrir de una forma homogénea el rango de concentraciones se aumenta el número de muestras del diseño con valores de concentraciones intermedias, y para ello se inscriben dos antiprismas hexagonales de tamaño inferior, en el interior de los primeros (figura 4.2c). De esta manera tenemos 7 niveles de X y 7 de Y (figura 4.1b) y 8 de Z (figura 4.1c).

Se añaden al diseño algunas mezclas que contengan la concentración media de X y de Y, se inscriben 4 puntos centrales en los niveles Z de -1, -0.33, 0.17 y 0.67. Un recuento de las mezclas indica que 8 hexágonos por 6 mezclas en cada hexágono son 48 muestras y si añadimos 4 puntos centrales tenemos un total de 52 muestras. La ortogonalidad del diseño para factores cuantitativos se ha establecido mediante el cálculo de los coeficientes de correlación entre factores.

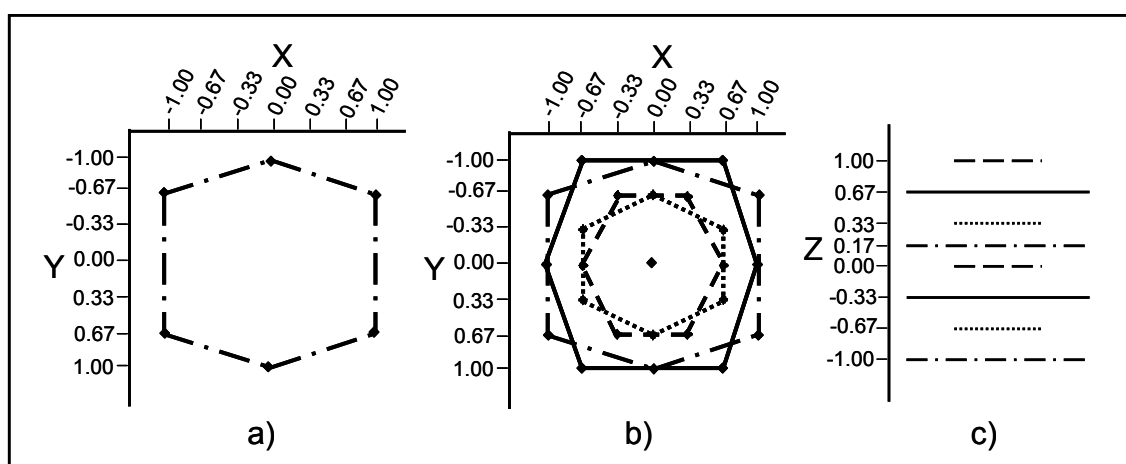


Figura 4.1 Pasos en la construcción del diseño del antiprisma de base hexagonal. a) Base hexagonal del diseño b) Proyección del plano XY del diseño c) Proyección del eje Z. Obsérvese que son dos grupos de los 4 hexágonos dibujados en b).

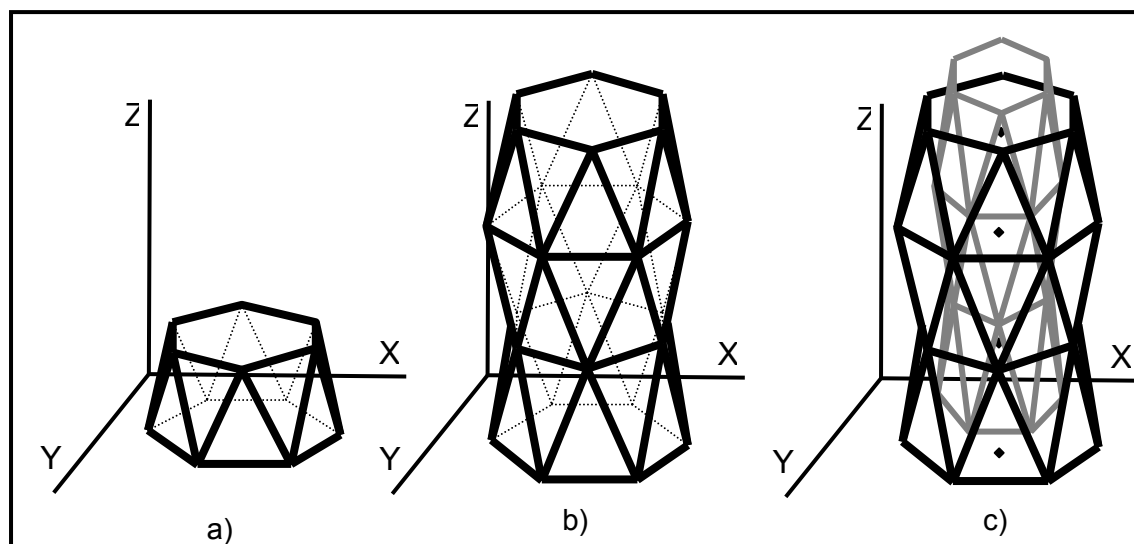


Figura 4.2. a) Antiprisma de base hexagonal. b) Unión de 2 antiprismas hexagonales. c) Diseño final.

La segunda parte del diseño tiene en cuenta los factores cualitativos, para este caso se han considerado 2 factores, a los que llamaremos A y B. Se utiliza el D-optimal design que sigue el D-optimality criterion en modo cualitativo, para crear mezclas entre clases de A y de B. El número de niveles de cada factor dependerá de las clases que se tengan de A y de B. En el diseño cuantitativo se propusieron 52 mezclas y por lo tanto, proponemos el mismo número de mezclas de A y B.

El último paso del diseño es la asociación de la matriz de concentraciones que obtenemos a partir del primer diseño y la matriz de combinaciones de clases de A y B obtenida del diseño cualitativo, formando una nueva matriz donde se especifica la concentración de cada uno de los analitos y las clases de analito que se deben usar en la preparación de la mezcla (tabla 4.1). La tabla 4.2 recoge los rangos de concentraciones estudiados para cada componente y los niveles para cada uno de los factores del diseño de experimentos del antiprisma hexagonal.

Metodología

Tabla 4.1. Coordenadas del diseño del antiprisma hexagonal y combinaciones de aditivos.

Mix	X (Ad2)	Y (Ad1)	Z (sand)	Class Ad1	Class Ad2	Mix	X (Ad2)	Y (Ad1)	Z (sand)	Class Ad1	Class Ad2
1	-1	-0.67	-1	Ad1b	Ad2d	27	-1	-0.67	0.17	Ad1b	Ad2c
2	0	-1	-1	Ad1c	Ad2a	28	0	-1	0.17	Ad1f	Ad2a
3	1	-0.67	-1	Ad1i	Ad2c	29	1	-0.67	0.17	Ad1b	Ad2a
4	1	0.67	-1	Ad1e	Ad2f	30	1	0.67	0.17	Ad1a	Ad2e
5	0	1	-1	Ad1g	Ad2e	31	0	1	0.17	Ad1c	Ad2f
6	-1	0.67	-1	Ad1d	Ad2b	32	-1	0.67	0.17	Ad1a	Ad2c
7	0	0	-1	Ad1a	Ad2d	33	0	0	0.17	Ad1f	Ad2f
8	-0.67	-0.33	-0.67	Ad1h	Ad2d	34	-0.67	-0.33	0.33	Ad1j	Ad2c
9	0	-0.67	-0.67	Ad1h	Ad2a	35	0	-0.67	0.33	Ad1i	Ad2d
10	0.67	-0.33	-0.67	Ad1i	Ad2a	36	0.67	-0.33	0.33	Ad1h	Ad2e
11	0.67	0.33	-0.67	Ad1j	Ad2b	37	0.67	0.33	0.33	Ad1f	Ad2e
12	0	0.67	-0.67	Ad1d	Ad2a	38	0	0.67	0.33	Ad1a	Ad2f
13	-0.67	0.33	-0.67	Ad1d	Ad2d	39	-0.67	0.33	0.33	Ad1f	Ad2d
14	-0.33	-0.67	-0.33	Ad1h	Ad2f	40	-0.33	-0.67	0.67	Ad1i	Ad2b
15	0.33	-0.67	-0.33	Ad1h	Ad2c	41	0.33	-0.67	0.67	Ad1d	Ad2e
16	0.67	0	-0.33	Ad1e	Ad2e	42	0.67	0	0.67	Ad1a	Ad2b
17	0.33	0.67	-0.33	Ad1g	Ad2c	43	0.33	0.67	0.67	Ad1e	Ad2b
18	-0.33	0.67	-0.33	Ad1g	Ad2a	44	-0.33	0.67	0.67	Ad1g	Ad2f
19	-0.67	0	-0.33	Ad1e	Ad2c	45	-0.67	0	0.67	Ad1d	Ad2f
20	0	0	-0.33	Ad1e	Ad2d	46	0	0	0.67	Ad1f	Ad2b
21	-0.67	-1	0	Ad1b	Ad2e	47	-0.67	-1	1	Ad1i	Ad2e
22	0.67	-1	0	Ad1j	Ad2a	48	0.67	-1	1	Ad1g	Ad2b
23	1	0	0	Ad1c	Ad2e	49	1	0	1	Ad1j	Ad2f
24	0.67	1	0	Ad1a	Ad2a	50	0.67	1	1	Ad1c	Ad2d
25	-0.67	1	0	Ad1c	Ad2b	51	-0.67	1	1	Ad1d	Ad2c
26	-1	0	0	Ad1b	Ad2f	52	-1	0	1	Ad1j	Ad2d

Tabla 4.2. Parámetros de interés para la construcción del diseño.

	Cemento	Árido	Ad1	Ad2
Intervalo de concentraciones	28-34%	66 - 72 %	0 - 0.6%	0 - 2%
Niveles (factor de concentración)	7	7	7	7
Niveles (factor cualitativo)	1	1	10	6

Las muestras se prepararon por pesada en las proporciones que se indican de la tabla 4.1, donde el valor de -1 corresponde a la concentración inferior del factor a considerar y el valor +1 a la máxima. El peso final de las mezclas fue de 10 g y el orden de preparación de las mismas fue aleatorio. Posteriormente, éstas se homogenizaron en una mezcladora para sólidos durante 15 minutos y se consideró que la mezcla era homogénea cuando espectros sucesivos de la misma muestra, durante el proceso de homogeneización, eran idénticos.

El porcentaje en peso de cada analito en la mezcla se utilizó como valor de referencia en la construcción del modelo PLS.

Para validar el método propuesto se prepararon 8 nuevas muestras, con lotes de producción de las materias primas diferentes a los utilizados en la construcción del modelo. Estas muestras cubren el rango de concentraciones propuesto para cada analito y la variabilidad química debida a los tipos de aditivos.

- Áridos industriales.

Se utilizaron en el estudio un total de 30 muestras de árido con diferente distribución del tamaño de partícula. Todas las muestras proceden de la mezcla en diferentes proporciones de dos áridos que a su vez presentan diferente tamaño medio y distribución del tamaño de partícula.

4.2.2 Muestras de la industria farmacéutica.

Las muestras farmacéuticas estudiadas presentan diferentes características físicas: sólidos en polvo, granulados y comprimidos. Las muestras se extrajeron directamente de cada una de las etapas del proceso productivo (granulación, compactación y recubrimiento) o bien fueron preparadas en el laboratorio. El rango de concentración de principio activo y excipientes en las muestras de producción es muy estrecho, ya que las características del proceso están altamente controladas y optimizadas para que la

Metodología

concentración del producto final no diste de las deseadas. La variación de la concentración del principio activo en muestras de producción es inferior al $\pm 5\%$ [2] respecto a la etiquetada. Las muestras de producción no cubren el rango de concentración óptimo para construir un modelo de calibración que pueda utilizarse para la determinación de API, si durante el proceso productivo se producen situaciones de mayor variabilidad y la concentración de API se aleja de la normalidad el modelo no sería apto para esas muestras, por ello es necesario preparar muestras en el laboratorio con el fin de ampliar el rango.

En el laboratorio, las muestras se preparan intentando aproximarse lo máximo posible las muestras de producción, en cuanto a forma (polvo, granulado, núcleo o comprimido recubierto) y composición química (principio activo y excipientes).

Se han preparado muestras que se han utilizado en la construcción de modelos para dos especialidades farmacéuticas distintas: Ibuprofeno y Metformina; ambos en forma de comprimidos recubiertos.

Comprimidos de Ibuprofeno

La formulación farmacéutica estudiada contiene una alta proporción de API (63.5% w/w ibuprofeno) y cuatro excipientes (28.5% w/w almidón de maíz, 5% w/w Avicel pH 102 (celulosa microcristalina), 2% w/w aerosil (silica fumed) y 1% w/w estearato de magnesio).

Los componentes mayoritarios, almidón e ibuprofeno, se pesan y se añaden a la amasadora junto con la cantidad de agua adecuada, se remueve hasta obtener una mezcla homogénea y se seca con un flujo de aire caliente. El granulado formado se tamiza (gránulos <2.0 mm) y seguidamente, se hace una adición en seco del resto de excipientes, se mezclan y finalmente se tamiza de nuevo (gránulos <1.5 mm). A partir de este granulado se preparan dos tipos de comprimidos con dosificaciones diferentes: 400 mg y 600 mg que presentan diferente forma galénica (ver figura 4.3). Los núcleos se

recubren por pulverización con una dispersión de laca, obteniendo los comprimidos recubiertos finales. Las características físicas de dichos comprimidos se recogen en la tabla 4.3.

La laca esta constituida por una dispersión acuosa de sepifilm, sepisperse y polietilenglicol.

Se dispone de un total de 10 lotes de producción de comprimidos de ibuprofeno de 400 mg y 18 lotes de ibuprofeno 600 mg.

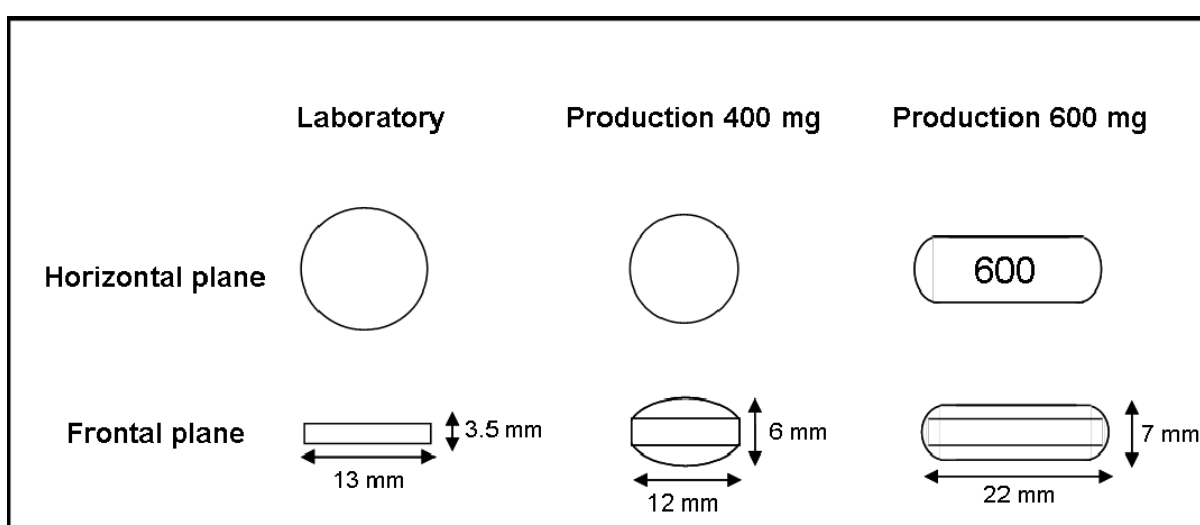


Figura 4.3. Dimensiones de un comprimido de laboratorio y los comprimidos de producción.

Tabla 4.3. Características físicas de los comprimidos de producción.

	Tipo 1	Tipo 2
Forma	Cilíndrico	Oblongo
Peso por comprimido (mg)	630	960
Peso de API (mg)	400	600
Presión de compactación (MPa)	120	155

En el laboratorio se prepararon un conjunto de muestras a partir de las materias primas que conforman la formulación. Estas muestras fueron sometidas a los mismos procesos (granulación, compactación, lacado) que en la producción o bien su espectro NIR fue

Metodología

modificado matemáticamente, con el objeto de disponer de muestras semejantes a las de las diferentes etapas del proceso productivo y que se pudieran utilizar en la construcción de los modelos correspondientes.

- Muestras en polvo (set A).

Las muestras de laboratorio se prepararon mezclando las cantidades adecuadas de API y de diferentes placebos de modo que cubrieran un rango de concentraciones adecuado para la calibración.

Se diseñaron 13 mezclas de placebo mediante la aplicación de un diseño de experimentos D-optimal cubriendo un rango de concentraciones de $\pm 5\%$ para cada compuesto respecto a su valor nominal y presentando una baja colinealidad entre los valores de concentración.

Los placebos se prepararon por pesada en una balanza analítica y fueron homogenizadas en un mezclador para sólidos.

Se prepararon 34 mezclas de API y placebo que cubrían un rango de ibuprofeno de 80-120% del valor nominal, siendo 100% la concentración nominal del fármaco de producción.

Las 34 mezclas finales se preparan por pesada en una balanza analítica y se homogenizan en un mezclador para sólidos.

- Núcleos (set B).

Las muestras en polvo fueron compactadas en el rango de presiones de 80 a 190 MPa para obtener los núcleos de laboratorio. Por cada muestra en polvo se compactaron un mínimo de 2 núcleos a diferentes presiones. La presión de compactación aplicada a cada mezcla de laboratorio fue escogida aleatoriamente.

- Núcleos (set C).

Un conjunto de muestras de granulado de producción fue compactado en el rango de 35 a 260 MPa con el objetivo de determinar la presión de compactación de los núcleos de producción. La presión de compactación aplicada a cada mezcla granulada fue escogida aleatoriamente.

- Comprimidos recubiertos (set D).

Los espectros de los comprimidos recubiertos de laboratorio se obtuvieron mediante una suma algebraica de los espectros NIR de los núcleos de laboratorio y varios espectros promedio de la capa de recubrimiento.

Para la obtención de los espectros promedio de la capa de recubrimiento se registraron un total de 50 comprimidos recubiertos pertenecientes a 5 lotes (10 comprimidos por lote) para cada dosificación (400 mg y 600 mg); posteriormente se limó una de las caras y se volvió a registrar el espectro NIR. Restando el espectro de la cara recubierta (s_{coated}) del de la cara limada (s_{filed}) se obtuvo el espectro diferencia (d_i) para cada comprimido. Se calculó el espectro diferencia promedio de cada lote usando un total de 5 lotes de comprimidos de 400 mg y 5 lotes de 600 mg. Los diferentes espectros diferencia promedio se han utilizado para modificar los espectros de los núcleos de laboratorio:

$$d_i = s_{\text{coated}} - s_{\text{filed}}$$

$$\bar{d}_i = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

$$s'_{\text{coated}} = s_{\text{core}} + \bar{d}_i$$

Siendo d_i el espectro diferencia, s_{coated} el espectro del comprimido recubierto, s_{filed} el espectro del comprimido limado, \bar{d}_i el espectro diferencia promedio, n el número de espectros diferencia que se promedian, s'_{coated} el espectro modificado y s_{core} el espectro de un núcleo de laboratorio.

Metodología

Un segundo estudio con este tipo de muestras nos llevó a la construcción de modelos de calibración a partir de espectros de muestras de laboratorio equivalentes en su variabilidad espectral a las muestras de producción.

Para ello se ha utilizado el set A de muestras de laboratorio en polvo descrito anteriormente. Adicionalmente, se prepararon 3 mezclas en polvo con los valores nominales de principio activo y excipientes, estas muestras se utilizan como muestras referencia en la construcción del conjunto de calibración.

En la figura 4.4 se recogen los pasos que deben seguirse para construir los conjuntos de calibración y validación para este segundo estudio.

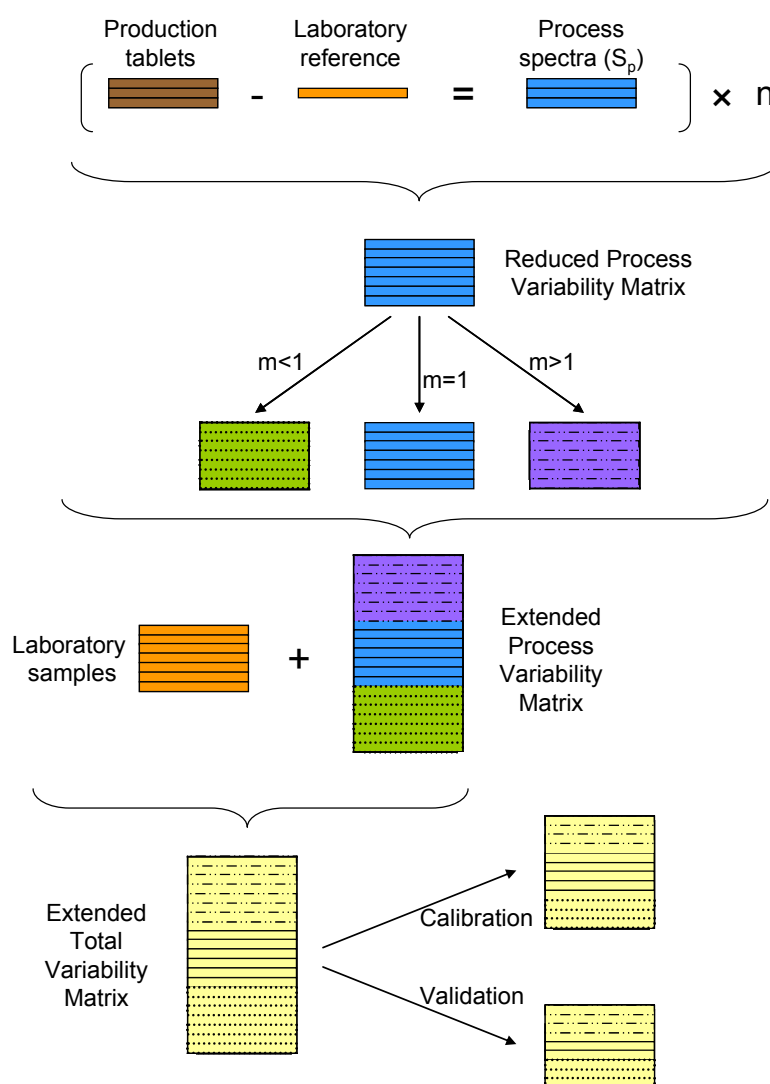


Figura 4.4 Esquema de la nueva propuesta para la construcción de los conjuntos de calibración y validación. Donde n es el número de lotes y m es un factor multiplicativo.

Inicialmente se calcula el process spectrum que recoge la variabilidad del proceso de cada comprimido:

$$S_p = S_T - S_{ref\ lab}$$

Siendo S_p el espectro del proceso, S_T el espectro de un comprimido recubierto de producción y $S_{ref\ lab}$ el espectro de la muestra en polvo de laboratorio con la concentración nominal de principio activo y excipientes o espectro referencia. Este proceso se repite con tres comprimidos de cada lote de producción, con ello se obtienen 3 espectros S_p por cada lote. Esta operación se realizó con tres lotes diferentes para los comprimidos de 400 mg y otros 3 lotes para los de 600 mg, obteniendo un total de 9 S_{P400} y 9 S_{P600} . Este conjunto de espectros constituye la *reduced process variability matrix*.

Con el objeto de aumentar la variabilidad de los espectros proceso, los espectros S_{P400} y S_{P600} se han multiplicado por los factores m de 0.5, de 0.75 y 1.25. De esta manera se han obtenido 18 espectros con el factor 0.5 (9 $S_{P400\cdot0.5}$ y 9 $S_{P600\cdot0.5}$), 18 con el factor 0.75 (9 $S_{P400\cdot0.75}$ y 9 $S_{P600\cdot0.75}$) y otros 18 con el factor 1.25 (9 $S_{P400\cdot1.25}$ y 9 $S_{P600\cdot1.25}$), además de los 18 multiplicados por el factor $m = 1$ (9 S_{P400} y 9 S_{P600}).

Los 72 *espectros proceso* (9 $S_{P400\cdot0.5}$, 9 $S_{P400\cdot0.75}$, 9 S_{P400} , 9 $S_{P400\cdot1.25}$, 9 $S_{P600\cdot0.5}$, 9 $S_{P600\cdot0.75}$, 9 S_{P600} y 9 $S_{P600\cdot1.25}$) constituyen la *extended process variability matrix* y se sumaron aleatoriamente a los espectros de las muestras en polvo preparadas en el laboratorio:

$$S_{var.ext.} = S_{lab} + S_{p.ext.}$$

Siendo $S_{var.ext.}$ el espectro de una muestra en polvo con la variabilidad del proceso, S_{lab} el espectro de una de las muestras en polvo de laboratorio y $S_{p.ext.}$ uno de los espectros de variabilidad del proceso. El conjunto de espectros $S_{var.ext.}$ constituyen la *extended total variability matrix*. Esta matriz se divide en 2 subconjuntos: uno para la construcción de los modelos (calibración) y el otro para la validación de los mismos.

Metodología

Comprimidos de Metformina.

La formulación farmacéutica contiene una alta proporción de API (clorhidrato de metformina) (89.29% w/w) y relativamente bajas concentraciones (7.88% w/w) de dos excipientes (hidroxypropilmethylcellulose 15000 mPa y polivinylpirrolidona) y estearato de magnesio (0.53% w/w). El film de recubrimiento (constituido por hidroxypropilmethylcellulose 5 mPa, macrogol 6000 y dióxido de titanio) representa el 2.31 % (w/w) del comprimido.

El comprimido tiene una forma oblonga, es biconvexo con doble ranura (ver figura 4.5) y esta recubierto de una laca blanca. La cara inferior con la ranura más grande la nombraremos cara WS (wide score) por lo contrario la cara superior la nombraremos NS (narrow score).

En el estudio se han utilizado comprimidos correspondientes a un total de 13 lotes de producción.

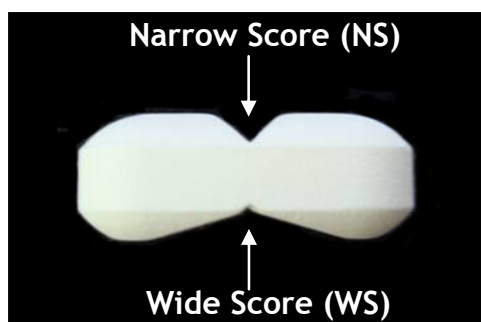


Figura 4.5. Imagen de un comprimido comercial de metformina 850 mg.

Se han preparado un total de 30 muestras de laboratorio por mezcla de las cantidades adecuadas de los componentes en polvo, que deberían cubrir un rango de concentraciones de ± 20 % del valor nominal del API [3]; sin embargo el rango efectivamente cubierto es de 80-112% de API respecto al valor nominal y el valor superior corresponde al API puro. Se ha preparado, por pesada, un placebo que contiene las concentraciones nominales de excipientes y que se ha usado también para preparar las mezclas con el principio activo cubriendo el rango de concentraciones indicado.

Todas las muestras han sido preparadas por pesada, en una balanza analítica, de los diferentes componentes y posteriormente, se han homogenizado en un mezclador de sólidos. Las mezclas se han considerado homogéneas cuando dos registros sucesivos de la mezcla presentan espectros NIR idénticos. Los valores de concentración se expresan como porcentaje del contenido nominal de API.

Una de las mezclas de laboratorio preparadas contiene las concentraciones nominales de principio activo y excipientes. Esta mezcla se utilizó como muestra de referencia en la construcción del conjunto de calibración mediante la metodología explicada en la figura 4.1. A diferencia de los comprimidos de producción de ibuprofeno, los de metformina son biconvexos (ver figura 4.3) lo que obligó a registrar el espectro NIR por ambas caras y por lo tanto, se obtuvo el espectro proceso S_{PWS} si el espectro S_T se registró por la cara WS (wide score) o bien S_{PNS} si S_T se registró por la cara NS (narrow score). Este proceso se repitió con tres comprimidos de cada lote de producción, con ello se obtienen 3 espectros proceso por cada cara que se promediaron para obtener un espectro de variabilidad medio por cada cara del comprimido. Esta operación se realizó con tres lotes diferentes de manera que se obtuvieron un total de 3 S_{PWS} y 3 S_{PNS} . Este conjunto de espectros constituye la matriz de variabilidad de proceso reducida (ver figura 4.1). Los espectros de esta matriz se han sumado aleatoriamente a los espectros de las 30 muestras en polvo con lo que se obtuvieron un total de 30 muestras WS y otras 30 NS. Esta matriz de 60 espectros se divide en dos sub-conjuntos: uno de calibración que contiene 15 muestras WS y 15 NS y otro de validación que contiene las muestras restantes.

Con el objeto de aumentar la variabilidad del proceso de fabricación, los espectros proceso se han multiplicado por un factor de 0.5 o bien por un factor de 1.5. De esta manera se han obtenido 6 espectros con el factor 0.5 (3 $S_{PWS-0.5}$ y 3 $S_{PNS-0.5}$) y otros 6 con el factor 1.5 (3 $S_{PWS-1.5}$ y 3 $S_{PNS-1.5}$).

Metodología

Los 18 *espectros proceso* (3 $S_{PWS-0.5}$, 3 S_{PWS} , 3 $S_{PWS-1.5}$, 3 $S_{PNS-0.5}$, 3 S_{PNS} y 3 $S_{PNS-1.5}$) constituyen la matriz de variabilidad del proceso ampliada y se sumaron aleatoriamente a los espectros de las muestras en polvo preparadas en el laboratorio:

$$S_{var.ext.} = S_{lab} + S_{p.ext.}$$

Siendo $S_{var.ext.}$ el espectro de una muestra en polvo con la variabilidad del proceso, S_{lab} el espectro de una de las muestras en polvo de laboratorio y $S_{p.ext.}$ uno de los espectros de variabilidad del proceso. El conjunto de espectros $S_{var.ext}$ constituyen la matriz de variabilidad total extendida (ver figura 4.1). Esta matriz se divide en 2 subconjuntos: uno para la construcción de los modelos (calibración) y el otro para la validación de los mismos.

4.3 Instrumentación y métodos de análisis.

A continuación se describen los instrumentos utilizados a lo largo de esta tesis y los diferentes métodos de análisis.

4.3.1 Espectroscopía NIR.

Los espectros NIR fueron registrados utilizando un espectrofotómetro FOSSNirsystems modelo 6500 en el intervalo de longitudes de onda de 1100 a 2500 nm y con una resolución espectral de 2 nm. Cada espectro obtenido es el resultado de promediar 32 barridos. El espectrofotómetro incorpora un módulo *Rapid Control Analyzer* (RCA) que permite el registro de espectros NIR en modo reflectancia y transflectancia. Previo al registro del espectro NIR de las muestras, se registra un espectro de referencia de la placa cerámica incorporada en el instrumento.

Los espectros NIR de muestras sólidas en polvo o granulado se registraron por triplicado en modo reflectancia utilizando una cubeta de vidrio como contenedor de la muestra. Entre los distintos replicados, el sólido se devolvió al contenedor de origen, se mezcló con una espátula y se tomó una nueva alícuota. Los espectros NIR de núcleos y

comprimidos fueron obtenidos también en modo reflectancia. Se registró el núcleo o comprimido intacto colocándolo directamente sobre la ventana de cuarzo del instrumento y se ajustó el iris a la medida de éste. Los núcleos o comprimidos se registraron por ambas caras y se obtuvo el espectro promedio, cuando se consideró oportuno.

Diariamente, antes de comenzar el registro de los espectros de las muestras, se realiza la comprobación del correcto funcionamiento del instrumento mediante los test de linealización de longitudes de onda y de ruido.

4.3.2 Cromatografía líquida.

Para las determinaciones de ibuprofeno en los comprimidos se utilizó un cromatógrafo de HPLC Agilent 1200 con detector UV. Los cromatogramas y la posterior cuantificación de ibuprofeno fueron realizados en los laboratorios de KERNPHARMA S.L. (Terrassa, España).

4.3.3 Espectroscopía UV.

El espectrofotómetro UV que se usó para la determinación de metformina fue un Perkin Elmer, Lambda 35, con software UV Winlab versión 2.85.04. Dichas determinaciones fueron realizadas por los laboratorios de KERNPHARMA S.L. (Terrassa, España).

4.3.4 Mezclador para sólidos.

Las mezclas sólidas preparadas en el laboratorio (morteros y mezclas farmacéuticas) fueron homogenizadas en un mezclador para sólidos “Túrbula T2C WAB”

Metodología

4.3.5 Tamizadora.

Los áridos fueron tamizados con una tamizadora BA100-N Sieve Shaker de CISA (Barcelona, España). Se dispone de 12 tamices con luz de malla de 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.250, 0.300, 0.400, 0.500 y 1.000 mm

4.3.6 Métodos de referencia.

A continuación se describen las características más relevantes de los métodos utilizados como referencia.

Pesada en balanza analítica ⇒ El valor de la pesada en una balanza analítica de los aditivos en las mezclas de morteros industriales y de los principios activos y excipientes en las mezclas pulverulentas y de comprimidos de laboratorio se usó como valores de referencia en la construcción de los modelos de calibración.

Tamizado de áridos ⇒ La determinación del porcentaje en peso de los diferentes tamaños de partícula del árido se llevó a cabo mediante el tamizado de las muestras con tamices de diferente tamaño de malla.

Una cantidad aproximada de 100 g de cada árido fue tamizada en 13 fracciones de diferente tamaño de partícula. Para ello se utilizaron 12 tamices con luz de malla de 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.250, 0.300, 0.400, 0.500 y 1.000 mm. La fracción que atravesó todos los tamices (< 0.050 mm) fue la decimotercera fracción. Cada fracción fue pesada en una balanza analítica con el objetivo de calcular la proporción de muestra en cada fracción y poder construir la curva de distribución de tamaño de partícula.

Se construyó una segunda curva de distribución con un número menor de datos. La nueva curva de referencia se obtuvo sumando la fracción de peso de tamices consecutivos (por ejemplo: la fracción de 0.100 mm junto con la de 0.125 mm) de esta

forma se obtuvo un nuevo valor de masa y la fracción fue renombrada con el nombre del tamiz de menor luz. Este cálculo produjo 8 nuevas fracciones y por lo tanto un nuevo conjunto de valores Y para la construcción de una segunda curva de distribución de partícula de menor resolución.

Determinación de principios activos.

- Determinación de ibuprofeno por cromatografía HPLC con detector UV.

Para la determinación del contenido medio de un lote de comprimidos de ibuprofeno se toman 20 comprimidos y se trituran; una alícuota de peso equivalente a un comprimido se trata con 40 ml de fase móvil (acetonitrilo/agua 60:40 v/v tamponado a pH=3 con ácido cloracético/cloracetato ajustado con $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$), se agita hasta disolución completa (unos 30 minutos) y se enrasa con fase móvil en un matraz de 50 ml. Una alícuota de la disolución se centrifuga durante 5 minutos y el sobrenadante se inyecta en el cromatógrafo con columna Hypersil ODS de 5 μm , 20 \times 0.46 cm y detector de UV a la longitud de onda de 254 nm. La cuantificación del ibuprofeno se realiza por interpolación en una recta de calibración usando 4-isobutilacetofenona como patrón interno. El valor de ibuprofeno obtenido corresponde al valor medio del lote.

Para el análisis de la uniformidad de dosis, se toma un comprimido, se tritura y se trata y analiza del mismo modo.

Las concentraciones se expresan en porcentaje respecto al valor nominal de la preparación, a la que se asigna el valor 100%.

- Determinación de metformina por espectroscopía UV.

Para la determinación del contenido medio de un lote de comprimidos de metformina 850 mg se toman 20 comprimidos y se trituran. Se pesan con exactitud 112 mg del pulverizado (equivale a 100 mg de metformina HCl) y se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 100ml. Se añaden 70ml de agua, se agita mecánicamente durante

Metodología

15 minutos y finalmente se enrasa. La solución se filtra, desechando los primeros 20 ml. Se toman 10 ml del filtrado y se diluyen a 100 ml. Se repite la dilución, 10 ml de muestra a 100 ml. Concentración de metformina HCl en la muestra problema debe ser aproximadamente de 0.01 mg/ml.

La disolución patrón se prepara pesando con exactitud 40 mg de metformina estándar en un matraz aforado de 200 ml, se disuelve con agua y se enrasa con el mismo disolvente. Se toman 5 ml de la disolución y se diluyen a 100 ml con agua. Concentración de metformina HCl en el patrón debe ser aproximadamente de 0.01 mg/ml.

Se registra la absorbancia de la disolución problema y la disolución patrón por UV en cubeta de cuarzo de 1 cm a la longitud de onda de 232 nm y utilizando agua como blanco.

El valor de metformina obtenido corresponde al valor medio del lote.

Las concentraciones se expresan en porcentaje respecto al valor nominal de la preparación, a la que se asigna el valor 100%.

4.4 Programas para la adquisición y el tratamiento quimiométrico de los datos.

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

- MODDE v6.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Se ha utilizado para desarrollar diseños de experimentos adecuados para la preparación de muestras de laboratorio. El programa incorpora diseños como factoriales completos o fraccionados, Placket-Burman, D-óptimos, diseños de mezclas...

- VISION v2.51 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA). Programa diseñado para el control del espectrofotómetro NIR. Permite el registro de los espectros así como su

visualización, aplicando los pretratamientos espectrales convencionales. Su entorno permite diseñar protocolos de análisis, tanto cualitativos como cuantitativos.

- UNSCRAMBLER v9.2-9.8 (Camo Process S.A., Trondheim, Norway). Programa diseñado para el tratamiento de datos multivariantes y el diseño de experimentos. Incorpora los pretratamientos espectrales habituales (SNV, derivadas de Savitzky-Golay o Norris, suavizados, correcciones de línea base...) y herramientas quimiométricas tanto para el análisis cualitativo (PCA) como para el análisis cuantitativo (PCR, PLS o PLS2). El programa permite también la realización de diseños de experimentos como factoriales completos o fraccionados, Plackett-Burman, D-óptimos...

- ANN toolbox (Eigenvector Research, WA, USA). Programa implementado en el entorno Matlab v7.0 (The Mathworks, MA, USA). Se ha utilizado para la construcción de redes neuronales artificiales por retro-propagación (Back-propagation Artificial Neural Networks) que permitieran la cuantificación simultánea de diversas variables.

- SPSS v15.0 para Windows (IBM, Chicago, IL, USA). Programa estadístico que contiene diversas opciones de modelos de regresión multivariable, de clasificación (análisis por clusters), de reducción de datos, pruebas no paramétricas...

4.5 Construcción de modelos cualitativos y cuantitativos.

Los métodos de análisis cualitativo han sido desarrollados para evaluar el grado de similitud (o disimilitud) entre los diferentes tipos de muestras de cada estudio. El análisis en componentes principales (PCA) o los dendogramas obtenidos por el análisis de clusters han proporcionado información relevante y de interés para el desarrollo de los diferentes estudios que se han realizado.

Metodología

En el análisis por componentes principales (PCA) las muestras objeto de estudio fueron tratadas previamente con los tratamientos espectrales convencionales (SNV, 1ª y 2ª derivada) y en los casos que fue necesario, se escogieron los rangos de longitudes de onda más significativos.

El análisis por clusters se utilizó con el objeto de establecer las posibles diferencias entre los espectros NIR. En todos los casos, previamente al análisis por cluster, a los espectros se les aplicaron los pretratamientos quimiométricos adecuados y posteriormente se utilizaron los scores del PCA para la construcción del dendograma. El número de componentes principales utilizados siempre superó el 95% de la varianza explicada. El rango de longitudes de onda fue de 1100-2500 nm. El dendograma se construyó usando *average linkage* y el cuadrado de la distancia euclídea en el espacio de los componentes principales.

Los métodos de análisis cuantitativos que han sido desarrollados tenían como objetivo la determinación de propiedades analíticas de interés en las diferentes muestras. Estas propiedades fueron concentración de aditivos en morteros industriales, principios activos y excipientes en comprimidos farmacéuticos y el % de tamaño de partícula en áridos de uso industrial. Estos métodos se basan en la utilización de modelos de calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS y PLS2) y por redes neuronales artificiales con retro-propagación (Back-propagation ANN).

Los modelos PLS y PLS2 fueron construidos por cross-validation mediante el método de leave-one-out. Se ensayaron diferentes pretratamientos espectrales y combinaciones de pretratamientos y rangos de longitudes de onda. En los casos que se utilizaron derivadas éstas se ajustaron a un polinomio de segundo orden con ventana móvil de 11 puntos.

Para la construcción de los modelos de redes neuronales se realizó una reducción de las variables; se usaron como inputs los scores de un PCA de los espectros en 2ª derivada en el rango de longitudes de onda de 1100-2450 nm. La red utilizada es de retro-propagación basada en un aprendizaje supervisado utilizando un conjunto de muestras

conocidas como test set. En el aprendizaje por retro-propagación, inicialmente se introduce una entrada en la red, y se propaga para conseguir la salida. Dicha salida se compara con la salida correcta, obteniéndose el error. Finalmente, el peso de cada conexión a una unidad de salida se ajusta en la dirección adecuada para reducir el error. En cuanto a las funciones de transferencia utilizadas cabe distinguir entre funciones no-lineales, funciones lineales y funciones umbral. Para la capa de entrada se ensayó una función sigmoideal no-lineal (*tansig* function), en cambio para la capa oculta la función lineal *puerlin* fue la que ofreció mejores resultados.

El número de nodos de la capa de salida es el correspondiente al número de fracciones que conformarán la curva granulométrica.

La selección del número de factores óptimo, para cualquiera de los modelos PLS, se realizó basándose en el estadístico RMSE (ecuación 2.24) o bien el RSE (ecuación 2.25), el menor valor de RMSE o RSE para el conjunto de predicción indica el número de factores necesarios para una adecuada capacidad predictiva del modelo.

Para los modelos cuantitativos PLS2 y ANN el número óptimo de factores fue escogido a partir del RSE adaptado a la predicción simultánea de n variables Y (ecuación 2.26).

REFERENCIAS

1. R. Kramer, Chemometric techniques for quantitative analysis, (1998), New Cork: Marcel Dekker.
2. European medicines agency. Guideline on specifications and control test on the finished product. June 1992. 3AQ11a.
3. ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. <http://www.ich.org>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5

Aplicaciones en la industria del cemento

5.1 Determinación de aditivos orgánicos en matrices inorgánicas

5.2 Determinación de curvas de distribución de tamaño de partícula en áridos de uso industrial

5 Aplicaciones en la industria del cemento.

Hoy en día, cualquier tipo de industria requiere cada vez más de nuevas estrategias de análisis que proporcionen una mejora en la calidad del producto, la espectroscopia NIR se ofrece como una técnica adecuada para evaluar los parámetros que determinan la calidad, tanto de las materias primas como del producto final. A continuación se detallan y discuten los resultados obtenidos para los estudios realizados con productos de la industria del cemento.

5.1 Determinación de aditivos orgánicos en matrices inorgánicas.

5.1.1 Diseño de experimentos.

La mezcla está constituida por 4 compuestos sólidos: el árido y el cemento que forman la base del mortero y se expresan como el 100% de la mezcla y las cantidades de aditivos se expresan como porcentaje de la suma de árido y cemento; en consecuencia, la suma de todos los componentes es mayor al 100%. Definimos 3 factores de concentración (árido, Ad1 y Ad2), el porcentaje de cemento se puede obtener por diferencia a partir del porcentaje de árido. En este caso, se utilizó el diseño del antiprisma hexagonal para la construcción de los conjuntos de calibración y validación. Se asoció el factor X, Y y Z del diseño del antiprisma hexagonal a los factores de concentración de Ad2, Ad1 y árido, respectivamente.

La función de Ad1 es acelerar el proceso de fraguado y se usan indistintamente varias celulósicas con diferente grado y tipo de funcionalización. La función de Ad2 es aumentar la cohesión entre partículas y está constituido por resinas vinílicas de diferente funcionalización. En la figura 5.1, se muestran las diferencias espectrales de diferentes lotes de aditivo Ad2 debidas principalmente a la diferente funcionalización del polímero. Diferencias semejantes se observan con el aditivo Ad1. Se consideraron dos factores cualitativos “clase Ad1” que se asignó al factor A del diseño cualitativo y “clase Ad2” que se asignó al factor B. Se utilizan 10 tipos de aditivo Ad1 y 6 tipos de aditivos Ad2;

Resultados y Discusión

por tanto tendremos 10 niveles del factor cualitativo “clase Ad1”, que se identifican como Ad1 seguido de las letras de la *a* a la *j* y 6 niveles para el factor cualitativo “clase Ad2”, que se identifican como Ad2 seguido de las letras de la *a* a la *f*. Para el árido y el cemento no se consideraron factores cualitativos ya que no existían diferencias significativas entre diferentes lotes, y se consideró una sola clase de árido y una de cemento.

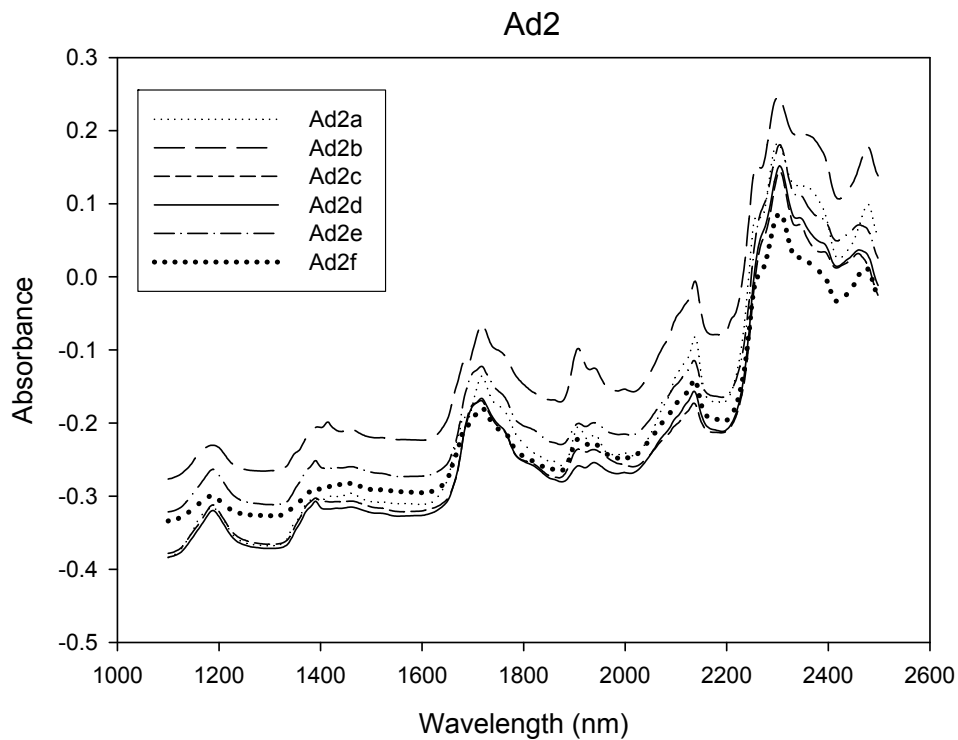


Figura 5.1. Espectros NIR de diferentes lotes de aditivo Ad2.

En la tabla 5.1, se muestran los parámetros que se utilizaron para la construcción del conjunto de muestras.

Tabla 5.1. Parámetros de interés para la construcción del diseño.

	Cemento	Árido	Ad1	Ad2
Intervalo de concentraciones	28-34%	66 - 72 %	0 - 0.6%	0 - 2%
Niveles (factor de concentración)	7	7	7	7
Niveles (factor cualitativo)	1	1	10	6

El diseño propuesto tiene por objeto minimizar la correlación entre todos los componentes de la muestra para obtener un conjunto de calibración que proporcione un modelo robusto. El diseño creado proporciona 52 mezclas que están recogidas en la tabla 4.1. Este diseño resulta ser prácticamente ortogonal, ya que los coeficientes de correlación entre los vectores de concentración de cada factor (tabla 5.2) son próximos a cero.

Tabla 5.2. Coeficientes de correlación entre analitos.

	ρ
Ad2 / Ad1	0.000
Ad2 / árido	-0.003
Ad1 / árido	0.000

5.1.2 Cuantificación de aditivos mediante PLS.

Se han desarrollado 2 modelos PLS uno para Ad1 y otro para Ad2. Los datos espectrales NIR junto con los valores de referencia se modelaron usando el algoritmo PLS. Para construir cada uno de los modelos se dividió el total de muestras preparadas en dos conjuntos, uno para construir el modelo de calibración y un segundo para evaluar su capacidad predictiva. Las muestras constituyentes del conjunto de calibración para el modelo de Ad1 se han seleccionado mediante un gráfico de PCA, de forma que las muestras cubran la máxima variabilidad espectral y a la vez, el rango de concentración de cada uno de los componentes de la mezcla de una manera homogénea. En la figura 5.2, se muestra el gráfico de PCA para construir el modelo de calibración de Ad1. La selección para el modelo de Ad2 se realiza del mismo modo. Las muestras usadas en la construcción de cada uno de los modelos son distintas.

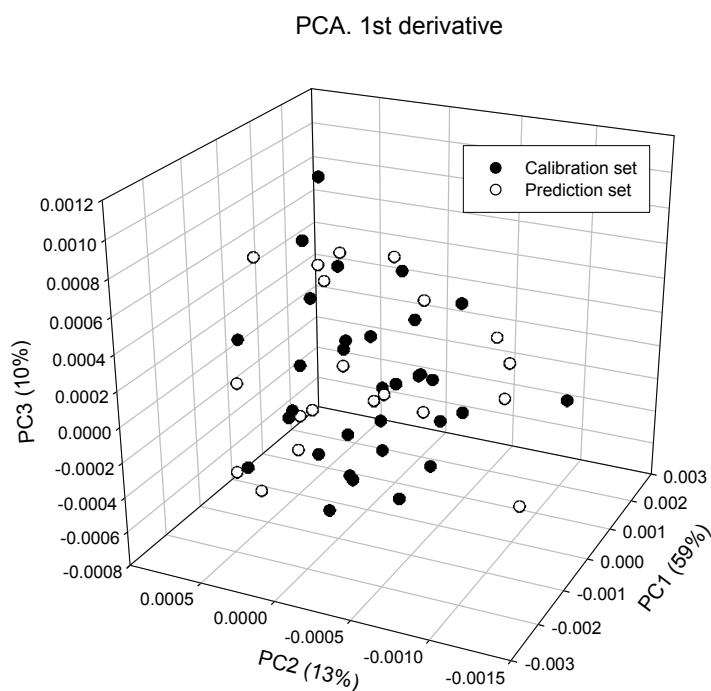


Figura 5.2 Gráfico de dispersión de los tres primeros componentes del PCA de los espectros de 1ª derivada. Selección de los conjuntos de calibración y predicción para el modelo de calibración de Ad1.

Se han ensayado modelos con los datos espectrales directos o después de realizar pre-tratamientos como Standard Normal Variate (SNV) o bien primera y segunda derivada. El pre-tratamiento que dio mejores resultados para Ad1 fue en primera derivada y para Ad2 fue en segunda derivada (tabla 5.3).

La elección de los intervalos de longitudes de onda se llevó a cabo teniendo en cuenta la influencia del agua en los espectros NIR, ya que las mezclas son ligeramente higroscópicas. El agua tiene dos bandas de absorción características, la banda correspondiente al primer sobretono del enlace O-H a 1450 nm y la banda de combinación a 1940 nm. Los intervalos correspondientes a las bandas de absorción del agua se eliminaron de ambos modelos; los modelos que incluían estas zonas resultaron peores en la predicción. Se seleccionaron aquellas zonas donde la absorción del analito fuera mayor a la de las otras especies presentes en la mezcla.

Tabla 5.3. Modelos de calibración y predicción de Ad1 y Ad2.

	Ad1		Ad2	
	Calibración	Predicción	Calibración	Predicción
Pre-tratamiento	1 ^a derivada		2 ^a derivada	
Rango (nm)	1500-1650	2000-2450	1650-1850	2000-2450
Factores	6		2	
Concentración	0 - 0.6%		0 - 2%	
Muestras*	32	17	28	20
Pendiente	0.99 ± 0.02	1.02 ± 0.04	0.98 ± 0.03	1.00 ± 0.05
Ordenada en origen	0.004±0.008	0.007±0.014	0.02 ± 0.03	0.06 ± 0.06
Correlación	0.993	0.987	0.991	0.980
RSEC/P (%)	6.2	10.6	7.4	10.7
RMSEC/P	0.023	0.043	0.087	0.153

*En la construcción del modelo para Ad1 y para Ad2 se hallaron 3 y 4 muestras anómalas, respectivamente. Por esta razón el número de muestras en cada modelo no suma las 52 mezclas que se realizaron.

En la tabla 5.3, se muestran las figuras de mérito de cada uno de los modelos construidos para cada uno de los aditivos. Las pendientes y ordenadas de origen de los gráficos de valores predichos frente a los de referencia para cada modelo, tanto en calibración como en predicción, son próximas a 1 y 0 respectivamente, lo que indica que los modelos están exentos de error sistemático.

Las muestras de validación preparadas en el laboratorio se analizaron (tabla 5.4) con los modelos creados dando un valor de RMSEP de 0.032 para Ad1 y de 0.111 para Ad2, estos valores no difieren significativamente de los valores de RMSEP obtenidos para las muestras de validación de los respectivos modelos (tabla 5.3). Esto nos demuestra la solidez de los modelos obtenidos, dando resultados aceptables cuando se usan para predecir muestras externas y, por lo tanto, los modelos constituyen una correcta descripción del conjunto de muestras experimentales.

Resultados y Discusión

Table 5.4. Valores de predicción de las muestras de validación externa.

	Ad1			Ad2		
	Valor referencia (%)	Valor NIR (%)	Residual	Valor referencia (%)	Valor NIR (%)	Residual
M. Val 1	0.603	0.650	0.047	1.069	1.045	-0.024
M. Val 2	0.206	0.188	-0.018	0.314	0.291	-0.023
M. Val 3	0.109	0.146	0.037	1.300	1.540	0.240
M. Val 4	0.324	0.309	-0.015	0.000	-0.087	-0.087
M. Val 5	0.117	0.133	0.016	2.006	1.945	-0.061
M. Val 6	0.494	0.536	0.042	1.718	1.534	-0.184
M. Val 7	0.399	0.382	-0.017	0.610	0.687	0.077
M. Val 8	0.228	0.188	-0.040	0.608	0.611	0.003
RSEP (%)		9.0			10.2	
RMSEP		0.032			0.111	

Finalmente, con objeto de comprobar la aplicabilidad de los modelos de calibración en la industria se analizaron muestras de producción. Existen dos tipos de muestras de producción, PA y PB, que tienen aplicaciones distintas y se diferencian en el porcentaje de aditivos. En la tabla 5.5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en la predicción de las muestras de producción. Los valores medios obtenidos por NIR de las muestras de producción no difieren significativamente de los valores teóricos de la dosificación, aunque el rango de concentración que cubren es indicativo de una incorrecta dosificación de los aditivos o bien a la falta de homogeneidad de la mezcla. Estos resultados demuestran que puede mejorarse la calidad mediante un control del proceso productivo.

Tabla 5.5. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de producción.

	PA		PB	
	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2
Muestras	26		27	
Valor teórico (%)	0.32	1.54	0.35	0.4
Valor NIR medio (%)	0.31 ± 0.02	1.49 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.04
Rango de concentraciones (%)	0.18 - 0.51	1.12 - 1.86	0.20 - 0.46	0.10 - 0.60

5.2 Determinación de curvas de distribución de tamaño de partícula en áridos de uso industrial.

Uno de los objetivos esenciales de este estudio es definir una metodología de trabajo apropiada para la determinación de la distribución de los diferentes tamaños de partícula de una muestra pulverulenta y que ésta sea apropiada a cualquier tipo de muestra, independientemente de su naturaleza. La muestra es un árido constituido principalmente por sílice, que es un material que presenta una baja absorción en la región NIR con un tamaño de partícula medio semejante al de granulados intermedios del proceso de producción farmacéutico.

Se ensayaron los algoritmos PLS2 y ANN ya que ambos permiten la cuantificación simultánea de n variables; se descartó utilizar un modelo PLS1 para cada tamaño de partícula, aunque con toda probabilidad estos modelos tendrán una mejor capacidad predictiva que un único modelo PLS2 ya que se están modelando las variables una a una y no en su conjunto como hace PLS2. En este estudio, se decidió sacrificar la posible mejor capacidad predictiva de los modelos PLS1 por la obtención de un único modelo PLS2 que predijera la curva de distribución de partícula de forma expeditiva. La innegable correlación existente entre las variables predictoras justifica también la construcción de modelos PLS2.

Resultados y Discusión

5.2.1 Evaluación cualitativa de las muestras de áridos.

La primera cuestión que debemos abordar es como se ve afectado el espectro NIR por la variación del tamaño de partícula de la muestra. En la figura 5.3 se muestra los espectros NIR de varias muestras utilizadas en este estudio. Se puede observar que el perfil espectral de las 5 muestras es el mismo, pero sin embargo, existe un desplazamiento significativo entre dos grupos de muestras, este desplazamiento de la línea base es debido a las diferencias en el tamaño de partícula, a mayor tamaño de partícula mayor absorción en la región NIR.

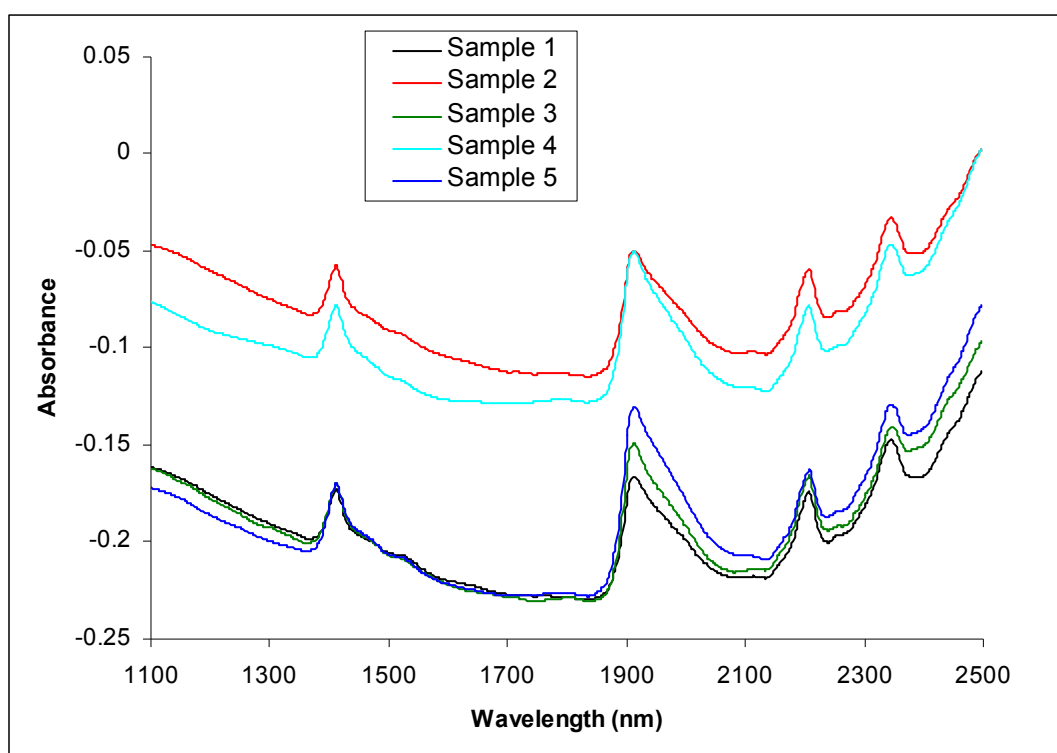


Figura 5.3. Espectros NIR de varias muestras de árido.

Para obtener un modelo multivariable con buena capacidad predictiva es necesario que el conjunto de calibración incorpore todas las fuentes de variabilidad de las muestras que han de predecirse y por ello, es conveniente realizar una adecuada selección de estas muestras. La variabilidad espectral puede mostrarse a través de un PCA, en la figura 5.4 se encuentra recogido el gráfico de dispersión que nos muestra la distribución de las muestras en este nuevo espacio. En el gráfico, se observa claramente la

formación de 2 conjuntos los cuales reflejan las mismas diferencias que se habían observado en los espectros de absorbancia (figura 5.3) y que corresponden a las diferencias del tamaño de partícula entre las muestras, siendo el conjunto de la derecha el que corresponde al grupo de muestras que presentan un mayor tamaño de partícula. Las muestras seleccionadas para formar parte de cada conjunto, calibración y predicción, se muestran en la figura 5.4 y se realizó mediante la inspección visual del gráfico de dispersión de manera que ambos conjuntos seleccionados incluyeran la variabilidad espectral típica.

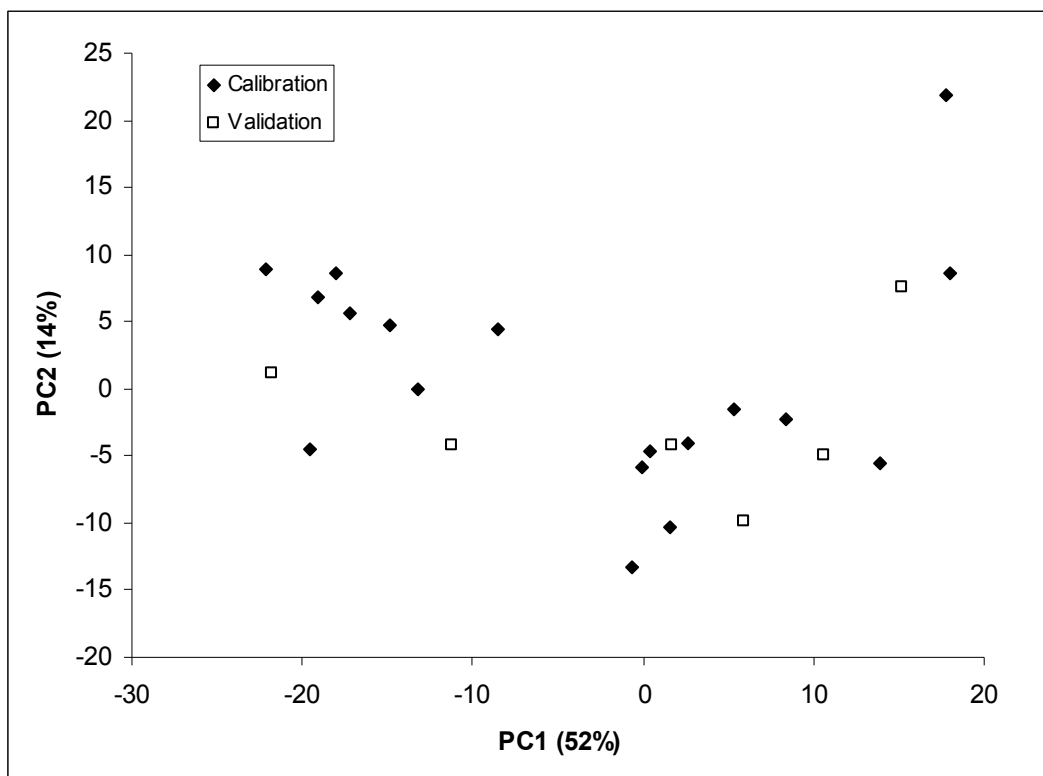


Figura 5.4. Gráfico de dispersión del PCA realizado con las muestras de árido (2ª derivada).

Los pretratamientos espectrales usuales no eliminan completamente desplazamiento de los espectros debidos a las diferencias en el tamaño de partícula. La aplicación de SNV sobre los datos no conduce a una ordenación correcta de los espectros por tamaño de partícula, mientras que, tras aplicar la segunda derivada en los espectros de las

Resultados y Discusión

fracciones recogidas en el tamizado, éstas se ordenan perfectamente según el tamaño de partícula (Figura 5.5). Esta ordenación se repite en cada una de las bandas que presenta el espectro. No se pudo registrar el espectro de las fracciones inferiores a 0.050 mm y la superior 1 mm, debido a que la cantidad de muestra recogida fue muy pequeña e insuficiente para el registro del espectro NIR.

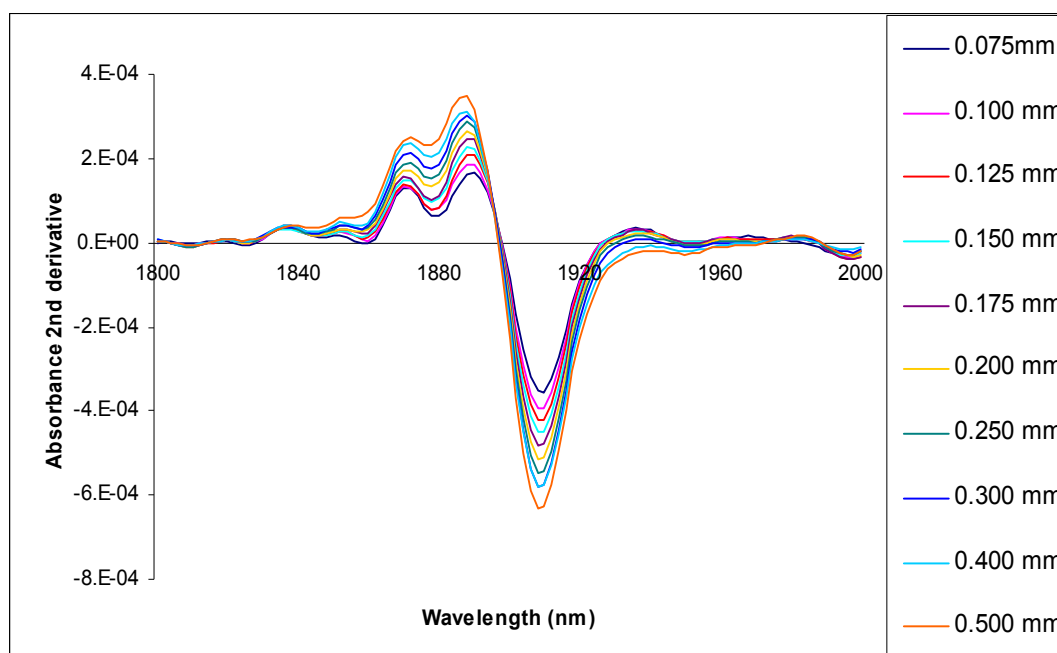


Figura 5.5. Comparación de los espectros (2ª derivada) de diferentes tamaños de partícula de una misma muestra, en la región de 1800-2000 nm.

La clara ordenación de los espectros que proporcionan las derivadas nos hicieron elegirlos como pretratamiento adecuado para la construcción de los modelos de calibración, obteniendo una mejor capacidad predictiva en 2ª derivada para todos los casos.

5.2.2 Modelos de calibración PLS2.

Los rangos de longitudes de onda para el desarrollo de los modelos de calibración PLS2 fueron seleccionadas basándose en las posiciones de las bandas del espectro de árido (1350-1460 nm y 1850-2450 nm) (ver figura 5.3), de esta manera se pueden excluir

aquellas zonas del espectro NIR donde la absorción es débil o que únicamente proporcionan ruido espectral y construir el modelo de regresión con aquellas que proporcionan información sobre el analito a cuantificar.

Se han construido 2 modelos PLS2 en 2ª derivada para la obtención de curvas granulométricas de 7 y 12 variables, los resultados de ambos modelos se recogen en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Parámetros de los mejores modelos de PLS2.

	Calibración	Predicción	Calibración	Predicción
Nº tamices	7		12	
Pre-tratamiento	2ª derivada		2ª derivada	
Rango (nm)	1350-1460	1850-2450	1350-1460	1850-2450
Factores PLS	3		8	
Muestras	19	6	19	6
RSEC/P %	8.7	8.6	2.6	7.6

Las tablas 5.7 y 5.8 recogen la evolución de los valores de RSEC y RSEP de los modelos construidos, para el modelo de 7 variables el número de factores que da un valor mínimo de RSEP es de 3, mientras que para el modelo de 12 variables es de 8 factores. Un mayor número de factores no mejora la capacidad predictiva de ninguno de los modelos.

Tabla 5.7. RSEC y RSEP de los modelos PLS2 con 7 tamices.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
RSEC	11.0	10.0	8.7	11.3	13.0
RSEP	8.9	8.8	8.6	10.7	11.2

Tabla 5.8. RSEC y RSEP de los modelos PLS2 con 12 tamices.

	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
RSEC	3.7	3.2	2.6	2.2	2.1
RSEP	8.3	8.1	7.6	7.6	7.6

Comparando los dos modelos PLS2 obtenidos observamos que con un mayor número de variables a predecir se obtiene un sistema más complejo y por lo tanto es necesario un mayor número de factores PLS para explicarlo; otro posible efecto es la corrección de la no linealidad del sistema (es conocida la capacidad del PLS para corregir pequeñas desviaciones de la linealidad añadiendo más factores al modelo). En cambio, si

Resultados y Discusión

comparamos los valores de RSEP de ambos modelos (tabla 5.6) podemos observar que los dos tienen capacidades predictivas similares.

5.2.3 Modelos de calibración ANN.

Se construyeron 2 modelos de calibración con redes neuronales para 7 y 12 variables Y. Se ha aplicado una reducción de variables, utilizando los *scores* de un PCA como *inputs* de la red neuronal con el objeto de simplificar la arquitectura de la red. Sin embargo, la reducción de variables puede conllevar una pérdida de la información espectral, con el objetivo de evitarlo se ensayaron redes neuronales utilizando como *inputs* desde 1 componente principal hasta 5 en el caso de la red de 7 variables y hasta 12 componentes principales para la red de 12 variables. Obteniéndose los mejores resultados para las redes que se presentan en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Figuras de mérito para los modelos de ANN.

	Calibración	Predicción	Calibración	Predicción
Nº tamices	7		12	
Pre-tratamiento	2ª derivada		2ª derivada	
Rango (nm)	1100-2450		1100-2450	
Reducción de datos	PCA (3PC)		PCA (9PC)	
Neuronas en la capa de entrada	3		9	
Función de transferencia para la capa de entrada	Tansig		Tansig	
Neuronas en la capa oculta	2		1	
Función de transferencia para la capa oculta	Puerlin		Puerlin	
Neuronas en la capa de salida	7		12	
Muestras	18	6	21	6
RSEC/P %	11.2	5.6	7.2	7.9

Para el modelo con 7 variables Y se utilizaron 3 PC (96.3% de la varianza explicada). Para las curvas granulométricas de 12 variables fueron necesarios 9 PC (98.9% de la varianza explicada), la mayor complejidad de estas curvas explica la necesidad de

aumentar el número de *inputs*. El número de neuronas en la capa de entrada, el número de capas ocultas y de neuronas en las capas ocultas fue optimizado en función de los valores de RSEP de los *outputs* obtenidos. Para ambos modelos, se utilizó una única capa oculta. El número de neuronas en la capa oculta optimizado fue de 2 para el modelo con 7 variables Y y de 1 para el modelo con 12 variables Y, ambas redes presentan los valores mínimos de RSEP para las arquitecturas estudiadas.

Del mismo modo que con los modelos PLS2, la arquitectura de la red para el modelo de 7 variables es más sencillo que el de 12 variables (ver tabla 5.9). La mayor complejidad del perfil granulométrico de 12 variables hace necesaria una red más compleja, aun así, los valores de RSEP de ambos modelos no difieren significativamente.

5.2.4 Comparación de los resultados de PLS2 y ANN.

En las figuras 5.6 y 5.7 se recoge un ejemplo de las curvas granulométricas de referencia y las predichas para cada uno de los modelos PLS2 (figura 5.6) y ANN (figura 5.7). Puede observarse que las curvas de predicción se ajustan correctamente a las curvas de obtenidas por el método de referencia.

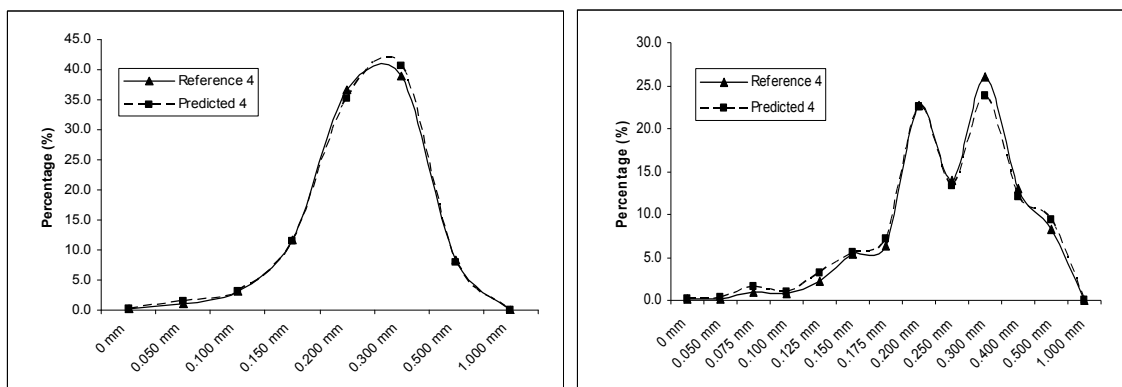


Figura 5.6. Ejemplo de la predicción de las curvas de distribución de partícula para la muestra 4. Usando los modelos de calibración PLS2, izquierda modelo de 7 variables y derecha modelo 12 variables.

Resultados y Discusión

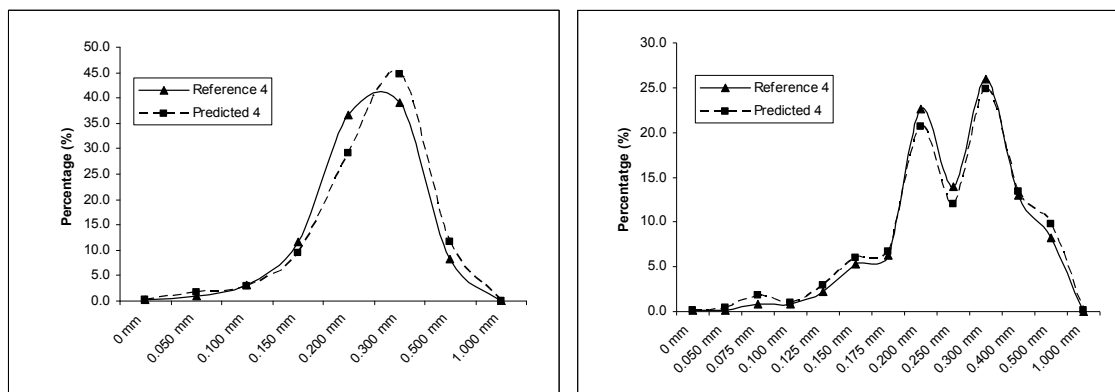


Figura 5.7. Ejemplo de la predicción de las curvas de distribución de partícula para la muestra 4. Usando los modelos de calibración ANN, izquierda modelo de 7 variables y derecha modelo 12 variables.

El parámetro estadístico del coeficiente de correlación es útil para comparar la similitud entre los perfiles de las curvas de distribución obtenidas por el método de referencia y las obtenidas por el método NIR (ver tabla 5.10) para cada uno de los modelos creados. Como podemos observar la media de los coeficientes de correlación obtenidos para cada modelo es igual o superior a 0.97 lo que demuestra la gran similitud que presentan los perfiles de ambas curvas (referencia y predicha).

Tabla 5.10. Coeficientes de correlación entre las curvas de distribución de tamaño de partícula de referencia y la predicha por los modelos NIR.

Muestra	PLS2		ANN	
	7 variables	12 variables	7 variables	12 variables
1	0.98	0.97	0.98	0.97
2	0.95	0.93	0.99	0.95
3	0.92	0.96	0.99	0.94
4	1.00	1.00	0.97	1.00
5	0.97	0.98	0.98	0.99
6	0.99	0.99	0.99	0.99
Media	0.97	0.97	0.98	0.97

Los modelos construidos, tanto para 7 como para 12 variables Y, demuestran tener una correcta predicción de la curva granulométrica independientemente del perfil que ésta

tenga, ya que como puede observarse en las tablas 5.6 y 5.9 los RSEP no difieren estadísticamente, todos ellos se sitúan entre el 5.6 y 8.6 % de error, un porcentaje de error aceptable para el tipo de determinación realizada, pero si es cierto que perfiles granulométricos más complejos requieren de modelos con mayor número de factores en PLS2 y mayor número de neuronas en ANN.

6

Aplicaciones en la industria farmacéutica

- 6.1 Influencia de parámetros físicos en el desarrollo de modelos de calibración
- 6.2 Determinación de API y excipientes sin método de referencia

6. Aplicaciones en la industria farmacéutica.

La espectroscopía NIR se ha convertido en los últimos años en una de las técnicas espectroscópicas de mayor interés en la industria farmacéutica en virtud de sus características de rapidez, simplicidad y calidad de los resultados. La determinación de principios activos en las diferentes etapas del proceso de producción, pero sobretodo en el producto acabado, es quizás el análisis más practicado ya que éste es quizás el parámetro más importante de los que depende la liberación de un lote. Podemos encontrar en la bibliografía multitud de estudios NIR donde se determinan principios activos como lidocaína [1], ketoprofeno [2,3], ácido ascórbico [4], acyclovir [5], paracetamol[6,7], ibuprofeno[8]...

Uno de los principales problemas que plantea la utilización de la espectroscopía NIR reside en la necesidad de disponer de un conjunto de calibración adecuado para cada especialidad y para cada etapa del proceso productivo y además que contenga todas las fuentes de variabilidad de las muestras de producción.

Un buen conjunto de calibración debe incluir la variabilidad tanto química como física de las muestras que se deben analizar posteriormente; el contenido en API de las diferentes muestras (granulados, comprimidos, etc.) es casi constante ($\pm 5\%$ del valor nominal [9]) y por lo tanto, su contribución a la variabilidad química de los espectros es muy reducida. La variabilidad física de los comprimidos esta constituida por los efectos que cada una de las etapas del proceso de fabricación introducen en los espectros de las muestras. Las fuentes de variabilidad física son diversas: granulación (seca o húmeda, diferencias en el tamaño de partícula), compresión (variación en las presiones aplicadas a los diferentes núcleos), lacado (diferencias en el grosor del recubrimiento), forma del comprimido, etc. y los efectos sobre los espectros pueden ser importantes y variables (causados por la variabilidad interna en cada lote y entre lotes).

Un modelo de calibración PLS tendrá mayor capacidad predictiva cuanto más parecidas sean las muestras de calibración a las muestras de producción. Idealmente, un buen

Resultados y Discusión

conjunto de calibración se obtendría de muestras del propio proceso de producción pero que cubrieran el rango de concentraciones deseado. Como esto no es posible, se debe ampliar la variabilidad química hasta obtener el rango de concentraciones deseado ($\pm 20\%$ respecto al valor nominal según las guías ICH [10]). Incorporar la variabilidad química al conjunto de calibración es una tarea simple que se reduce a preparar muestras en el laboratorio con el intervalo de concentraciones deseado. El problema reside en cómo incorporar la variabilidad física del proceso al conjunto de calibración.

Otra importante cuestión que se debe considerar en la construcción de un buen conjunto de calibración es el método de referencia que se utilizará para determinar la propiedad a predecir. La elección de un método u otro determinará la bondad de los resultados del modelo de calibración, ya que la determinación por NIR mediante el modelo quimiométrico nunca será más exacta que el método de referencia. En el trabajo de Blanco et al [11] se propone el NIR como método absoluto, ya que no se utiliza ningún método de referencia para la determinación del API en comprimidos, dado que el valor de referencia se obtiene de la pesada en balanza analítica. Este modo de proceder evita incorporar el error del método de referencia al método NIR y por tanto mejora la exactitud de la determinación final. La precisión es otro de los parámetros a considerar en un nuevo método de análisis, este parámetro no depende del método de referencia con lo que a menudo la repetibilidad del método NIR puede ser mejor que la del de referencia [12].

En las siguientes líneas se discuten los resultados obtenidos en los diferentes trabajos desarrollados en el campo farmacéutico con el objetivo común de profundizar en el conocimiento de los procesos farmacéuticos estudiados y proporcionar nuevas metodologías de análisis que permitan independizar al NIR de los métodos de referencia.

6.1. Influencia de parámetros físicos en el desarrollo de modelos de calibración.

El objetivo último del trabajo es la obtención de modelos de calibración apropiados para realizar el control del API durante diferentes etapas del proceso de fabricación de un preparado. Se estudiarán diferentes estrategias para obtener modelos fáciles de construir y que a la vez sean simples y robustos. Otro importante objetivo es la construcción de los diferentes modelos usando únicamente muestras de laboratorio y usar las muestras de producción como muestras de validación de los modelos. De este modo, pretendemos demostrar la posibilidad de desvincular el NIR del uso de métodos de referencia para la construcción de modelos cuantitativos fiables.

6.1.1. Influencia del tamaño de partícula en el espectro NIR. Determinación de API en granulados.

La diferencia más relevante entre las muestras preparadas en el laboratorio (mezclando cantidades conocidas de los compuestos puros en polvo) y las de producción es el tamaño de partícula, ya que las de laboratorio son mezclas pulverulentas y las de producción frecuentemente han sido sometidas a un proceso de granulación. El pretratamiento de los datos juega un papel clave para reducir estas diferencias. Es bien conocida la capacidad del pretratamiento de SNV para reducir diferencias entre los espectros debidas al tamaño de partícula [13] y por ello se optó por aplicar este tratamiento a los datos espectrales.

Con el objeto de establecer las posibles diferencias entre los espectros, se ha realizado un análisis por clusters (dendograma) de las mezclas en polvo preparadas en el laboratorio y de las muestras granuladas de producción después de un pretratamiento de SNV. En el dendograma se usó *average linkage* y el cuadrado de la distancia euclídea en el espacio de los componentes principales. El dendograma se construyó con los dos primeros PC's (contienen el 97,4 % de la varianza total) de los espectros en el intervalo de 1100-2500 nm después de un pretratamiento espectral de SNV (figura 6.1). El

Resultados y Discusión

el dendograma muestra la gran similitud espectral entre las muestras de producción y las muestras de laboratorio cercanas al valor nominal de API y en consecuencia podrán predecirse correctamente en un modelo construido únicamente con muestras de laboratorio en polvo.

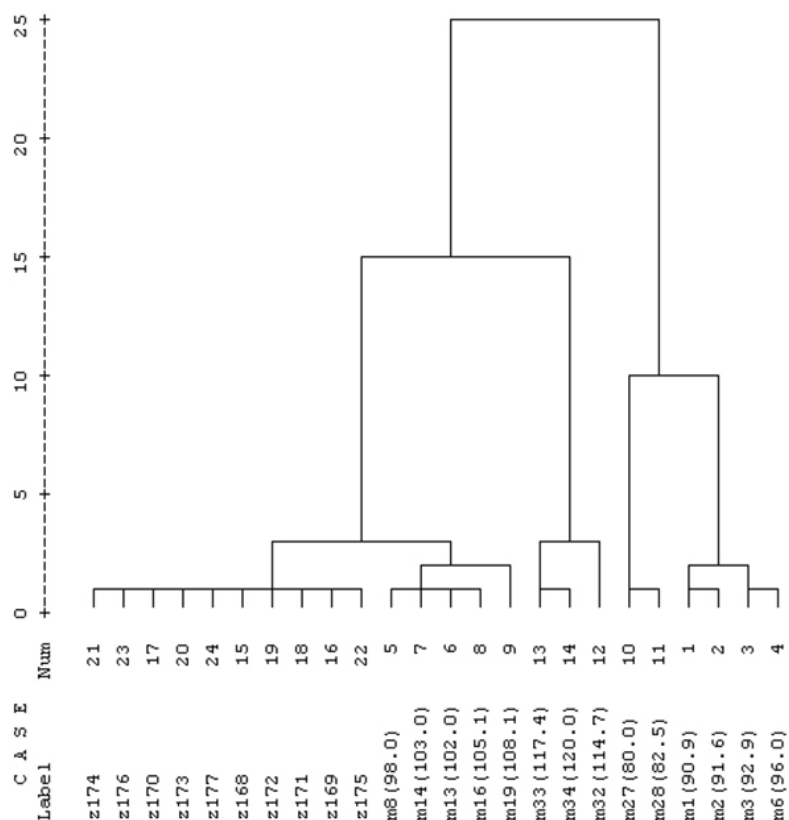


Figura 6.1. Dendograma de las mezclas de laboratorio (m1-m34) y los granulados de producción (z169-z177).

Las mezclas en polvo de laboratorio se han dividido en 2 grupos: el primero se utiliza para construir el modelo de calibración PLS y el 2º para evaluar la capacidad predictiva del modelo; ambos conjuntos cubren el rango de $\pm 20\%$ respecto al valor nominal.

La tabla 6.1 muestra los parámetros más significativos del modelo, éste puede utilizarse tanto para muestras en polvo como para granulados. Se puede observar como los resultados de predicción (RSEP) de muestras granuladas de producción no difieren significativamente de los de muestras en polvo de laboratorio. Estos resultados

demuestran que el pretratamiento SNV es suficiente para corregir las diferencias entre los espectros de muestras en polvo (preparadas en el laboratorio) y muestras granuladas de producción y por lo tanto, la utilidad del modelo para ambos tipos de muestras.

Tabla 6.1. Parámetros del modelo de calibración polvo/granulado.

	Modelo polvo/granulado		
	Cal lab	Pred lab	Pred prod
Pre-tratamiento	SNV		
Rango (nm)	1100-2500		
Nº de PC	2		
Varianza Y (%)	99.2		
Nº de muestras	21	7	12
RSEC/P	0.88	0.69	1.75

6.1.2. Influencia de la forma galénica y la presión de compactación en el espectro NIR.

Determinación de API en núcleos.

Una de las etapas del proceso de fabricación de comprimidos farmacéuticos es la compactación del granulado. En el caso del fármaco en estudio, el producto granulado se compacta para obtener 2 tipos de núcleos con geometría y peso diferente (ver figura 4.3 y tabla 4.3) pero con la misma composición. Estos núcleos difieren de las muestras que se utilizaron en el modelo para granulados en la geometría y en la presión de compactación. La predicción del valor de API de estos núcleos con el modelo para granulados provoca errores sistemáticos en la determinación. Tanto en la determinación de núcleos de 400 como de 600 mg el error en la predicción es por exceso, con residuales de 1,1% y 5.0% respectivamente.

La superficie de ambos núcleos presenta una pequeña curvatura que podría afectar a las medidas por reflectancia difusa mientras que, los núcleos de laboratorio tienen ambas caras planas y puesto que van a ser los que se utilicen en el modelo de calibración es

Resultados y Discusión

necesario comprobar que estas diferencias en la superficie de los tres tipos de núcleos no afectan al modelo. 10 núcleos de 400 mg y 10 de 600 mg se liman hasta dejar la superficie de contacto con la ventana de cuarzo totalmente plana con el objetivo de hacerlos similares a los comprimidos de laboratorio. Se tomó el espectro NIR de los comprimidos antes y después de limarlo. La figura 6.2 muestra el espectro en absorbancia y en SNV de un núcleo registrado antes de limarlo (400NF) y después (400F). Se observa como en modo absorbancia existe un desplazamiento del espectro que se corrige perfectamente cuando se aplica el tratamiento SNV en los espectros.

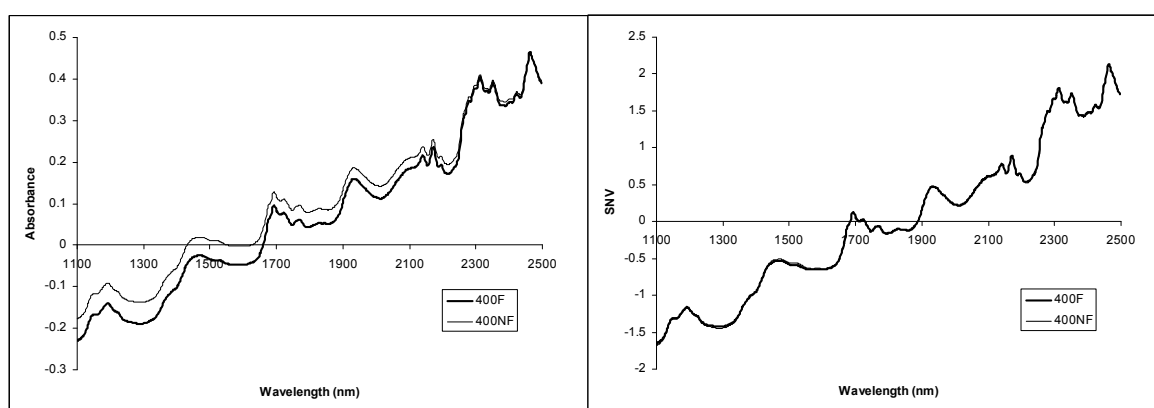


Figura 6.2 Comparación de espectros en modo absorbancia y SNV de un núcleo limado (400F) y sin limar (400NF).

Se realiza un dendograma con los núcleos de laboratorio y los núcleos de producción limados y sin limar mediante *average linkage* y el cuadrado de la distancia euclídea. Los datos para el dendograma se obtienen de los dos primeros factores de un PCA (96,0 % de la varianza) con los datos en SNV y en todo el rango de longitudes de onda (1100-2500 nm). El dendograma construido con espectros de núcleos de 400 mg limados (400F), sin limar (400NF) y de los núcleos de 600 mg limados (600F) y sin limar (600NF) se muestra en la figura 6.3 donde se puede observar que los núcleos de producción se agrupan con los de laboratorio que tienen una concentración próxima al 100% respecto al valor nominal. Tanto los núcleos limados como sin limar presentan distancias pequeñas a los

núcleos de laboratorio de concentración próxima al 100%, lo que indica que la variabilidad causada por la curvatura del núcleo no es significativa.

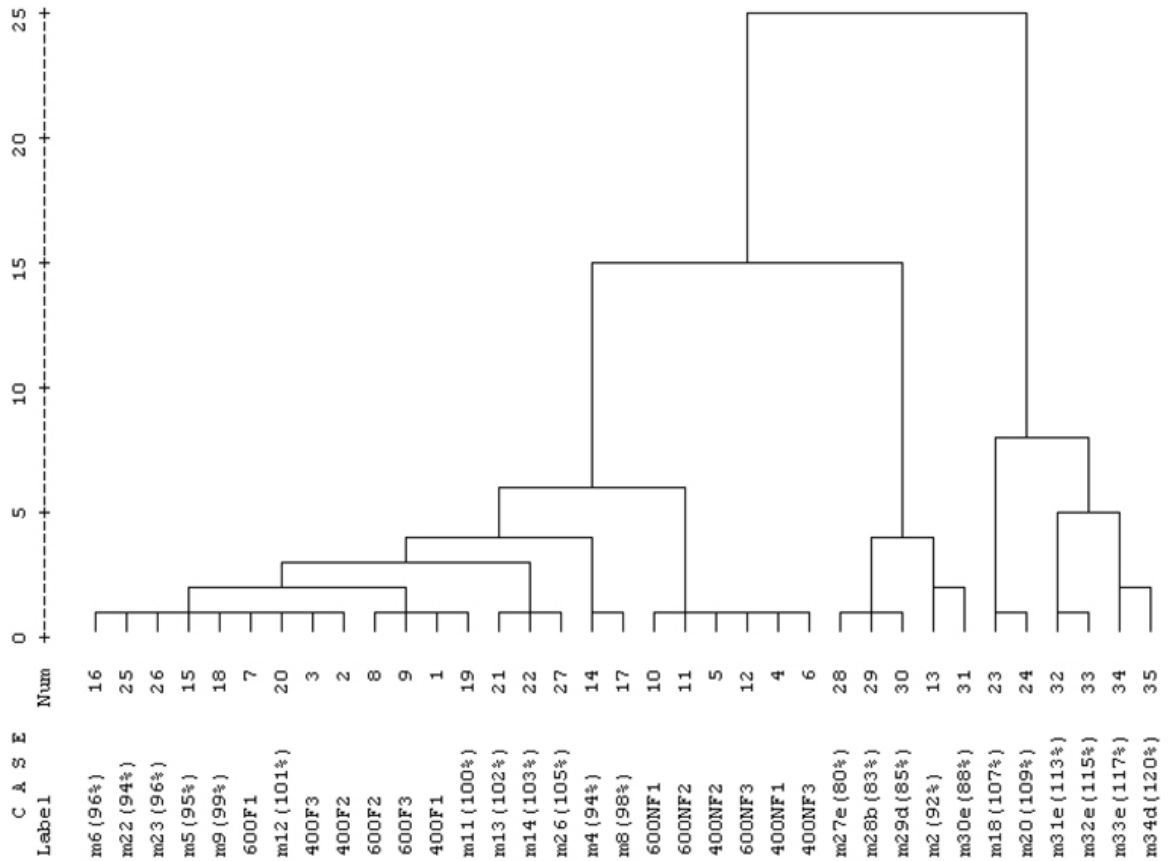


Figura 6.3 Dendrograma de los núcleos de laboratorio (m1-m34) y los de producción limados (400F y 600F) y los no limados (400NF y 600NF). Entre paréntesis se recoge la concentración de API para las muestras de laboratorio.

La presión de compactación es otro factor que influye sobre el espectro NIR, como mayor es la presión de compactación aplicada, mayor es la absorbancia del espectro NIR. La incorporación de núcleos de producción a un modelo de calibración con muestras en polvo, incorpora al modelo la variable de la presión, proporcionando una mejora de los resultados de predicción pero a costa de obtener un modelo con mayor número de componentes PLS y por lo tanto un modelo más complejo [14]. La construcción de un modelo de calibración utilizando únicamente núcleos de laboratorio que incorporen el rango de presiones adecuado puede proporcionar modelos más simples. Para ello, es

Resultados y Discusión

necesario determinar la presión de compactación de las muestras de producción y preparar núcleos de laboratorio en el rango de presiones adecuado. Se han preparado una serie de núcleos, a partir de granulado de producción, que se han compactado en un rango de presiones de 35 a 220 MPa. Un PCA de los espectros (en SNV y en el rango de 1100-2500 nm) de las muestras de laboratorio compactadas a diferentes presiones y los espectros medios de varios lotes de núcleos de 400 y de 600 mg se muestran en la figura 6.4. El PC1 recoge la variación espectral debida a la presión de compactación, y se puede deducir que los núcleos de 400 mg han sido obtenidos aplicando una presión de compactación inferior a la de los de 600 mg. Todos los núcleos de producción se hallan en el rango de 80 a 190 MPa de presión, y por lo tanto, éste será el rango de presiones a aplicar en las muestras de laboratorio que se utilizarán para construir el modelo de cuantificación del API.

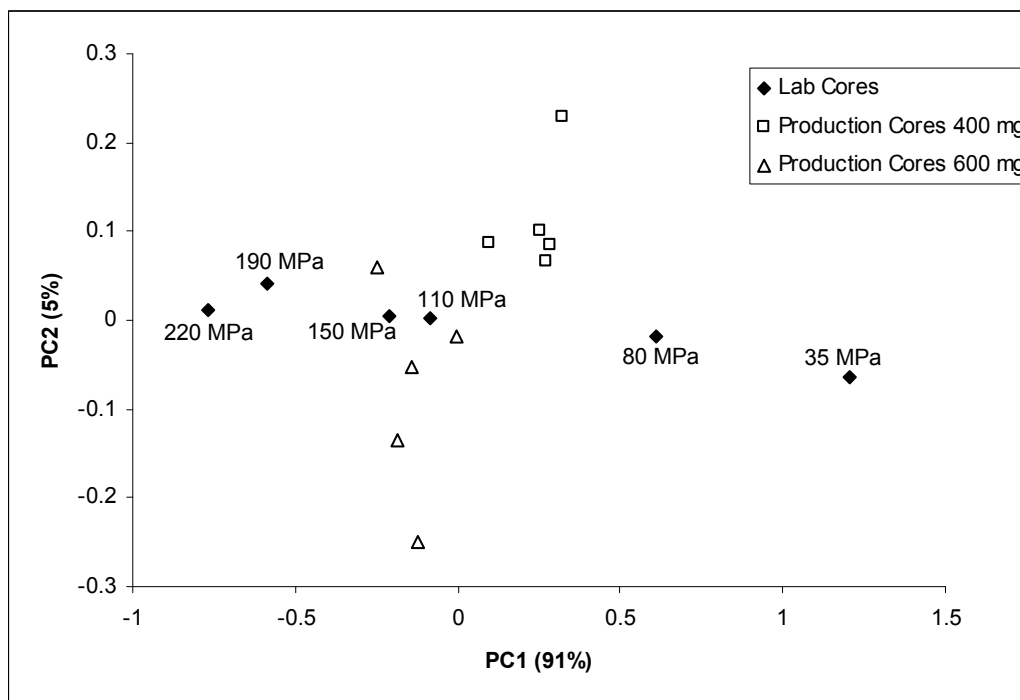


Figura 6.4 Gráfico de dispersión de un PCA en SNV y en el rango 1100-2500 nm de núcleos compactados a diferentes presiones (35-220 MPa) y núcleos de producción.

La construcción del modelo de calibración para núcleos de producción se realiza usando únicamente espectros de núcleos de laboratorio, ya que la curvatura de los núcleos no ha demostrado tener una influencia significativa en el espectro. El modelo se construye en el rango de concentraciones de API de 80-120% respecto al valor nominal y en el rango de presiones de 80-190 MPa escogido en función de los resultados presentados en la figura 6.4.

En la tabla 6.2, se recogen los principales parámetros del modelo construido para núcleos. Los valores de RSEP de las muestras de producción corresponden a 5 lotes de 400 mg y 5 de 600 mg, como se puede observar el valor de RSEP de dichos lotes no son significativamente diferentes al del valor de laboratorio, esto nos confirma que la influencia de la curvatura de los núcleos de producción en el espectro NIR se corrige con el pretratamiento de SNV y además que el modelo es adecuado para predecir muestras de producción.

Tabla 6.2. Parámetros de mérito del modelo de calibración para núcleos.

	Modelo núcleos			
	Cal lab	Pred lab	Pred 400	Pred 600
Pre-tratamiento	SNV			
Rango (nm)	1100-2500			
Nº de PC	4			
Varianza Y (%)	99.7			
Nº de muestras	26	10	5*	5*
RSEC/P	0.69	1.23	1.47	1.12

* Número de lotes analizados. Cada lote es media de 10 comprimidos.

Resultados y Discusión

6.1.3. Influencia de la capa de lacado en el espectro NIR. Determinación de API en comprimidos recubiertos.

La etapa final del proceso de producción de un fármaco, a menudo supone el recubrimiento de los núcleos con una fina película de laca. El recubrimiento implica la adición de 3 nuevos compuestos químicos a la formulación. La suma de estos 3 compuestos representa aproximadamente un 2% en peso para los comprimidos de 600 mg y un 5% para los de 400 mg, según la guía de fabricación del fármaco. La predicción de comprimidos recubiertos con el modelo creado para núcleos proporciona errores sistemáticos por defecto con valores de residuales del 19.3% para comprimidos de 400 mg y del 7.6% para los de 600 mg. Obsérvese que los mayores errores en predicción se obtienen para los comprimidos de 400 mg, los cuales tienen una capa de lacado más gruesa. Como más grueso es éste recubrimiento menor es la radiación NIR que consigue interaccionar con el núcleo y por lo tanto con el principio activo. La significativa influencia que tiene el recubrimiento sobre el espectro NIR nos lleva a incorporar esta variable en el modelo de calibración para API.

Las diferencias en el grosor de la capa de lacado se pueden confirmar cualitativamente mediante la inspección visual del gráfico de dispersión de un PCA de los núcleos y los comprimidos recubiertos (figura 6.5), se puede observar que los comprimidos de 600 mg, con menor grosor en la capa de recubrimiento, se hallan más próximos a los núcleos que el conjunto de comprimidos de 400 mg con una capa de lacado más gruesa. Los núcleos se encuentran agrupados a la izquierda del gráfico y con una baja dispersión, en cambio los comprimidos recubiertos se distribuyen de forma mucho más dispersa por el centro y derecha del gráfico; de esta distribución se deduce que el proceso de recubrimiento produce comprimidos con grosores variables del film de laca.

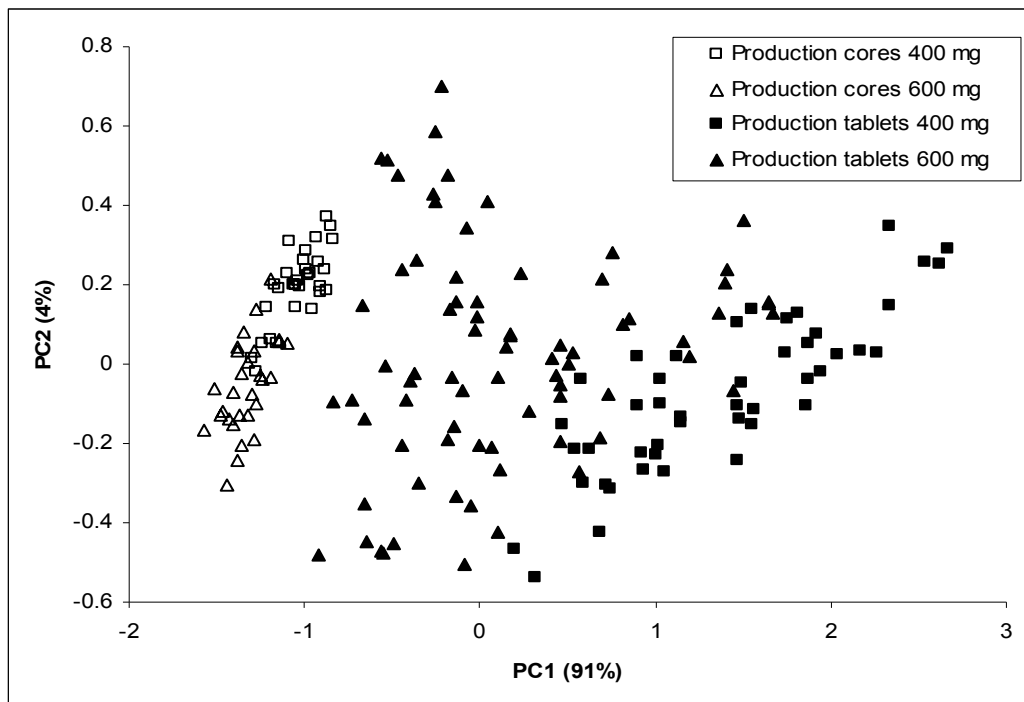


Figura 6.5 Gráfico de dispersión de un PCA en modo SNV y en el rango 1100-2500 nm de espectros de núcleos y comprimidos recubiertos de producción.

Debido a la gran variabilidad en el grosor de la capa de recubrimiento y a la dificultad de reproducir esta variabilidad en el laboratorio se optó por obtener 5 espectros promedio de la capa de recubrimiento de los comprimidos de 400 mg (la más gruesa) y otros 5 espectros del recubrimiento de los comprimidos de 600 mg (la más fina). Estos espectros promedio del recubrimiento se sumaron por separado y aleatoriamente a los espectros de los núcleos de laboratorio obteniendo una nueva matriz de datos espectrales que incluía la variabilidad del recubrimiento, además del rango de concentraciones (80-120% respecto al valor nominal) y el rango de presiones (80-190 MPa). En la figura 6.6 se recoge el gráfico de dispersión de un PCA en SNV y en el rango de 1100-2500 nm donde se muestran los núcleos de laboratorio corregidos por el espectro promedio de la laca y comprimidos recubiertos de producción. Se observa como los comprimidos recubiertos de producción se encuentran integrados en el cluster

Resultados y Discusión

constituido por los espectros de los núcleos de laboratorio corregidos con el espectro de la laca.

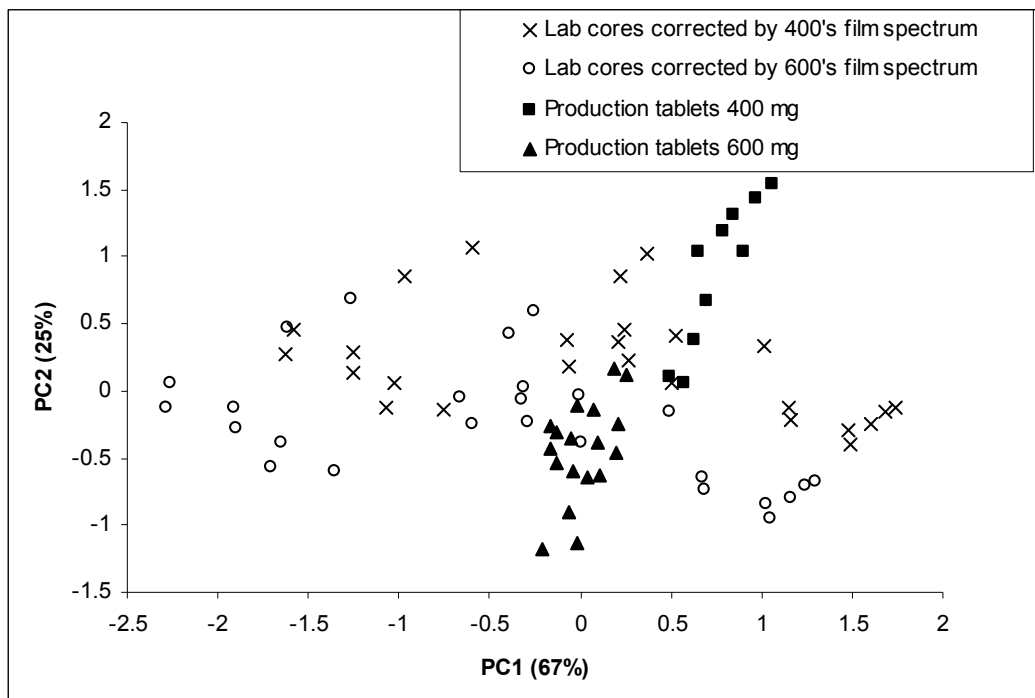


Figura 6.6 Gráfico de dispersión de un PCA de núcleos de laboratorio corregidos por el espectro del film de laca de 400 o 600 mg junto con comprimidos recubiertos de producción.

Del mismo modo que en modelos anteriores la matriz de datos se divide en 2 conjuntos, el primero de ellos para construir el modelo de calibración y el segundo para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Finalmente, se utiliza el modelo para predecir los comprimidos de producción y obtener así el valor medio de API del lote. En la tabla 6.3 se encuentran los parámetros más relevantes del modelo de calibración. Se puede observar que los valores de RSEP de los comprimidos de producción no difieren significativamente de los comprimidos de laboratorio. Podemos deducir que el modelo construido usando únicamente espectros de muestras preparadas en el laboratorio es capaz de predecir correctamente muestras de producción que presentan diferencias en la forma de los comprimidos, diferencias de presión de compactación y diferencias en el grosor del film de recubrimiento, sin necesidad de incluir en el conjunto de calibración

muestras de producción y por lo tanto, sin necesidad de realizar análisis para establecer los valores de referencia.

Tabla 6.3. Parámetros de mérito del modelo de calibración para comprimidos recubiertos.

	Modelo comprimidos recubiertos			
	Cal lab	Pred lab	Pred 400	Pred 600
Pre-tratamiento	SNV			
Rango (nm)	1100-2500			
Nº de PC	5			
Varianza Y (%)	99.7			
Nº de muestras	42	20	10*	18*
RSEC/P	0.68	1.18	1.34	1.23

* Número de lotes analizados. Cada lote es media de 10 comprimidos.

6.2. Determinación de principios activos y excipientes sin método de referencia.

En los estudios que se presentan a continuación se propone una nueva y sencilla estrategia para incorporar la variabilidad del proceso productivo a muestras preparadas en el laboratorio que comprenden el rango de concentraciones deseado.

6.2.1. Influencia de las diferentes etapas del proceso productivo sobre el espectro NIR.

Cada una de las etapas del proceso de producción farmacéutico aumenta la variabilidad de los espectros del producto final y puede considerarse que la variabilidad total es la suma de variabilidades de las diferentes etapas. Si bien estas diferencias son pequeñas, en muchos casos tiene una importancia esencial en el desarrollo de los modelos de calibración y en la predicción de muestras aplicando estos modelos [15-17]. En la figura 6.7 pueden observarse los espectros NIR desde una mezcla en polvo de laboratorio hasta el comprimido recubierto final de la formulación de Metformina 850mg, en todas las muestras de la figura el principio activo y los excipientes se encuentran a concentración nominal. Si comparamos la mezcla en polvo con la mezcla granulada se observa como ha

Resultados y Discusión

habido un cambio en la pendiente de la línea base, esto es debido al diferente tamaño de partícula de ambas mezclas. El efecto de la compresión sobre la muestra se ve reflejado en una disminución de la pendiente de la línea base y en la suavización de las bandas del espectro del núcleo en comparación con las del granulado; la banda alrededor de 2300 nm es un claro ejemplo. La línea base del espectro del comprimido recubierto también ha disminuido su pendiente respecto al espectro del núcleo además de sufrir una atenuación de todas las bandas debido a la capa de recubrimiento.

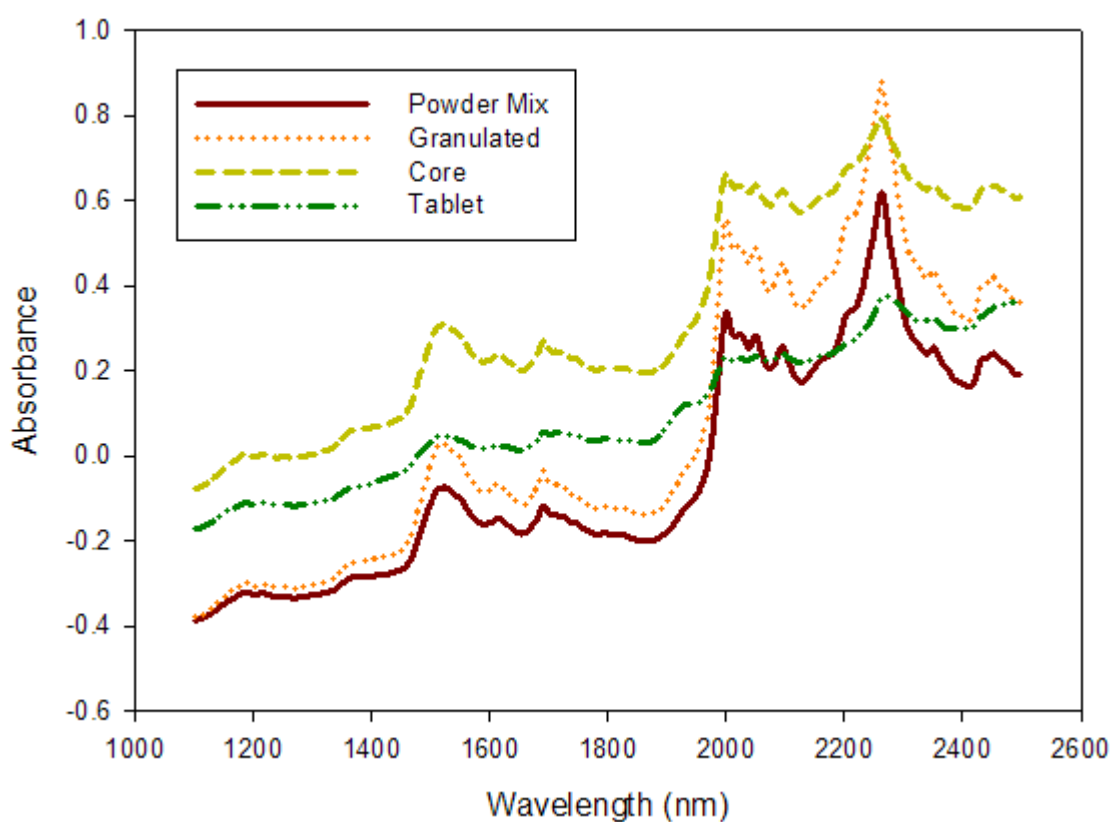


Figura 6.7 Espectros de una mezcla en polvo de laboratorio, de un granulado, un núcleo y un comprimido de la formulación de Metformina 850 mg. Todas las muestras están a la concentración nominal de todos los componentes.

6.2.2. Construcción de los conjuntos y modelos de calibración a partir del espectro proceso.

Determinación de API en comprimidos de Metformina 850 mg.

La “huella” que van dejando las diferentes etapas del proceso sobre el espectro NIR (ver apartado 6.2.1) se puede obtener calculando las diferencias entre espectros de etapas consecutivas (ver figura 6.8A), se obtiene el espectro $S_{\text{granulation}}$ que es la diferencia entre el espectro de un granulado y el espectro de una mezcla en polvo con las mismas concentraciones de principio activo y excipientes ($S_{\text{granulation}} = S_{\text{granulated}} - S_{100\% \text{ lab}}$), de un modo similar se calcula $S_{\text{compression}}$ ($S_{\text{compression}} = S_{\text{core}} - S_{\text{granulated}}$) y S_{coating} ($S_{\text{coating}} = S_{\text{tablet}} - S_{\text{core}}$). La suma de los espectros $S_{\text{granulation}}$, $S_{\text{compression}}$ y S_{coating} proporciona la variación global del proceso. En la figura 6.8B se comparan 2 *espectros proceso* obtenidos de 2 formas diferentes $S_{\text{process 1}}$ ($S_{\text{process 1}} = S_{\text{granulation}} + S_{\text{compression}} + S_{\text{coating}}$) y $S_{\text{process 2}}$ ($S_{\text{process 2}} = S_{\text{tablet}} - S_{100\% \text{ lab}}$) como se puede observar no existen diferencias significativas entre ambos, por lo que los *espectros proceso* se obtendrán a partir de la segunda ecuación ya que simplifica de forma significativa los cálculos a realizar. En la figura 6.8B se puede observar también como la región de 1100 a 1900 nm incorpora una variación al espectro prácticamente constante de aproximadamente +0.2 unidades de absorbancia, en cambio, la región de 1900 a 2500 nm estas variaciones no son constantes y son de mayor magnitud (aprox. -0.2 unidades de absorbancia) para aquellas regiones donde el espectro de la muestra tiene bandas de absorción más intensas (banda de 2300 nm) (efecto multiplicativo del scattering). Resumiendo, aquellas regiones donde el espectro de la muestra presenta una mayor absorción son las que más se ven influenciadas por el efecto del proceso de fabricación.

Resultados y Discusión

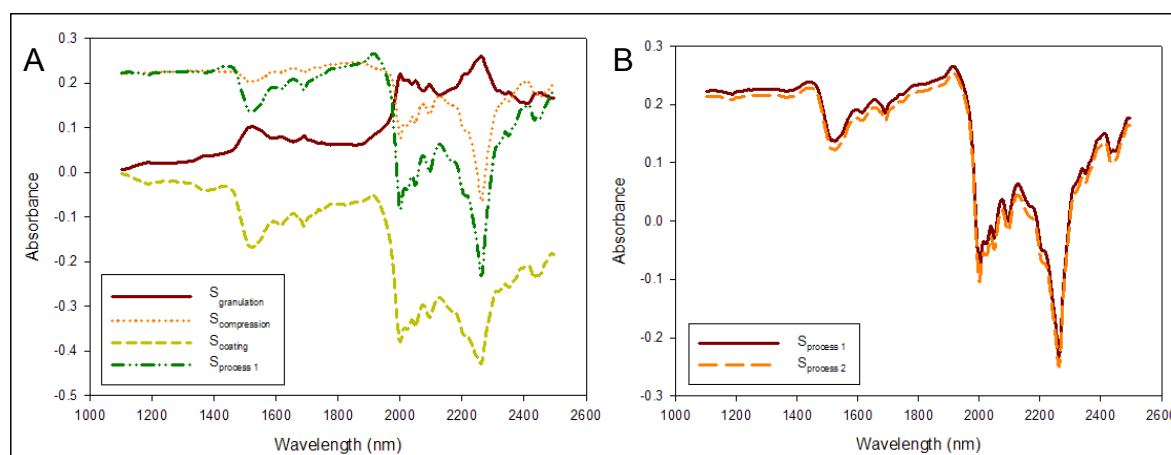


Figura 6.8. Espectros de la variabilidad del proceso farmacéutico de Metformina 850 mg.

A) Espectros del efecto granulación, compresión, recubrimiento y proceso.

B) Comparación de los espectros proceso obtenidos por suma de los efectos de cada etapa ($S_{process 1}$) y por diferencia directa entre un comprimido y la mezcla en polvo ($S_{process 2}$).

Se ha considerado conveniente obtener *espectros proceso* de cada una de las caras del comprimido ya que su diferente geometría (ver figura 4.5) puede generar *espectros proceso* ligeramente diferentes debido a la diferente forma de reflejar el haz de luz, y de este modo se incluye en el conjunto de calibración la variabilidad debida a la diferente geometría de cada cara del comprimido.

A partir de los cálculos explicados en el capítulo de metodología (figura 4.4) se obtendrán varios *espectros proceso* que se adicionan de forma aleatoria a los espectros de las muestras en polvo de laboratorio que cubren el rango de concentraciones deseado, obteniendo así un nuevo conjunto de espectros.

La figura 6.9 muestra el gráfico de dispersión de los *scores* de un PCA de las muestras de laboratorio modificadas con los espectros proceso junto con muestras de producción. A los espectros se les ha aplicado SNV y se ha utilizado el rango completo de 1100-2500 nm. Se puede observar como el conjunto de puntos de las muestras de laboratorio incluye casi completamente las muestras de producción, lo que permite deducir que las muestras de laboratorio modificadas incorporan la mayor parte de la variabilidad del proceso de producción.

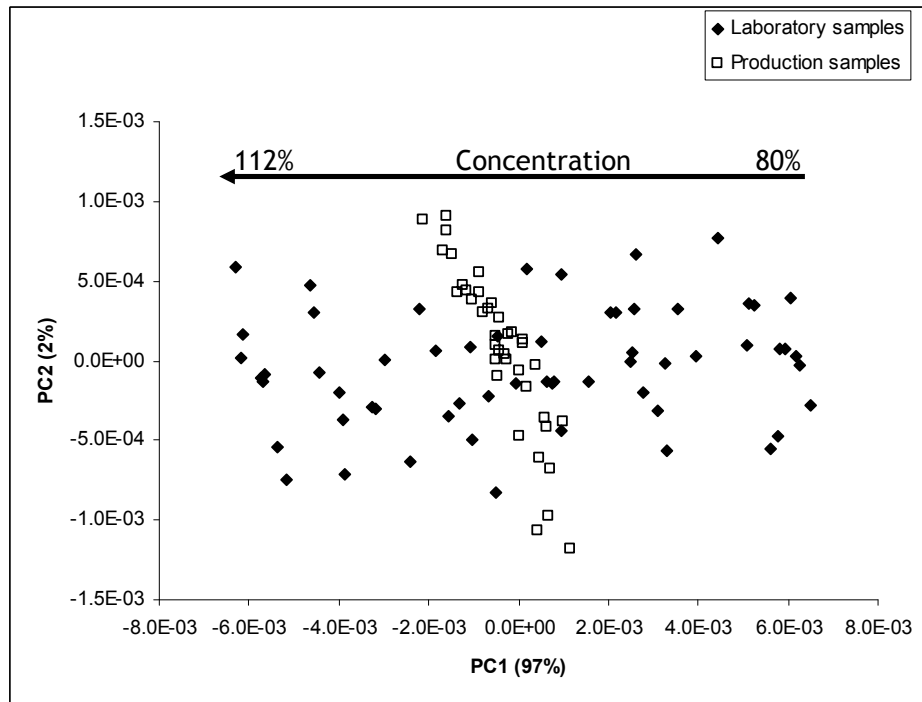


Figura 6.9 Gráfico de dispersión de un PCA de muestras de laboratorio modificadas con los espectros proceso y de muestras de producción. Los espectros se encuentran en 2ª derivada y en el rango de 1100-2500 nm.

Las muestras de laboratorio modificadas se dividen en 2 conjuntos, el primero de ellos servirá para la construcción del modelo de calibración PLS y el segundo para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Los parámetros más significativos del modelo construido se recogen en la tabla 6.4 bajo el nombre de NIR100. Hay que destacar que éste es un modelo sumamente sencillo, ya que solo con 2 factores se explica el 98.1% de la varianza de las muestras y que los valores de RMSE de calibración y predicción no son significativamente diferentes.

El modelo PLS creado (NIR100) se utiliza para predecir 13 lotes de producción. El valor de cada lote corresponde a la media de predicción de 10 comprimidos del mismo lote. Los resultados de dichas predicciones se recogen en la tabla 6.5 bajo el nombre de NIR100. La columna "Referencia" recoge la concentración de principio activo del lote obtenida por el método de referencia. Realizando un test t de datos emparejados entre los valores obtenidos por el método de referencia (UV) y los obtenidos por el modelo

Resultados y Discusión

NIR100, obtenemos un $t_{calculada} = 2.49$ mientras que la $t_{critica, 0.05/2, n=13} = 2.179$, por lo tanto, los 2 métodos proporcionan resultados estadísticamente diferentes.

Tabla 6.4. Figuras de mérito del modelo NIR100.

	NIR100	
	Cal	Pred
Pretratamiento	2ª derivada	
Rango (nm)	1100-2500	
Rango API (%)	80-112	
Nº de PC	2	
Varianza Y (%)	97.6	
Ordenada	2±5	0±5
Pendiente	0.98±0.05	1.00±0.05
Nº de muestras	30	30
RMSEC/P	1.30	1.24

Tabla 6.5. Resultados de predicción de los diferentes lotes de producción.

	Referencia	NIR100*	Ref-NIR100
Lote 1	100.12	100.86	-0.74
Lote 2	100.05	99.64	0.41
Lote 3	100.31	99.32	0.99
Lote 4	98.07	99.49	-1.42
Lote 5	99.49	99.38	0.11
Lote 6	99.19	102.93	-3.74
Lote 7	98.74	102.28	-3.54
Lote 8	98.07	101.14	-3.07
Lote 9	98.25	99.94	-1.70
Lote 10	100.84	100.86	-0.02
Lote 11	101.95	102.29	-0.34
Lote 12	101.29	101.04	0.26
Lote 13	98.46	99.66	-1.20
Media	99.60	100.68	-1.08
SD	1.28	1.23	1.56

* El valor NIR obtenido es la media de la predicción de 10 comprimidos.

El modelo NIR100 no muestra resultados de predicción satisfactorios por lo que se decidió aumentar la variabilidad del conjunto de calibración. Los *espectros proceso* obtenidos se multiplican por un factor de 0.5 y 1.5, de este modo se amplía matemáticamente la variabilidad del proceso productivo (*extended process variability matrix*, figura 4.4). Igual que en el modelo anterior, estos *espectros proceso* ampliados se adicionan a los espectros de las muestras en polvo de laboratorio.

El nuevo conjunto de datos contiene muestras a las que se les ha adicionado espectros proceso multiplicados por 0.5, espectros multiplicados por 1.5 y también espectros proceso no modificados por ningún factor ($S_{PWS-0.5}$, S_{PWS} , $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, S_{PNS} y $S_{PNS-1.5}$). Este nuevo conjunto se denomina *extended process variability matrix*.

Este conjunto de espectros se adiciona al constituido por los espectros de las muestras en polvo que cubre el rango de calibración para dar lugar a la *extended total variability matrix*.

La figura 6.10 recoge el gráfico de dispersión de *scores* de un PCA realizado con las muestras de *extended total variability matrix* y muestras de producción (espectros en 2ª derivada y en el rango de 1100-2500 nm). En la figura se observa como las muestras de laboratorio modificadas con los espectros proceso S_{PWS} y S_{PNS} no incluyen totalmente las muestras de producción; esta situación se muestra también en la figura 6.9. La introducción de muestras modificadas con los *espectros proceso* $S_{PWS-0.5}$, $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, y $S_{PNS-1.5}$ ofrece una área de variabilidad que incluye completamente las muestras de producción.

Resultados y Discusión

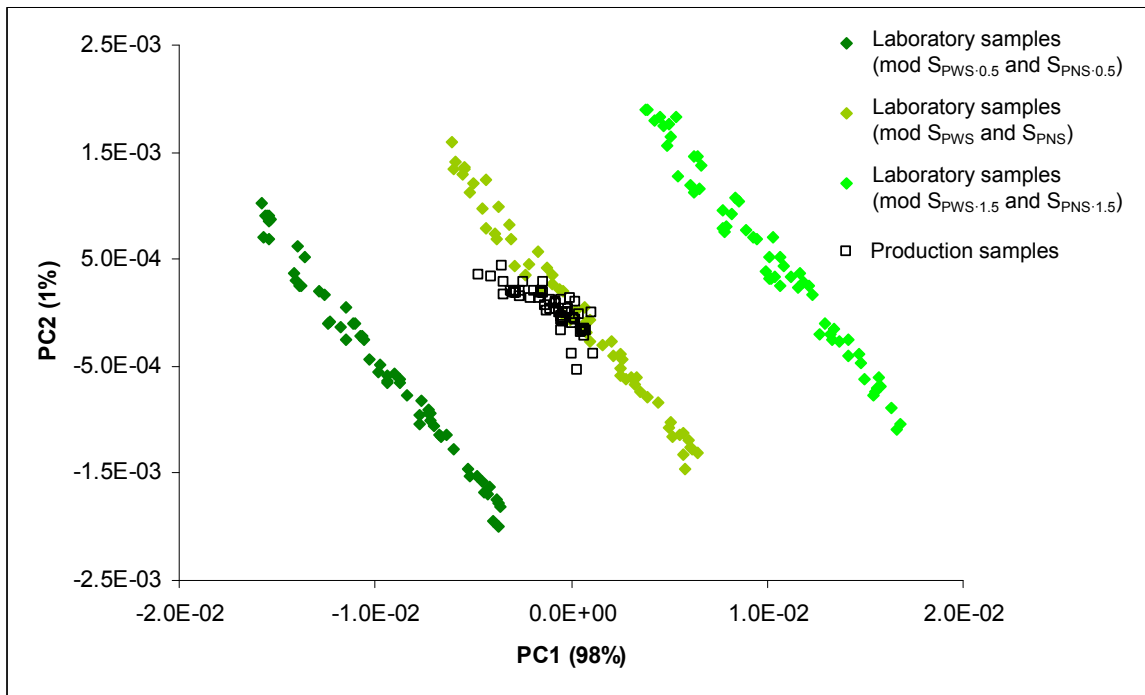


Figura 6.10 Gráfico de dispersión de *scores* de un PCA de muestras de laboratorio modificadas con los espectros proceso ($S_{PWS-0.5}$, S_{PWS} , $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, S_{PNS} y $S_{PNS-1.5}$) y de muestras de producción. Los espectros se encuentran en 2ª derivada y en el rango de 1100-2500 nm.

Este conjunto de datos modificado (*extended total variability matrix*) se divide en 2 subconjuntos, uno de ellos para construir el modelo de calibración y el segundo para evaluar la capacidad predictiva del modelo. Los parámetros más significativos del modelo PLS se recogen en la tabla 6.6 bajo el nombre de NIR100 extended. La principal diferencia entre las figuras de mérito de los modelos NIR100 (tabla 6.4) y NIR100 extended (tabla 6.6) es la incorporación de 2 factores más a este último modelo para explicar la variabilidad introducida por los *espectros proceso* modificados ($S_{PWS-0.5}$, $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, y $S_{PNS-1.5}$). En la tabla 6.7, se recogen los resultados de predicción del producto acabado. En la misma tabla, se encuentran los residuales del modelo NIR100 extend respecto a los valores de referencia, cabe destacar que la media de los residuales es de 0.03, si comparamos este valor con el -1.08 obtenido con el modelo NIR100 (tabla 6.5), vemos que los residuales han mejorado sustancialmente. Realizando un test t de datos emparejados se comparan los resultados de referencia con los de NIR100 extend, se obtiene una $t_{calculada} = 0.07$ ($t_{critica, 0.05/2, n=13} = 2.179$) demostrándose

que los 2 métodos ofrecen resultados que no difieren estadísticamente. El valor de RMSEP para los comprimidos de producción es de 1.33%.

Tabla 6.6. Figuras de mérito del modelo NIR100 extended.

	NIR100 extended	
	Cal	Pred
Pretratamiento	2ª derivada	
Rango (nm)	1100-2500	
Rango API (%)	80-112	
Nº de PC	4	
Varianza Y (%)	99.2	
Ordenada	1±2	0±1
Pendiente	0.99±0.02	1.00±0.01
Nº de muestras	90	90
RMSEC/P	0.83	0.50

Tabla 6.7. Resultados de predicción de los diferentes lotes de producción.

	Referencia	NIR100 extended*	Ref-NIR100 extended
Lote 1	100.12	99.77	0.35
Lote 2	100.05	99.28	0.77
Lote 3	100.31	99.59	0.72
Lote 4	98.07	99.84	-1.77
Lote 5	99.49	100.29	-0.80
Lote 6	99.19	99.60	-0.41
Lote 7	98.74	99.76	-1.02
Lote 8	98.07	99.31	-1.24
Lote 9	98.25	99.54	-1.29
Lote 10	100.84	99.64	1.20
Lote 11	101.95	99.29	2.66
Lote 12	101.29	99.39	1.90
Lote 13	98.46	99.16	-0.70
Media	99.60	99.57	0.03
SD	1.28	0.30	1.35

* El valor NIR obtenido es la media de la predicción de 10 comprimidos.

Resultados y Discusión

Finalmente, destacar que ninguno de los modelos de calibración construidos contiene muestras de producción y sin embargo el modelo NIR100 extended las cuantifica correctamente. La adición del *espectro proceso* a las muestras en polvo de laboratorio ha sido suficiente para incorporar la variabilidad del proceso productivo en el conjunto de calibración y predecir adecuadamente las muestras de producción.

Determinación de API y excipientes en comprimidos de Ibuprofeno 400 y 600 mg.

La formulación de comprimidos de ibuprofeno resulta especialmente adecuada para evaluar la capacidad del *espectro proceso* para recoger la variabilidad del proceso farmacéutico, ya que la concentración de API (63.5%) deja margen para poder construir un diseño de experimentos donde tanto las concentraciones de API como las de excipientes varíen en rangos aceptables, pudiendo así aplicar la metodología desarrollada a la cuantificación de todos los componentes.

Las mezclas en polvo de laboratorio se preparan a partir de un diseño D-optimal. La aplicación de un diseño de muestras permite definir el rango de concentraciones deseado para cada uno de los analitos en estudio a la vez que se minimiza la colinealidad entre los valores de concentración. La tabla 6.8 muestra los coeficientes de correlación espectral y los de concentración obtenidos a partir del diseño de experimentos. Destacar que la correlación espectral entre los componentes de la formulación supera el 0.74, en todos los casos, siendo especialmente elevada entre el almidón de maíz y la celulosa (0.97). En los valores de coeficiente de correlación entre concentraciones, el valor más elevado es entre el ibuprofeno y el almidón de maíz (-0.85), sería deseable un valor más bajo pero debe recordarse que el ibuprofeno (63.5%) y el almidón de maíz (28.5%) son los componentes mayoritarios y suman un 92% en contenido; cuando se tiene prácticamente una mezcla binaria, evitar una elevada colinealidad es francamente difícil. Sin embargo, para el almidón de maíz y la celulosa

(tienen una alta correlación espectral) se consigue una baja correlación entre concentraciones (0.37).

Tabla 6.8. Coeficientes de correlación espectral y de concentraciones entre los componentes de la formulación comprimidos de ibuprofeno.

Coeficientes de correlación		Ibuprofeno	Almidón de maíz	Celulosa	Sílice	Estearato de magnesio
Ibuprofeno	Concentración	1	-	-	-	-
	Espectral	1	-	-	-	-
Almidón de maíz	Concentración	-0.85	1	-	-	-
	Espectral	0.76	1	-	-	-
Celulosa	Concentración	-0.63	0.37	1	-	-
	Espectral	0.78	0.97	1	-	-
Sílice	Concentración	-0.72	0.57	0.42	1	-
	Espectral	0.88	0.90	0.87	1	-
Estearato de magnesio	Concentración	0.03	-0.30	-0.26	-0.07	1
	Espectral	0.89	0.74	0.77	0.74	1

La incorporación de la variabilidad física del proceso productivo al conjunto de calibración es un proceso más complejo; los tratamientos que sufren las mezclas en polvo de los componentes durante el proceso se reflejan en el espectro NIR y es difícil predecir el efecto sobre el espectro. El espectro NIR de cada una de estas etapas recoge los efectos de los diferentes tratamientos que se han aplicado a la mezcla inicial (ver sección 6.2.1). Con el objeto de incorporar el efecto que estos tratamientos ejercen sobre el espectro NIR se propone la construcción de un conjunto de calibración a partir del cálculo del *process variability matrix* (ver capítulo metodología, figura 4.4). Esta matriz contendrá únicamente la variabilidad del proceso productivo siempre y cuando la mezcla de laboratorio que se tome como referencia tenga exactamente las mismas concentraciones de API y excipientes que los comprimidos de producción (ver 6.2.3).

Resultados y Discusión

La figura 6.11 recoge los espectros en absorbancia de una mezcla en polvo de laboratorio a concentración nominal, de un comprimido de producción de 400 mg y un espectro proceso (S_p) obtenido a partir de un comprimido de 400 mg. El espectro proceso de la figura 6.11 es el vector diferencia entre el espectro del comprimido de 400 mg y la mezcla en polvo a concentración nominal. Puede observarse que el espectro proceso presenta 2 regiones de absorción invertida, una alrededor de 1700 nm y una segunda por encima de 2100 nm, ambas coinciden con las regiones de absorción más definidas del comprimido. De la visualización del espectro proceso se deduce que el proceso productivo (granulación, compactación y lacado) influyen de manera diferente en función de la longitud de onda. El comportamiento con espectros de 600 mg es similar.

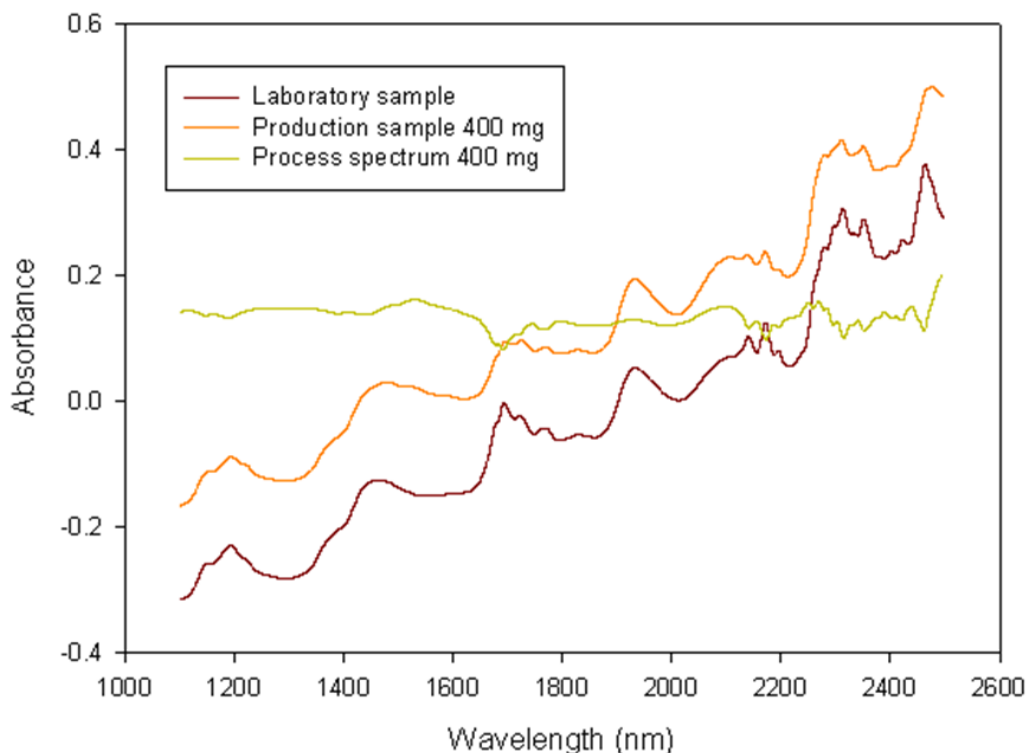


Figura 6.11. Espectros en absorbancia de una mezcla en polvo de laboratorio a concentración nominal, una muestra de producción de 400 mg y un espectro proceso calculado a partir de un comprimido de 400 mg.

La suma de la matriz de espectros de las muestras en polvo de laboratorio (variabilidad química) con la *extended process variability matrix* (variabilidad del proceso) nos

proporciona una matriz que recoge todas las fuentes de variabilidad del proceso de producción de los comprimidos. Un gráfico de dispersión de *scores* de un PCA realizado con muestras de laboratorio sumadas a la *extended process variability matrix* y muestras de producción de las 2 dosificaciones estudiadas, muestra que las muestras de laboratorio modificadas recogen la variabilidad de las de producción (Figura 6.12). En la misma figura, se observa la ordenación de las muestras de laboratorio según el factor aplicado, lo que permite evaluar la adecuación de los factores a ensayar. Puede observarse que las muestras de laboratorio a las que se le ha aplicado el factor 1.25 quedan a la derecha del gráfico alejadas de las muestras de producción, se decidió no incorporar este grupo de muestras al conjunto de calibración ya que no son necesarias para recoger la variabilidad del proceso y únicamente haría que los modelos PLS fueran más complejos. En cambio, las muestras con el factor de 0.5 se encuentran justo en el límite del cluster de las de 600 mg, por lo que consideramos que si era necesario introducirlas en el conjunto de calibración. Las muestras a las que se aplicó el factor de 0.75 también fueron descartadas, ya que únicamente con las del factor de 0.5 y 1 se cubría la superficie experimental, de este modo se evita obtener modelos con una elevada complejidad.

Esta estrategia permite obtener la variabilidad total del proceso productivo a partir de un número reducido de muestras de producción y por tanto reducir de forma importante el trabajo experimental de registro de espectros de un elevado número de muestras.

La *extended total variability matrix* contiene mezclas con intervalo de concentración suficientemente amplio para todos los componentes de la formulación lo que nos permite, a partir de la misma matriz, construir un modelo de calibración PLS para cada uno de los analitos (API y excipientes). Dicha matriz se divide en 2 subconjuntos, uno para la construir los modelos de calibración y el segundo para la evaluación de la capacidad predictiva de los modelos construidos. La tabla 6.9, muestra los parámetros de mérito de los modelos construidos para el API y los 4 excipientes.

Resultados y Discusión

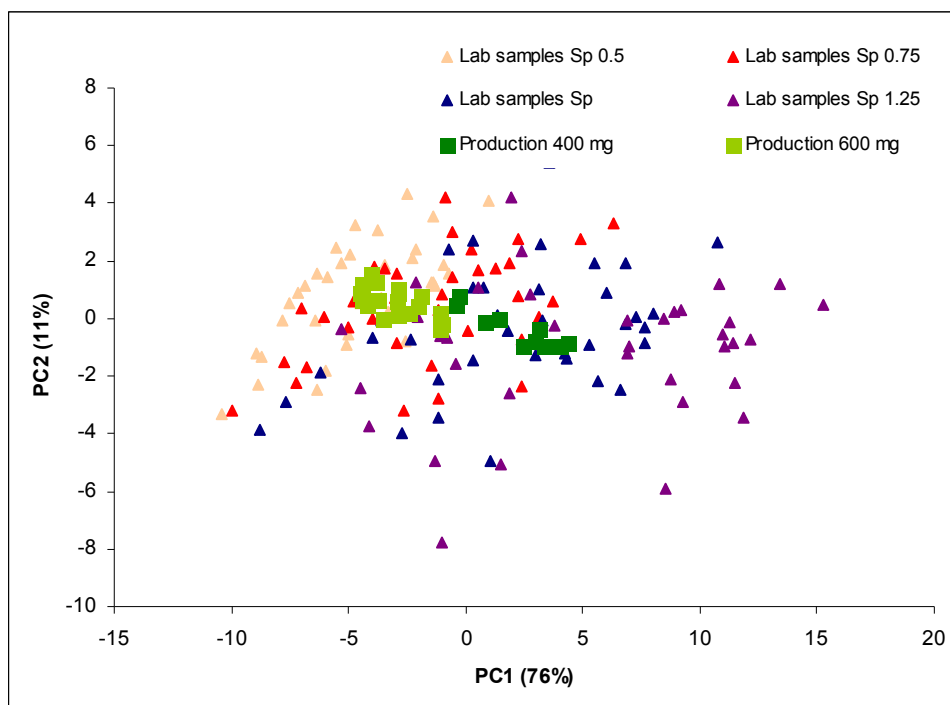


Figura 6.12. Gráfico de dispersión de *scores* de un PCA de las muestras de laboratorio modificadas por la *extended process variability matrix* junto con muestras de producción. Pretratamiento espectral aplicado es 1ª derivada + SNV en el rango de 1100-2500 nm.

Todos los modelos se construyeron en 1ª derivada seguida de un SNV, después de aplicar diferentes pretratamientos espectrales, esta combinación resultó ser la más adecuada para la construcción de los modelos lo que ya se podía deducir del gráfico de dispersión de *scores* del PCA. Para la construcción de los diferentes modelos se ha utilizado el rango completo de longitudes de onda (1100-2500 nm) excepto en el modelo para sílice. Este analito no presenta bandas de absorción remarcables en la región NIR lo que impide la selección de un rango de longitudes de onda adecuado, y por ello se usó el *Martens' uncertainty test* implementado en Unscrambler 9.8. Éste es un test de significación, el cual evalúa la estabilidad de los resultados de la regresión e identifica las muestras o variables anómalas y selecciona aquellas variables X que son significativas. El test se basa en el principio de Jack-Knifing [18].

Tabla 6.9. Parámetros de mérito de los modelos PLS para API y excipientes.

	Ibuprofeno		Almidón de maíz		Celulosa		Sílice		Estearato de magnesio	
	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred
Pretratamiento	1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV	
Rango de longitudes de onda (nm)	1100-2500		1100-2500		1100-2500		1100-2500*		1100-2500	
Rango de concentraciones (% w/w)	50.8-74.6		18.3-37.7		2.9-8.4		1.2-2.7		0.0-6.9	
Factores PLS	3		4		11		10		5	
Concentration Variance (Y) (%)	97.4		97.8		97.1		97.0		99.2	
Ordenada	2 ± 3	1 ± 3	0.6 ± 1.0	1.0 ± 2.0	0.2 ± 0.2	-0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.3	0.01 ± 0.05	0.03 ± 0.07
Pendiente	0.97 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.97 ± 0.05	0.97 ± 0.05	1.03 ± 0.9	0.97 ± 0.06	1.0 ± 0.2	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.03
RMSEC/P	0.86	1.00	0.64	1.03	0.24	0.49	0.06	0.12	0.15	0.24

* Se realizó una selección de longitudes de onda mediante *Martens' uncertainty test* basado en el principio de jack-knifing en el rango de 1100-2500 nm.

Resultados y Discusión

El API y el almidón de maíz son los componentes mayoritarios de la formulación, con un 63.5 y 28.5 % w/w respectivamente, la alta concentración de los analitos permite la obtención de modelos con un número reducido de factores PLS (3 y 4 factores respectivamente, ver tabla 6.9). En cambio, los modelos PLS para celulosa y sílice, que se encuentran en proporciones relativamente bajas, son más complejos y necesitan 11 y 10 factores PLS, respectivamente. Esta mayor complejidad se explica por la elevada correlación entre los espectros de celulosa y almidón (coeficiente de correlación de 0.97) la cual dificulta la determinación del minoritario, es por ello que es importante un adecuado diseño de las muestras reduciendo la correlación entre concentraciones (para estos analitos es de 0.37) y poder obtener un buen modelo para cada analito. Paralelamente, la ausencia de bandas de absorción significativas en el espectro de sílice explica la complejidad del modelo de calibración, mientras que el modelo del estearato de magnesio es simple, comparable al modelo para API, a pesar de su baja concentración, esto es debido a que el espectro de estearato de magnesio presenta bandas definidas e intensas.

Todos los modelos de cuantificación explican como mínimo un 97% de la varianza de la concentración y tanto las rectas de calibración como las de predicción, comprenden el 0 para la ordenada de origen y el 1 para la pendiente. Los errores de predicción expresados como RMSEP prácticamente no superan el 1.0% (ver tabla 6.9).

Los 5 modelos construidos y validados se utilizaron para predecir un conjunto de comprimidos de producción. Se registraron 10 comprimidos por lote de un total de 10 lotes de Ibuprofeno 400 mg y 18 lotes de Ibuprofeno 600 mg. Se obtuvo el valor NIR de predicción de cada analito y para cada comprimido. Se promediaron los valores obtenidos para cada lote y posteriormente, se promediaron los resultados de cada dosificación. La tabla 6.10 recoge los resultados de las predicciones y sus desviaciones estándares. En la misma tabla, se muestra el valor medio de contenido de API por HPLC y los valores teóricos del resto de los excipientes.

Tabla 6.10. Resultados de las determinaciones NIR para el API y excipientes en los dos tipos de comprimidos. Comparación con los valores de referencia y teóricos.

		400 mg	600 mg
Ibuprofeno	Valor NIR (% w/w)	64.1 (0.8)*	63.5 (1.1)*
	Valor referencia (% w/w)	64.2 (0.9)**	64.0 (1.0)**
Almidón de maíz	Valor NIR (% w/w)	28.2 (0.6)*	28.3 (0.9)*
	Valor teórico (% w/w)	28.5	28.5
Celulosa	Valor NIR (% w/w)	5.3 (0.5)*	5.4 (0.5)*
	Valor teórico (% w/w)	5.0	5.0
Sílice	Valor NIR (% w/w)	2.1 (0.1)*	2.1 (0.3)*
	Valor teórico (% w/w)	2.0	2.0
Estearato de magnesio	Valor NIR (% w/w)	0.9 (0.1)*	0.9 (0.2)*
	Valor teórico (% w/w)	1.0	1.0

*Desviación estándar ponderada

**Desviación estándar

Para cada uno de los lotes de comprimidos de Ibuprofeno se obtuvo el valor medio en contenido de principio activo mediante HPLC y se comparó con los resultados obtenidos por NIR para cada lote mediante un test t de datos emparejados. Para los comprimidos de 400 mg se obtuvo una $t_{\text{calculada}} = 0.12$ ($t_{\text{crítica, } 0.05/2, n=10}=2.26$) y para los 600 mg $t_{\text{calculada}} = 1.99$ ($t_{\text{crítica, } 0.05/2, n=18}=2.11$), en ambos casos $t_{\text{calculada}} < t_{\text{crítica}}$ por lo tanto, los 2 métodos proporcionan resultados estadísticamente iguales. Para los excipientes no se dispone de un método alternativo para analizar el contenido de cada analito con lo que se compararon los valores NIR con los valores teóricos de contenido, en todos los casos las predicciones de los modelos construidos se aproximan significativamente al valor teórico y las desviaciones estándares ponderadas comprenden, en todos los casos, el valor teórico de excipiente (ver tabla 6.10).

Resultados y Discusión

6.2.3. Evaluación de errores sistemáticos en la predicción de muestras.

Los comprimidos de Metformina 850 mg se han utilizado para realizar un estudio sobre incorporación de errores sistemáticos en los modelos de calibración cuando se usa el *espectro proceso* para incluir la variabilidad del proceso farmacéutico.

Si la mezcla en polvo de referencia ($S_{100\% \text{ lab}}$) no tiene exactamente las mismas concentraciones de principio activo y excipientes que los comprimidos de producción usados para obtener el *espectro proceso*, se incorpora un error sistemático a los *espectros proceso* que se transmite a los espectros de calibración. Para comprobar esta hipótesis, se ha realizado el mismo cálculo de *espectro proceso* pero utilizando como referencia una mezcla en polvo con un 95.7% de concentración de principio activo (la concentración de los excipientes en el placebo fue la misma que para la mezcla al 100% de API). La obtención de los conjuntos de calibración y validación se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de metodología (ver figura 4.4) pero con los nuevos *espectros proceso*. En las tablas 6.11 y 6.12 se encuentran las características principales del modelo PLS que denominamos NIR95 y los resultados obtenidos en la predicción de muestras. Se ha realizado el mismo procedimiento, calcular los *espectros proceso* y a continuación crear el modelo PLS correspondiente, utilizando como muestra de referencia una con un contenido de 104.3% de API, dicho modelo lo denominamos NIR105. Igualmente, los resultados obtenidos con este modelo se muestran en las tablas 6.11 y 6.12.

En la tabla 6.12 se muestran los valores de los residuales obtenidos como diferencia de las predicciones de los modelos NIR95 y NIR105 con los valores de referencia. Viendo los residuales medios Ref-NIR95 y Ref-NIR105 podemos estimar que se está produciendo un error sistemático por defecto de alrededor del 3% cuando utilizamos como espectro de referencia la muestra al 95.7% y un error sistemático por exceso de alrededor del 4% cuando utilizamos la muestra al 104.3% como referencia. Estos resultados indican la producción de un error sistemático en el modelo de calibración cuando el espectro de

referencia (muestra en polvo preparada en el laboratorio) no contiene exactamente las mismas concentraciones de API y excipientes que el producto acabado.

Tabla 6.11. Figuras de mérito de los modelos construidos.

	NIR 100		NIR 95		NIR 105	
	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred
Pretratamiento	2ª derivada		2ª derivada		2ª derivada	
Rango (nm)	1100-2500		1100-2500		1100-2500	
Rango API (%)	80-112		80-112		80-112	
Nº de PC	2		2		2	
Varianza Y (%)	98.1		97.6		97.8	
Ordenada	2±5	0±5	2±6	0±4	2±6	1±5
Pendiente	0.98±0.0 5	1.00±0.0 5	0.98±0.0 6	1.00±0.0 4	0.98±0.0 6	0.99±0.0 5
Nº de muestras	30	30	30	30	30	30
RMSEC/P	1.30	1.24	1.43	1.09	1.36	1.54

Tabla 6.12. Resultados de predicción de los diferentes lotes de producción. Cálculo de los residuales entre los diferentes modelos.

	Referencia	NIR95*	NIR100*	NIR105*	Residual		
					Ref - NIR95	Ref- NIR100	Ref- NIR105
Lote 1	100.12	96.87	100.86	104.00	3.25	-0.74	-3.88
Lote 2	100.05	95.65	99.64	102.81	4.39	0.41	-2.76
Lote 3	100.31	95.44	99.32	102.53	4.87	0.99	-2.23
Lote 4	98.07	95.40	99.49	102.47	2.68	-1.42	-4.40
Lote 5	99.49	95.60	99.38	102.59	3.89	0.11	-3.10
Lote 6	99.19	98.77	102.93	105.96	0.41	-3.74	-6.78
Lote 7	98.74	98.16	102.28	105.35	0.58	-3.54	-6.61
Lote 8	98.07	97.16	101.14	104.21	0.91	-3.07	-6.14
Lote 9	98.25	95.97	99.94	103.11	2.27	-1.70	-4.86
Lote 10	100.84	96.89	100.86	104.00	3.95	-0.02	-3.16
Lote 11	101.95	98.30	102.29	105.36	3.66	-0.34	-3.41
Lote 12	101.29	97.07	101.04	104.15	4.22	0.26	-2.86
Lote 13	98.46	95.70	99.66	102.86	2.75	-1.20	-4.40
Media	99.60	96.69	100.68	103.80	2.91	-1.08	-4.20
SD	1.28	1.17	1.23	1.19	1.49	1.56	1.51

* El valor NIR obtenido es la media de la predicción de 10 comprimidos.

Resultados y Discusión

Estos resultados demuestran que se debe ser sumamente cuidadoso en el momento de escoger tanto la mezcla en polvo de referencia como los comprimidos de producción que se usarán para la obtención del espectro proceso, ya que una pequeña diferencia entre concentraciones conlleva la creación de modelos de calibración con errores sistemáticos.

REFERENCIAS

1. P. Dubois, J.R. Martinez and P. Levillain. Determination of five components in a pharmaceutical formulation using near infrared spectrophotometry, *Analyst*. (1987), 112, 1675.
2. P. Corti, E. Dreassi, C. Murratzu, G. Corbini, L. Ballerini and S. Gravina. Application of NIRS to the quantity control of pharmaceuticals ketoprofen assay in different pharmaceutical formulae, *Pharm. Acta Helv.* (1989), 64, 140.
3. M. Blanco, M. Alcalà, M. Bautista. Pharmaceutical gel analysis by NIR spectroscopy. *Eur.J. Pharm. Sci.* (2008), 33, 409.
4. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and C. de la Pezuela. Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations by near infrared reflectance spectroscopy. *Talanta*. (1993), 40, 1671.
5. D. Jouan-Rimbaud, B. Walczak, D. L. Massart, I. R. Last and K. A. Prebble. Comparisson of multivariate methods based on latent vectors and methods based on wavelength selection for analysis of near-infrared spectroscopic data. *Anal. Chem. Acta*. (1995), 304, 285.
6. A. Eustaquio, P. Graham, R. D. Jee, A. C. Moffat and A. D. Trafford. Quantitation of paracetamol in intact tablets using near infrared transmittance spectroscopy. *Analyst*. (1998), 123, 2303.
7. M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, A. Peguero. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2010) 51, 797.
8. C. P. Meza, M. A. Santos and R. J. Romañach. Quantitation of drug content in a low dosage by transmisión near infrared spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* (2006), 7, 29.
9. European medicines agency. Guideline on specifications and control test on the finished product. June 1992. 3AQ11a
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/3aq11aen.pdf>
10. ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996.
<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
11. M. Blanco, M. Alcalà, J. M. González and E. Torras. A process analytical approach based on near infrared spectroscopy: tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurementsof intact tablets. *J. Pharm. Sci.* (2006), 95, 2137.
12. G. E. Ritchie, R. W. Roller, E. W. Ciurczak, H. Mark, C. Tso and S. A. MacDonald. Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure. Part B:

Resultados y Discusión

- Application to alternate content uniformity and release assay methods for pharmaceutical solid dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2002), 29, 159.
13. R. J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister. Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* (1989), 43, 772.
 14. M. Blanco, M. Alcalà. 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, 353.
 15. M. Blanco, M. Bautista, M. Alcalà. Preparing Calibration Sets for Use in Pharmaceutical Analysis by NIR Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* (2007), 97, 1236.
 16. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela. Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry. *Analyst.* (1997), 122, 761.
 17. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and N. Pou. Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analysis. *Analyst.* (2001), 126, 1129.
 18. The Unscrambler help topics in Unscrambler 9.8 from CAMO Process. Norway.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones

7. Conclusiones

7 Conclusiones.

Se han propuesto nuevas estrategias para el desarrollo y construcción de modelos de calibración NIR que se han aplicado al análisis de diferentes productos de interés industrial. De los estudios realizados se extraen las siguientes conclusiones:

- Se demuestra que un diseño de las muestras de calibración, donde se minimice la correlación entre las concentraciones de los componentes de la muestra, es el factor clave para el éxito de los modelos quimiométricos permitiendo obtener modelos más exactos y robustos. Un diseño adecuado de las muestras resulta especialmente útil cuando los factores a considerar para la preparación de las muestras son muchos y de variada naturaleza. A lo largo de la tesis se han aplicado dos diseños experimentales para la preparación del conjunto de calibración:

- Se ha propuesto un nuevo diseño de experimentos para recoger todas las fuentes de variabilidad de los componentes basado en la figura del antiprisma hexagonal que ha demostrado ser efectivo para construir modelos con buena capacidad predictiva.

- Se ha demostrado que el diseño D-optimal permitió crear un conjunto de muestras de laboratorio en los rangos de concentraciones deseados a la vez que se evitaba la colinealidad, principalmente, entre aquellos analitos que presentaban coeficientes de correlación espectral elevada.

- La espectroscopia NIR ha demostrado ser un técnica útil para la determinación de diversos analitos y aplicable tanto durante el proceso de fabricación del producto como sobre el producto acabado.

- Se han propuesto nuevos métodos de calibración para la determinación de aditivos orgánicos a bajas concentraciones (aprox. 0.5-1.0%) en matrices inorgánicas.

Conclusiones

- Se ha determinado correctamente el contenido de principio activo en cada una de las etapas de fabricación de Ibuprofeno comprimidos (granulado, núcleos y producto acabado) y sobre el producto final de Metformina comprimidos.
 - Los modelos construidos permiten la determinación de los excipientes que completan la formulación de Ibuprofeno comprimidos con errores de predicción (RMSEP) inferiores a 1.1%.
-
- El efecto del tamaño de partícula sobre el espectro NIR ha sido utilizado para la construcción de modelos de calibración que permiten obtener las curvas de distribución de tamaño de partícula. Se han aplicado dos algoritmos de cálculos distintos: PLS como modelo bilineal y ANN como modelo no lineal.
 - La aplicación de la 2ª derivada sobre los datos espectroscópicos es el pretratamiento más adecuado para la construcción de los modelos con este tipo de datos.
 - Se han construido modelos quimiométricos (PLS2 y ANN) para determinar el perfil granulométrico de las muestras de árido. Los dos perfiles estudiados (7 y 12 variables) con los dos algoritmos ensayados proporcionan resultados similares en cuanto a valores de RSEP y demuestran que la correcta predicción de una curva granulométrica no depende de la forma del perfil que ésta tenga. Los perfiles más complejos requieren mayor número de factores en PLS2 y mayor número de neuronas en ANN en la construcción de los modelos.
 - PLS2 y ANN son dos algoritmos que afrontan la resolución del sistema espectroscópico desde vertientes diferentes y se ha demostrado que ambas técnicas son capaces de resolver el sistema correctamente y llegar a resultados estadísticamente iguales.

- Se ha profundizado en el estudio de los parámetros que intervienen en el proceso productivo de comprimidos farmacéuticos construyendo modelos que incluyen aquellas características que aparecen reflejadas en el espectro NIR (tamaño de partícula, geometría del comprimido, presión de compactación y grosor del recubrimiento).

- El PCA y el *cluster analysis* constituyen técnicas adecuadas para establecer el grado de semejanza entre muestras de origen distinto (laboratorio y producción, forma del comprimido, presión de compactación y grosor de la capa de lacado).

- La presión de compactación de los núcleos tiene una influencia significativa en el espectro NIR. La preparación de muestras de laboratorio en el rango adecuado de presiones permitió incluir dicha variabilidad en el modelo de calibración.

- El recubrimiento de los comprimidos de producción, que resultó ser poco homogéneo, se modeló añadiendo el espectro promedio de la laca a los núcleos de laboratorio conduciendo a un modelo con una correcta capacidad de predicción.

- Se ha desarrollado una nueva metodología simple y sencilla para la construcción de conjuntos de calibración, que permite la incorporación de la variabilidad del proceso farmacéutico en el conjunto de calibración basándose en la obtención de la *process variability matrix*.

- En el cálculo de los *espectros proceso* es necesario que las muestras de laboratorio que se toman como referencia tengan la misma concentración de principio activo y excipientes que las muestras de producción, pues de lo contrario los modelos quimiométricos producirán errores sistemáticos “bias” en las predicciones que se realicen.

- La aplicación de factores multiplicativos a los *espectros proceso* ha demostrado que amplía adecuadamente la superficie experimental hasta englobar las muestras de producción.

Conclusiones

- El gráfico de dispersión del PCA de las muestras de laboratorio modificadas con los diferentes *espectros proceso* junto con las muestras de producción resultó ser una herramienta de gran utilidad para la elección de los factores multiplicativos a usar, ya que permitió seleccionar únicamente aquellas muestras que aportaban la variabilidad deseada.
 - Esta estrategia ha permitido la cuantificación tanto del principio activo como de los excipientes que completan la formulación a partir del mismo conjunto de muestras, lo que simplifica extraordinariamente el trabajo de laboratorio y permite extraer mayor cantidad de información de las muestras.
 - Se ha aplicado un test t de datos emparejados entre los resultados del método de referencia y los proporcionados por los modelos NIR. En todos los casos, los métodos NIR no ofrecieron diferencias significativas en la determinación de API.
-
- Los modelos de calibración desarrollados no contienen muestras de producción, evitando el uso de métodos de referencia para determinar la propiedad en los conjuntos de calibración y por lo tanto, la propagación del error del método de referencia. Únicamente se han utilizado muestras preparadas en el laboratorio para construir los modelos; esta estrategia permite la obtención de métodos análisis más exactos y precisos que los de referencia y desvincula definitivamente la espectroscopia NIR de la necesidad de usar métodos de referencia.

Las metodologías desarrolladas en esta memoria han aportado soluciones rápidas y simples al control analítico en las diferentes industrias con las que se ha colaborado y se demuestra que la espectroscopia NIR es una herramienta de análisis adecuada para el control de calidad de productos industriales.

ANEXOS

8

Artículos aceptados

- 8.1 Determination of organic additives in mortars by near-IR spectroscopy. A novel approach to designing a sample set with high-variability components
- 8.2 An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy:
Comparison of PLS2 and ANN models
- 8.3 Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy

Determination of organic additives in mortars by near-IR spectroscopy. A novel approach to designing a sample set with high-variability components.

Analytical and Bioanalytical Chemistry
(2007), 387, 1525.

Determination of organic additives in mortars by near-IR spectroscopy. A novel approach to designing a sample set with high-variability components

Marcelo Blanco · Anna Peguero

Received: 22 September 2006 / Revised: 9 November 2006 / Accepted: 30 November 2006 / Published online: 3 January 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Industrial mortars consist primarily of a mixture of cement and an aggregate plus a small amount of additives that are used to modify specific properties. Using too high or too low additive rates usually results in the loss of desirable properties in the end product. This entails carefully controlling the amounts of additives added to mortar in order to ensure correct dosing and/or adequate homogeneity in the final mixture. Near-IR (NIR) spectroscopy has proved effective for this purpose as it requires no sample pretreatment and affords expeditious analyses. The purpose of this work was to determine two organic additives (viz. Ad1 and Ad2) in mortars by using partial least squares regression multivariate calibration models constructed from NIR spectroscopic data. The additives are used to expedite setting and increase cohesion between particles in the mortar. In order to ensure that the sample set contained natural variability in the samples, we used a methodology based on experimental design to construct a representative set of samples. This novel design is based on a hexagonal antiprism that encompasses the concentration ranges spanned by the analytes and the variability inherent in each additive. The D-optimality criterion was used to obtain various combinations between Ad1 and Ad2 additive classes. The partial least squares calibration models thus constructed for each additive provided accurate predictions: the intercept and the slope of the plots of predicted values versus reference values for each additive were close to 0 and 1, respectively, and their confidence ranges included

the respective value. The ensuing analytical methods were validated by using an external sample set.

Keywords Near-IR spectroscopy · Partial least squares · Hexagonal antiprism design · Mortar

Introduction

Mortars are mixtures of a binder (usually lime, cement or both), an aggregate and a small amount of additives. The combination of cement, aggregate and additives is known as *mortar mixture*. Adding water to the mixture produces *fresh mortar*, which becomes *hardened mortar* after some time. The most used cement is synthetic and there are a wide variety of types with different composition, mechanical structure, properties and specific uses. The most important and most utilized type is Portland cement. Normally, the aggregate has a natural origin and principally it is composed of silica. The aggregate is crushed and later it is washed to reduce or to eliminate the finest particles. Mortar additives can be both organic and inorganic in nature, and are added in proportions not exceeding 5% by weight [1] in order to improve some property of the mortar or introduce some special characteristic. Additives span a wide range of compounds, and so do their effects on fresh and hardened mortar; however, obtaining quality mortar entails their correct dosing and proper blending with the other components of the mixture. The nature of the additives used depends on their particular purpose [2]. *Retarding admixtures* (e.g. glucose, sucrose) delay the hydration of cement and lengthen the set time of the mortar. On the other hand, *accelerating admixtures* (e.g. calcium chloride, calcium hydroxide) shorten the set time of the mortar. *Superplasticizers* (e.g. melamine, naphtha-

M. Blanco (✉) · A. Peguero
Departament de Química,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Edifici Cn, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain
e-mail: marcel.blanco@uab.es

A. Peguero
e-mail: anna.peguero@uab.es

lene derivatives) afford large water reduction, and *air-entraining admixtures* (e.g. mixtures of poly(vinyl chloride) s or acetates, acrylics and butadiene–styrene copolymers) entrain small air bubbles in the mortar and increase its durability in freeze–thaw cycles [3]. Finally, *colouring additives*, which are largely metal oxides (e.g. cobalt or iron oxides), change the typical grey colour of mortar.

Construction materials must have a minimum uniformity. Applicable standards (e.g. EN [4], ASTM [5], ISO [6]) require mechanical tests to be conducted on fresh or hardened mortar; some such tests are performed 28 days after specimens have been prepared, which considerably increases the time needed to obtain the information required to release the material. These tests typically measure the tensile strength, wetting capacity and slide of fresh mortar; however, no official analytical methods exist for checking whether a mortar mixture has been properly dosed and homogenized. Although the cement industry rarely quantifies additives in mortar mixtures, accurately establishing the composition of mortar can help ensure its quality and provide a useful tool for controlling the quality of the end product immediately upon production.

Near-IR (NIR) spectroscopy can be useful for this purpose as it requires no sample treatment and affords simple, expeditious analyses. However, in order to extract useful quantitative information, NIR spectra must be subjected to multivariate calibration chemometric procedures, and constructing the required calibration models entails obtaining an appropriate set of laboratory and/or production samples representative of those to be subsequently analysed.

To prepare a set of representative samples we used the methodology of experimental design; such samples should span the whole range of expected values while avoiding colinearity [7]; also, they should contain all expected variations within each component. The design should allow the use of factors with different levels, a *factor* being an independent variable influencing variability in the samples (e.g. an analyte concentration, the nature of a component) and a *level* a class, type or grade of a factor [8] (e.g. the analyte concentration in a sample for the concentration factor or the type of additive for the component factor).

A number of experimental designs for constructing sample sets exist [9–12]. Factorial designs consider every possible combination of the levels of the different factors and their potential interactions. Such designs are useful with a relative small number of factors and levels. Fractional factorial designs require fewer tests than integral factorial designs as they only consider first-order interactions. Latin, Graeco-Latin and hyper-Graeco-Latin square designs [8] are applicable with three, four and five factors, respectively; all factors have the same number of levels and no interactions between factors are expected. The central

composite design is a factorial design additionally including axial and central points. Equiradial or geometric designs consist of equispaced points on the circumference of a sphere; Dohler's designs [13], which allow a variable number of levels to be used depending on the particular influence of each factor, constitute one example. The previous designs have the disadvantage that they can only use a fixed number of factors and levels.

Optimal designs [8] provide an effective alternative when the target problem cannot be adapted as they allow one to choose the number of factors and the number of levels, which need not be identical for all factors. The best known among the optimal designs is that based on the D-optimality criterion, which seeks to find the optimal combination of points in a design from a list of candidate points in order to minimize the determinant $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$, \mathbf{X} being the information matrix. This brings the design as close to ideality (i.e. to orthogonality and rotability) as possible. Optimal designs allow one to construct a sample set involving a large number of factors and levels; also, the factors need not have the same number of levels. In those situations where the number of levels is high, using an optimal design in order to construct an appropriate set entails preparing a large number of samples. This contradicted our aim, so we chose to develop a new design that was constructed in two steps. In the first step, a quantitative design was established by considering the analyte concentrations alone; in the second step, qualitative factors potentially influencing the performance of the calibration model were considered.

The primary aim of this work was to construct a representative sample set appropriate for building a robust calibration model. The second aim was to develop a calibration model with a view to determining two organic additives in production samples of mortar in order to facilitate control of the composition and homogeneity of the mixture.

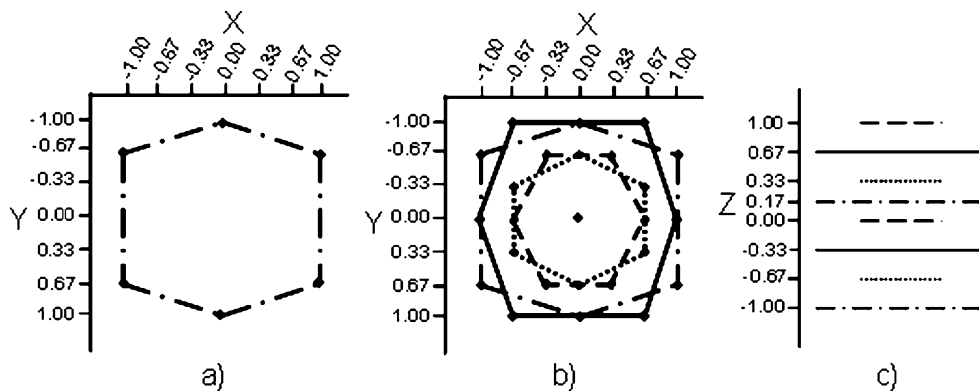
Design of the sample set

We used the methodology of the experimental design to build a representative sample set which includes all variability sources of the raw materials with a minimal correlation in their composition. In this design is not necessary to optimize a response function and or to consider interactions between factors.

The design was based on a hexagonal-base antiprism which was constructed by connecting two hexagons lying at a different height that were rotated by 30° with respect to each other.

The design was conceived for mixtures involving three quantitative (concentration) factors (X , Y and Z). The XY -

Fig. 1 Steps involved in the construction of the hexagonal antiprism. **a** Hexagonal base. **b** Projection on the *XY*-plane. **c** Projection of the *Z*-axis. Note that the four hexagons in **b** have been doubled in **c**



plane was used to construct a hexagon where each vertex corresponded to a mixture of composition x_i and y_i in the compounds X and Y , respectively (Fig. 1a). This hexagon encompassed three concentration levels for X , four for Y and one for Z (level -1) (Fig. 1c, dotted-dashed line). A second hexagon of the same size (Fig. 1b, solid line) was then added a different Z level (-0.33 , Fig. 1c, solid line) that was rotated by 30° with respect to the first, thereby expanding the explored range to five X levels, five Y levels and two Z levels. The two hexagons were used to construct the first hexagonal-base antiprism (Fig. 2a). The next step was to add a third hexagon (Z level 0.17 , Fig. 1c) that was rotated by 30° with respect to the second. The first and third hexagons were identical but were located in different Z levels. The fourth hexagon was placed above the third with the same geometrical position as the second, but in level 0.67 of the Z -axis (Fig. 2b).

In order to span the concentration range in a uniform manner, the sample set was expanded with samples containing intermediate concentrations by inscribing a new and smaller hexagonal figure within the previous ones (Fig. 2c). This raised the number of levels to seven for X and Y (Fig. 1b), and eight for Z (Fig. 1c).

Then, the design was further expanded with some mixtures containing the average concentrations of X and Y by inscribing four central points at Z levels -1 , -0.33 , 0.17 and 0.67 . With eight hexagons containing six mixtures each plus the four central points, the total number of samples was thus 52. Orthogonality of the quantitative factors in the

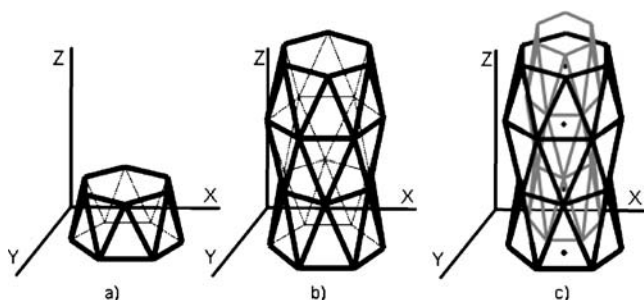


Fig. 2 **a** Hexagonal antiprism. **b** Connection of the four hexagons. **c** Final design

design was checked by calculating the correlation coefficients between factors.

Using this design, we could prepare the mixtures if we only had one type of each component. But, we had one type of cement and one type of aggregate, and ten types of Ad1 and six types of Ad2 which are used indistinctly. No different types of aggregate or cement were considered because no significant differences between batches were detected. However, we observed spectral differences between batches of the additives; Fig. 3 illustrates the spectra of six types of Ad2, the differences between spectra being due to functionalization of the polymer. Similar differences were observed in Ad1.

In order to include in the design the variability from the different additives, we used the D-optimal design [14], which is based on the qualitative mode of the D-optimality criterion, to construct mixtures using different types of Ad1 and Ad2. The number of levels of each factor depended on the types of each one. We considered two qualitative factors, namely *type Ad1* and *type Ad2*. We used ten different types of Ad1 and six of Ad2, so we had ten levels for the qualitative factor *type Ad1*, which were labelled “Ad1” followed by a letter from “a” to “j”, and six levels

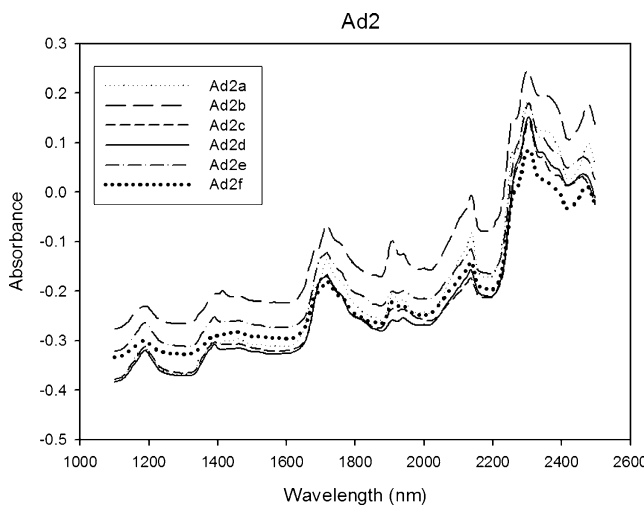


Fig. 3 Near-IR spectra for different batches of additive Ad2

Table 1 Coordinates of the hexagonal antiprism design and additive combinations used

Mix	Hexagonal antiprism design			D-optimal design	
	X (Ad2)	Y (Ad1)	Z (agg.)	Type Ad1	Type Ad2
1	-1	-0.67	-1	Ad1b	Ad2d
2	0	-1	-1	Ad1c	Ad2a
3	1	-0.67	-1	Ad1i	Ad2c
4	1	0.67	-1	Ad1e	Ad2f
5	0	1	-1	Ad1g	Ad2e
6	-1	0.67	-1	Ad1d	Ad2b
7	0	0	-1	Ad1a	Ad2d
8	-0.67	-0.33	-0.67	Ad1h	Ad2d
9	0	-0.67	-0.67	Ad1h	Ad2a
10	0.67	-0.33	-0.67	Ad1i	Ad2a
11	0.67	0.33	-0.67	Ad1j	Ad2b
12	0	0.67	-0.67	Ad1d	Ad2a
13	-0.67	0.33	-0.67	Ad1d	Ad2d
14	-0.33	-0.67	-0.33	Ad1h	Ad2f
15	0.33	-0.67	-0.33	Ad1h	Ad2c
16	0.67	0	-0.33	Ad1e	Ad2e
17	0.33	0.67	-0.33	Ad1g	Ad2c
18	-0.33	0.67	-0.33	Ad1g	Ad2a
19	-0.67	0	-0.33	Ad1e	Ad2c
20	0	0	-0.33	Ad1e	Ad2d
21	-0.67	-1	0	Ad1b	Ad2e
22	0.67	-1	0	Ad1j	Ad2a
23	1	0	0	Ad1c	Ad2e
24	0.67	1	0	Ad1a	Ad2a
25	-0.67	1	0	Ad1c	Ad2b
26	-1	0	0	Ad1b	Ad2f
27	-1	-0.67	0.17	Ad1b	Ad2c
28	0	-1	0.17	Ad1f	Ad2a
29	1	-0.67	0.17	Ad1b	Ad2a
30	1	0.67	0.17	Ad1a	Ad2e
31	0	1	0.17	Ad1c	Ad2f
32	-1	0.67	0.17	Ad1a	Ad2c
33	0	0	0.17	Ad1f	Ad2f
34	-0.67	-0.33	0.33	Ad1j	Ad2c
35	0	-0.67	0.33	Ad1i	Ad2d
36	0.67	-0.33	0.33	Ad1h	Ad2e
37	0.67	0.33	0.33	Ad1f	Ad2e
38	0	0.67	0.33	Ad1a	Ad2f
39	-0.67	0.33	0.33	Ad1f	Ad2d
40	-0.33	-0.67	0.67	Ad1i	Ad2b
41	0.33	-0.67	0.67	Ad1d	Ad2e
42	0.67	0	0.67	Ad1a	Ad2b
43	0.33	0.67	0.67	Ad1e	Ad2b
44	-0.33	0.67	0.67	Ad1g	Ad2f
45	-0.67	0	0.67	Ad1d	Ad2f
46	0	0	0.67	Ad1f	Ad2b
47	-0.67	-1	1	Ad1i	Ad2e
48	0.67	-1	1	Ad1g	Ad2b
49	1	0	1	Ad1j	Ad2f
50	0.67	1	1	Ad1c	Ad2d
51	-0.67	1	1	Ad1d	Ad2c
52	-1	0	1	Ad1j	Ad2d

Table 2 Values of the parameters used to construct the proposed design

	Cement	Aggregate	Ad1	Ad2
Concentration range (%)	28–34	66–72	0–0.6	0–2
Levels (concentration factor)	7	7	7	7
Levels (qualitative factor)	1	1	10	6

for the qualitative factor type Ad2, which were labelled “Ad2” followed by a letter from “a” to “f”. We used the D-optimal design to obtain a set of 52 combinations of Ad1 and Ad2 types and to ensure that pairs of additives did not repeat themselves. Because we used 52 mixtures for the antiprism design, we chose the same number of mixtures of Ad1 and Ad2.

The last step in constructing the overall design involved associating the concentration matrix provided by the quantitative design (Table 1, columns 2–4) and the combination matrix of the Ad1 and Ad2 types (Table 1, columns 5 and 6) obtained with the D-optimal design in order to construct a new matrix containing the concentration of each analyte and the analyte types to be used with a view to preparing the mixture (Table 1).

Experimental

Samples

The mortar studied consisted of a mixture of four solid components: Portland cement and aggregate, which were the main ingredients of the mortar, plus two organic additives (Ad1 and Ad2). The role of Ad1 in the mortar was to accelerate hardening; we had ten types of Ad1, all of them constituted by cellulose derivatives but with different functionalization. The role of Ad2 was to increase cohesion between particles; in this case, we had six types, all of them a variably functionalized vinyl resin. Samples were prepared by weighing the four components in the proportions listed in Table 1, the values -1 and $+1$ corresponding to the minimum and maximum concentrations, respectively, of the factor concerned. The final weight of each sample was 10 g and the preparation sequence completely random. Subsequently, the mixtures were homogenized in a mixer for 15 min. A mixture was deemed homogeneous when two successive spectra recorded during the mixing period were identical.

The proportion by weight of each analyte in the mixture was used as a reference in constructing the partial least squares (PLS) model. Table 2 shows the concentration ranges and levels used to construct the sample set.

Table 3 Correlation coefficients between analytes

	ρ
Ad2/Ad1	0.000
Ad2/aggregate	-0.003
Ad1/aggregate	0.000

The proposed method was validated by using eight new samples prepared from production batches of the components other than those used to construct the model.

Finally, the applicability of the model was also checked by using production samples.

Instrumentation and software

Samples were blended in a Turbula type T2C WAB shaker mixer and their spectra recorded using a Foss NIRSystems 6500 spectrophotometer equipped with a rapid content analyser module. The instrument was controlled via the Vision version 2.51 software package, also from Foss NIRSystems.

The D-optimal design was developed in part by using the software Modde version 6.0 from Umetrics. Data were processed and PLS1 models constructed by using The Unscrambler version 9.2 from Camo Process.

Recording of NIR spectra

NIR reflectance spectra were recorded at 2-nm intervals over the range 1,100–2,500 nm by placing the powdered samples in glass cells and using a ceramic plate as a

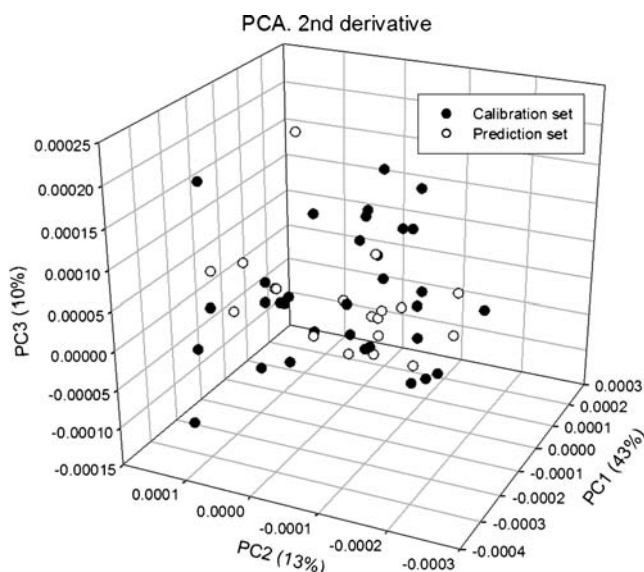


Fig. 4 Scatter plot for the first three principal components analysis (PCA) scores of the second-derivative spectra. Selection of the calibration and prediction samples for the Ad2 calibration model

Table 4 Results of different pretreatments

	SNV		1st derivative		2nd derivative	
	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2
Number of factors	9	4	6	3	6	2
Explained variance	98.8	98.1	98.6	98.1	98.2	97.7
RSEC/P (%)	6.2/13.1	7.7/13.2	6.2/10.6	7.5/11.8	7.1/10.9	7.4/10.7
RMSEC/P	0.021/0.052	0.089/0.214	0.023/0.043	0.089/0.163	0.026/0.047	0.087/0.153

The best pretreatments for each additive are shown in *bold*.

SNV standard normal variate, RSEC/P relative standard error of calibration or prediction, RMSEC/P root mean square error of calibration or prediction

reference. Each spectrum was the average of 32 scans. Each sample was analysed in triplicate and was turned over between recordings.

Data processing

Spectral data were subjected to different pretreatments as the standard normal variate, first derivative or second derivative in order to reduce potential baseline shifts or scattering. Spectral derivatives were obtained by using the Savitzky–Golay algorithm fitting a second-order polynomial with an 11-point window.

We constructed two PLS models (one for Ad1 and the other for Ad2). NIR spectral data and the reference values were modelled by using the PLS algorithm. Models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The optimum number of PLS components was taken to be that minimizing the least-squares difference between the reference value and the parameter measured. The goodness of the results provided by the different PLS models was assessed from the relative standard error (RSE) and the root mean square error (RMSE).

Results and discussion

As stated already, the mixture studied consisted of four solid components, namely the aggregate and the cement, which constituted the base of the mortar and were expressed as 100% of the mixture, and two additives that were expressed as a percentage of the sum of the previous two; therefore, the combination of the four compounds exceeded 100%. We used three concentration factors (viz. aggregate, Ad1 and Ad2), the content of cement being calculated by difference from that of aggregate. Factors X, Y and Z in the hexagonal antiprism experimental design were assigned to the concentration factors Ad2, Ad1 and aggregate, respectively. We had to span the concentrations of the factors Ad1, Ad2 and aggregate because these influence NIR spectra; in addition, the span of the concentrations is useful to obtain a robust model. Only Ad1 and Ad2 were predicted with the PLS models, but if different concentrations of aggregate are not included in the samples used, the variations in the content of aggregate will produce errors in these determinations.

The proposed design was intended to minimize correlation between the concentrations of the sample components

Table 5 Figures of merit of the calibration and prediction sets for Ad1 and Ad2

	Ad1		Ad2	
	Calibration	Prediction	Calibration	Prediction
Pretreatment	1st derivative		2nd derivative	
Range (nm)	1,500–1,650 and 2,000–2,450		1,650–1,850 and 2,000–2,450	
Factors	6		2	
Range (%)	0–0.6		0–2	
Samples ^a	32	17	28	20
Slope	0.99±0.02	1.02±0.04	0.98±0.03	1.00±0.05
Intercept	0.004±0.008	0.007±0.014	0.02±0.03	0.06±0.06
Correlation	0.993	0.987	0.991	0.980
RSEC/P (%)	6.2	10.6	7.4	10.7
RMSEC/P	0.023	0.043	0.087	0.153

^a A total of three and four anomalous samples were detected in constructing the models for Ad1 and Ad2, respectively. For this reason, the total number of samples used with each model was less than that of mixtures studied (52).

Table 6 Predicted values for the external validation samples

	Ad1			Ad2		
	Reference value (%)	NIR value (%)	Residual	Reference value (%)	NIR value (%)	Residual
M. Val 1	0.603	0.650	0.047	1.069	1.045	-0.024
M. Val 2	0.206	0.188	-0.018	0.314	0.291	-0.023
M. Val 3	0.109	0.146	0.037	1.300	1.540	0.240
M. Val 4	0.324	0.309	-0.015	0.000	-0.087	-0.087
M. Val 5	0.117	0.133	0.016	2.006	1.945	-0.061
M. Val 6	0.494	0.536	0.042	1.718	1.534	-0.184
M. Val 7	0.399	0.382	-0.017	0.610	0.687	0.077
M. Val 8	0.228	0.188	-0.040	0.608	0.611	0.003
RSEP (%)		9.0			10.2	
RMSEP		0.032			0.111	

NIR near IR, RSEP relative standard error of prediction, RMSEP root mean square error of prediction.

in order to obtain a set allowing a robust model to be developed even though only the two additives could be determined. The design, which involved the 52 samples listed in Table 1, is virtually orthogonal as shown by the correlation coefficients between the concentration vectors for each factor (Table 3) that are near to zero.

In order to construct each model, the body of samples was split into two sets, one being used to establish the calibration model and the other to validate the calibration model and to assess its predictive ability. We assessed the predictive ability from the values of the RSE and the RMSE. The model with minor values of the RSE and the RMSE is the one that will have the better predictive ability; in addition, it is advisable that the number of factors is minimal and the explained variance approaches 100% as much as is possible. The samples making up the calibration set for model Ad2 were selected by the joint use of a principal components analysis (PCA) plot in such a way that they would encompass the maximum possible spectral variability and the whole concentration range for each component of the mixture in a uniform manner. Figure 4 shows the PCA plot used to construct the Ad2 calibration model. The samples used to construct the Ad1 model were chosen following the same procedure, and so the samples of calibration set of Ad2 were different from those of set Ad1.

We constructed models from absorbance, first-derivative, second-derivative and standard normal variate treated data. The pretreatment giving the best results was the first spectral derivative for Ad1 and the second for Ad2 (Table 4).

The target wavelength ranges were chosen with consideration of the influence of water on NIR spectra as the mixtures were slightly hygroscopic. Water exhibits two characteristic absorption bands in the NIR region: one at 1,450 nm corresponding to the first overtone of the OH bond and the other, a combination band, at 1,940 nm. The

ranges of the absorption bands for water were excluded from both models as including them led to poorer predictions. Only those spectral zones where absorption of the analyte exceeded that of the other species present in the mixture were examined.

Table 5 shows the figures of merit of each model for the additives. The intercepts and slopes of the plots of the predicted values versus the reference values for each calibration and prediction model were close to 0 and 1, respectively; therefore, the models were free of systematic errors.

The PLS method developed was validated with a new sample set prepared in the laboratory. These samples had different concentrations and raw materials from those used to construct the model (Table 6). The statistical values for external validation were RMSE of prediction (RMSEP) of 0.032 for Ad1 and 0.111 for Ad2, neither of which differs significantly from the RMSEP for the validation samples of the respective models (Table 5). These values testify to the quality of the models, which provide acceptable predictions for external samples; therefore, the proposed models provide an accurate description of the body of experimental samples.

Table 7 Results of the analysis of the production samples

	PA		PB	
	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2
Number of samples	26		27	
Dose (%)	0.32	1.54	0.35	0.4
Mean NIR value (%)	0.31 ± 0.02	1.49 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.04
Range (%)	0.18 – 0.51	1.12 – 1.86	0.20 – 0.46	0.10 – 0.60

Finally, we analysed production samples, obtained in different stages of the production process, in order to check the applicability of the calibration models on an industrial level. We studied two types of production samples (viz. PA and PB, which are used for a different purpose and differ in their additive contents). Table 7 summarizes the predicted results for both. The average NIR values were not significantly different from the theoretical dosing values; however, the concentration range they spanned suggests that the additives were incorrectly dosed or that the mixture was poorly blended in some cases. These results reveal that the quality of the end product can be improved by properly controlling the production process.

Conclusions

The proposed hexagonal antiprism design, which is virtually orthogonal, is effective with a view to choosing an appropriate set of samples in order to construct a calibration model encompassing the variability sources in the additives of mortar. In fact, the design includes the wide chemical variability (viz. nature and composition of the components of the mixture) in the samples in a small set of mixtures. NIR spectroscopy, which had never previously been used for this purpose, has proved an effective choice for controlling and determining organic additives in

mortars. This can help ensure quality in the end product and provide a method for identifying potential failures in the production system.

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

References

1. <http://www.anfah.org>
2. <http://www.efca.info>
3. <http://www.toolbase.org/techinv/techDetails.aspx?technologyID=159>
4. <http://www.cenorm.org>
5. <http://www.astm.org>
6. <http://www.iso.org>
7. Kramer R (1998) Chemometric techniques for quantitative analysis. Dekker, New York
8. Montgomery DC (2001) Design and analysis of experiments, 5th edn. Wiley, New York
9. Haswell SJ, Walmsley AD (1999) Anal Chim Acta 400:399–412
10. Gil Libarona MA, Iñon FA (2005) Anal Chim Acta 536:159–169
11. Madan J, Dwivedi AK, Singh S (2005) Anal Chim Acta 538:345–353
12. Ferré J, Rius FX (1997) Trends Anal Chem 16:70–73
13. Doehlert DC (1970) Appl Stat 19:231
14. Umetrics (2001) MODDE 6 user guide and tutorial. Umetrics, Umeå

An expeditious method for determining
particle size distribution by near infrared
spectroscopy:

Comparison of PLS2 and ANN models

Talanta (2008), 77, 647



An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: Comparison of PLS2 and ANN models

Marcelo Blanco*, Anna Peguero

Departament de Química, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2008

Received in revised form 19 June 2008

Accepted 3 July 2008

Available online 16 July 2008

Keywords:

Particle size distribution

PLS2

ANN

NIR spectroscopy

ABSTRACT

The particle size distribution of a solid product can be crucial parameter considering its application to different kinds of processes. The influence of particle size on near infrared (NIR) spectra has been used to develop effective alternative methods to traditional ones in order to determine this parameter. In this work, we used the chemometrical techniques partial least squares 2 (PLS2) and artificial neural networks (ANNs) to simultaneously predict several variables to the rapid construction of particle size distribution curves. The PLS2 algorithm relies on linear relations between variables, while the ANN technique can model non-linear systems.

Samples were passed through sieves of different sieve opening in order to separate several size fractions that were used to construct two types of particle size distribution curves. The samples were recorded by NIR and their spectra were used with PLS2 and ANN to develop two calibration models for each. The correlation coefficients and relative standard errors of prediction (RSEP) have been used to assess the goodness of fit and accuracy of the results.

The four calibration models studied provided statistically identical results based on RSEP values. Therefore, the combined use of NIR spectroscopy and PLS2 or ANN calibration models allows determining the particle size distributions accurately. The results obtained by ANN or PLS2 are statistically similar.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many industrial products are solids consisting of particles of variable size and shape. An accurate knowledge of the physical dimensions of the particles in raw materials can be crucial with a view to ensuring proper development of a production process or the desired properties in the end product. Many industrial pharmaceutical processes involve transferring homogeneous mixtures of ingredients (active principle and excipients) to various production zones without altering their uniformity or detracting from the physical properties sought in the end product—in fact, the flowing properties of powdered solids depend strongly on their particle size and shape. Granulating powders in order to facilitate product transfer and determining particle size distribution are two frequent operations in this context. Also, the stability of a suspension depends largely on the particle size of the dispersant; ensuring such stability is crucial for purposes such as the production of plastic paints, – which typically consist of aqueous emulsions of a vinyl or acrylic resin – inks or drugs formulated as suspensions of the

active principal ingredient (API) in sweetened water. Particle size distribution is also strongly influential on the quality of building mortars, where too high or too low a proportion of small particles can alter some properties such as the workability of wet mortar, its hardening time or its strength once cured. The previous examples testify to the importance of particle size in various industrial fields and of developing expeditious, reliable methods to determine it.

The determination of particle size distribution has been approached in various ways depending on the accuracy and precision required, and also of the size discrimination level to be reached. Laser diffraction analysis [1–4] is probably the most widespread choice by virtue of its affording measurements over a wide range of particle sizes (0.05–3500 μm). Scanning electron microscopy and sieving [5–6] are also widely used for this purpose. The latter provides a simple method for determining particle size distribution by passing the sample through a series of sieves of variable sieve opening and weighing the fraction retained on each sieve.

Particle size is known to influence NIR spectra [7]. Its effect has frequently been deemed undesirable or disturbing with a view to the subsequent processing of data. This has promoted its lessening or the use of some sample pretreatment (e.g. sieving) in order to ensure uniformity prior to recording the NIR spectrum or subjecting the spectrum to a common spectral treatment such

* Corresponding author. Tel.: +34 935811367; fax: +34 935811367.
E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

as multiplicative scatter correction (MSC), standard normal variate (SNV), detrending or derivation.

Studies on the use of NIR to determine particle size have so far focused on predicting an average particle size (whether the mass median particle size or the mean particle diameter) [1,4,8]; by contrast, few have aimed at determining particle size distribution [9,10]. O'Neil et al. [9] determined cumulative particle size distributions by applying multiple linear regression (MLR) or principal component regression (PCR) to each individual variable to be predicted and found the latter to provide the better results; in fact, PCR afforded accurate predictions of particle size from NIR data, but required constructing one calibration model per target variable. In subsequent work [10], he used a single calibration model, of the partial least squares 2 (PLS2) type, to simultaneously obtain the whole particle size distribution curve for samples of microcrystalline cellulose reference values for which had previously been determined by laser diffraction analysis.

Extracting analytically useful information from a NIR spectrum entails using a multivariate calibration technique such as those employed in the previous studies [1,4,8–10]. In this work, we used the calibration techniques PLS2 and artificial neural networks (ANNs). The PLS2 algorithm [11], which is an extension of that originally developed by Wold et al. [12] and Martens and Næs [13], calculates latent variables by aiming at the largest possible covariance between the variables X (NIR spectra) and Y (the n properties to be determined), models all Y variables simultaneously and provides a calibration model for the n properties. Simultaneously modeling all variables has the advantage that it allows a single model to be used to predict all; also, it is especially suitable when the Y variables are correlated. However, it fails to provide the best possible model for each individual variable. This algorithm requires a bilinear model.

We also used the ANN algorithm [14–16], which, unlike PLS2, assumes no linear relationship between X (the NIR spectra or latent variables) and Y (the properties to be determined). Artificial neural networks are trained until they “learn” the nature of the relationship between their inputs and outputs.

The primary aim of this work was to develop a working methodology for determining particle size distribution. To this end, we comparatively examined the predictive ability of four calibration models based on two different algorithms (*viz.* PLS2, which assumes a linear relationship between NIR spectra and particle size distribution, and ANN, which assumes no linear relationship); the models were applied to size distribution curves constructed from a different number of points (*viz.* 13, including 2 unresolved maxima, and 8, with a single maximum).

2. Experimental

2.1. Samples

The sample is an aggregate, a natural product composed basically by silicon dioxide. A total of 30 samples of aggregate, with different particle size distributions were studied. All were prepared by mixing variable proportions of two types of aggregate also differing in average particle size and size distribution.

2.2. Instrumentation and software

Spectra were recorded on a Foss NIRSystems 6500 spectrophotometer equipped with a rapid content analyser (RCA) module. The instrument was governed via the software Vision v. 2.51, also from NIRSystems.

Each sample was sieved with a BA100-N Sieve Shaker from CISA (Barcelona, Spain).

PLS2 models were constructed by using The Unscrambler v. 9.2 from Camo and the ANN models by using ANN toolbox in Matlab v. 7.0.

2.3. Reference method

An amount of *ca.* 100 g of each sample was sieved to obtain 13 fractions of different particle size. The sieve opening of the 12 sieves used was 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200, 0.250, 0.300, 0.400, 0.500 and 1.000 mm, respectively. The fraction passing through all sieves (<0.050 mm in size) was also collected. Each fraction was weighed on an analytical balance in order to calculate the proportion of sample retained by each sieve with a view to constructing a particle size distribution curve.

In order to examine the predictive ability of the ensuing models (PLS2 and ANN) over resolution curve, we prepared another curve with less data points. The new reference curve was obtained by sum of the fraction weights of two consecutive sieves (*e.g.* 0.100 and 0.125 mm), in this way a new value of mass was obtained and the fraction was renamed like tighter sieve. This calculation provided eight new fractions and therefore a new Y data set, which draws a curve with minor resolution, than previous one. These new combined fractions were used to study the influence on resolution in different chemometrical models.

2.4. Recording of NIR spectra

Near infrared reflectance spectra were recorded at 2-nm intervals over the wavelength range 1100–2500 nm by placing the powdered samples in glass cells and using a ceramic plate as reference. Each spectrum was the average of 32 scans and an aliquot of each sample (3–4 g) were measured in triplicate, with turnover between recordings.

2.5. Construction of models and processing of data

Spectral data were subjected to the following treatments: standard normal variate (SNV), and first and second derivative. Both spectral derivatives were obtained by using the Savitzky–Golay algorithm with a second-order polynomial and an 11-point moving window. PLS2 models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The optimum number of PLS2 components was taken to be that minimizing the least squares difference between the reference value and the measured parameter.

Artificial neural network models were constructed from a reduced number of variables, using the scores of a PCA of the second-derivative spectra over the wavelength range 1100–2450 nm as inputs. The specific network architecture used was of the back-propagation type and subjected to supervised training on a selected body of samples (the test set). Back-propagation training involved feeding the network with an input and propagating it in order to obtain an output. The output was then compared with the correct response in order to determine the prediction error. Finally, the weight of each connection to an output unit was adjusted in the appropriate direction in order to reduce the error.

The transferred functions used with ANNs can be of the non-linear, linear and threshold types. We used a non-linear sigmoidal (*tansig*) function for the input layer and found the *puerlin* function to provide the best results for the hidden layer.

The number of nodes in the output layer coincided with that of fractions used to construct the particle size distribution curve.

The goodness of the results provided by the different models was assessed via the relative standard error (RSE):

$$\text{RSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (Y_{ij}^{\text{NIR}} - Y_{ij}^{\text{REF}})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m Y_{ij}^{\text{REF}^2}} \times 100$$

3. Results and discussion

One of the primary aims of this study was to establish an effective working methodology for determining the distribution of particle sizes in powders applicable to all types of samples, whichever their nature. To this end, we used an inorganic sample, namely: an aggregate consisting largely of silica – which exhibits low absorption in the NIR region – in an average particle size similar to those of intermediate granulates in industrial drug production processes. We assessed the goodness of fit obtained as a function of the size resolution of the sieving system (7 or 12 sieves) and the linear (PLS2) or non-linear nature (back-propagation ANN) of the algorithm used to construct the models.

The first question to be answered was how the NIR spectrum would be affected by variability in particle size. Fig. 1 shows the NIR spectra for several samples with different particle size mean. As can be seen, the spectral profiles were identical in shape; however, there were substantial baseline shifts between consecutive groups of samples as a result of differences in particle size—the greater the particle size, the higher the absorption in the NIR region.

Ensuring an adequate predictive ability in a multivariate model is known to entail using a calibration set containing all possible sources of variability in the samples to be predicted; this in turn relies on appropriate selection of the samples. Spectral variability can be exposed by using principal component analysis. The scores plot of Fig. 2 shows the distribution of samples in the PCA space. As can be seen, the samples clearly clustered in two groups reflecting the same differences previously observed in the absorbance spectra (see Fig. 1), i.e. those in particle size between samples, the cluster on top encompassing the samples with the greater particle sizes. The samples to be included in the calibration and prediction sets, which are shown in Fig. 2, were chosen by visual inspection of the scores plot and in such a way as to ensure that both sets would include the typical spectral variability of the samples.

The wavelength ranges for application of the PLS2 models were selected in terms of the positions of the spectral bands for the aggregate (1350–1460 and 1850–2450 nm) (see Fig. 1). This allowed NIR spectral zones of low absorption or containing noise only to be excluded, and each regression model to be constructed from those zones containing useful information about the target variable.

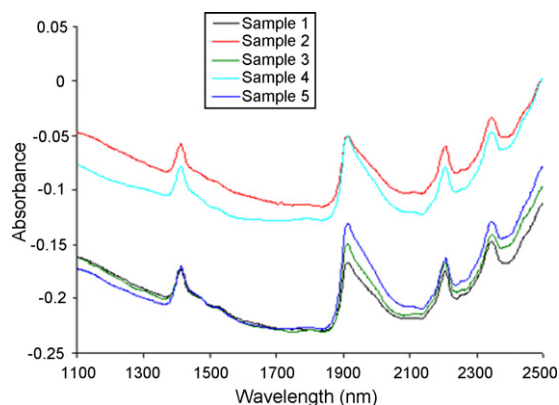


Fig. 1. NIR spectra for selected aggregate samples.

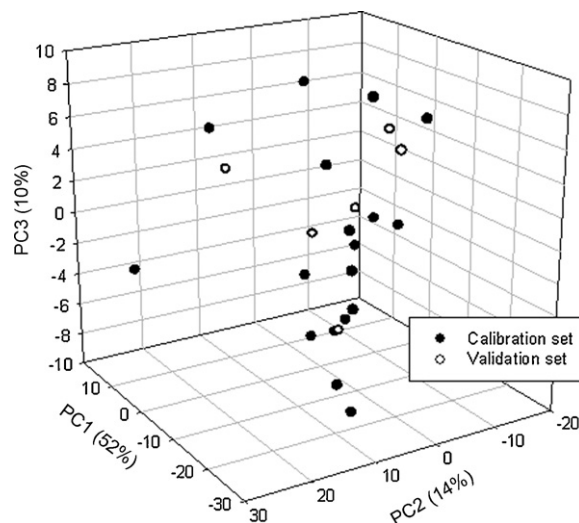


Fig. 2. PCA scores plot obtained from the second-derivative spectra for selected aggregate samples.

The usual sample pretreatments fail to completely suppress the above-described shifts resulting from differences in particle size. Also, the SNV algorithm failed to accurately classify spectra according to particle size; on the other hand, the second-derivative spectra for the sieved fractions afforded accurate classification (see Fig. 3) from all spectral bands. The spectra for the finest fractions (0 and 0.050 mm) and the coarsest one (>1 mm) could not be recorded owing to the inadequate amounts obtained after sieving.

The ability of derivative spectra to discriminate samples according to particle size led us to adopt this spectral treatment to construct the calibration models; second-derivative spectra provided even better predictions than first-derivative spectra.

We tested both PLS2 and ANN because the two afford the simultaneous quantitation of n variables. However, we discarded using PLS models, even though they were highly likely to provide better predictions than the sole PLS2 model employed since PLS models variables one by one rather than as a whole. In fact, we chose to sacrifice the predictive ability of PLS in order to be able to use a single PLS2 model to predict particle size distribution in an expeditious manner. Also, the undeniable correlation between the predictor variables further warranted using PLS2.

We constructed two PLS2 models from second-derivative spectra to obtain particle size distribution curves consisting of 7 and 12 points (sieves). The results are shown in Table 1, and the RSEC

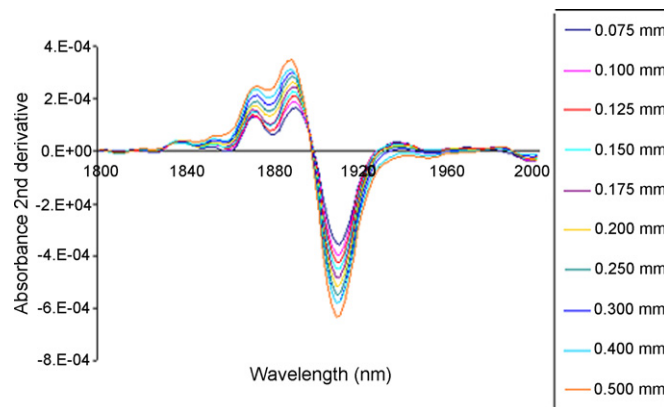


Fig. 3. Comparison of the second-derivative spectra in the 1800–2000 nm region for different particle size fractions.

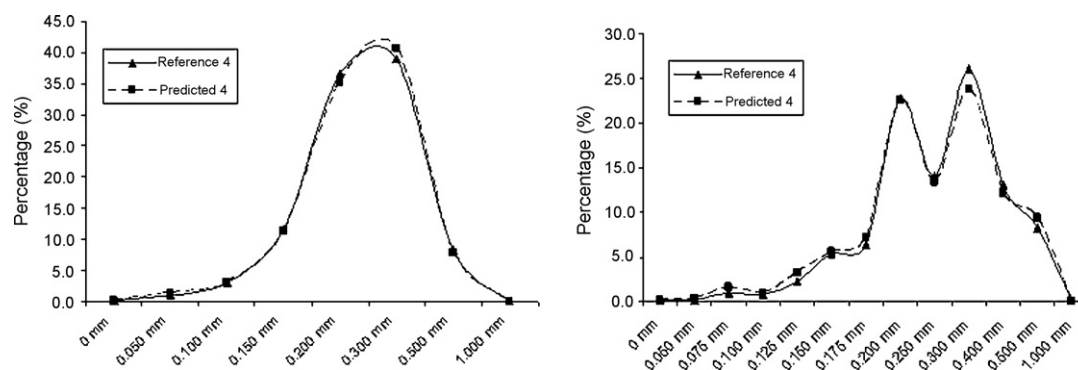


Fig. 4. Predicted particle size distribution curves for sample 4 as obtained by using PLS2 calibration models constructed from 7 (left) and 12 variables (right).

Table 1
Parameters for the best PLS2 calibration models

	Calibration	Prediction	Calibration	Prediction
Number of sieves		7		12
Pretreatment		2nd derivative		2nd derivative
Range (nm)		1350–1460, 1850–2450		1350–1460, 1850–2450
PLS factors		3		8
Samples	19	6	19	6
RSEC/P%	8.7	8.6	2.6	7.6

Table 2
RSEC and RSEP for the PLS2 models with 7 variables

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
RSEC	11.0	10.0	8.7	11.3	13.0
RSEP	8.9	8.8	8.6	10.7	11.2

and RSEP values for the ensuing models in Tables 2 and 3 (the best results are in bold). As can be seen, the number of factors resulting in the lowest RSEP with the 7 and 12 variables model was 3 and 8, respectively. Using a greater number of factors provided no further improvement in predictive ability with any model.

A comparison of the results provided by the two PLS models reveals that determining an increased number of variables required using a more complex mathematical model and hence an also greater number of PLS factors to account for variability and also, possibly, to correct non-linearity in the system—PLS is known to correct small deviations from linearity by using models expanded

Table 3
RSEC and RSEP for the PLS2 models with 12 variables

	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
RSEC	3.7	3.2	2.6	2.2	2.1
RSEP	8.3	8.1	7.6	7.6	7.6

Table 4
Operational parameters and figures of merit of the ANN calibration models

	Calibration	Prediction	Calibration	Prediction
Number of sieves		7		12
Pretreatment		2nd derivative		2nd derivative
Range (nm)		1100–2450		1100–2450
Data reduction		PCA (3PC)		PCA (9PC)
Input nodes		3		9
Transfer function to input layer		Tansig		Tansig
Hidden nodes		2		1
Transfer function to hidden layer		Puerlin		Puerlin
Output layer		7		12
Samples	18	6	21	6
RSEC/P%	11.2	5.6	7.2	7.9

with new factors. On the other hand, a comparison of the RSEP values for the two models (Table 1) reveals that both had a similar predictive ability.

We then constructed two calibration models by using ANN with 7 and 12 Y variables, respectively. Also, we reduced the number of variables by using the scores of a PCA as inputs in order to simplify the network architecture. However, reducing the number of variables can also reduce the spectral information that can be extracted from a system; this was avoided by using a variable number of principal components from 1 to 5 with the 7 variables network and up to 12 with the 12 variables network. The best results were provided by the networks shown in Table 4.

The model containing 7 Y variables was used with 3 PCs, which jointly accounted for 96.5% of the total variance; by contrast, the model involving 12 variables required 9 PCs, which accounted for 98.9% of the total variance. The increased number of inputs required by the latter model was an obvious consequence of the greater complexity of the curves. The number of neurons in the input layer, that of hidden layers, and that of neurons in each hidden layer, were optimized as a function of RSEP for the respective outputs. The optimum number of neurons in the hidden layer was 2 for the 7 variables model and 1 for the 12 variables model; both networks exhibited the lowest RSEP values among all studied.

As with the PLS2 models, the architecture of the network required for the 7 variables model was simpler than that for the 12 variables model (see Table 4). The increased complexity of the particle size profile with 12 variables called for a more complex network; even so, the 2 models provided essentially similar RSEP values.

By way of example, Figs. 4 and 5 show the reference and predicted particle size distribution curves obtained with the PLS and ANN models, respectively. As can be seen, the prediction curves fitted the reference curves quite closely. The correlation coefficient proved useful with a view to comparing the reference and NIR-predicted particle size profiles obtained with each model. As can be seen from Table 5, the average correlation coefficient for all mod-

Table 5
Correlation coefficients between the reference and predicted distribution curves

Sample	PLS2		ANN	
	7 variables	12 variables	7 variables	12 variables
1	0.98	0.97	0.98	0.97
2	0.95	0.93	0.99	0.95
3	0.92	0.96	0.99	0.94
4	1.00	1.00	0.97	1.00
5	0.97	0.98	0.98	0.99
6	0.99	0.99	0.99	0.99
Average	0.97	0.97	0.98	0.97

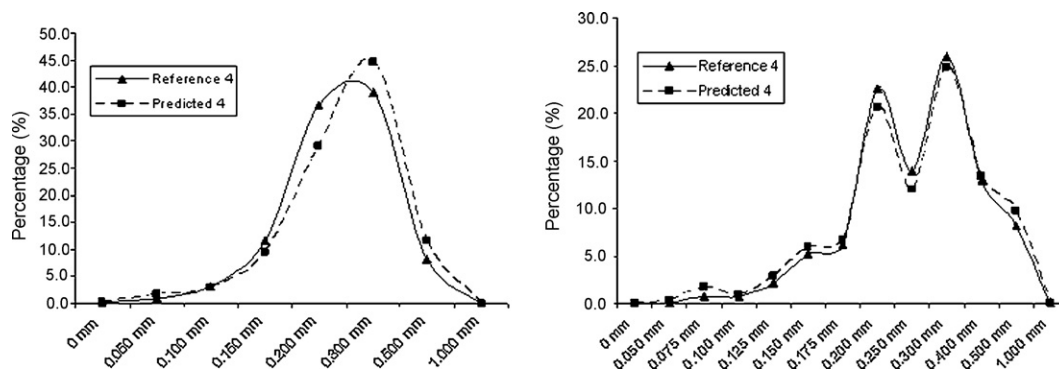


Fig. 5. Predicted particle size distribution curves for sample 4 as obtained by using ANN calibration models constructed from 7 (left) and 12 variables (right).

els was at least 0.97, which testifies to the high similarity of the reference and predicted curves. Tables 3 and 4 list the prediction errors in the particle size distribution curves obtained with the four studied models. As can be seen, RSEPs were statistically identical; also, they ranged from 5.6 to 8.6%, which is quite acceptable for the reference method used.

4. Conclusions

As confirmed in this work, NIR spectra contain information about particle size. Also, it allows particle size distribution curves essentially identical with those obtained by sieving to be constructed. Therefore, NIR spectroscopy is an effective choice for determining particle size distribution.

The four calibration models used were constructed from second-derivative spectra. Therefore, derivation not only retains the effects of particle size contained in a NIR spectrum, but also constitutes the most suitable treatment for this type of data.

Using models consisting of 7 and 12 Y variables revealed that an accurate prediction of particle size distribution does not depend on its particle size profile; in fact, both types of models provided similar results as regards percent error. However, the greater the number of variables required a greater number of factors to be used in PLS2 or neurons in ANN.

The PLS2 and ANN techniques approach the resolution of spectral problems differently; based on the correlation coefficients between the reference and NIR-predicted curves obtained in this work, however, they are equally effective with a view to obtaining accurate results.

Acknowledgement

The authors are grateful to Spain's MCYT for funding this research within the framework of Project CTQ2006-12923.

References

- [1] A.J. O'Neil, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst* 123 (1998) 2297.
- [2] O. Beerntsson, L.G. Danielsson, M.O. Johansson, S. Folestad, *Analytica Chimica Acta* 419 (2000) 45.
- [3] C. Marriot, H.B. MacRitchie, X.-M. Zeng, G.P. Martin, *International Journal of Pharmaceutics* 326 (2006) 39.
- [4] M. Otsuka, *Powder Technology* 141 (2004) 244.
- [5] C. Washington, *Particle Size Analysis in Pharmaceutics and other Industries Theory and Practice*, Ellis Horwood Limited, England, 1992.
- [6] ASTM D 6913 Standard Test Methods for Particle-Size Distribution (Gradation) of Soils Using Sieve Analysis.
- [7] M.C. Pasikatan, J.L. Steele, C.K. Spillman, E. Haque, *Journal Near Infrared Spectroscopy* 9 (1998) 153.
- [8] P. Frake, I. Gill, et al., *Analyst* 123 (1988) 2043.
- [9] A.J. O'Neil, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst* 124 (1999) 33.
- [10] A.J. O'Neil, R.D. Jee, A.C. Moffat, *Analyst* 128 (2003) 1326–1330.
- [11] R.G. Brereton, *Analyst Review* 125 (2000) 2125.
- [12] S. Wold, C. Albano, W.J. Dunn III, K. Esbensen, S. Hellberg, E. Johansson, M. Sjöström, in: H. Martens, H. Russworm (Eds.), *Food Research and Data Analysis*, Applied Science Publishers, London, 1983, p.147.
- [13] H. Martens, T. Næs, in: P.C. Williams, K. Norris (Eds.), *Near-Infrared Technology in Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, 1987, p. 57.
- [14] B.J. Wythoff, *Chemometrics and Intelligent Laboratories Systems* 18 (1993) 115–155 (tutorial).
- [15] J.R.M. Smits, W.J. Melssen, L.M.C. Buydens, G. Kateman, *Chemometrics and Intelligent Laboratories Systems* 22 (1994) 165–189 (tutorial).
- [16] F. Despagne, D.L. Massart, *The Analyst* 123 (1998) 157R–178R (tutorial).

Influence of physical factors on the
accuracy of calibration models for NIR
spectroscopy.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
(2010), 52, 59.



Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy

Marcelo Blanco*, Anna Peguero

Departament de Química, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2009

Received in revised form 3 December 2009

Accepted 4 December 2009

Available online 30 December 2009

Keywords:

NIRS

Chemical and physical factors

Pharmaceutical process

PLS model

API determination

ABSTRACT

The quality of pharmaceutical drugs is strongly influenced by a number of physical and chemical factors that require careful control during the production process in order to ensure that the end-product will meet the specifications. Near infrared spectroscopy has proved effective for monitoring changes in such factors and is currently the most widely used technique for controlling drug manufacturing processes. In this work, the authors determined an active pharmaceutical ingredient (API) throughout its production process. The influence of particle size, galenic form, compaction pressure and coating thickness on NIR spectra was evaluated with a view to developing effective methodologies for constructing simple, accurate calibration methods affording API quantization at different stages of a drug production process. All calibration models were constructed from data for laboratory samples alone and NIR calibration models for determining the API determination by using product weights as reference values. The proposed models were validated by application to samples obtained at three stages of a drug manufacturing process and comparison of the predicted values with HPLC reference values. The RSEP values thus obtained never exceeded 1.5%.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Near infrared (NIR) spectroscopy has been successfully used to determine the chemical composition and various physical properties of a number of pharmaceutical samples [1–5]. Multivariate calibration methods constitute essential tools for extracting quantitative information from NIR spectra. The use of calibration models in routine determinations is limited to the prediction of samples of nature and composition similar to those used in their construction. In addition, NIR models require using reliable reference methods [6] to both construct models and check their results.

Can the quality of a product at each step of its production process be assured by using a multivariate model constructed from laboratory samples alone? Properly answering this question requires a thorough knowledge of the production process, and also of the performance and constraints of the analytical methodology to be used to construct calibration models, which will obviously depend on those of the analytical measuring instrument.

Pharmaceuticals are subject to stringent national and international regulations as regards production and end-product characteristics compliance with which must be confirmed by using appropriate control analyses. In fact, a pharmaceutical end-product

must not be released until it has been checked to meet each and every specification. This is a complex, time-consuming process that delays parametric release and can adversely affect productivity at a drug production plant. Also, a product failing to meet some quality specification must be rejected or reprocessed, which obviously has adverse economic implications.

Most drugs are available in solid form, whether as single doses, capsules or tablets. Their production process includes mixing of the raw materials and, frequently, granulation. These steps are used to homogenize the active principle and excipients in order to ensure dosing and mass uniformity in the end-product. Obtaining an appropriate particle size upon granulation increases the fluidity of the solid and avoids disaggregation losses during transport [6] – and hence inhomogeneity.

Tablet production processes involve a tableting step and, frequently, a coating step as well. Prior granulation of the mixture of ingredients facilitates compression. Tablets should be compacted at a high enough pressure to avoid subsequent breaking, but not so high as to prevent disaggregation when it enters the body. Tablets are most often cylindrical or oblong in shape and have rounded edges to facilitate swallowing.

The last step in the tablet production process involves coating with a thin film of lacquer usually consisting of sugars or polymers. The film is intended to protect tablets from aggressive environmental agents, masking some unpleasant odour or flavour, or making them resistant to gastric juices in order to facilitate controlled release of the active pharmaceutical ingredient (API).

* Corresponding author. Tel.: +34 9 3 5811 712; fax: +34 9 3 5812 379.
E-mail address: marcel.blanco@uab.es (M. Blanco).

Some tablet production variables including grain size [1,7], compaction pressure [2], galenic form and coating [8,9] influence the properties of the end-product and thus require careful control. These variables have some effect on the NIR spectrum for the product and should therefore be considered in constructing a multivariate calibration model to determine its API content. This allows NIR spectroscopy to be used to monitor changes in these physical variables during the production process and quantify the API in each critical step.

Recent studies [10,11] have shown that NIR technology continues to effectively meet a number pharmaceutical challenges and be useful for determining a number of variables of pharmaceutical processes. Since the primary aim of this work was to develop effective calibration models for controlling the API in different steps of drug manufacturing processes with a view to facilitating their control from beginning to end, we examined various ways of developing simple, robust models for this purpose.

We assessed the potential of NIR spectroscopy for monitoring the API concentration during a drug production process and developed simple calibration models based on laboratory samples alone for quantifying the API in each step of the process. Since the physical factors influencing NIR spectra differ from stage to stage, their effects were evaluated on an individual basis with a view to their inclusion in the calibration set if judged significant. In this way, one can efficiently monitor a production process by using a simple calibration model that can be expanded as required by successive incorporation of additional sources of variability.

2. Experimental

2.1. Production samples

The pharmaceutical formulation studied contained a high proportion of API (63.5% ibuprofen) and the following four excipients: maize starch, avicel PH 102, aerosil and magnesium stearate. The major ingredients (ibuprofen and starch) were weighed in appropriate amounts and placed in the blender together with an appropriate amount of water before stirring to a homogeneous mixture that was then dried under a stream of hot air. The resulting granulate was sieved to obtain grains less than 2 mm in size, supplied with the other ingredients, all in dry form, mixed and re-sieved to obtain grains smaller than 1.5 mm. These granules were used to prepare two different types of cores in two galenic forms containing 400 and 600 mg of API, respectively (see Fig. 2). The cores were spray-coated with a lacquer dispersion to make the final, coated tablets, the most salient physical properties of which are shown in Table 1.

The lacquer was a dispersion of sepiFilm, sepisperse and polyethylene glycol in water.

All samples were kindly supplied by Kern Pharma, S.L. (Terrassa, Spain).

2.2. Laboratory samples

2.2.1. Powder samples (set A)

Laboratory samples were prepared by mixing appropriate amounts of API and various placebos in order to span a wide enough

concentration range for calibration. A total of 13 placebo mixtures at concentrations $\pm 5\%$ around the nominal content for each compound and exhibiting the lowest possible collinearity between concentration values were prepared by using a D-optimal experimental design.

Mixtures were prepared by weighing on an analytical balance and homogenizing in a solid blender.

A total of 34 API–placebo mixtures were prepared that spanned an ibuprofen concentration range of 80–120% the nominal value (viz. the drug concentration in production tablets).

2.2.2. Cores samples (set B)

Powder samples were compacted at pressures from 80 to 190 MPa to obtain laboratory cores. Two cores were obtained for each composition that were compacted at a variable, randomly selected pressure.

2.2.3. Cores samples (set C)

A set consisting of samples of production granulate was compacted at pressures from 35 to 260 MPa in order to determine the optimum compaction range. As with set B, the compaction pressure applied to each sample was randomly selected.

2.3. Spectrum for the lacquer coating

The average spectrum for the tablet coating was obtained by recording the individual spectra for 50 coated tablets from 5 production batches (10 tablets per batch) for each dose (400 and 600 mg). Then, each tablet was filed on one side and its NIR spectrum re-recorded. Subtracting the spectrum for the coated side (s_{coated}) from that for the filed side (s_{filed}) provided the difference spectrum (d_i) for each tablet. The average difference spectrum \bar{d}_i for each of 5 batches of 400-mg tablets and 600-mg tablets was then calculated and used to modify the core spectra:

$$d_i = s_{\text{coated}} - s_{\text{filed}}$$

$$\bar{d}_i = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

$$s'_{\text{coated}} = s_{\text{core}} + \bar{d}_i$$

where n is the number of difference spectra used, s'_{coated} the modified spectrum for the coated tablets and s_{core} the spectrum for a core.

The set of spectra thus obtained was taken to be the tablet sample set (D).

2.4. Hardware and software

Laboratory samples were homogenized in a Turbula T2C WAB shaker mixer and compacted in a cylindrical die with a cross-sectional area of 132.7 mm² on a Perkin-Elmer 15.011 press. Sample spectra were recorded on a Foss NIRSystems 6500 spectrophotometer equipped with a Rapid Content Analyser (RCA) module. The instrument was governed via the Vision v. 2.51 software package, also from NIRSystems. The D-optimal design was developed by using the software Modde v. 6.0 from Umetrics. Dendrograms were obtained by cluster analysis with the software SPSS v. 15.0 for Windows. PCA and PLS models were constructed by using The Unscrambler v. 9.8 from Camo Process.

Table 1
Characteristics of the production tablets.

	Type 1	Type 2
Shape	Cylindrical	Oblong
Weight by tablet (mg)	630	960
Weight of API (mg)	400	600
Pressure of compression (MPa)	120	155

2.5. Recording of NIR spectra

The NIR spectra for powder and granulate samples were recorded in glass cells that were placed on the window of the RCA module. Each sample was analysed in triplicate, with turnover between recordings, in order to obtain an average spectrum.

The spectra for the tablets, both round and oblong, were recorded by direct placement on the instrument window and irradiation of the smooth, unmarked side. Each sample was analysed in duplicate and turned a right angle between recordings in order to obtain an average spectrum.

2.6. Reference values

The reference values for the laboratory-made samples were obtained by direct weighing of each mixture.

Production samples were analysed by HPLC. An average API value for each batch was obtained by analysing 20 milled tablets. To this end, an amount of mass equivalent to one tablet was supplied with 40 ml of mobile phase (a 60:40, v/v acetonitrile/water mixture buffered at pH 3), stirred to complete dissolution—which took about 30 min—and made to 50 ml with mobile phase. An aliquot of the resulting solution was centrifuged for 5 min and the supernatant injected into the chromatograph. Ibuprofen was quantified by interpolating the chromatographic measurement into a calibration curve previously constructed by using isobutylacetophenone as internal standard. The result was taken to be the batch content.

The same methodology was used to analyse granulate except that the amount of sample used was equivalent to one tablet.

All concentrations are given as percentages of the nominal value for the studied preparation, which was taken to be 100%.

Although the HPLC values were only compared with the NIR values, they were used to construct the models.

2.7. Construction of calibration models

Similarity between laboratory and production samples in each step of the production process was assessed by principal component analysis and/or cluster analysis (dendrograms).

PLS multivariate regression models were constructed at concentrations over the range 80.0–20.0% of the nominal value. One PLS model was constructed for each type of sample representing one step of process (*viz.* granulate, cores and tablets). The results were acquired over various wavelength ranges and subjected to different spectral treatments. The joint use of the whole wavelength range (1100–2500 nm) and the standard normal variate (SNV) treatment was found to provide the best results.

PLS calibration models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method. The optimum number of factors was selected in terms of the relative standard deviation (RSE):

$$RSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{NIR} - Y_i^{REF})^2}{\sum_{i=1}^m Y_i^{REF^2}}} \times 100$$

Thus, the best model (*viz.* the model with the highest predictive ability) was taken to be that leading to the lowest RSE for the prediction set of laboratory samples. Thereafter, the predictive ability of the model for granulate samples was assessed with 12 production batches; that for cores with 5 batches of each dose; and that

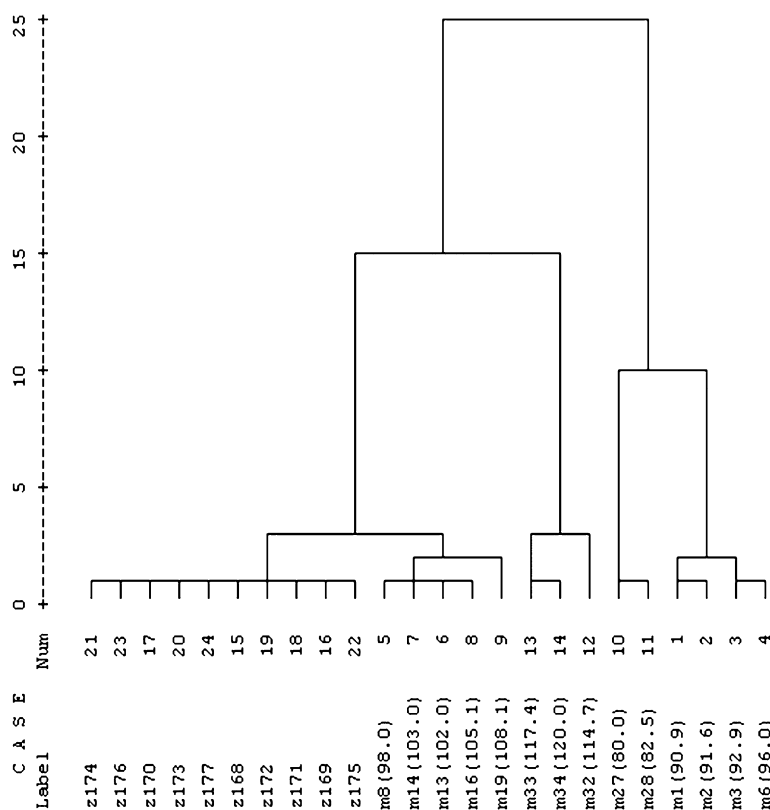


Fig. 1. Dendrogram for laboratory mixtures (m1–m34) and production granulates (z169–z177) constructed from the first two factors of a PCA (97.4% of explained variance) based on spectral data obtained over the wavelength range 1100–2500 nm and corrected with SNV. The API contents of the laboratory samples are given as percentages in brackets.

Table 2
Figures of merit for calibration models.

	Powder model			Cores model				Tablet model			
	Cal lab	Pred lab	Pred prod	Cal lab	Pred lab	Pred 400	Pred 600	Cal lab	Pred lab	Pred 400	Pred 600
Pretreatment	SNV			SNV				SNV			
Range (nm)	1100–2500			1100–2500				1100–2500			
No. of PC	2			4				5			
Variance Y (%)	99.2			99.7				99.7			
No. of samples	21	7	12	26	10	5 ^a	5 ^a	42	20	10 ^a	18 ^a
RSEC/P	0.88	0.69	1.75	0.69	1.23	1.47	1.12	0.68	1.18	1.34	1.23
Bias	1.1×10^{-6}	-0.16	1.33	2.3×10^{-6}	-0.58	-1.15	0.60	1.1×10^{-6}	-0.18	-0.66	-0.25

^a Number of analysed batches. Each batch is an average of 10 tablets.

for tablets with 10 batches of the 400 mg formulation and 18 of the 600 mg formulation.

The average value for each production batch was obtained from the spectra for 10 tablets.

3. Results and discussion

The primary aim of this work was to construct models from laboratory samples alone (*i.e.* by using no reference method) with a view to predicting samples from various steps of the production process.

One of the major sources of variability to be considered in constructing a calibration set is the target concentration range. The ICH guidelines [12] recommend that the API concentration range spanned by models for assessing a pharmaceutical end-product be $\pm 20\%$ around the nominal value. This was the specific target adopted in our study. Also, placebos were prepared in such a way as to span a range of $\pm 5\%$ around the nominal value for each excipient in order to account for potential differences in their concentrations and minimize correlation between them with a view to ensuring robustness in the ensuing model.

3.1. Influence of particle size on NIR spectra. API determination in granulates

Success in developing an accurate calibration model relies heavily on the availability of a large enough set of calibration samples with characteristics similar to those to be predicted. The most salient difference between laboratory-made and production samples is that particle size; in fact, laboratory samples (set A) are powder mixtures whereas production samples are frequently granulated prior to processing. Properly processing spectral data can help reduce differences. The SNV treatment is known to be especially effective in reducing spectral differences due to particle size differences [13], which led us to adopt it for our spectral data.

In order to identify potential differences between spectra, the results for laboratory-made powder samples and granulate production samples were subjected to cluster analysis following application of the SNV treatment. The dendrogram was constructed by using average linkage in conjunction with the square of the Euclidean distance in the principal component space as similarity

parameter. It was obtained from the first two PCs for whole spectra (1100–2500 nm) subjected to SNV, which jointly accounted for 97.4% of the total variance (see Fig. 1). The dendrogram revealed a high spectral similarity between production and laboratory samples (particularly in those with API contents near the nominal value); therefore, a model constructed from laboratory samples alone can be expected to provide accurate predictions.

Powder laboratory samples were split into two sets that were used to construct the PLS calibration model and assess its predictive ability, respectively. The two in combination spanned a concentration range $\pm 20\%$ around the nominal value.

Table 2 shows the figures of merit of the model, which is applicable to both powder and granulate samples. As can be seen from the RSEP values, the predictions differed very little from the values for the powder laboratory samples. Therefore, an SNV treatment suffices to suppress differences between powder (laboratory-made) samples and production granulate samples, and the NIR model is useful for both.

3.2. Influence of galenic form and compaction pressure on NIR spectra. API determination in cores

During the production process, the granulate is compacted to obtain two types of cores of different shape (Fig. 2) and weight but identical in composition. Predicting the API content in cores with the model for granulates led to systematic errors in the determination. In fact, the contents of the 400 and 600 mg formulations were both overestimated (by 1.1% and 5.0%, respectively). The latter error was large enough to justify constructing an alternative, more accurate model.

The batch cores differed from the laboratory-made cores (set B) in that the former were smaller and flat-surfaced, and also in their compaction pressure. Both types of production cores had a slightly curved surface that might affect diffuse reflectance measurements. Also, the laboratory cores (set B) were flat on both sides; because they were used as samples to construct the calibration model, checking that the differences in surface characteristics between the two types of cores would have no effect on measurements was an essential pre-requisite. To this end, 10 cores (uncoated tablets) containing 400 mg of API and another 10 cores containing 600 mg were filed as needed to leave the contact surface with the quartz window fully

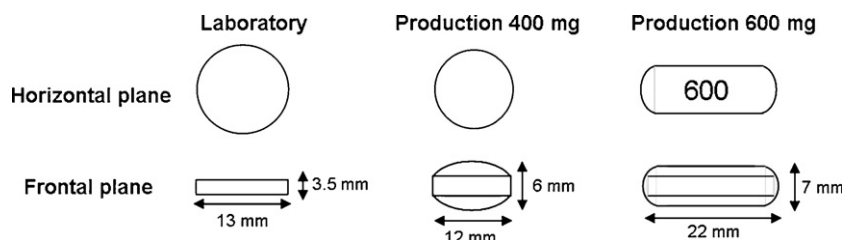


Fig. 2. Shape and dimensions of the three types of cores and tablets.

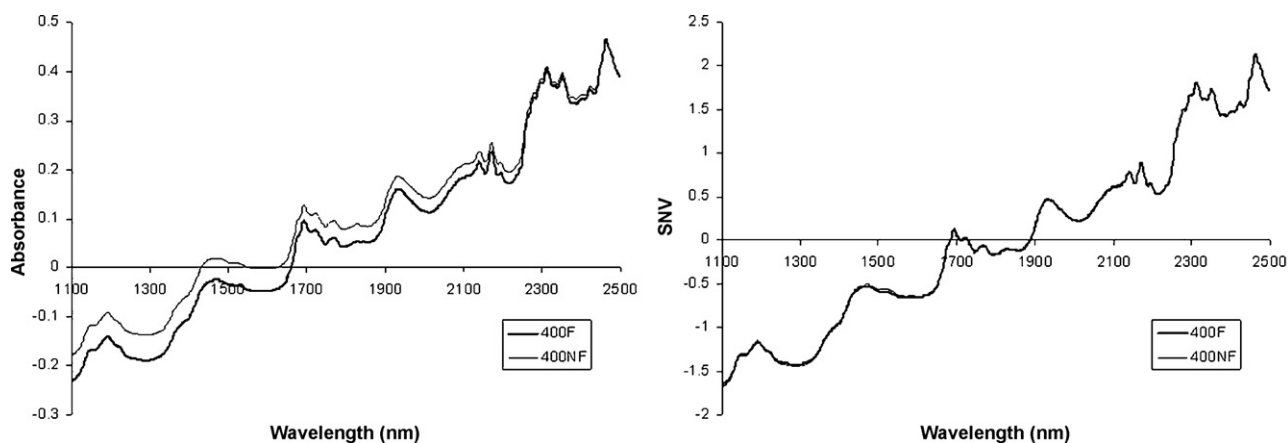


Fig. 3. Comparison of the absorbance and SNV-corrected spectra for a filed 400 mg core (400F) and an unfiled core with the same API content (400NF).

flat in order to make them as similar to the laboratory tablets as possible. NIR spectra for the cores were recorded before and after filing. Fig. 3 shows the absorbance and SNV-corrected spectra for a core prior to (400NF) and after filing (400F). As can be seen, the absorbance spectrum exhibited a shift that was efficiently corrected by the SNV treatment.

A dendrogram for laboratory cores, and filed and unfiled production cores, was obtained by using average linkage and the Euclidean distance squared in conjunction with the first two factors of a principal component analysis, which jointly accounted for 96.0% of the variance. Fig. 4 shows the dendrogram obtained by using the spectra for filed 400 mg cores (400F), unfiled 400 mg cores (400NF), and the ten 600 mg cores before (600NF) and after filing (600F). As can be seen, the production cores clustered together with the laboratory cores containing an API concentration near its nominal value. Both filed and unfiled cores lay close to the laboratory cores containing near 100% of the nominal concentration, which indicates that variability due to core curvature was unimportant.

The tablet compression pressure is one other factor influencing NIR spectra: the higher it is, the greater is the shift in the NIR spec-

trum. One way of correcting this effect is by expanding a calibration set consisting of powder samples with production cores in order to introduce variability due to the compaction pressure and improve predictive ability—all at the expense of using a greater number of PLS components and making the model more complex as a result [14]. Because one of our aims was to avoid the need to use production samples for calibration, this entailed using a calibration set consisting of cores compacted at pressures similar to those for the production tablets. This required the prior determination of the compaction pressure for the production samples and preparing laboratory cores compacted at pressures over an appropriate range. To this end, the production granulate was used to prepare a series of cores (set C) that were compacted at 35–260 MPa. Fig. 5 shows the results of a PCA of the spectra for set C samples and the average spectra for several batches of 400 and 600 mg cores; spectra were recorded throughout the wavelength range and subjected to SNV treatment. The first PC contained the spectral variability due to the compaction pressure; based on the results, the 400 mg cores were pressed at a lower pressure than the 600 mg cores. All production cores were pressed at 80–190 MPa, which was thus the selected

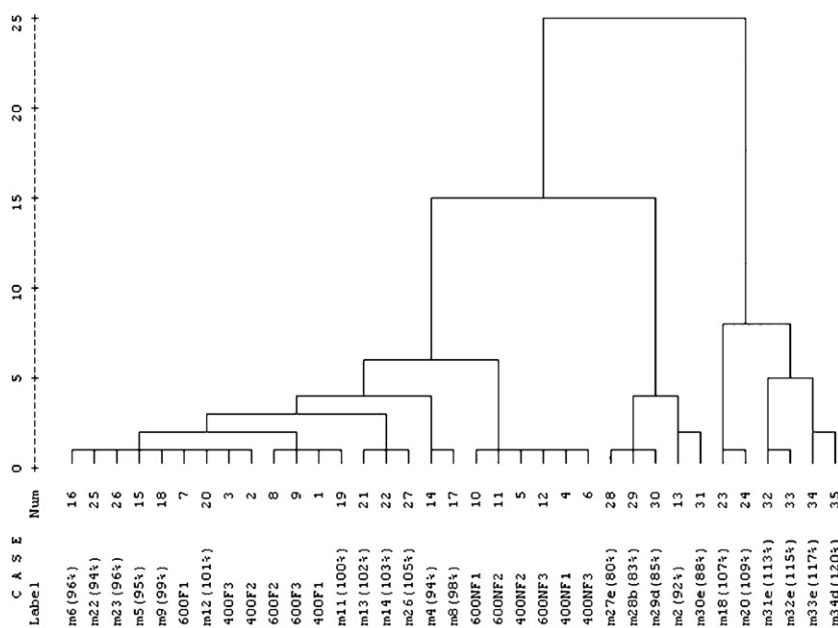


Fig. 4. Dendrogram for laboratory cores (m1–m34) and filed (400F and 600F) and unfiled production cores (400NF and 600NF) constructed from the first two factors of a PCA (96.0% of explained variance) based on spectral data obtained over the wavelength range 1100–2500 nm and corrected with SNV. The API contents of the laboratory samples are given in brackets.

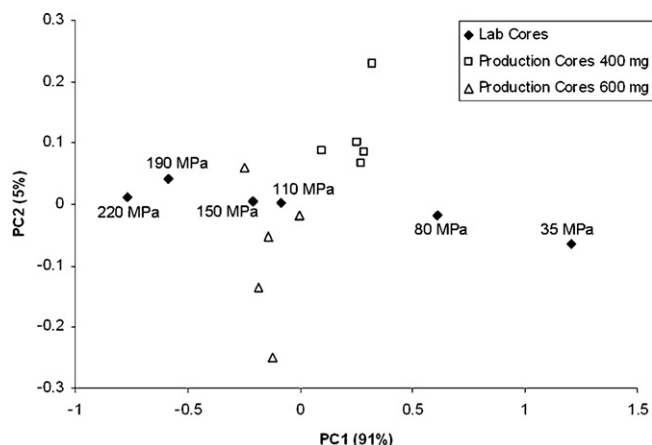


Fig. 5. Scores plot of a PCA based on spectral data acquired over the wavelength range 1100–2500 nm and corrected with SNV for production cores and laboratory cores pressed at variable compaction pressures (35–260 MPa).

range for pressing the laboratory cores and constructing the API quantization model. Although differences in the second PC, which accounted for 5% of the variance, were not examined in depth, they can be ascribed to physical differences (e.g. geometric shape) or reflectance changes by effect of core geometry.

The calibration model for the production cores was constructed from the spectra for set B cores alone since, as shown before, tablet surface curvature had no substantial effect on the spectral results. Based on the data of Fig. 5, the calibration set was built from samples with API contents 80–120% the nominal value and pressed at 80–190 MPa.

Table 2 shows the figures of merit of the model used to quantify the cores. The RSEP values shown correspond to 5 batches of 400 mg cores and 5 of 600 mg cores; the RSEP values for 400 mg and 600 mg were 1.47% and 1.12%, respectively, and similar to those for the laboratory samples (1.23%), which confirms that the surface curvature of the production cores has absolutely no effect on their NIR spectra and also that the proposed model provides accurate predictions of their concentrations.

3.3. Influence of the lacquer coating on NIR spectra. API determination in tablets

In the last step of the drug production process, cores are coated with a thin film of lacquer to obtain the final tablets. The coating introduces three new chemicals in the formulation which together account for about 2% by weight of the 600 mg tablets and 5% of the 400 mg tablets. Using the core model to predict production tablets resulted in underestimation, with residuals of 19.3% for the 400 mg tablets and 7.6% for the 600 mg tablets. Therefore, the 400 mg tablets—those with the thicker lacquer coating—were quantified with greater errors than the 600 mg tablets. This can be ascribed to increased attenuation of radiation by effect of its crossing a thicker layer in the former formulation. The substantial influence of the coating film on the NIR spectra for the tablets led us to incorporate it into the API calibration model.

Differences in lacquer coating thickness can be quantified by visual inspection of the scores plot of a PCA for cores and coated tablets. As can be seen from Fig. 6, the 600 mg tablets, which were coated with a thinner film, were more similar to the cores than was the set of 400 mg tablets, which had a thicker coating. The cores clustered on the left of the scores graph and exhibited low dispersion; by contrast, the coated tablets scattered on the right and middle of the graph. This result confirms that coating leaves a lacquer film of variable thickness.

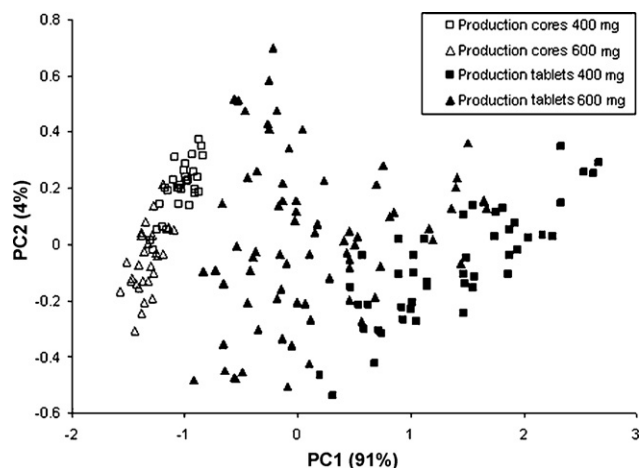


Fig. 6. Scores plot of a PCA based on spectral data acquired over the wavelength range 1100–2500 nm and corrected with SNV for production cores and coated tablets.

The high variability in coating thickness and the difficulty of accurately reproducing such variability in the laboratory led us to obtain 5 average spectra for the coating in 400 mg tablets—the thicker—and another 5 for that in 600 mg tablets—the thinner—which were obtained as described in Section 2.3. The average coating spectra were combined separately at random with those for the laboratory cores in order to obtain a new matrix of spectral data (set D) incorporating coating variability in addition to concentration and compaction pressure variability (80–120% of the API nominal value and 80–190 MPa, respectively). Fig. 7 shows the scores plot for PCA of SNV-treated spectra data recorded over the 1100–2500 nm wavelength range for the laboratory cores as corrected with the average spectrum for the lacquer coating and coated production tablets—each spectrum was the average of those for 10 production tablets from the same batch. As can be seen, the spectra for the coated production tablets clustered together with those for the laboratory cores as corrected for the coating spectrum.

Similarly to the previous models, set D was split into two that were used to construct the calibration model and assess its predictive ability, respectively. Finally, the model was used to predict production tablets and obtain the average API content for each batch. Table 2 shows the figures of merit of the calibration model. As can be seen, the RSEP values for the production samples differed little from those for the laboratory tablets. Therefore, the model constructed from laboratory-made samples can be used to accu-

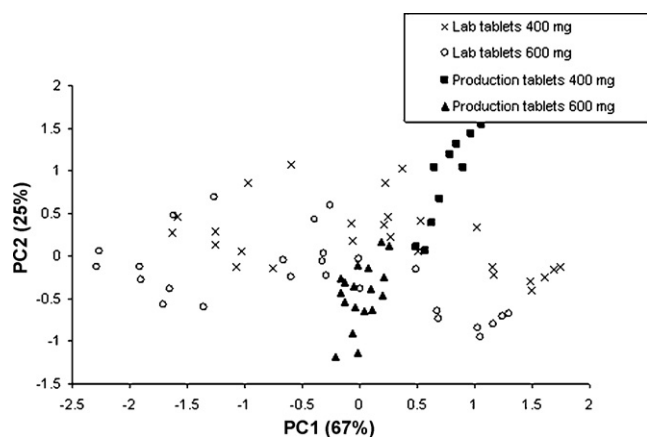


Fig. 7. Scores scatter plot for modified tablet spectra (set D, see the text) acquired over the wavelength range 1100–2500 nm and corrected with SNV for coated production tablets.

rately predict production samples differing in shape, compaction pressure and coating thickness without the need to include any production samples—or conduct any additional analysis to obtain reference values.

4. Conclusions

In this work, we furthered research into the variables affecting the production of drug tablets by constructing models incorporating the sources of variability that typically affect NIR spectra (particle size, tablet geometry, compaction pressure and coating thickness).

Principal component analysis and cluster analysis allow similarity between samples of disparate origin (laboratory and production), shape, compaction pressure and coating thickness to be assessed in order to anticipate the influence of these factors on calibration models. The SNV treatment significantly reduces their effects and facilitates construction of more robust predictive models. In this work, we used SNV to correct the effect of differences in particle size.

The core compaction pressure has a significant influence on NIR spectra. Compacting laboratory cores at pressures over an appropriate range allows the effect of this source of variability on calibration to be lessened and the API to be more accurately quantified as a result.

The effect of differences in coating thickness between production tablets was modelled by incorporating the average spectrum for the lacquer coating to the model for laboratory cores. The expanded model exhibited good predictive ability.

Calibration models were constructed from laboratory samples alone, the production samples being used to assess their predictive ability. The models were validated by determining the RSE values between their predictions and the HPLC reference values. Based on the results, the models afford efficient control of the drug production process.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project CTQ2006-12923.

Anna Peguero also wishes to acknowledge additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

References

- [1] A.J. O'Neil, R.D. Jee, A.C. Moffat, Measurement of the cumulative particle size distribution of microcrystalline cellulose using near infrared reflectance spectroscopy, *Analyst* 124 (1999) 33–36.
- [2] M. Blanco, M. Alcalà, A process analytical technology approach based on near infrared spectroscopy: tablet hardness, content uniformity, and dissolution test measurements of intact tablets, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2137–2144.
- [3] J.J. Moes, M.M. Ruijken, E. Gout, Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108–118.
- [4] M. Blanco, A. Peguero, An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: comparison of PLS2 and ANN models, *Talanta* 77 (2008) 647–651.
- [5] E.W. Ciurczak, J.K. Drenen III, *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
- [6] M.E. Aulton, *Farmacia: La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas*, Elsevier, Amsterdam, 2004.
- [7] A.J. O'Neil, J. Andrew, D. Roger, A.C. Moffat, The application of multiple linear regression to the measurement of the median particle size of drugs and pharmaceutical excipients by near-infrared spectroscopy, *Analyst* 123 (1998) 2297–2302.
- [8] J.D. Kirsch, J.K. Drennen, Determination of film-coated tablet parameters by near-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 1273–1281.
- [9] S.H. Tabasi, R. Fahmy, D. Bensley, C. O'Brien, S.W. Hoag, Quality by design, part II: application of NIR spectroscopy to monitor the coating process for a pharmaceutical sustained release product, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 4052–4066.
- [10] M. Cruz Sarraguça, J. Almeida Lopes, Quality control of pharmaceuticals with NIR: from lab to process line, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 204–210.
- [11] J.M. Amigo, C. Ravn, Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-Chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76–82.
- [12] ICH Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.
- [13] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777.
- [14] M. Blanco, M. Alcalà, Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 353–359.

9

Artículos pendientes de aceptación

9.1 NIR determination of actives in pharmaceuticals
without a reference method

9.2 Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy
without a reference method

NIR determination of actives in pharmaceuticals without a reference method

Pendiente de aceptación

NIR determination of actives in pharmaceuticals without a reference method

Marcelo Blanco* and Anna Peguero

Departament de Química, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. marcel.blanco@uab.es

ABSTRACT

The NIR spectra for pharmaceuticals depart from those of powder mixtures of their components as a result of the effects of the different steps of the production process (granulation, compaction, coating). Incorporating such effects into the calibration set is essential with a view to constructing a model capable of accurately predicting the contents of production tablets. In this work, we developed a new method for incorporating the variability introduced by the production process in the spectra for the calibration set. The method uses the difference between the spectrum for a tablet and that for a powder mixture of identical composition for this purpose. The body of differences thus calculated for several tablets constitutes a set of mathematical vectors that define the overall variability of the process: the *process variability matrix*, which is added to a set of NIR spectra for several powder mixtures (prepared in laboratory) spanning the desired content range for the active pharmaceutical ingredient (API) in order to obtain the spectral matrix for the calibration set. The API content of the lab powder mixtures is established by weighing of their components. The calibration model is constructed by applying the partial least-squares (PLS) algorithm to the results for the calibration set. This methodology has been applied successfully on API determination in commercial pharmaceutical tablets. In this way, tablet contents can be predicted with a root mean square error (RMSE) less than 1.5%.

The proposed method provides a simple choice for establishing a calibration set that incorporates the variability of the production process and facilitates construction of a PLS calibration model for the accurate quantitation of the API in coated tablets.

Keywords: calibration set, process variability matrix, NIR, API determination, pharmaceutical variability.

1. INTRODUCTION

By virtue of its simplicity and expeditiousness, and the quality of its results, near infrared (NIR) spectroscopy has over the last few years become the spectroscopic technique of choice for the pharmaceutical industry. However, obtaining accurate results with this technique requires using an appropriate calibration set containing all possible sources of variability in the production samples for each formulation. Also, constructing the calibration model entails using an appropriate reference method.

The production of a pharmaceutical involves a series of unit steps by which the starting raw materials are subjected to various treatments of primarily physical nature that alter the behaviour of the formulation components and also their NIR spectra.

The production of solid formulations, which are the most frequent, involves blending their components, usually in powder form, to obtain a homogeneous mixture. The powder mixture is then granulated to increase particle size in order to avoid disaggregation of its components during transport, and also to improve compaction and sliding properties in the mixture. Therefore, the median particle size and measurement of the cumulative particle size distribution are critical parameters that have been tackled by NIR spectroscopy [1-2].

The granulated, homogeneous mixture is then pressed at an appropriate pressure to obtain hard enough tablets to resist crumbling and fracture, but also soft enough to facilitate disaggregation in the body once swallowed. The NIR spectrum is influenced by the compaction pressure; this has led to several studies to determine it, and even the dissolution test measurements by NIR [3]. In other studies, the applied pressure has been taken into account to ensure the success of API determination by NIR [4].

The final cores thus obtained are often coated with a thin film of sugars or polymers in order to protect them from the environment, conceal unpleasant flavours, or facilitate controlled release of the API [5]. The coating thickness measurements have also been investigated by NIR spectroscopy [6-7], in these cases NIR analysis is alternative much faster and cheaper than scanning electron microscopy (SEM).

The starting powder mixture undergoes various physical changes such as an increase in particle size, pressing into a preset shape and potential polymorphic transformations, during the production process; in addition, it is coated with a film that may affect release of the API in the body. These changes introduce alterations that are somehow reflected in spectra obtained after each step of the process, and considerably

hinder accurate prediction of their effects and construction of an appropriate calibration step.

A number of studies have been devoted to find ways of incorporating the spectral changes caused by the different steps of the production process into calibration sets. This can be accomplished mainly in two ways, namely: (a) by mimicking the production process in the laboratory [8]; or (b) by including production samples in the calibration set [9]. The former approach is confronted with some difficulties arisen from the difficulty of incorporating all possible sources of variability in a pharmaceutical process into a laboratory experiment. By contrast, the latter is easy to implement since it only requires using some production samples with a known value for the target property, so it is the more widely used.

In this work, we developed a method for incorporating the variability introduced by the production process in order to obtain NIR spectral sets containing pertinent information about both the different steps of the process (granulation, compaction and coating), which introduce pharmaceutical process variability, and the chemical composition of the formulation concerned (pharmaceutical chemical information). The variability of the production process is collected in a process variability matrix that is used to incorporate the variability introduced by each step into a set of powder samples containing the chemical information about the formulation in order to obtain an appropriate sample set (total variability matrix) for constructing the PLS calibration model required to determine the API in production tablets.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Production samples

The pharmaceutical formulation studied contains a high proportion (89.29 wt%) of API (metformine hydrochloride) and relatively low proportions (8.41 wt%) of three excipients (hydroxypropylmethylcellulose, polyvinylpyrrolidone and magnesium stearate). The coated film, which consists of hydroxypropylmethylcellulose, macrogol 6000 and titanium dioxide, accounts for 2.31 wt% of each tablet.

The tablets have an oblong shape and have a score on each side, and are biconvex and coated with a white lacquer on both sides. The lower side has a wide score (WS) and the upper side a narrow score (NS).

The tablets studied were collected from a total of 13 production batches. All were kindly supplied by KERN PHARMA, S.L. (Terrassa, Spain).

2.2. Laboratory samples

A total of 30 laboratory samples were prepared by mixing accurately weighed amounts of their components, in powder form, spanning a content range $\pm 20\%$ around the nominal API value (ICH guideline [10]); however, the content range spanned was in fact 80–112% API, the upper limit corresponding to a sample containing pure API. A placebo mixture containing the nominal concentrations of excipients was also prepared by weighing and added to different amounts of API in order to obtain new additional mixtures with the API spanning the previously defined content range.

All samples were prepared by weighing the mixture components on an analytical balance and homogenization in a solid blender. The mixtures were assumed to be homogeneous when they gave two identical consecutive NIR spectra. All concentration values are given as percentages of the API nominal content.

2.3. Instrumentation and software

Laboratory samples were homogenized in a Turbula T2C WAB shaker mixer and their spectra recorded on a Foss NIRSystems 6500 spectrophotometer equipped with a Rapid Content Analyser (RCA) module governed with the Vision v. 2.5.1 software package, also from Foss NIRSystems.

Spectra were processed and multivariate models constructed by using the software The Unscrambler v. 9.8 (Camo Process, Oslo, Norway).

2.4. Recording of NIR spectra

Near infrared reflectance spectra for the powder samples were recorded in glass cells about 3 cm in diameter that were placed on the window of the RCA module. Before each measurement, a reference spectrum of the glass cell was taken. A total of 3 spectra per sample were obtained with turnover between recordings in order to calculate an average value for each.

The spectra for the tablets were obtained by placing them on the instrument window and adjusting the shutter aperture. A duplicate spectrum for each tablet side was recorded to obtain an average value.

2.5. Construction of the process variability matrix and calibration/validation set

The spectral variability S_P for each tablet and tablet side was calculated from Eq.(1),

$$S_P = S_T - S_{100\% \text{ lab}} \quad \text{Eq.(1)}$$

where S_P is the process spectrum, S_T that for a production tablet and $S_{100\% \text{ lab}}$ that for a laboratory powder sample containing the nominal concentrations of API and excipient (the reference spectrum).

Two different S_T spectra per tablet were recorded: one for the WS (wide score) side, S_{PWS} and the other for the NS (narrow score) side, S_{PNS} (see figure 1). Three different tablets from each production batch were used to obtain as many process spectra, S_P , those were averaged into a single variability spectrum for each side. The procedure was applied to three different batches, so a total of three spectra for each side (S_{PWS} and S_{PNS}) were obtained. This body of spectra constituted the *reduced process variability matrix*. The spectra in this matrix were randomly added to those for the 30 powder samples in order to construct the *total variability matrix*, which encompassed 30 WS samples and 30 NS samples. Such a matrix was split into a calibration set containing 15 WS samples and 15 NS samples, and a validation set containing all others.

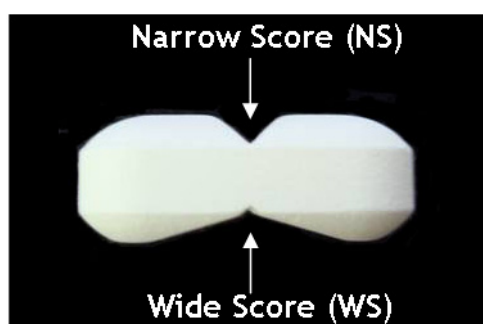


Figure 1. Image of a commercial tablet under investigation.

In order to increase the variability of the production process, S_P was multiplied by either 0.5 or 1.5. This provided six spectra with factor 0.5 (three $S_{PWS,0.5}$ and three $S_{PNS,0.5}$) and another 6 with factor 1.5 (three $S_{PWS,1.5}$ and three $S_{PNS,1.5}$).

The 18 process spectra thus obtained (three $S_{PWS-0.5}$, S_{PWS} , $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, S_{PNS} and $S_{PNS-1.5}$ each) constituted the *extended process variability matrix* and were randomly added to the those for the laboratory powder samples (Eq. (2)):

$$S_{var.ext} = S_{lab} + S_{P.ext} \quad \text{Eq. (2)}$$

where $S_{var.ext}$ is the spectrum for a powder sample with the process variability, S_{lab} that for a laboratory powder sample and $S_{P.ext}$ one of the process variability spectra. The body of $S_{var.ext}$ constituted the *extended total variability matrix*.

2.6. UV reference method

The average content for a sample batch was determined by using 20 ground tablets to accurately weigh 112 mg of powder (equivalent to 100 mg of API) and transferring it quantitatively to a 100 ml calibrated flask which was then supplied with 70 ml of water, stirred mechanically for 15 min and made to volume. The solution was filtered and the first 20 ml discarded. Then, 10 ml of filtrate was diluted to 100 ml and dilution repeated (10 ml of diluted solution to a 100 ml final volume). The API concentration thus obtained should be *ca.* 0.01 mg/ml.

The standard solution was prepared by accurately weighing 40 mg of API standard in a 200 ml calibrated flask, dissolving it with water and making to volume with the same solvent. Finally, a 5 ml aliquot of the solution was diluted to 100 ml in order to obtain an API concentration of *ca.* 0.01 mg/ml in the standard.

The absorbance at 232 nm of the sample and standard were measured in a quartz cell of 1 cm path length against water as blank. The difference between both readings was used to calculate the average API concentration for the batch.

The UV method has been validated following the requirements of EMA [10].

All concentrations are given as percentages with respect the formulation nominal value, which was taken to be 100%.

2.7. Construction of calibration models

Multivariate (PLS) calibration models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method.

The API content range spanned by the model was 80.0–112% (actual content vs nominal content). Various spectral treatments and wavelength ranges were tested and the best results found to be those provided by second-derivative spectra, the whole wavelength range (1100–2500 nm) and 11-point moving window.

The optimum number of factors as regards prediction ability was taken to be that resulting in the lowest possible root mean square error (RMSE, Eq. (3)):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{\text{NIR}} - Y_i^{\text{REF}})^2}{m}} \quad \text{Eq. (3)}$$

where Y_i^{NIR} is the NIR-predicted API content, Y_i^{REF} that obtained by weighing and m the number of samples.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The predictive ability of a PLS model increases with increasing similarity between calibration and production samples. Ideally, a calibration set should contain production samples spanning the whole desired content range. In pharmaceuticals, however, the API content rarely differs by more than $\pm 5\%$ from the nominal value; such a narrow range precludes the construction of robust, accurate prediction models and must be expanded in some way. In this work, we used a novel, very simple approach to constructing the calibration set for the NIR analysis of pharmaceuticals.

Because each step of the production process increases the variability of the spectrum for the end-product, the total variability of the process can be assumed to be a combination of those for its individual steps. While the differences are often quite small, they can have a strong effect on calibration models and their ability to accurately predict the API contents of production samples. Figure 2 shows the NIR spectra obtained in each step of the production sample, from a laboratory powder sample to the coated tablet; both the API and the excipients were at their nominal concentrations in all samples. A comparison of the results for the powder sample and granulate mixture reveals a change in the baseline slope which can be ascribed to the difference in particle size between the two types of sample. Also, compaction of the powder reduces the baseline slope and causes slight flattening of the bands in the spectrum for the core (see, for example, the band at 2300 nm). The baseline for the coated spectrum also exhibits a lower slope than that for the core, in addition to weaker bands by effect of its coating. The “fingerprint” of each step of the process on the NIR spectrum can be “revealed” by calculating the differences between the spectra for consecutive steps (Fig. 3A). Thus, the impact of granulation can be assessed from the difference between the spectra for the granulate and a powder sample containing

identical concentrations of API and excipients ($S_{\text{granulation}} = S_{\text{granulate}} - S_{100\%}$). Similarly, the effect of compaction can be calculated as $S_{\text{compaction}} = S_{\text{core}} - S_{\text{granulate}}$ and that of coating as $S_{\text{coating}} = S_{\text{tablet}} - S_{\text{core}}$. The overall variability of the process will be the combination of $S_{\text{granulation}}$, $S_{\text{compaction}}$ and S_{coating} . Figure 3B compares two process spectra obtained in two different ways: $S_{\text{process1}} = S_{\text{granulation}} + S_{\text{compaction}} + S_{\text{coating}}$ and $S_{\text{process2}} = S_{\text{tablet}} - S_{100\% \text{ lab.}}$ As can be seen, the two are essentially identical; therefore, process spectra can be obtained from the second equation, which is much easier to solve (see Sec. 2.5). As can also be seen from Fig. 3B, the region from 1100–1900 nm contains a virtually constant variability of *ca.* +0.2 a.u.; on the other hand, the region from 1900 to 2500 nm includes variable, more marked differences (*ca.* -0.2 a.u.), especially in the zones exhibiting the strongest bands (2300 nm), which are the result of the multiplicative effect of scattering. In summary, the effect of variability in the production process is greatest in those spectral regions exhibiting the highest absorbance.

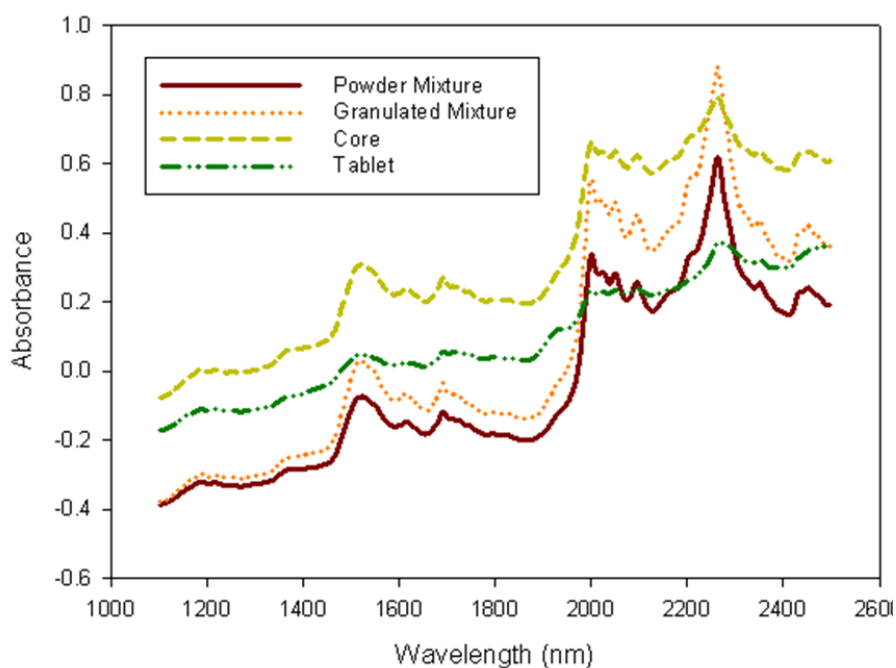


Figure 2. Spectra for a laboratory powder mixture, a core and a production tablet. The sample components were all at their nominal concentrations.

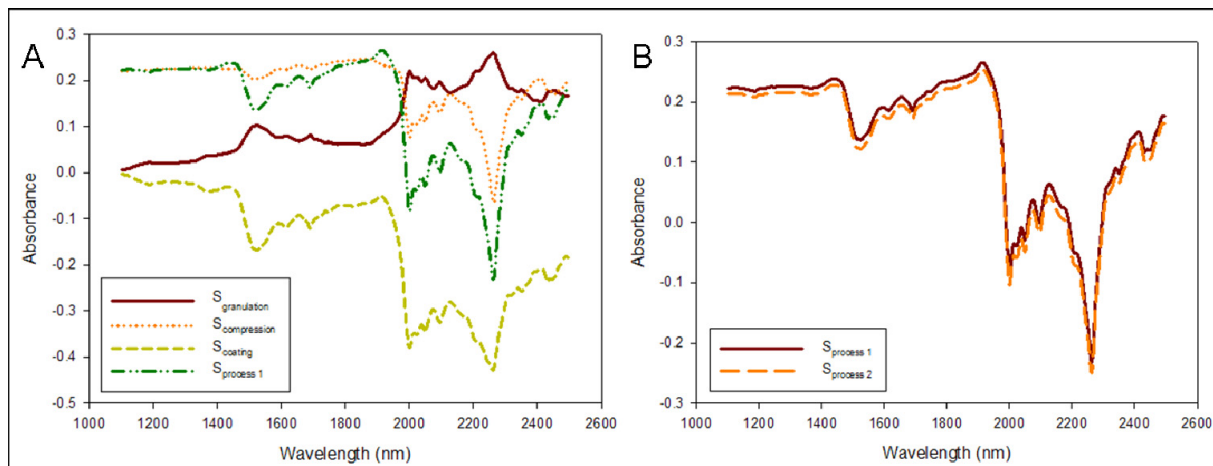


Figure 3. Process variability spectra. (A) Effects of granulation ($S_{\text{granulation}} = S_{\text{granulated}} - S_{100\% \text{ lab}}$) and compaction ($S_{\text{granulation}} + S_{\text{compaction}} + S_{\text{coating}}$). (B) Comparison of process spectra obtained by adding up the effects of each step (S_{process1}) with the difference between those for a tablet and a powder mixture ($S_{\text{process2}} = S_{\text{tablet}} - S_{100\% \text{ lab}}$).

In order to incorporate the potential effects of differences in geometry between the two sides of tablets (see Fig. 1) we recorded NIR spectra for each tablet side and subsequently, the process spectra were calculated for each side.

The calculations described in Section 2.5 provided various process spectra that were randomly added to those for laboratory powder samples spanning the content range stated under Experimental in order to obtain a new set of spectra.

Figure 4 is a scatter plot of the PCA scores for laboratory samples modified with process spectra and also for production samples. The spectra were SNV-treated and spanned the whole wavelength range (1100–2500 nm). As can be seen, the cluster of laboratory samples included virtually all production samples; therefore, modified laboratory samples incorporate most of the variability introduced by the production process.

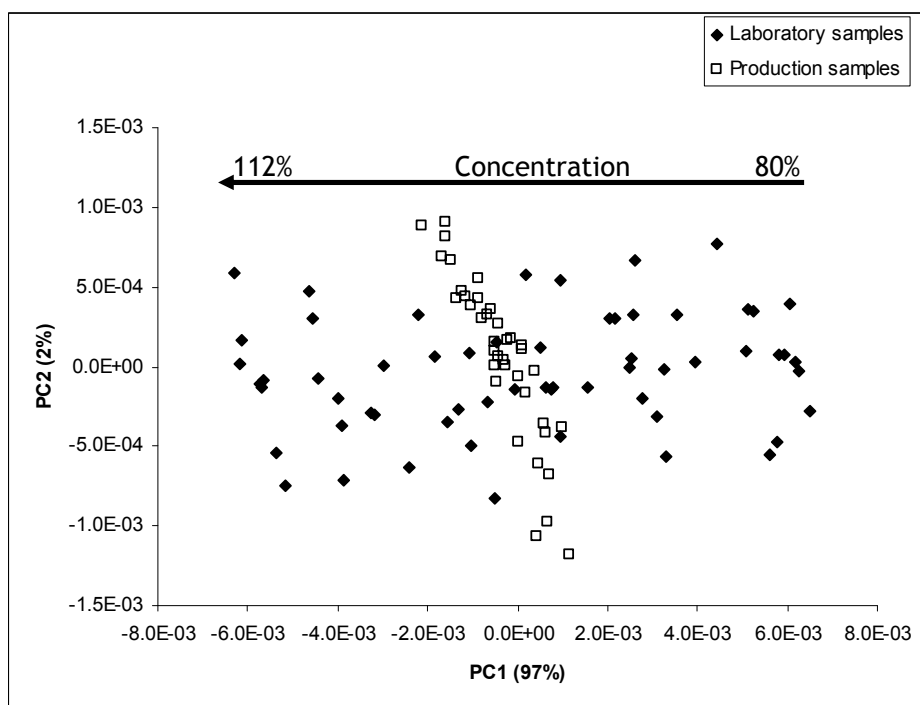


Figure 4. Scatter plot of PCA scores for laboratory samples modified with spectra for the process and production samples. Spectral mode: second-derivative. Wavelength range: 1100–2500 nm.

The modified laboratory samples were split into two sets; one was used to construct the PLS calibration model and the other to assess its predictive ability. Table 1 shows the figures of the merit for model NIR100. This model is extremely simple; in fact, 2 factors sufficed to account for 98.1% of the sample variance, and the calibration and prediction RMSE values were not significantly different. The most salient properties of the model are summarized in Table 1.

The proposed PLS model (NIR100) was used to predict the API contents of 13 production batches. The value for each batch was taken to be the average of the predicted values for 10 tablets. The predictions obtained are shown on the NIR100 column. The Reference column lists the API content in the batch as determined with the reference method. A paired t -test between the reference (UV) values and those provided by the NIR100 model gave $t_{\text{calc}} = 2.49$ and $t_{\text{crit } 0.05/2, n=13} = 2.179$; therefore the two methods provided statistically different results.

Table 1. Figures of merit of the models

	NIR100		NIR95		NIR105		NIR100 extended	
	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred	Cal	Pred
Treatment	2 nd derivative		2 nd derivative		2 nd derivative		2 nd derivative	
Range (nm)	1100–2500		1100–2500		1100–2500		1100–2500	
API content (%)	80–112		80–112		80–112		80–112	
N° of PC	2		2		2		4	
Variance Y (%)	98.1		97.6		97.8		99.2	
Offset	2±5	0±5	2±6	0±4	2±6	1±5	1±2	0±1
Slope	0.98±0.05	1.00±0.05	0.98±0.06	1.00±0.04	0.98±0.06	0.99±0.05	0.99±0.02	1.00±0.01
Number of samples	30	30	30	30	30	30	90	90
RMSEC/P	1.30	1.24	1.43	1.09	1.36	1.54	0.83	0.50

Process spectra may contain a systematic error –one which will be transferred to calibration spectra– if the reference powder mixture ($S_{100\% \text{ lab}}$) does not contain exactly the same amounts of API and excipients as the production tablets used to record the process spectrum. In order to confirm this hypothesis, the process spectrum was obtained by using a powder mixture containing an API concentration of 95.7% the nominal value and excipient concentrations identical with those in the mixture containing 100% API. The calibration and validation sets were obtained as described in Section 2.5, but using the new process spectra. Tables 1 and 2 show the figures of merit of the new PLS model (NIR95) and its predictions. Process spectra were obtained identically as before and PLS models constructed by using a reference sample containing 104.3% API (model NIR105). The results thus obtained are also shown in Tables 1 and 2.

Table 2 shows the residuals obtained by subtracting the predictions of NIR95 and NIR105 from the reference values. Based on the mean residuals, Ref–NIR95 and Ref–NIR105, using the spectra for the samples containing 95.7% and 104.3% of the API nominal content as reference introduced a systematic error of –3% and +4%, respectively. Therefore, the calibration model can be expected to give a systematic error if the reference

spectrum, recorded from a laboratory powder sample, does not contain exactly the same amounts of API and excipients as the end-product. Based on this conclusion, we used batches 1–3 to record the process spectra since their average API contents (Reference column in Table 2) coincided with the API nominal content in the reference mixture (100.1%).

Table 2. Predictions for different production batches and residuals between models

	Reference	NIR95*	NIR100*	NIR105*	NIR100 extended*	Residual			
						Ref–NIR95	Ref–NIR100	Ref–NIR105	Ref–NIR100 extended
Batch 1	100.12	96.87	100.86	104.00	99.77	3.25	−0.74	−3.88	0.35
Batch 2	100.05	95.65	99.64	102.81	99.28	4.39	0.41	−2.76	0.77
Batch 3	100.31	95.44	99.32	102.53	99.59	4.87	0.99	−2.23	0.72
Batch 4	98.07	95.40	99.49	102.47	99.84	2.68	−1.42	−4.40	−1.77
Batch 5	99.49	95.60	99.38	102.59	100.29	3.89	0.11	−3.10	−0.80
Batch 6	99.19	98.77	102.93	105.96	99.60	0.41	−3.74	−6.78	−0.41
Batch 7	98.74	98.16	102.28	105.35	99.76	0.58	−3.54	−6.61	−1.02
Batch 8	98.07	97.16	101.14	104.21	99.31	0.91	−3.07	−6.14	−1.24
Batch 9	98.25	95.97	99.94	103.11	99.54	2.27	−1.70	−4.86	−1.29
Batch 10	100.84	96.89	100.86	104.00	99.64	3.95	−0.02	−3.16	1.20
Batch 11	101.95	98.30	102.29	105.36	99.29	3.66	−0.34	−3.41	2.66
Batch 12	101.29	97.07	101.04	104.15	99.39	4.22	0.26	−2.86	1.90
Batch 13	98.46	95.70	99.66	102.86	99.16	2.75	−1.20	−4.40	−0.70
Mean	99.60	96.69	100.68	103.80	99.57	2.91	−1.08	−4.20	0.03
SD		1.41**	1.54**	1.47**	0.43**	1.49	1.56	1.51	1.35

* The NIR value was the mean of the predictions for 10 tablets

** Weighed standard deviation.

Constructing model NIR100 from process spectra for batches 1–3 resulted in no improved predictions, however. This led us to increase the variability of the calibration set by applying a multiplying factor of 0.5 or 1.5 to the process spectra in order to mathematically expand the variability of the production process (extended process variability matrix). As with the previous models, the extended process spectra were added to those for laboratory powder samples (see Section 2.5).

The new data set thus obtained contained samples the spectra for which were expanded with process spectra multiplied by 0.5, 1.5 or no factor ($S_{PWS-0.5}$, S_{PWS} , $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, S_{PNS} , $S_{PNS-1.5}$). Such a set was designated “extended process variability matrix”.

Figure 5 is a PCA scores plot for the samples in the extended total variability matrix and production samples; the spectra were second-derivative and spanned the whole wavelength range (1100–2500 nm). As can be seen, the laboratory samples modified with the process spectra S_{PWS} and S_{PNS} failed to encompass all production samples –which is also apparent from Fig. 4. However, introducing the samples modified with the process spectra $S_{PWS-0.5}$, $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$ and $S_{PNS-1.5}$ allowed all production samples to be included.

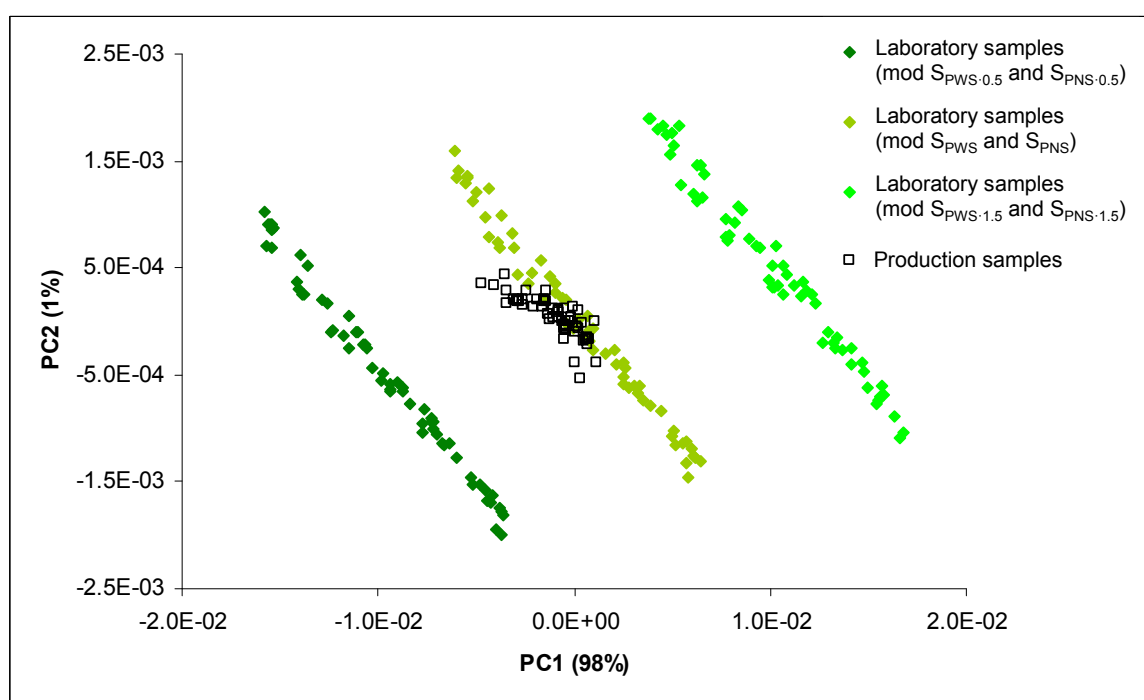


Figure 5. Scatter plot of PCA scores for laboratory samples modified with spectra for the process ($S_{PWS-0.5}$, S_{PWS} , $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$, $S_{PNS-1.5}$,) (extended process variability matrix) and production samples. Spectral mode: second-derivative. Wavelength range: 1100–2500 nm.

The modified data set (extended total variability matrix) was split into a calibration subset and a prediction subset. The figures of merit of the PLS model thus established, NIR100 extended, are shown in Table 1. The primary difference between this model and NIR100 was the incorporation of two additional factors into the former in order to consider the variability introduced by the modified process spectra ($S_{PWS-0.5}$, $S_{PWS-1.5}$, $S_{PNS-0.5}$ and $S_{PNS-1.5}$). The predictions of model NIR100 extended for the API content of the end-product

are shown under the column of the same name in Table 2. The table also gives the residuals of this model with respect to the reference values. As can be seen, the mean residual was 0.03, which is much better than the value obtained with model NIR100. A paired *t*-test between the reference (UV) values and those obtained with NIR100 extended gave $t_{\text{calc}} = 0.07$ and $t_{\text{crit } 0.05/2, n=13} = 2.179$; therefore, the results provided by the two methods were not statistically different. Also, RMSEP for the production tablets was only 1.33%.

Finally, none of the calibration models used here included any production samples and yet model NIR100 extended allowed their accurate quantitation. In fact, simply adding the process spectrum to those for laboratory powder samples sufficed to incorporate the variability of the production process into the calibration set.

4. CONCLUSIONS

As shown here, the variability of a pharmaceutical production process (process variability matrix) can be determined from the difference spectrum between a coated tablet and a laboratory powder mixture containing identical amounts of API and excipients.

Using process spectra for laboratory samples containing the API at concentrations departing from the nominal value introduces systematic errors in the predictions of production samples. This requires exercising special care in choosing the reference spectra.

Expanding the process spectrum with multiplying factors (*e.g.* 0.5 and 1.5) extends the variability of the model and facilitates the construction of a PLS calibration model affording accurate prediction of production samples. The model containing the extended process variability matrix provides better results than the reduced model.

The models thus obtained require no reference method to quantify the API in laboratory powder samples inasmuch as API concentrations are established by weighing. We used the UV reference here only to check the quality of the NIR results.

The proposed method provides a simple choice for constructing a calibration set incorporating the whole variability of the production process and facilitating the obtainment of a PLS calibration model capable of accurately predicting the API content of the end-product.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's MCyT for funding this research within the framework of Project CTQ2006-12923. Anna Peguero also wishes to acknowledge additional support from Universitat Autònoma de Barcelona in the form of a scholarship.

REFERENCES

- [1] A. J. O'Neil et al., The application of multiple linear regression to the measurement of median particle size of drugs and pharmaceutical excipients by near-infrared spectroscopy, *Analyst* 123 (1998) 2297-2302.
- [2] A. J. O'Neil et al., Measurement of the cumulative particle size distribution of microcrystalline cellulose using near infrared reflectance spectroscopy, *Analyst* 124 (1999) 33-36.
- [3] M. Blanco et al., A process analytical technology approach based on near infrared spectroscopy: tablet hardness, content uniformity, and dissolution test measurements of intact tablets. *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2137–2144.
- [4] M. Blanco et al., Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 797-804.
- [5] M. E. Aulton, *Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*. 3rd edition. Elsevier. (2007).
- [6] J. J. Moes et al., Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 108–118.
- [7] J. D. Kirsch et al., Determination of film-coated tablet parameters by near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 1273–1281.
- [8] M. Blanco et al., Preparing Calibration Sets for Use in Pharmaceutical Analysis by NIR Spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 97 (2007) 1236-1245.
- [9] M. Blanco et al., Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry, *Analyst* 122 (1997) 761-765.
- [10] ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, (1996). <http://www.ich.org/ich5q.html>

Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method

Pendiente de aceptación

ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS BY NIR SPECTROSCOPY WITHOUT A REFERENCE METHOD

Marcelo Blanco^{*} and Anna Peguero

Departament de Química, Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. marcel.blanco@uab.es

ABSTRACT

Using near infrared (NIR) spectroscopy for quantitative analysis requires the application of multivariate calibration techniques and careful selection of representative samples to construct accurate PLS calibration models from NIR spectra. Selecting an appropriate set of samples for this purpose is a complex, elaborate task successful conduct of which dictates the quality of the ensuing calibration model and its predictions. In this work, we developed a new approach to the construction of calibration sets for quantifying the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients in pharmaceutical tablets. The operating procedure involves preparing a set of laboratory samples by using an appropriate experimental design and recording a series of NIR spectra during the pharmaceutical production process. Process spectra are calculated by difference between the NIR spectra for production tablets and those for laboratory samples containing the nominal concentrations of API and excipients. Adding the matrix of process spectra to that of NIR spectra for powder samples prepared by weighing of their components provides a spectral set encompassing the experimental domain of the production tablets, as shown by the scores plot of a Principal Component Analysis (PCA) of the results. All quantitative information required to construct the calibration model are the concentrations calculated from the component weights in each mixture; this dispenses with the need to use a reference method and results in increased accuracy in the predicted values. The combined matrix of process and sample spectra was used here to construct 5 PLS models in order to quantify the API and the four excipients in the studied formulation. The predicted values thus obtained were quite accurate, as reflected in their root mean square error of prediction (RMSEP), which never exceeded 1.0%. Based on the results, the proposed approach provides

a simple, expeditious tool for constructing appropriate sample sets to develop PLS calibration models without the need for a reference method.

Keywords: calibration set, process variability matrix, API determination, excipient determination, PLS models, pharmaceutical analysis.

1. INTRODUCTION

Near infrared (NIR) spectroscopy has gained widespread acceptance in the pharmaceutical industry, especially by virtue of its simplicity, expeditiousness and result quality. The ability to determine several parameters, both physical and chemical, from a single measurement and the need for no solvents –and the consequent absence of waste to dispose of– make NIR spectroscopy a cost-effective, environmentally benign technique appealing to any type of industry. However, its low sensitivity and selectivity –and, especially, its requiring the use of chemometric methods– has somehow delayed widespread use until recently. In fact, today's NIR spectrophotometers come with dedicated software including the chemometric tools users may typically need to acquire and process data in a simple, user-friendly manner.

Using NIR spectroscopy to determine the API and excipients in a pharmaceutical preparation requires preparing a set of calibration samples containing a known concentration of each component. This is the greatest difficulty the analyst is confronted with in analysing pharmaceutical formulations. The sample set should meet two essential requirements, namely: (a) it should span a wide enough concentration range to afford the prediction of process samples with abnormal concentrations; and (b) it should contain the whole variability, both physical and chemical, of the production process. Fulfilling the former requirement with production samples alone is virtually impossible since pharmaceutical processes are typically optimized to obtain a product meeting the specifications; as a result, the API and excipient concentrations rarely depart by more than $\pm 5\%$ from their respective nominal values [1], which is too narrow a range to ensure accurate quantitation of abnormal samples. The ICH guideline [2] recommends using a range of $\pm 20\%$ around the API nominal value, but no similar criterion has been established for excipients [1,3]. The latter requirement is crucial with a view to ensuring accurate predictions. The greater the similarity of the calibration samples to those to be predicted (*i.e.* the production samples) is, the more accurate will be the predicted results. There are essentially three different ways of expanding the concentration range and incorporating the variability of the production process into the calibration set, namely [4]:

- (a) Using *pilot plant samples* mimicking the actual production samples as regards API content and physical properties. Alternatively, samples can be prepared in the

laboratory, using the same operations as in the industrial process (e.g. granulation, milling and pressing for tablets).

- (b) *Overdosing and underdosing production samples*. To this end, powdered production samples are supplied with known, usually small, amounts of API (overdosing) or a mixture of the excipients (underdosing) in order to obtain the desired range of API contents.
- (c) Using *synthetic laboratory samples* prepared by weighing known amounts of API and excipients to span the desired range of API concentrations. This requires using a large enough number of samples to successfully incorporate variability in the production process.

Figure 1 illustrates the preparation procedure for the previous three types of calibration samples and the variability they contain. The figure also shows an additional procedure devised by the authors which allows a calibration set to be constructed from a combination of powder samples and process spectra.

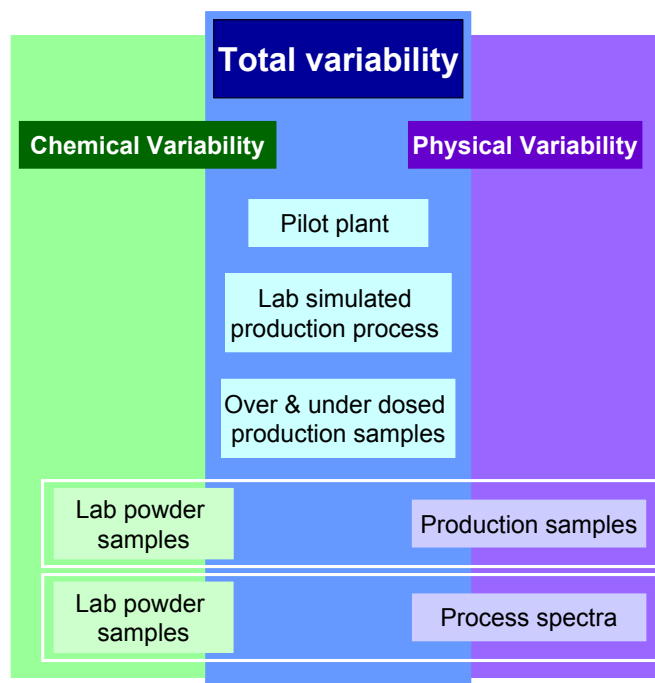


Figure 1. Approaches to the preparation of calibration sets representative of production tablets.

Available literature on the topic (Table 1) includes examples of the three above-described approaches and reflects changes in the procedures used to prepare calibration sets over the last 20 years. Until 1989 [5,6], the calibration set was constructed solely from synthetic samples and calibration was done by multiple linear regression (MLR). MLR models use a discrete number of wavelengths (*viz.* those where absorption of the analyte is maximal) and exclude the spectral regions under the strongest influence of the matrix; this allows models with an acceptable predictive ability to be established without incorporating the variability of the process. Advances in computer technology and the development of powerful algorithms have facilitated the use of the whole NIR spectrum to model data since the 1990s by allowing the calibration set to be expanded with production samples thanks to the easier discrimination of spectral differences between these and laboratory samples [7-17]. Blanco *et al.* [13] compared the two most widely used approaches to constructing NIR calibration sets; they applied one to synthetic laboratory samples and production samples; and the other to production samples of nominal concentration supplemented with over- and underdosed samples of the same type. Although, strictly, the use of over- and underdosed samples provided better results, the difference was not large enough to warrant rejection of the other approach.

Table 1. Applications of NIR spectroscopy to the determination of APIs and excipients.

Ref	Year	Sample	Analyte	Measurement mode	Calibration sample type	Calibration method
5	1987	Liquid	Glycerol Ethanol Phenazone Lidocaine Sodium thiosulphate	Transflectance	Synthetic	MLR
6	1989	Gel Powder	Ketoprofen	Reflectance	Synthetic	MLR
7	1990	Milled tablets	Ranitidine hydrochloride	Reflectance	Doped + production	MLR
8	1992	Powder	Streptomycin sulphate Cloxacillin benzathine	Reflectance	Production (narrow range)	MLR
9	1993	Powder	Ascorbic acid	Reflectance	Doped + production	SMLR + PLS
10	1995	Powder Milled tablets	Cefuroxime acetyl	Reflectance	Doped + production	MLR + PLS
11	1995	Intact tablets	Acylovir	Reflectance	Pilot plant + production	PCR + PLS
12	1996	Milled tablets	Otilonium bromide Microcrystalline cellulose Maize starch Sodium starch glycolate	Reflectance	Synthetic + production	PLS
13	1997	Milled tablets	Miokamycin	Reflectance	Synthetic + production Doped + production	PLS
18	1998	Milled tablets Intact tablets	Acetylsalicylic acid	Reflectance/ Transmittance	Pilot plant	PLS
19	1998	Intact tablets	Paracetamol	Transmittance	Pilot plant	PLS
20	1999	Powder Intact tablets	Diphenhydramine hydrochloride	Reflectance/ Transmittance	Pilot plant	PLS
14	1999	Powder Intact tablets	Gemfibrozil	Reflectance	Synthetic + production	PLS
15	2000	Blended product Cores Coated tablets	Otilonium bromide	Reflectance	Doped + production	PLS
16	2001	Coated tablets	–	Reflectance	Synthetic + production Doped + production	PLS
21	2001	Intact tablets	Hormone steroid	Transmittance	Pilot plant	PLS
26	2006	Intact tablets	Deflazacort	Reflectance	Laboratory	PLS
22	2006	Intact tablets	Ibuprofen	Transmittance	Pilot plant	PLS
23	2007	Intact tablets	Aspirin and phenacetin	Reflectance	Pilot plant	PC-ANN
17	2008	Granulate	–	Reflectance	Synthetic Synthetic + Production Laboratory	PLS
24	2009	Intact tablets	–	Transmittance	Pilot plant	PLS

Constructing a calibration set from pilot plant samples [11,18–24] or laboratory samples prepared in the same manner as production samples [17,25] allows one not only to incorporate the variability of the production process, but also to quantify the API directly in the finished product, thereby dispensing with the need for any sample pretreatment (*e.g.* grinding, sieving). Kovar *et al.* [18] compared the predictions obtained with three calibration models; one was based on powder samples measured in the reflectance mode, and the other two on intact tablets from a pilot plant spanning an appropriate content range that were measured in the reflectance and transmittance modes. The results obtained with the three models exhibited no statistically significant differences. Table 1 lists a number of studies conducted over a fairly long period; based on it, the three above-described approaches to constructing an NIR calibration set (pilot plant, over- and underdosed, and synthetic samples, respectively) are similarly efficient and their choice dictated by available means in the particular laboratory.

The three approaches share a common problem: collinearity in the concentrations, which can lead to errors in matrix inversion—a required procedure for most calibration algorithms. Low correlation between concentrations is one of the requirements for NIR calibration sets since spectral correlation between the components of a pharmaceutical formulation is usually very high and impossible to correct. The scientific literature abounds with descriptions of sample composition designs allowing the construction of appropriate calibration sets. D-optimal designs are specially interesting for this purpose inasmuch as they require using no preset numbers of factors or levels. Optimal designs are based on the D-optimality criterion, which seeks to find the optimal combination of points in a design from a list of candidate points in order to maximize the determinant $(X^T X)^{-1}$, X being the information matrix. This brings the design as close to ideality (*i.e.* to orthogonality and rotability) as possible [26].

One other important point to be considered in constructing an appropriate calibration set is the specific reference method to be used in order to determine the property to be predicted. The choice in each case will be dictated by the goodness of the calibration results since an NIR determination with a chemometric method will never be more accurate than one with a reference method. However, Blanco *et al.* [25] successfully used NIR as an absolute technique requiring no reference method to determine the API in tablets; rather, they obtained reference

values by weighing the formulation components on an analytical balance. This procedure avoids incorporating the error of the reference method into the NIR method and improves the overall quality of the determination as a result. Also, the need for no reference method leads to improved precision –to a level even surpassing that of common reference methods in some cases [27].

Most of the studies listed in Table 1 were aimed mainly –or solely– at determining the API in a pharmaceutical formulation. Also, API content uniformity in a tablet batch, which is possibly the most important drug release related parameter, was the target for many. The excipients accompanying the API in a formulation are also very important in many cases, both as regards API bioavailability and preparation shelf-life. Although the European Medicines Agency (EMA) has issued no general rules on the quantitation of excipients in the final product, any potentially affecting bioavailability of the API should in fact be determined [1]. The excipients typically used as disaggregants (starch, cellulose), dyes or flavours are normally harmless, so, according to EMA, they need not be determined. However, an exceedingly large or small amount of one can lead to failure in, for example, a dissolution test; similarly, an unpleasant taste can lead to rejection of a whole batch. Although usually unimportant, determining the excipient contents of a formulation can endow the product with an added value.

In this work, we developed a new method for constructing NIR calibration sets from samples representative of the production process that requires the use of no reference method to determine the target property. The proposed methodology obtains a process variability matrix which incorporates the effects of the different production operations (granulation, compaction, coating) on the NIR spectrum. The process variability matrix is incorporated into the matrix of NIR spectra for laboratory samples prepared by weighing and spanning the desired concentration ranges for the API and excipients. The new matrix thus obtained is used to construct chemometric models which allow all components (API and excipients) in a pharmaceutical formulation to be determined. The proposed methodology provides very simple models of a high predictive ability in terms of accuracy and precision; also, it eventually releases NIR spectroscopy from the need to use a reference method for quantitation. In addition, our methodology can be used for product control purposes at any stage of the

production process. Finally, its enabling the extremely easy construction of calibration models may have a considerably impact on FDA-approved PATs in the future.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Production samples

The pharmaceutical formulation studied contains a high proportion of API (63.5% w/w ibuprofen) and four excipients, namely: 28.5% w/w maize starch, 5% w/w Avicel pH 102 (microcrystalline cellulose), 2% w/w aerosil (fumed silica) and 1% w/w magnesium stearate. A granulated mixture of the API and excipients is used to prepare tablets containing 400 or 600 mg of API that differ in shape and weight, but not in their API or excipient concentrations. The 400 mg tablets are cylindrical and the 600 mg tablets oblong; in addition, the latter are imprinted with the figure “600”. Both are coated with an aqueous dispersion of sepifilm, sepisperse and polyethyleneglycol.

The study was conducted on 10 batches each of 400 and 600 mg tablets.

2.2. Laboratory samples

A total of 34 powder mixtures of the formulation ingredients were prepared in the laboratory by weighing the required amount of each component in an analytical balance and mixing them in a solid blender. A mixture was deemed homogeneous when it gave an identical NIR spectrum over three consecutive recordings.

The sample set was established by using a D-optimal design in order to minimize collinearity between concentrations. The concentration ranges examined to this end are shown in Table 2.

Table 2. Spectral and concentration correlation coefficients between the formulation components.

Correlation coefficients		Ibuprofen	Maize starch	Cellulose	Fumed silica	Magnesium stearate
Ibuprofen	Concentration	1	–	–	–	–
	Spectral	1	–	–	–	–
Maize starch	Concentration	–0.85	1	–	–	–
	Spectral	0.76	1	–	–	–
Cellulose	Concentration	–0.63	0.37	1	–	–
	Spectral	0.78	0.97	1	–	–
Fumed silica	Concentration	–0.72	0.57	0.42	1	–
	Spectral	0.88	0.90	0.87	1	–
Magnesium stearate	Concentration	0.03	–0.30	–0.26	–0.07	1
	Spectral	0.89	0.74	0.77	0.74	1

Three additional powder mixtures containing the nominal concentrations of API and excipient were used as references to construct the calibration set.

2.3. Hardware and software

Laboratory samples were homogenized in a Turbula type T2C WAB shaker mixer.

Sample spectra were recorded on a Foss NIRSystems 6500 spectrophotometer equipped with a Rapid Content Analyser (RCA) module. The instrument was governed via the Vision v. 2.51 software package, also from Foss NIRSystems.

The D-optimal design was developed with the software Modde v. 6.0 from Umetrics.

Spectral treatments were applied and multivariate models constructed by using The Unscrambler v. 9.8 from Camo.

2.4. Recording of NIR spectra

The NIR reflectance spectra for the powder samples were recorded by using a glass cell *ca.* 3 cm in diameter that was placed on the window of the RCA module. Each sample was recorded in triplicate, with turnover between successive recordings, to obtain an average spectrum.

The reflectance spectra for the tablets were obtained by placing each tablet directly on the instrument window and adjusting the shutter aperture to the tablet size. Each spectrum was recorded in duplicate to obtain an average.

2.5. Construction of calibration and validation sets

Figure 2 depicts the process used to construct the calibration and validation sets. The first step involved calculating the process spectrum, S_P , which incorporates process variability into each tablet:

$$S_P = S_T - S_{\text{lab ref}}$$

where S_T is the spectrum for a production tablet and $S_{\text{lab ref}}$ is the reference spectrum (that for a laboratory powder mixture containing the API and excipients at their nominal concentrations). The procedure was applied to 3 tablets per production batch in order to obtain 3 process spectra (S_P) per batch. By using 3 different batches of 400 mg tablets and as many of 600 mg tablets, a total of 9 process spectra for each tablet type (9 S_{P400} and 9 S_{P600}) were obtained. This spectral set constituted the *reduced process variability matrix*.

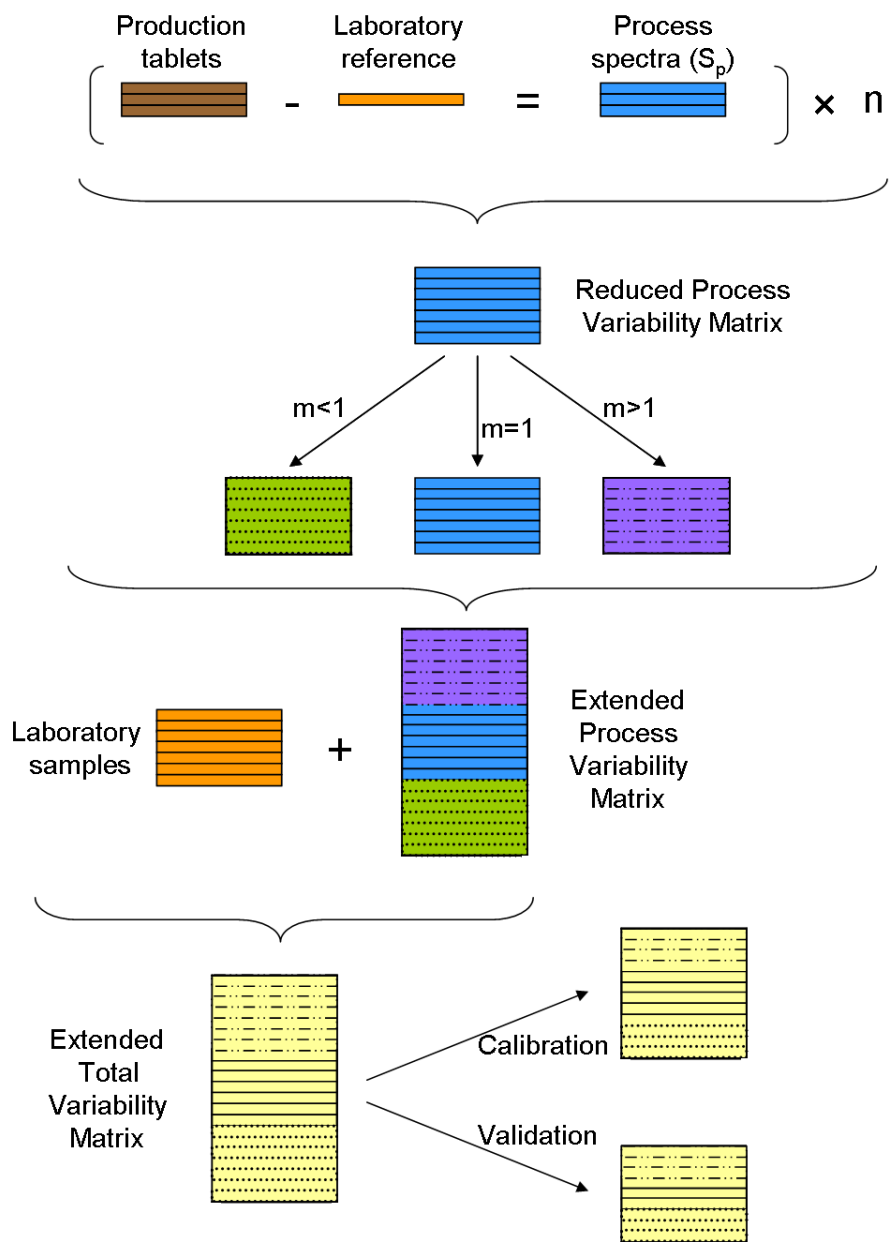


Figure 2. Proposed approach to the construction of NIR calibration sets.

In order to increase the variability in process spectra, S_{P400} and S_{P600} were multiplied by a factor m equal to 0.5, 0.75 or 1.25. This allowed 18 spectra per m value (9 each for $S_{P400-0.5}$, $S_{P600-0.5}$, $S_{P400-0.75}$, $S_{P600-0.75}$, $S_{P400-1.25}$ and $S_{P600-1.25}$) to be obtained. These 72 spectra and 18 above mentioned (9 S_{P400} and 9 S_{P600}) constituted the *extended process variability matrix* and were randomly added to the spectra for the laboratory powder samples:

$$S_{\text{ext var}} = S_{\text{lab}} + S_{P \text{ ext}}$$

where $S_{\text{ext var}}$ is the spectrum for a powder sample incorporating the variability of the process, S_{lab} that for a laboratory powder sample and $S_{P \text{ ext}}$ a process variability spectrum. The body of $S_{\text{ext var}}$ constituted the *extended total variability matrix*, which was split into two subsets: one for constructing the calibration model and the other for validating it.

2.6. Reference values

The reference values for the laboratory samples were obtained from the weight of each mixture component.

The API contents of the production tablets were determined by HPLC. The average value for each batch was obtained by grinding 20 tablets and treating an aliquot containing the weight of one with 40 ml of mobile phase (a 60:40 v/v acetonitrile/water mixture buffered at pH 3.0), stirring to complete dissolution—which took about 30 min—and making to volume in a 50 ml flask, an aliquot of the resulting solution then being centrifuged for 5 min and the supernatant injected into the chromatograph for analysis. The API (ibuprofen) was quantified by interpolation of its reading into a calibration curve, using isobutylacetophenone as internal standard.

No reference method was available for any of the excipients.

2.7. Construction of calibration models

PLS multivariate calibration models were constructed by cross-validation, using the leave-one-out method.

A PLS model was constructed over the selected wavelength range for each component of the studied formulation. Various wavelength ranges and spectral treatments (and their combinations) were studied. The best results in all instances were obtained by using the first-

derivative treatment in combination with an 11 point moving window and subsequent application of Standard Normal Variate (SNV) methodology. Most of the models spanned the whole NIR wavelength range (1100–2500 nm).

The optimum number of factors was taken to be that leading to the lowest Root Mean Square Error (RMSE) –and optimally accurate predictions as a result–. RMSE was calculated from

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{NIR} - Y_i^{REF})^2}{m}}$$

where Y_i^{NIR} is the API content predicted by the NIR model, Y_i^{REF} that obtained by weighing and m the number of samples.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A good calibration set should contain the physical and chemical variability in the samples to be analysed. Chemical variability in the API content between production samples is typically very low (less than $\pm 5\%$ around the nominal content) and physical variability a result of the effects of each step of the production process on their spectra. Physical variability can originate from a variety of sources including granulation (whether dry or wet), compression (differences in compaction pressure between cores), tablet shape (cylindrical, oblong) and lacquering (differences in coating thickness between tablets). Their effects on spectra can be quite substantial and result from differences within or between batches.

Constructing an appropriate calibration set requires expanding chemical variability in the samples in order to encompass a wide enough concentration range. Incorporating chemical variability into the calibration set is fairly simple and involves preparing laboratory samples spanning the desired content range for each formulation component. This is not so easy with the calibration set, however. The problem is how to incorporate the physical variability to the calibration set. As noted in the Introduction, the problem can be solved in various ways. In this

work, we developed a new, straightforward approach to incorporating the variability of the production process into laboratory samples spanning the required concentration range.

Chemical variability is incorporated into the calibration set by using a set of powder laboratory samples prepared in accordance with a D-optimal design. This allows the desired concentration range for each component to be defined while minimizing collinearity between concentration values. Table 2 shows the spectral correlation and concentration coefficients the spectral and concentration correlation for samples prepared by following the prescriptions of the D-optimal design. It should be noted that spectral correlation between components in the formulation exceeded 0.74 in all cases and was specially high (0.97) for maize starch and cellulose. The correlation coefficients between concentrations were highest for the ibuprofen–maize starch couple (−0.85). Although a lower coefficient would have been desirable, one should bear in mind that these two components in combination account for 92% of the formulation content (63.5% the API and 28.5% the excipient); it is therefore virtually impossible to avoid such a high collinearity in a mixture of the two. On the other hand, the spectral correlation for maize starch and cellulose was quite low (0.37).

Incorporating the physical variability of the production process into the calibration process is a more complex task since the treatments undergone by the powder mixture components during the process reflect in their NIR spectra in a manner that is rather difficult to predict. The NIR spectrum obtained after each production step gathers the effects of the different treatments applied to the initial mixture [28]. In order to incorporate such effects, we constructed the calibration set in terms of the calculated *process variability matrix* (see Section 2.5). Such a matrix will only contain the whole variability of the production process if the laboratory mixture used as reference contains exactly the same API and excipient concentrations as the production tablets; otherwise, the results of the ensuing model will be subject to a systematic error [28].

Section 2.5 describes the methodology used to construct the *process variability matrix* and Fig. 2 depicts its application in order to facilitate understanding of the procedure for obtaining the *extended total variability matrix*.

Figure 3 shows the absorbance spectra for a laboratory powder mixture containing the nominal concentrations for a 400 mg production tablet and the process spectrum S_P obtained for a 400 mg tablet. The process spectrum was calculated as the difference between that for the 400 mg tablets and the powder mixture containing its nominal concentration. As can be seen, it exhibited two inverted absorption regions: one around 1700 nm and the other above 2100 nm; also, the two coincided with the strongest absorption regions for the tablet. Based on the visual appearance of the spectrum, the effect of each step of the production process (granulation, compaction and coating) varied with the particular wavelength. The results for the 600 mg formulation were quite similar.

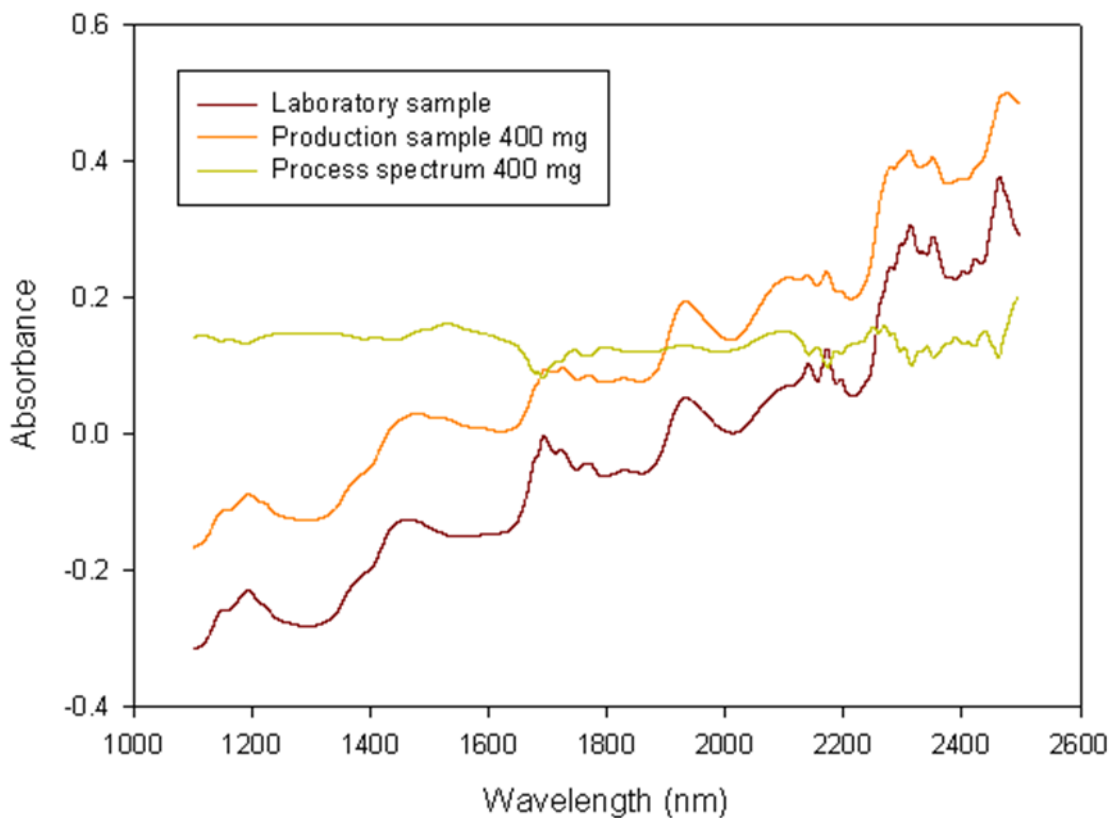


Figure 3. Absorbance spectra for a laboratory powder mixture and a production sample both containing the same concentration of each component, and process spectrum calculated from the previous two.

Combining the spectral matrix for the laboratory powder samples –which incorporated chemical variability– and the *extended process variability matrix* –which incorporated physical variability– provided a new matrix containing all sources of variability in the tablet production process. As can be seen from Fig. 4 (a scatter plot of the PCA scores for laboratory samples added to the *extended variability matrix* and production samples of the two studied doses), the production samples fell in the sample cluster of the *extended total variability matrix*. The figure, which additionally shows the origin of each type of sample, reveals the way the laboratory samples clustered according to each factor, which allowed us to assess the usefulness of each individual factor. As can be seen, the laboratory samples to which a factor m of 1.25 was applied fell on the right of the graph, far from the production samples. This led us to exclude them from the calibration set as they were judged redundant with a view to incorporating the variability of the production process and would simply complicate the PLS models. On the other hand, the samples to which $m = 0.5$ was applied fell right on the boundary for the cluster of the 600 mg tablets and were judged indispensable for inclusion in the calibration set. The samples to which $m = 0.75$ was applied were also discarded since using those with a factor of 0.5 and 1 sufficed to span the whole experimental surface and allowed fairly uncomplicated PLS models to be established.

The above-described approach allows the whole variability of the production process to be incorporated via a small number of production samples, thereby substantially reducing experimental work as it avoids the need to record the spectra for a large number of samples.

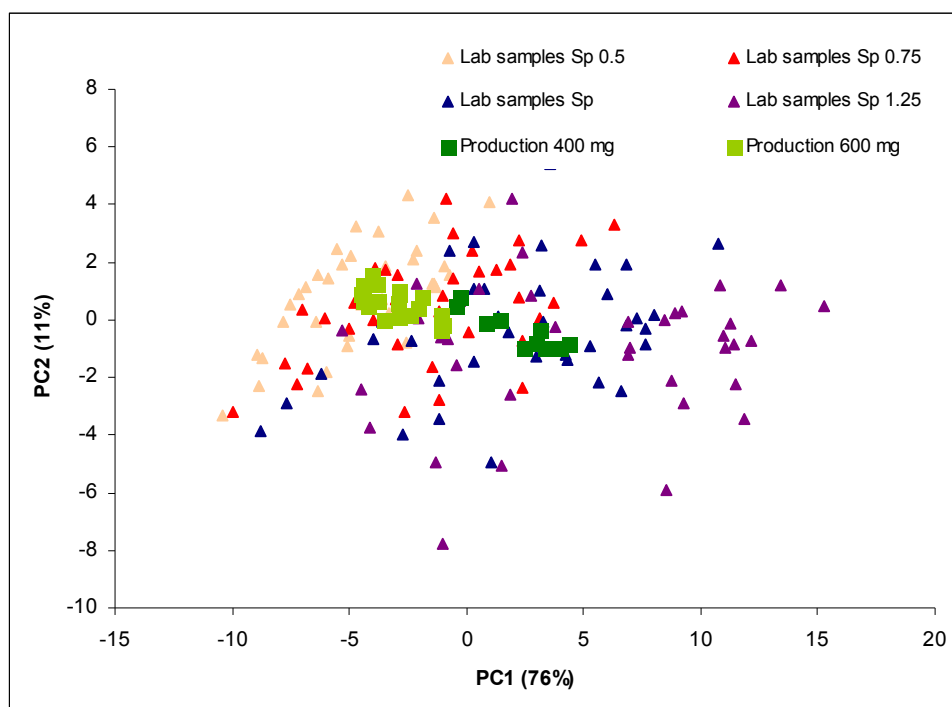


Figure 4. Scatter plot of PCA scores for laboratory samples modified with the extended process variability matrix and production samples. Spectral treatment: first derivative + SNV over the wavelength range 1100–2500 nm.

The *extended total variability matrix* contained mixtures spanning a wide enough concentration range for each component of the formulation to allow a PLS calibration model for each analyte (API and excipients) to be constructed. To this end, the matrix was split into two subsets that were used to construct the calibration models and assess their predictive ability, respectively. Table 3 shows the characteristics of the ensuing models for the API and the four excipients.

A first-derivative treatment followed by SNV was found to be the most suitable combination for constructing the models; the choice was assisted by the scatter plot of the PCA scores. All models except that for fumed silica spanned the whole wavelength range (1100–2500 nm). In fact, the fact that fumed silica exhibits no salient absorption bands in the NIR region precluded choosing an appropriate wavelength range, which had to be determined via the Martens uncertainty test as implemented in The Unscrambler. This is a significance testing method which assesses the stability of regression results and identifies any perturbing samples or variables in selecting the significant X variables. The test is based on the jack-knifing principle [29].

As stated above, the API and maize starch were the major components of the studied formulation and their high concentrations allowed models to be constructed from a small number of PLS factors (3 for the API and 4 for the excipient, Table 3). On the other hand, the PLS models for cellulose and fumed silica, which are present in relatively small amounts in the formulation, were more complex and required 11 and 10 PLS factors, respectively. The increased complexity of the models for cellulose and fumed silica can be ascribed to the high spectral correlation between these excipients (0.97), which usually hinders the determination of the minor component. The sample set used in an experimental design should ideally minimize correlation between concentrations (0.37 for these two excipients) with a view to obtaining good calibration models. In addition, the absence of substantial absorption bands in the spectrum for fumed silica increased the complexity of its calibration model. On the other hand, the model for magnesium stearate was comparable to that for the API in simplicity as a result of the excipient giving strong, well-defined bands despite its low concentration in the formulation.

All quantitation models explained at least 97% of the concentration variance, and both calibration and prediction graphs contained 0 for the intercept and 1 for the slope. Prediction errors, as RMSEP, never exceeded 1.0% (see Table 3).

The five models established were used to predict a set of production tablets. A total of 10 tablets from each of 10 different batches of the 400 mg formulation and 18 of the 600 mg formulation were used to record NIR spectra and predict the concentrations for each analyte and tablet. The final results were obtained by averaging the values for the different batches of each formulation. Table 4 lists the predictions and their standard deviations, as well as the average API content as obtained by HPLC and the theoretical reference values for the excipients.

Table 3. Characteristics of the PLS models for quantifying the API and excipients.

Characteristic	Ibuprofen		Maize starch		Cellulose		Fumed silica		Magnesium stearate	
	Calc.	Pred.	Calc.	Pred.	Calc.	Pred.	Calc.	Pred.	Calc.	Pred.
Spectral treatment	1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV		1D + SNV	
Wavelength range (nm)	1100–2500		1100–2500		1100–2500		1100–2500*		1100–2500	
Concentration range (% w/w)	50.8–74.6		18.3–37.7		2.9–8.4		1.2–2.7		0.0–6.9	
PLS factors	3		4		11		10		5	
Concentration variance (Y) (%)	97.4		97.8		97.1		97.0		99.2	
Offset	2±3	1±3	0.6 ±1.0	1.0 ±2.0	0.2 ±0.2	-0.3 ±0.5	0.1 ±0.1	-0.1 ±0.3	0.01± 0.05	0.03 ±0.07
Slope	0.97 ±0.04	0.98 ±0.04	0.98 ±0.04	0.97 ±0.05	0.97 ±0.05	1.03 ±0.9	0.97 ±0.06	1.0 ±0.2	0.99 ±0.02	0.98 ±0.03
RMSEC/P	0.86	1.00	0.64	1.03	0.24	0.49	0.06	0.12	0.15	0.24

* Wavelengths were selected from a Martens' uncertainty test based on the jack-knifing principle over the range 1100–2500 nm.

Table 4. Comparison of the NIR and reference values for the API and excipients.

Component	Value	400 mg tablets	600 mg tablets
Ibuprofen	NIR (% w/w)	64.1 (0.8)*	63.5 (1.1)*
	Reference (% w/w)	64.2 (0.9)**	64.0 (1.0)**
Maize starch	NIR (% w/w)	28.2 (0.6)*	28.3 (0.9)*
	Theoretical (% w/w)	28.5	28.5
Cellulose	NIR (% w/w)	5.3 (0.5)*	5.4 (0.5)*
	Theoretical (% w/w)	5.0	5.0
Silica fumed	NIR (% w/w)	2.1 (0.1)*	2.1 (0.3)*
	Theoretical (% w/w)	2.0	2.0
Magnesium stearate	NIR (% w/w)	0.9 (0.1)*	0.9 (0.2)*
	Theoretical (% w/w)	1.0	1.0

* Weighted standard deviation

**Standard deviation

The HPLC technique was used to determine the average API content for each batch and compare it with the NIR result via a paired *t*-test. The test result for the 400 mg tablets was $t_{\text{calc}} = 0.12$ (vs $t_{\text{crit}, 0.05/2, n=10} = 2.26$) and that for the 600 mg tablets $t_{\text{calc}} = 1.99$ (vs $t_{\text{crit}, 0.05/2, n=18} = 2.11$); therefore, t_{calc} was smaller than t_{crit} in both cases and the two methods can be assumed to provide statistically not different results. Because no alternative methods for quantifying the excipients were available, their NIR values were compared with their theoretical contents; in all cases, the predictions of the models were quite similar to the theoretical values and the weighted standard deviation comprised the theoretical value for each excipient (see Table 3).

4. CONCLUSIONS

Constructing PLS models by using the proposed procedure provides clear advantages over the alternative approaches described in the Introduction. In fact, the proposed approach allows one to construct accurate quantitation models not only for the API, but also for all excipients in a tablet, by using a set of samples containing the component concentrations prescribed by a D-optimal design.

Using the extended process variability to incorporate physical variability in the production process into the calibration set proved an effective strategy. In fact, multiplying the process spectrum by variable factors provided a new experimental domain encompassing production samples; this resulted in improved predictive ability in the ensuing models, as reflected in the low RMSEP values obtained ($< 1.0\%$) and in the results of a paired *t*-test applied to the API predictions.

The concentrations of API and excipients used to construct the PLS models are established by weighing on an analytical balance; this dispenses with the need for an alternative method to determine the reference API and excipient concentrations. The proposed approach therefore releases NIR spectroscopy from the need for a reference method to construct quantitation models for this type of sample, and improves accuracy and precision in the results.

The simplicity of the approach and, especially, the quality of its results, clearly make it an effective alternative to conventional methods for constructing NIR calibration methods for pharmaceutical analysis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Spain's Ministry of Science and Innovation (MICINN) for funding this research within the framework of Project CTQ2009-08312.

REFERENCES

- [1] European medicines agency. Guideline on specifications and control test on the finished product. June 1992. 3AQ11a.
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/3aq11aen.pdf>
- [2] ICH, Guidelines: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994; Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996. <http://www.ich.org>
- [3] European medicines agency. Guideline on excipients in the dossier for application for marketing authorisation of a medicinal product. January 2008.
EMA/CHMP/QWP/396951/2006.
<http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/qwp/39695106enfin.pdf>
- [4] M. Blanco, M. Alcalà. Chapter 14: NIR spectroscopy in pharmaceutical analysis. In Process Analytical Technology. 2nd edition. Ed K. Bakeev. In press
- [5] P. Dubois, J.R. Martinez and P. Levillain. Determination of five components in a pharmaceutical formulation using near infrared spectrophotometry, *Analyst* 112 (1987) 1675.
- [6] P. Corti, E. Dreassi, C. Murratzu, G. Corbini, L. Ballerini and S. Gravina. Application of NIRS to the quantity control of pharmaceuticals ketoprofen assay in different pharmaceutical formulae, *Pharm. Acta Helv* 64 (1989) 140.

- [7] P. Corti, E. Dreassi, G. Corbini, S. Lonardi, R. Viviani, L. Mosconi and M. Bernuzzi. Application of near infrared reflectance to the analytical control of pharmaceuticals . Assay of Ranitidine chlorhydrate and water content in tablets, *Pharm. Acta Helv.* 65 (1990) 28.
- [8] P. Corti, L. Savini, E. Dreassi, G. Ceramelli, L. Montechi and S. Lonardi. Application of NIRS to the control of pharmaceuticals identification and assay of several primary materials, *Pharm. Acta Helv.* 67 (1992) 57.
- [9] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch and C. de la Pezuela. Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations by near infrared reflectance spectroscopy, *Talanta* 40 (1993) 1671.
- [10] E. Dreassi, G. Ceramelli, L. Savini and P. Corti. Application of near-infrared reflectance analysis to the integrated control of antibiotic tablet production, *Analyst* 125 (1995) 319.
- [11] D. Jouan-Rimbaud, B. Walczak, D. L. Massart, I. R. Last and K. A. Prebble. Comparisson of multivariate methods based on latent vectors and methods based on wavelength selection for analysis of near-infrared spectroscopic data, *Anal. Chem. Acta*, 304 (1995) 285.
- [12] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch and C. de la Pezuela. Quantitation of active compound and major excipients in a pharmaceutical formulation by near infrared diffuse reflectance spectroscopy with fibre optical probe, *Anal. Chem. Acta*, 333 (1996) 147.
- [13] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch and C. de la Pezuela. Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry, *Analyst*, 122 (1997) 761.
- [14] M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, and S. Maspoch. Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy, *Anal. Chem. Acta* 392 (1999) 237.

- [15] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and N. Pou. Development and validation of near infrared method for the analytical control of a pharmaceutical preparation in three steps of the manufacturing process, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 534.
- [16] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH and N. Pou. Influence of the procedure used to prepare the calibration sample set on the performance of near infrared spectroscopy in quantitative pharmaceutical analyses, *Analyst* 126 (2001) 1129.
- [17] M. Blanco, M. Bautista and M. Alcalà. Preparing calibration sets in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 1236.
- [18] P. Merckle and K. A. Kovar. Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 365.
- [19] A. Eustaquio, P. Graham, R. D. Jee, A. C. Moffat and A. D. Trafford. Quantitation of paracetamol in intact tablets using near infrared transmittance spectroscopy, *Analyst*, 123 (1998) 2303.
- [20] P. Corti, G. Ceramelli, E. Dreasi and S. Mattii. Near infrared transmittance analysis for the assay of solid pharmaceutical dosage forms, *Analyst*, 124 (1999) 755.
- [21] N. W. Broad, R. D. Jee, A. C. Moffat and M. R. Smith. Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets, *Analyst*. 126 (2001) 2207.
- [22] C. P. Meza, M. A. Santos and R. J. Romañach. Quantitation of drug content in a low dosage by transmissión near infrared spectroscopy, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7 (2006) 29.
- [23] Y. Dou, N. Qu, B. Wang, Y. Z. Chi and Y. L. Ren. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32 (2007) 193.

- [24] D. Xiang, M. Konigsberger, B. Wabuye, K. Hornung and J. Cheney. Development of robust quantitative methods by near-infrared spectroscopy for rapid pharmaceutical determination of content uniformity in complex tablet matrix, *Analyst*. 134 (2009) 1405.
- [25] M. Blanco, M. Alcalà, J. M. González and E. Torras. A process analytical approach based on near infrared spectroscopy: tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2137.
- [26] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, (2001) 5th edn. Wiley, New York.
- [27] G. E. Ritchie, R. W. Roller, E. W. Ciurczak, H. Mark, C. Tso and S. A. MacDonald. Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure. Part B: Application to alternate content uniformity and release assay methods for pharmaceutical solid dosage forms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 159.
- [28] M. Blanco and A. Peguero. NIR determination of actives in pharmaceuticals without a reference method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (submitted)
- [29] The Unscrambler help topics in Unscrambler 9.8 from CAMO Process. Norway.

