

## Desarrollo de un método analítico para la cuantificación del antibiótico florfenicol en un producto terminado farmacéutico veterinario por espectroscopía de infrarrojo cercano

An analytical method for quantifying antibiotics florfenicol in a veterinary pharmaceutical finished product by near-infrared spectroscopy

Luz Figueroa Zambrano



Natalia Afanasjeva



Jhon Ramírez Peña



Universidad del Valle, Colombia

OPEN ACCESS

Recibido: 14/12/2022

Aceptado: 06/03/2023

Publicado: 08/05/2023

Correspondencia de autores:

luz.figueroa@correounivalle.edu.co



Copyright 2020  
by Investigación e  
Innovación en Ingenierías

### Resumen

**Objetivo:** Diseñar un método para la cuantificación del Ingrediente Farmacéutico Activo (API) del antibiótico florfenicol, en un producto farmacéutico veterinario granulado por medio de la implementación de la técnica analítica de espectroscopía de infrarrojo cercano. **Metodología:** La metodología NIR implica obtener un método de predicción que incorpore la variabilidad de ingrediente API de florfenicol en el intervalo (16 g/100g (p/p) – 24 g/100g (p/p)), en el producto terminado. **Resultados:** El método analítico se logró diseñar por medio de técnicas quimiométricas con transformaciones espectrales y una regresión multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS), con la cual se obtienen los criterios de coeficiente de correlación (R), el error de calibración (SEC) y el error de validación cruzada (SECV). Finalmente, se realiza una validación externa de la técnica analítica NIR para conocer la capacidad predictiva de cuantificar el API florfenicol en el producto terminado, determinando el error estándar de predicción (SEP) evaluando parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. **Conclusiones:** El método NIR diseñado permite la cuantificación del API florfenicol en el producto terminado en presentación granular para aplicación de control de calidad en una industria farmacéutica como una técnica alterna a la técnica tradicional de HPLC.

**Palabras clave:** antibiótico, principio activo, quimiometría, granulado.

### Abstract

**Objective:** Design a method for the quantification of active ingredients (API) of antibiotic florfenicol in a veterinary pharmaceutical product granulated by means of implementation of the analytical technique of infrared spectroscopy near. **Methodology:** The NIR methodology implies obtaining a prediction method that incorporates the choice of florfenicol API ingredient in the interval (16 g/100g (w/w) – 24 g/100g (w/w)), in the finished product. **Results:** This is achieved by means of chemometric techniques with transformations spectral data and a multivariate Partial Least Squares regression (PLS), in which the correlation coefficient criteria (R), the Calibration Error (SEC) and the Cross Validation Error (SECV) are obtained. Finally, an external validation of the NIR analytical technique is carried out to know the predictive capacity of quantifying API florfenicol (in the finished product, determining the Standard Error of Prediction (SEP) evaluating parameters of specificity, linearity, accuracy, precision and sturdiness. **Conclusions:** The NIR method designed allows the quantification of API florfenicol in the finished product for application of quality control in a pharmaceutical industry. The designed method can be used as an alternative analytical technique to the traditional HPLC technique.

**Keywords:** antibiotic, active ingredient, chemometrics, granulate.

## Introducción

En la actualidad es importante obtener metodologías analíticas para la industria farmacéutica veterinaria que puedan implementarse de tal manera que no afecten los resultados de cuantificación del producto. No obstante, estas nuevas metodologías deberían minimizar el uso excesivo de sustancias químicas utilizadas para la extracción y disolución de los activos y que presentan un impacto ambiental [1]

such as the quality control of bulk drugs and pharmaceutical formulations, as well as the analysis of drugs in biological samples. However, RP-HPLC methods commonly use large amounts of organic solvents and generate high quantities of waste to be disposed, leading to some issues in terms of ecological impact and operator safety. In this context, greening HPLC methods is becoming highly desirable. One strategy to reduce the impact of hazardous solvents is to replace classically used organic solvents (i.e., acetonitrile and methanol).

La NIR se considera una técnica útil en el campo analítico de control farmacéutico [2], alimenticio [3], medicina tradicional [4] including silybin, silychristin and silydianin (SS, agrícola [5] y se caracteriza por tener alta velocidad de análisis, confiabilidad, seguridad, bajo costo de operación y de mantenimiento. Es conocido que la espectroscopia NIR no es una técnica destructiva debido al procesamiento mínimo de muestras y no requiere el uso de solventes químicos [6] y se puede operar en modos de transmitancia (NIT) y reflectancia [7,8] mostrando las vibraciones que provienen de grupos que tienen un átomo de hidrógeno, principalmente en enlaces químicos C – H, O – H y N – H [9]. La señal electromagnética del equipo penetra la muestra varios milímetros obteniendo espectros NIR que no solo proporcionan información de la estructura química, sino también características físicas de tamaño de partícula, humedad, polimorfismo, etc.

La técnica analítica NIR se aplica al producto terminado completo, es decir, a la compleja composición del principio API, los excipientes y la forma farmacéutica. De esta manera el producto que se analiza no requiere ninguna transformación química (extracción y/o dilución en algún solvente). Se conocen diferentes aplicaciones de NIR en procesos de fabricación en línea, como la determinación cuantitativa de productos encapsulados [10] this is done by visual inspection of spectra of the sample, its interfering layers and main pharmaceutical ingredients. Secondly, three regression models for quantification of active pharmaceutical ingredient (API, control en línea del ingrediente API durante la mezcla [2] y control de uniformidad de contenido con determinación de las propiedades de las tabletas [11].

Zhao et al. [12] interval partial least squares optimized by the genetic algorithm (GA-iPLS han presentado una revisión sobre la cuantificación de *Yangwei* sin azúcar y han enunciado la posibilidad de controlar el proceso para mantener el tamaño del gránulo adecuado. Liu et al. [3] requirieron una transferencia espectral de los espectros de gránulos a espectros en polvo para la cuantificación de la proteína en un producto.

Para la interpretación de los espectros NIR se requiere un análisis quimiométrico donde se usa la aplicación de los métodos matemáticos y estadísticos, como el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) y análisis de componentes principales (PCA) [13, 14, 15, 16] para lograr obtener la máxima cantidad de información química pertinente a partir de señales analíticas [17, 18]. El método de calibración multivariado quimiométrico se aplica primero estableciendo una relación entre las longitudes de onda NIR y la propiedad de interés para obtener un modelo predictivo, la cual se usa posteriormente para predecir las mismas propiedades a partir de las longitudes de onda NIR de muestras desconocidas.

Existen varias guías que no son requerimientos obligatorios de la Agencia Europea de Medicamentos, EMA [19], la tecnología analítica de procesos (PAT) aplicados por la FDA [20] y la Farmacopea de Estados Unidos,

USP [21] que pueden ser aplicadas para desarrollar y validar un método NIR [22NIR and Chemometrics, as well as there is a lot of Academia research on the matter. Despite that, the word innovation is often associated to such tools and there is a still slow implementation at industry. The paper is the outcome of the Associazione Farmaceutici dell'Industria (AFI, 23].

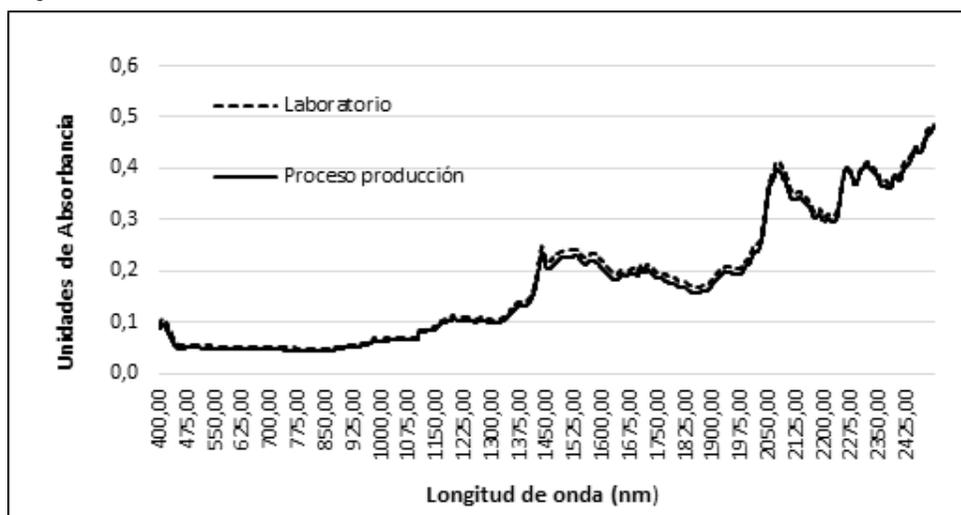
El objetivo de este proyecto fue desarrollar una metodología analítica de espectroscopía NIR que permita la cuantificación de antibiótico florfenicol en un producto terminado farmacéutico veterinario y en condiciones del clima tropical de la ciudad de Cali, Colombia y que el método sea aplicado de manera rutinaria en una empresa farmacéutica para la definición del estatus de calidad del producto mencionado. El florfenicol se conoce como un antibiótico sintético bacteriostático de amplio espectro dentro del grupo de los fenicoles que es activo frente a la mayoría de las bacterias gram-positivas y gram-negativas y el mecanismo de actuación se realiza a nivel ribosómico por inhibición de la síntesis proteica.

## Materiales y métodos

### Selección y obtención de las muestras de calibración

Las muestras de calibración se obtuvieron del proceso productivo y generalmente exhiben la variabilidad esperada del proceso; no obstante, estas muestras por sí solas no proporcionan un rango suficiente de variabilidad, por eso se prepararon las muestras adicionales en condiciones de laboratorio [24]. Estas últimas muestras contienen una porción del proceso productivo a la cual se le adicionaron cantidades de activo o placebo según el caso, con el fin de mantener la mayor similitud posible con las muestras de producción, como se evidencian los NIR en la Figura 1. Se utilizaron 77 muestras de producto terminado de antibiótico florfenicol, de las cuales 14 fueron de productos fabricados durante los años 2018-2020; y 63 muestras en el año 2021. Adicionalmente, se obtuvieron 29 muestras de lotes fabricados en el laboratorio que cubren el rango de concentraciones de API entre el 50 al 150 % (p/p) del contenido declarado de florfenicol. Fue un total de 108 muestras, incluyendo dos lotes de placebo del producto, para el desarrollo del método de cuantificación.

Figura 1. Comparación de espectros NIR de muestras del producto terminado obtenidos del proceso de producción y del laboratorio



Fuente: Elaboración propia

### Obtención de las lecturas en NIR

Previo a la toma de los espectros NIR, las muestras son sometidas a un proceso de molienda con un equipo FOSS KN 195 con refrigeración, a 20000 rpm por 2 ciclos de 10 s para obtener un tamaño de partícula de muestras más homogéneo. Los espectros de estas muestras son tomados en un instrumento XDS NIR-FOSS: en el módulo de sólidos XDS (reflectancia) Rapid Content Analyzer. En el software de Metrohm NIRS, 1997-2018 cada medida corresponde al promedio de 36 escaneos en una resolución de 16 cm<sup>-1</sup>, en el rango de 400 nm a 2500 nm. Cada muestra es compactada en una celda y leída por triplicado girando la celda 120° aproximadamente. Se utilizó el resultado promedio de los espectros leídos.

### Método de referencia

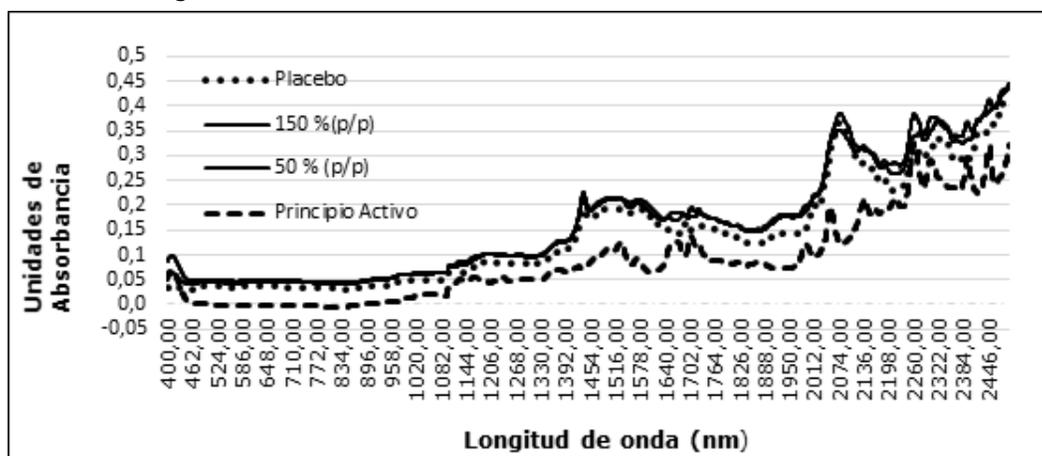
De la misma porción de muestra leída en el instrumento NIR se determinó la concentración de florfenicol según la técnica analítica de referencia cromatográfica HPLC. Se realizaron dos réplicas por cada muestra y se utilizó el valor promedio como el valor de referencia.

### Procesamiento espectral y selección de variables

En esta etapa se usaron los métodos matemáticos para tratar las transformaciones espectrales tales como: corrección de base línea (B-Corr), primera derivada (1ra y 2da) y variación normal estándar (SNV), que permiten amplificar la variación de interés dentro del conjunto de datos espectrales y atenuar la variación no pertinente a variables necesarias.

Para la elección de variables se seleccionó la longitud de onda de forma manual estableciendo una relación del cambio en altura espectral con el cambio de concentración, como se muestra en la Figura 2. De esta manera se observa el espectro del API a una altura menor con respecto a la altura de los espectros con variación de contenido de API de 150% y 50% en producto terminado y de 0,0% en el placebo. Esta selección es de un enfoque univariado que colecciona aquellas variables que tienen una mayor correlación con la respuesta. Sin embargo, esta correlación tuvo que ser además confirmada con el uso de la técnica multivariada de PLS para análisis cuantitativos y técnica PCA para análisis cualitativos. El procesamiento incluye ajuste de escala con corrección de base línea, lo cual se muestra en la Figura 3 y se evidencia un ajuste de altura entre los espectros NIR, pero se mantiene una diferencia en altura. También se usan tratamientos de primera derivada de Savitzky-Golay y variación SNV.

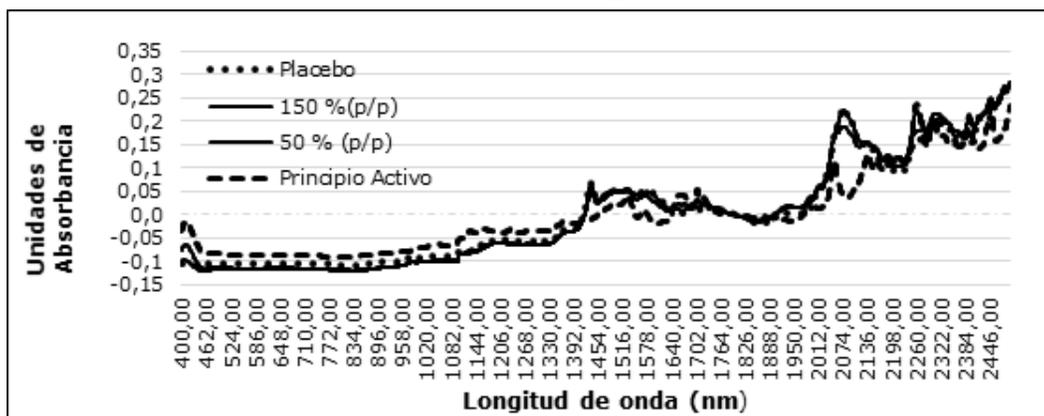
Figura 2. Espectros NIR sin procesamiento correlacionando el cambio de altura con el aumento de concentración del ingrediente API de antibiótico florfenicol



Fuente: Elaboración propia

Estos procesamientos son normalizaciones que permiten ajustar factores de dispersión por tamaño de partícula, por volumen de muestra, atenuar o eliminar desviaciones lineales o la contribución de ruido. Se tuvo en cuenta que un procesamiento excesivo puede aumentar variaciones indeseadas y algunos métodos de procesamiento pueden admitir datos con ruido.

Figura 3. Espectros con procesamiento B-Corr del producto antibiótico terminado correlacionando el cambio de altura versus el aumento de concentración del ingrediente API de florfenicol



Fuente: Elaboración propia

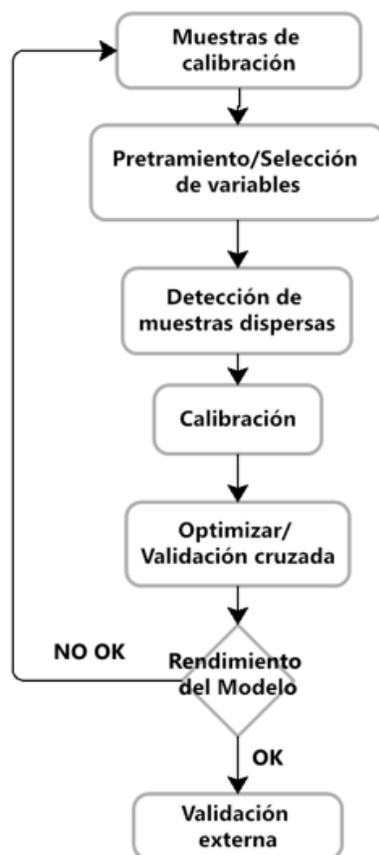
### Calibración cualitativa

Consistió en crear un modelo de identificación basado en la autenticación de la “huella dactilar”, donde se definen las características físicas y químicas de un espectro del producto antibiótico terminado. Un modelo cualitativo se puede crear por medio de las propiedades categóricas usando algoritmos quimiométricos (PCA); los algoritmos deberían aprovechar ya sea la proximidad o la distancia en espacios multivariante, lo que resulta en una asignación cualitativa de las muestras a una o más clases, dependiendo de la aplicación [15].

### Calibración cuantitativa

Se desarrollaron varios modelos de calibración por medio del método multivariado de PLS, el cual permite transformar la información espectral para predecir la composición química y física de la muestra, extrayendo variables de interés apropiada [25]. Las calibraciones se realizaron con el software de Vision 4.1.1.70 de Metrohm © NIRS, 1997-2018. La obtención de un modelo quimiométrico requiere de un proceso iterativo, resumido en la Figura 4, el cual se puede repetir las veces que sea necesario para obtener un modelo aceptable.

Figura 4. Proceso general propuesto para obtener un modelo quimiométrico



Fuente: Elaboración propia

Existen parámetros para definir el método apropiado de una calibración final, descritos a continuación. Decidir cuántos factores usar es una parte importante de la calibración. Con muy pocos factores, la calibración da cuenta de muy pobre información y errores de predicción altos. Cuando se utilizan demasiados factores, el modelo incorpora sobreajuste a los datos de calibración (incluye ruido o errores sistemáticos exclusivos), lo que da como resultado un modelo que no es robusto, ni estable. Las estadísticas para la calibración son proporcionadas automáticamente por el software [26].

El número óptimo de factores se establece durante la validación cruzada, el software Vision calcula el PRESS (Error residual de predicción: suma de cuadrados) para cada factor, luego recomienda el uso del factor que tiene el valor mínimo.

$$PRESS = \sum (X_{v,i} - Y_{v,i})^2 \quad (1)$$

Por medio de la validación cruzada se obtiene un estimado instantáneo del desempeño del modelo generado, ya que, utiliza las mismas muestras para la predicción y el desarrollo de la calibración. El enfoque de validación cruzada n-iteraciones se usa comúnmente para dividir los datos en n subconjuntos para realizar la validación cruzada. En cada una de las n iteraciones, se usan n-1 subconjuntos para desarrollar el modelo, que se utiliza para predecir la n<sup>ma</sup> división de datos remanente. El procedimiento se repite hasta que se predicen todos los subconjuntos. [15]. De esta manera se determina el error estándar de la validación

cruzada de acuerdo con la ecuación (2), que indica la desviación estándar de las diferencias de los datos de referencia ( $X_{cv,i}$ ) y los datos predichos NIR ( $Y_{cv,i}$ ) del número de muestras totales ( $n$ ) usado.

$$SECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{cv,i} - Y_{cv,i})^2}{n}} \quad (2)$$

El coeficiente de correlación múltiple ( $R^2$ ) es una medida de qué tan bien se ajustan los datos espectrales a los datos del principio activo. El valor de uno "1" significa que los valores del principio activo se ajustan perfectamente a los datos espectrales y todos los residuales son iguales a cero (0).

Otro parámetro estadístico definido es el error estándar de calibración (SEC), que es la medida de la variabilidad de la diferencia entre el valor predicho NIR ( $Y_{c,i}$ ) y el valor de referencia ( $X_{c,i}$ ) del grupo de muestras de calibración ( $n$ ) y el número de factores definidos ( $K$ ) en la ecuación (3).

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{c,i} - Y_{c,i})^2}{n - K - 1}} \quad (3)$$

El modelo óptimo se definió teniendo en cuenta estos parámetros estadísticos anteriores.

Posteriormente se validó, y, aunque aún no existe un método estándar para validar un método cuantitativo NIR, esto se realizó siguiendo parámetros generales recomendados en algunas publicaciones: especificidad, exactitud, precisión o repetibilidad, precisión intermedia, linealidad, rango y robustez [15, 19, 20].

Con los datos obtenidos de la validación externa se determinó el parámetro de error SEP para cada modelo de calibración, este representa una medida de la variabilidad de la diferencia entre los valores predichos ( $Y_{v,i}$ ) y de referencia ( $X_{v,i}$ ) para un grupo de muestras independiente de validación. El valor del SEP de la ecuación (4) se espera que sea lo más bajo posible y siempre inferior a valor del SEC.

$$SEP = \sqrt{\left\{ \sum (X_{v,i} - Y_{v,i})^2 - \frac{[\sum (X_{v,i} - Y_{v,i})]^2}{n} \right\} / (n - 1)} \quad (4)$$

### Validación

Las muestras para validación son un grupo independiente a las usadas en la calibración, proceden de producción y del laboratorio para obtener resultados estadísticamente significativos de acuerdo con los siguientes parámetros [20]:

**Especificidad.** Esta prueba se evalúa en el método NIR desarrollado y se basa en demostrar la selectividad y el poder discriminatorio. La evaluación permite realizar una validación cualitativa del método, lo que implica utilizar controles positivos y negativos [20].

**Exactitud.** Está definida para un procedimiento analítico al objeto de análisis como la proximidad entre los resultados de la prueba, obtenidos mediante el procedimiento y el valor aceptado como verdadero [27]. Se evalúa en tres niveles de concentración de 80, 100 y 120 % (p/p) del contenido declarado.

**Precisión.** Determina el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples lecturas de una muestra homogénea. Se calcula la desviación estándar de los resultados. En esta prueba no se realiza la comparación con el método de referencia, ya que el interés está en la precisión de los datos generados por el método NIR. Se evalúa en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

**Linealidad y rango.** La linealidad de un procedimiento analítico se basa en la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática, a la concentración del analito de muestra en un intervalo dado [27]. El desempeño predictivo de un modelo quimiométrico debe demostrarse mediante la linealidad de una gráfica de los resultados del modelo en función de los valores de referencia [15]. De la misma porción de muestra del producto terminado analizada por el método de NIR, se toman las cantidades requeridas para el análisis por el método cromatográfico de referencia HPLC, a fin de comparar los resultados obtenidos por cada método sobre una misma porción de muestra [20].

**Robustez.** La medida de la capacidad que tiene el método para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros de ejecución y aun así proporcionar un resultado confiable durante el uso normal [27].

## Resultados

**Calibración cualitativa.** En el desarrollo de la calibración cualitativa definido en la Tabla 1, se realizaron tratamientos espectrales, se calcularon las puntuaciones de los PCA y las distancias de Mahalanobis usando los espectros previamente definidos para la calibración.

Tabla 1. Parámetros definidos para el modelo de identificación del producto terminado

Algoritmo de selección	Procesamiento matemático	Región espectral (nm)	Cantidad de muestras	Umbral definido
Distancia de Mahalanobis por componentes principales	Corrección de base línea SNV	700-2500	106	0.500

Fuente: Elaboración propia

Esta calibración cualitativa se establece como una medida de similitud entre los espectros de calibración: a medida que disminuye la distancia, aumenta la similitud entre los espectros [22]. Para futuras muestras analizadas sus espectros serán identificados como negativos cuando presenten resultados superiores al umbral de 0.500.

**Calibración cuantitativa.** Se desarrollaron 30 modelos de calibración usando el método multivariado PLS. De estos, se probaron 6, cuya configuración se encuentra en la Tabla 2. En los modelos 1, 2, 3 y 5 se usó la región espectral entre 1100 - 2500 nm. En los modelos 4 y 5 la región espectral se dividió en dos subregiones de 1100 -1680 nm y 1698-2500 nm. Estos 6 modelos se definen con un  $R^2$  superior a 0,9 y por el SECV bajo. En todos los modelos se estableció una *relación lineal entre la señal espectral y el contenido de API* [15]. Adicionalmente, se tuvo en cuenta que la diferencia entre los datos predichos NIR y HPLC es menor a 3, en la evaluación de la validación cruzada. *No obstante, la decisión definitiva se da por los estadísticos satisfactorios en las predicciones del modelo durante la validación externa.*

Tabla 2. Resultados de los modelos definidos, los tratamientos de SNV, B-Corr y 1ra-S-G

Número de modelo	Región espectral	# factores	R2	SEC*	SECV‡	Tratamiento matemático	SEP	RMSEP
1	1100-2500	10	0.9968	1.1699	1.6185	SNV	1.424	1.496
						1ra- S-G		
2	1100-2500	8	0.9959	1.2713	1.6461	SNV	1.142	1.271
						1ra-S-G		
3	1100-2500	8	0.9941	1.4903	1.9791	B-Corr	0.855	0.827
						1ra-S-G		
4	1100-1680 1698-2500	10	0.9956	1.3355	1.8410	B-Corr	1.311	1.279
						1ra-S-G		
5	1100-2500	10	0.9957	1.3218	1.8263	B-Corr	1.335	1.296
						1ra-S-G		
6	1100-1680 1698-2500	8	0.9942	1.5171	1.8410	B-Corr	1.076	1.201
						1ra-S-G		

Fuente: Elaboración propia

Los datos para calcular el valor del SEP (Tabla 1) según la ecuación (4), son obtenidos a partir de la predicción de las muestras de validación externa de los 6 modelos seleccionados y comparados con los datos obtenidos por el método de referencia HPLC como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de las predicciones de cada una de las muestras de antibiótico según los modelos definidos en la Tabla 2

Número de modelo			1	2	3	4	5	6
Nivel C, (%)	ID Muestra	Concentración de referencia, X, (%)	Respuesta NIR, Y, (%)					
80	V.80-1	80.3	79.5	79.8	79.6	77.9	77.9	79.9
	V.80-2	78.4	78.9	79.7	78.3	78.6	78.6	78.8
	V.80-3	78.2	79.4	79.8	78.6	78.4	78.4	79.1
90	V.90-1	90.3	89.9	90.4	89.1	89.0	89.0	89.6
	V.90-2	90.2	90.2	90.5	90.3	89.9	89.9	90.8
	V.90-3	89.6	89.6	90.0	88.9	88.8	88.8	89.4
100	V.100-1	105.5	104.3	104.5	104.3	104.1	104.1	104.9
	V.100-2	106,0	104.7	105.1	105.1	104.3	104.3	105.6
	V.100-1	106.3	105.0	105.0	105.4	104.1	104.1	105.6
110	V.110-1	108.3	109.3	109.3	108.7	108.9	108.9	109.2
	V.110-2	109.2	111.7	111.4	110.9	111.1	111.1	111.7
	V.110-3	111.0	112.5	112.2	111.6	111.9	111.9	112.2
120	V.120-2	117.6	120.1	119.3	118.3	118.9	118.9	119.5
	V.120-4	118.4	120.8	120.2	119.3	119.8	119.8	120.4
	V.120-5	120.2	122.4	121.8	120.6	121.0	121.0	121.9

Fuente: Elaboración propia

De esta manera, el modelo NIR definido es el número 3 descrito en la Tabla 2. Este es el modelo que presenta el menor valor del SEP (0.855) o el RMSEP (0.827) y concuerda con [20]. El modelo tiene un tratamiento matemático de variación normal estándar (SNV) y 1ra derivada de Savitzky-Golay (1ra-S-G), en la región espectral NIR entre 1100nm y 2500nm. Está representado por 108 muestras según lo mencionado en la sección 2, entre las cuales hay muestras de proceso de producción de antibiótico y muestras de laboratorio dentro del rango de concentración de 50% al 150% (p/p) del contenido declarado de florfenicol.

### **Muestras para validación**

Se utilizaron tres muestras de proceso de producción y doce muestras del laboratorio, cubriendo el rango de concentraciones de principio activo entre el 80% al 120% (p/p) del contenido declarado, siguiendo las recomendaciones de las guías reconocidas [19, 20, 27, 28, 29].

**Especificidad.** Como se observa en la Tabla 4, para el control negativo se evaluó una muestra de placebo que contiene todos los excipientes del producto terminado sin incluir el API, una muestra con características físicas de aspecto granular y de color similar pero con composición de activo y excipientes diferentes, y el control positivo fue una muestra de producto terminado.

Tabla 4. Resultados de parámetro de especificidad

Control	Muestra	*M-Distance on PCA Scores	Resultado	Concepto
Positivo	Producto terminado	<0.500	0.032	Pasa
Negativo	Muestra de placebo		0.513	Falla
Negativo	Producto terminado similar físicamente**		2.392	Falla

*Criterio de aceptación para Identificación por \*. Muestra con características físicas similares al producto terminado, pero NO contiene API Florfenicol\*\*.*

*Fuente: Elaboración propia*

El parámetro de especificidad de un método tradicional está definido como la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes, como impurezas, productos de degradación o componentes de matriz [27]. La especificidad del método NIR se basa en demostrar la selectividad y el poder discriminatorio. Mediante esta evaluación es implícito utilizar controles positivos y negativos [20]. Con este enfoque de selectividad se permite medir el florfenicol en la matriz del producto terminado de presentación (granular) específica o “huella dactilar”. En este sentido el método NIR, según los datos de la Tabla 4, tiene la capacidad para discriminar negativamente muestras de placebo del producto terminado con similitud de componentes excepto el API y producto de características físicas similares pero diferente composición. Esto se ve evidenciado con los resultados frente a los límites de identificación.

**Exactitud.** Los cálculos de exactitud fueron realizados con los datos de los niveles de concentración de 80%, 100% y 120% de la Tabla 3. Los resultados de las pruebas estadísticas de presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las pruebas estadísticas de exactitud del método

Test estadístico	Criterio de aceptación	Resultado	Concepto
Test G de Cochran	$G_{exp} < G_{tab} (0.870)$ ;	0.866	El factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.
Límites del % recuperación	98.0%-102.0%	99.8%	Conforme

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de exactitud comparan los valores de predicción obtenidos por el método NIR con los del método de referencia, para los 3 niveles de concentración de 80%, 100% y 120% (p/p) del contenido de florfenicol, mediante el cálculo del porcentaje de recuperación. Estos resultados están dentro del intervalo requerido y el cumplimiento del test G de Cochran. Lo anterior demuestra que el nivel de concentración del activo no tiene efecto sobre la exactitud, de acuerdo con los resultados de la Tabla 5.

### Pruebas de precisión

**Repetibilidad.** Se realiza con 10 mediciones de una misma muestra, sin alterar la posición de la celda, como se puede apreciar en la Tabla 6.

La precisión del modelo se verifica con resultados individuales del método NIR desarrollado. Esta precisión no es comparada con el método de referencia, ya que, el interés es determinar la desviación estándar de los datos generados por el método NIR como una medida de desempeño del procedimiento analítico en su totalidad.

Tabla 6. Resultados de la prueba de repetibilidad del método

Número de medición	Respuesta NIR (%)	Promedio ( $\bar{X}$ )	Desviación estándar (S)	%RSD
1	104.8	105.1	0.1	0.1
2	105.0			
3	105.1			
4	105.1			
5	105.0			
6	105.1			
7	105.2			
8	105.0			
9	105.2			
10	105.0			

Fuente: Elaboración propia

**Precisión intermedia.** Se determinó midiendo seis veces el contenido del API en una muestra homogénea del producto terminado, en dos días diferentes, por dos analistas aparte (la molienda de la muestra la realizó cada analista para cada día) y utilizando el mismo equipo, para un total de 24 mediciones, como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de precisión obtenidos por dos analistas y en dos días diferentes

Analista	Día 1				Día 2			
	Respuesta NIR (%)	$\bar{X}$	S	%RSD	Respuesta NIR (%)	$\bar{X}$	S	%RSD
1	105.3	105.8	0.3	0.3	104.8	105.5	0.5	0.5
	106.3				105.6			
	105.8				106.2			
	105.7				105.5			
	105.5				105.1			
	105.9				105.8			
2	104.8	105.7	0.6	0.5	105.8	105.3	0.6	0.6
	106.0				104.7			
	105.5				105.0			
	105.7				105.1			
	106.4				104.9			
	106.0				106.3			

Fuente: Elaboración propia

A partir de los datos de la Tabla 7 se obtuvieron los resultados para las pruebas estadísticas de precisión, como se presenta de la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de las pruebas estadísticas de precisión

Test estadístico	Criterio de aceptación	Resultado	Concepto	
Repetibilidad del instrumento	$DRS \leq 1.0\%$	0.1 %	Conforme	
Repetibilidad del método	$< 2.0 \%$	0.5%	Conforme	
Precisión intermedia	$< 2.0 \%$	0.6 %	Conforme	
	ANOVA Analista	Fcal < Ftab 4.32		0.28
	ANOVA Día			2.78

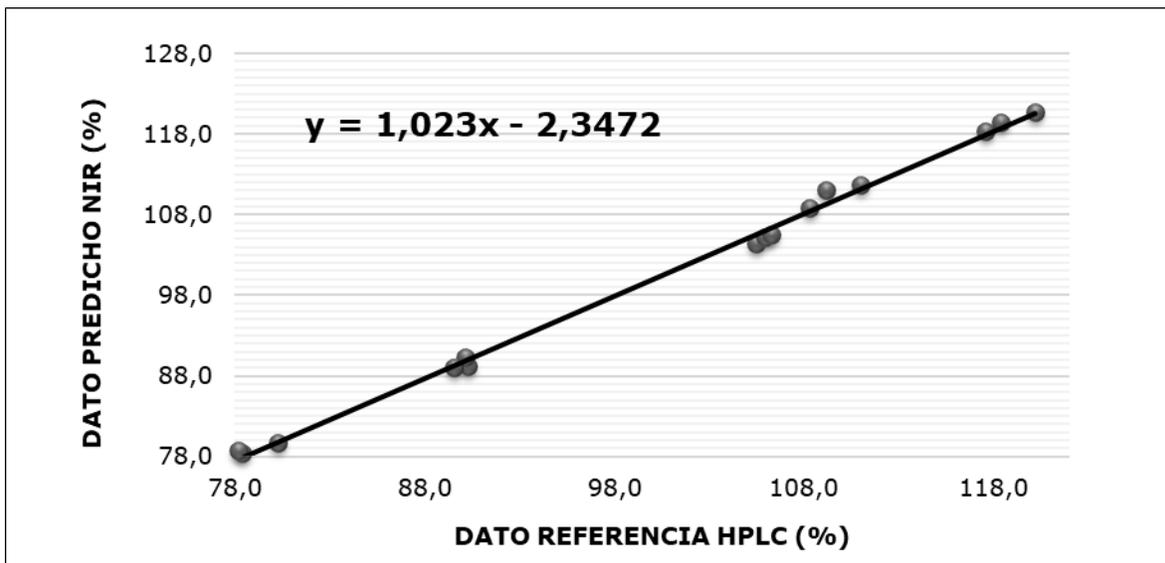
Fuente: Elaboración propia

Los resultados estadísticos de las Tablas 6 y 8 prueban que los resultados por medio del método analítico NIR son repetibles y reproducibles en condiciones de cambio de analista y día, por ende, estos cambios no tienen ninguna incidencia con la determinación de la concentración de florfenicol en el producto terminado. Lo que a la vez significa que los datos espectrales de las muestras leídas, siempre generarán el mismo resultado de concentración.

**Linealidad y rango.** Se realizó el análisis de las muestras por el método NIR y por el método de referencia por analista 1 en un día de análisis. Estos análisis se realizan por triplicado para los niveles de concentración de 80%, 90%, 100%, 110% y 120% (p/p), para un total de 15 determinaciones por cada técnica. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Para evaluar la linealidad del método obtenido, se procede a la ejecución de los cálculos estadísticos de una línea de regresión entre el método de referencia y el método NIR dentro del rango donde se desarrolló la calibración, como se presenta en la Figura 5.

Figura 5. Concentración obtenida por el método de referencia (HPLC) eje X versus la respuesta del instrumento NIR (predicción) eje Y



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9, se presentan los resultados estadísticos obtenidos para la valoración de linealidad del método NIR.

Tabla 9. Resultados estadísticos de las pruebas de linealidad del método NIR

Test estadístico	Criterio de aceptación	Resultado	Concepto u observación
Coefficiente de correlación	Mayor a 0.990	0.997	Conforme
Test de hipótesis para la pendiente (b)	$t_{exp} > t_{Tabla} (2.16)$	68.40	La pendiente es significativamente diferente de cero
Hipótesis para el intercepto (a)	$t_{exp} < t_{Tabla} (2.16)$	1.54	El intercepto NO es significativamente diferente de cero.
Test de Fisher para la regresión	$t_{exp} \gg t_{Tabla} (4.67)$	7274.36	La regresión es estadísticamente representativa.
Test de Fisher para la linealidad	$t_{exp} > t_{Tabla} (3.86)$	0.71	La falta de ajuste no es estadísticamente representativa.

Fuente: Elaboración propia

Se demostró la linealidad que hay entre los datos obtenidos por el método de HPLC y el método NIR, a partir de los resultados estadísticos para la linealidad obtenidos en la Tabla 9, se define que la pendiente es significativamente diferente de cero. Se infiere entonces que hay un cambio de la predicción NIR con respecto al cambio de concentración de la florfenicol confirmada por el método de referencia. El intercepto no es significativamente diferente de cero, es decir, que no hay interferencias que afecten la comparación de los resultados por ambas técnicas. De esta manera se indica que el modelo NIR proporciona la capacidad adecuada para predecir el contenido del API dentro del rango de concentraciones de 80% a 120% (p/p).

**Robustez.** Durante el desarrollo de la técnica NIR se consideraron algunos parámetros críticos para la

obtención de la calibración. Esto se ve reflejado en el tipo de muestras incorporadas, donde se contempló la variabilidad del proceso de fabricación del producto. Además, se incluyeron muestras preparadas en el laboratorio para incorporar variabilidad por concentración del API menor, lo que brinda robustez al método. El factor que más afecta la robustez de un método analítico está relacionado con el mismo instrumento. Estas condiciones operativas son verificadas durante cada uso a través de la prueba de rendimiento del equipo. De igual forma las condiciones ambientales se controlan y se mantienen estables.

En la robustez se evaluó la capacidad del método NIR de proveer resultados de precisión consistentes cuando se realizan variaciones deliberadas sobre los factores importantes de la ejecución del método. Sin embargo, durante la calibración del modelo se tuvo en cuenta toda la variabilidad detectada posible.

La solidez del método NIR se ha determinado comparando con datos de HPLC en la linealidad, en donde se tuvo en cuenta la variación de muestras de proceso de producción y muestras del laboratorio y se determinó una diferencia promedio de 0.73%. Los resultados muestran que el método NIR es bastante robusto al ser comparado con el método de referencia HPLC.

## Conclusiones

La metodología analítica de espectroscopia NIR desarrollada permite la cuantificación de antibiótico florfenicol en un producto terminado granular, obteniendo una técnica analítica rápida, sencilla, de bajo costo operativo en condiciones del clima tropical y amigable con el medio ambiente que no requiere del uso de solventes [28, 29].

Por medio de la validación externa se demostró que el método de cuantificación por NIR de florfenicol en el producto terminado es adecuado obteniéndose un método selectivo para florfenicol y específico para el producto terminado granular. La evaluación de la linealidad en el rango de 80 al 120 % (p/p) y comparada con la técnica de referencia HPLC, establece una correlación de 0.997 y confirmado con test estadísticos experimentales inferiores a los definidos en las Tablas.

## Referencias Bibliográficas

1. M. Yabré, L. Ferey, I. Somé, and K. Gaudin, "Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis," *Molecules*, vol. 23, no. 5, p. 1065, May 2018, doi: 10.3390/molecules23051065.
2. D. Biagi, P. Nencioni, M. Valleri, N. Calamassi, and P. Mura, "Development of a Near Infrared Spectroscopy method for the in-line quantitative bilastine drug determination during pharmaceutical powders blending," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 204, p. 114277, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.JPBA.2021.114277.
3. Y. Liu, Y. Li, Y. Peng, S. Yan, X. Zhao, and D. Han, "Non-destructive and rapid detection of the internal chemical composition of granules samples by spectral transfer," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 208, p. 104174, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.chemolab.2020.104174.
4. A. Ashie, H. Lei, B. Han, M. Xiong, and H. Yan, "Fast determination of three components in milk thistle extract with a hand-held NIR spectrometer and chemometrics tools," *Infrared Phys. Technol.*, vol. 113, p. 103629, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.infrared.2021.103629.
5. X. Liu *et al.*, "Determining the geographical origin and cultivation methods of Shanghai special rice using NIR and IRMS," *Food Chem.*, vol. 394, no. May, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133425.

6. C. da S. Araújo, L. L. Macedo, W. C. Vimercati, A. Ferreira, L. C. Prezotti, and S. H. Saraiva, "Determination of pH and acidity in green coffee using near-infrared spectroscopy and multivariate regression," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 100, no. 6, pp. 2488–2493, Apr. 2020, doi: 10.1002/jsfa.10270.
7. P. Williams, *Near infrared technology: Getting the best out of light*. Nanaimo, Canadá: AFRICAN SUN MeDIA, 2019.
8. L. Strani, "Process analytical technology approaches for dairy industry," Feb. 2021, doi: 10.13130/STRANI-LORENZO\_PHD2021-02-19.
9. K. B. Beć, J. Grabska, and C. W. Huck, "Current and future research directions in computer-aided near-infrared spectroscopy: A perspective," *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 254. Elsevier B.V., p. 119625, Jun. 05, 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119625.
10. O. Y. Rodionova, A. V. Titova, N. A. Demkin, K. S. Balyklova, and A. L. Pomerantsev, "Qualitative and quantitative analysis of counterfeit fluconazole capsules: A non-invasive approach using NIR spectroscopy and chemometrics," *Talanta*, vol. 195, pp. 662–667, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.088.
11. B. Nagy, A. Farkas, K. Magyar, B. Démuth, Z. K. Nagy, and G. Marosi, "Spectroscopic characterization of tablet properties in a continuous powder blending and tableting process," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 123, pp. 10–19, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.EJPS.2018.07.025.
12. J. Zhao, G. Tian, Y. Qiu, and H. Qu, "Rapid quantification of active pharmaceutical ingredient for sugar-free Yangwei granules in commercial production using FT-NIR spectroscopy based on machine learning techniques," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 245, p. 118878, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.saa.2020.118878.
13. Y. H. Yun, H. D. Li, B. C. Deng, and D. S. Cao, "An overview of variable selection methods in multivariate analysis of near-infrared spectra," *TRAC Trends Anal. Chem.*, vol. 113, pp. 102–115, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.TRAC.2019.01.018.
14. J. Zhao, G. Tian, Y. Qiu, and H. Qu, "Rapid quantification of active pharmaceutical ingredient for sugar-free Yangwei granules in commercial production using FT-NIR spectroscopy based on machine learning techniques," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 245, p. 118878, 2021.
15. United States Pharmacopeial Convention, *(1039) Quimiometría*. Rockville, MD, 2021.
16. J. Carlos, H. Vega, B. De, J. Rahmer, and G. Herrera Vidal, "Principal component analysis applied to the statistical control of multivariate processes," *Investig. e Innovación en Ing.*, vol. 10, no. 1, pp. 17–29, Feb. 2022, doi: 10.17081/INVINNO.10.1.4972.
17. Z. Zhang *et al.*, "Chemometrics in instrumental analysis of complex systems—in honor and memory of Yi-Zeng Liang," *J. Chemom.*, vol. 32, no. 11, pp. 1–22, 2018, doi: 10.1002/cem.3095.
18. A. B. Moroni, D. R. Vega, T. S. Kaufman, and N. L. Calvo, "Form quantitation in desmotropic mixtures of albendazole bulk drug by chemometrics-assisted analysis of vibrational spectra," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 265, p. 120354, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.SAA.2021.120354.
19. European Medicines Agency (EMA), "Guidelines on the use of near infrared spectroscopy by the Pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations," 2014.
20. Food and Drug Administration (FDA), "Development and Submission of Near Infrared Analytical Procedures Guidance for Industry," in *Food and Drug Administration*, 2021, [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
21. United States Pharmacopeial Convention, *<1856> Espectroscopia de infrarrojo cercano-Teoría y práctica*, USP43-NF38 ed. Rockville, MD, 2021

22. M. Panzitta *et al.*, "Spectrophotometry and pharmaceutical PAT/RTTR: Practical challenges and regulatory landscape from development to product lifecycle," *Int. J. Pharm.*, vol. 601, p. 120551, May 2021, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2021.120551.
23. L. Zhong *et al.*, "Method development and validation of a near-infrared spectroscopic method for in-line API quantification during fluidized bed granulation," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 274, p. 121078, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.SAA.2022.121078.
24. P. Williams, P. Dardenne, and P. Flinn, "Tutorial: Items to be included in a report on a near infrared spectroscopy project.," <http://dx.doi.org.bd.univalle.edu.co/10.1177/0967033517702395>, vol. 25, no. 2, pp. 85–90, Apr. 2017, doi: 10.1177/0967033517702395.
25. Z. Xiaobo, Z. Jiewen, M. J. W. Povey, M. Holmes, and M. Hanpin, "Variables selection methods in near-infrared spectroscopy," *Anal. Chim. Acta*, vol. 667, no. 1–2, pp. 14–32, 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.03.048.
26. Metrohm, "NIRS Vision 4.1, Manual-Theory." 2015.
27. D. D. López Juvinao, L. M. . Torres Ustate, y F. O. Moya Camacho, "Tecnologías, procesos y problemática ambiental en la Minería de arcilla", *Investigación e Innovación en Ingenierías*, vol. 8, n.º 2, pp. 20–43, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17081/invinno.8.2.3857>.
28. H. G. Hernandez Palma, J. Solórzano Movilla, y J. Jinete Torres, "La Teoría de restricciones para los procesos de gestión y control en las IPS del Caribe Colombiano", *Investigación e Innovación en Ingenierías*, vol. 8, n.º 1, pp. 54–68, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17081/invinno.8.1.3624>
29. [29] United States Pharmacopeial Convention, <1225> *Validación De Procedimientos Farmacopeicos*. 2020, pp. 1093–1098.