

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES



ANNÉE : 2008

THESE N° 3303/1

**MISE EN PLACE D'UNE METHODE D'IDENTIFICATION DES  
MATIERES PREMIERES PAR SPECTROPHOTOMETRIE DANS LE  
PROCHE INFRAROUGE**

**THÈSE**

**POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 21 janvier 2008

par

Matthieu PROUTEAU

Né le 25 janvier 1982 à MONTFERMEIL

JURY :

Président : Pr. Philippe CARDOT

Juge et directeur de thèse : Dr. Serge BATTU

Juge : Dr. Sébastien REICH

Juge : Mme Valérie CONTASSOT

# UNIVERSITE DE LIMOGES

\*\*\*\*\*

1.9.2006

## FACULTE DE PHARMACIE

\*\*\*\*\*

**DOYEN DE LA FACULTE :** Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX  
**ASSESEUR :** Madame le Professeur Dominique CHULIA  
**ASSESEUR :** Monsieur Francis COMBY

### PROFESSEURS :

<b>BENEYTOU Jean-Louis</b>	<b>BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>
<b>BOTINEAU Michel</b>	<b>BOTANIQUE et CRYPTOLOGAMIE</b>
<b>BROSSARD Claude</b>	<b>PHARMACOTECHNIE</b>
<b>BUXERAUD Jacques</b>	<b>CHIMIE ORGANIQUE</b>
	<b>CHIMIE THERAPEUTIQUE</b>
<b>CARDOT Philippe</b>	<b>CHIMIE ANALYTIQUE</b>
<b>CHULIA Albert</b>	<b>PHARMACOGNOSIE</b>
<b>CHULIA Dominique</b>	<b>PHARMACOTECHNIE</b>
<b>DELAGE Christiane</b>	<b>CHIMIE GENERALE et MINERALE</b>
<b>DESMOULIERE Alexis</b>	<b>PHYSIOLOGIE</b>
<b>DREYFUSS Gilles</b>	<b>PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE</b>
<b>DUROUX Jean-Luc</b>	<b>PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE</b>
<b>HABRIOUX Gérard</b>	<b>BIOCHIMIE FONDAMENTALE</b>
<b>LACHATRE Gérard</b>	<b>TOXICOLOGIE</b>
<b>MOESCH Christian</b>	<b>HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT</b>
<b>LOUDART Nicole</b>	<b>PHARMACODYNAMIE</b>
<b>ROGEZ Sylvie</b>	<b>BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE</b>

**MAITRES DE CONFERENCES**

<b>ALLAIS Daovy</b>	<b>PHARMACOGNOSIE</b>
<b>BASLY Jean-philippe</b>	<b>CHIMIE ANALYTIQUE</b>
<b>BATTU Serge</b>	<b>CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE</b>
<b>CALLISTE Claude</b>	<b>BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUE, INFORMATIQUE</b>
<b>CARDI Patrice</b>	<b>PHYSIOLOGIE</b>
<b>CLEDAT Dominique</b>	<b>CHIMIE ANALYTIQUE</b>
<b>COMBY Francis</b>	<b>CHIMIE THERAPEUTIQUE</b>
<b>DELEBASSEE Sylvie</b>	<b>BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE</b>
<b>DREYFUSS Marie-Françoise</b>	<b>CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE</b>
<b>FAGNERE Catherine</b>	<b>CHIMIE ORGANIQUE</b>
<b>FROISSARD Didier</b>	<b>BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE</b>
<b>JAMBUT Anne-Catherine</b>	<b>CHIMIE THERAPEUTIQUE</b>
<b>LAGORCE Jean-François</b>	<b>CHIMIE ORGANIQUE (en disponibilité)</b>
<b>LARTIGUE Martine</b>	<b>PHARMACODYNAMIE</b>
<b>LIAGRE Bertrand</b>	<b>SCIENCES BIOLOGIQUES</b>
<b>LOFTI Hayat</b>	<b>TOXICOLOGIE</b>
<b>MARION-THORE Sandrine</b>	<b>CHIMIE THERAPEUTIQUE</b>
<b>MARRE-FOURNIER Françoise</b>	<b>BIOCHIMIE</b>
<b>MOREAU Jeanne</b>	<b>IMMUNOLOGIE</b>
<b>PARTOUCHE Christian</b>	<b>NEUROLOGIE, ENDOCRINOLOGIE</b>
<b>POUGET Christelle</b>	<b>PHARMACIE GALENIQUE</b>
<b>ROUSSEAU Annick</b>	<b>BIOMATHEMATIQUES</b>
<b>SIMON Alain</b>	<b>CHIMIE PHYSIQUE et CHIMIE MINERALE</b>
<b>TROUILLAS Patrick</b>	<b>BIOMATHEMATIQUES et INFORMATIQUE</b>
	<b>PHARMACEUTIQUES</b>
<b>VIANA Marylène</b>	<b>PHARMACOTECHNIE</b>
<b>VIGNOLES Philippe</b>	<b>BIOMATHEMATIQUES</b>

**PROFESSEUR CERTIFIE**

**MARBOUTY Jean-Michel**

**ANGLAIS**

**ATER A MI-TEMPS**

**BEGAUD-GRIMAUD Gaëlle**

**See M.le Prof. BOTINEAU**

**COURTIOUX Bertrand**

**See M.le Prof. DREYFUSS**

**LE JEUNE Anne-Hélène**

**See M.le Prof. BOTINEAU**

**MOUSSEAU Yoanne**

**See M.le Prof. DREYFUSS et MOESCH**

**SAMARA Maha**

**See M.le Prof. OUDART**

**YAHIAOUI Samir**

**See M.le Prof. BUXERAUD**

## **REMERCIEMENTS**

A ma famille,

Je vous remercie pour le soutien financier et moral que vous m'avez apporté pendant ces longues années d'études.

A Vanessa,

Je te remercie de l'attention inflexible et du réconfort que tu as su m'offrir.

Au Professeur Philippe CARDOT, Professeur de la faculté de Pharmacie de LIMOGES,

Je vous remercie d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse.

Au Docteur Serge BATTU, Maître de Conférence à la faculté de Pharmacie de Limoges,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse.

A Madame Valérie CONTASSOT, Responsable Contrôle Qualité des laboratoires MAYOLY SPINDLER,

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Contrôle et de la confiance que vous m'avez accordée quant à la conduite de ce projet.

Au Docteur Sébastien REICH, Directeur Qualité des laboratoires MAYOLY SPINDLER,

Je vous remercie de tous les précieux conseils que vous avez pu me prodiguer lors de la rédaction de cette thèse.

A mes anciens collègues des laboratoires MAYOLY SPINDLER,

Je vous remercie pour votre présence et votre bonne humeur.

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>CONTEXTE REGLEMENTAIRE .....</b>	<b>12</b>
<b>HISTORIQUE.....</b>	<b>13</b>
<b>PARTIE I : THEORIE ET PRINCIPE DE LA SPIR .....</b>	<b>15</b>
<b>1. La théorie du proche infrarouge.....</b>	<b>15</b>
1.1. La zone du proche infrarouge.....	15
1.2. Qui absorbe dans le proche infrarouge ?.....	15
1.3. Le phénomène vibratoire.....	15
1.4. L'origine des bandes en proche infrarouge .....	16
1.5. Allure du spectre .....	18
1.6. Autres caractéristiques d'intérêt dans le proche infrarouge .....	19
<b>2. L'appareillage.....</b>	<b>20</b>
2.1. Les technologies disponibles sur le marché .....	20
2.2. Les spectrophotomètres : « une source et un détecteur » .....	21
2.3. Les 3 modes d'acquisition.....	24
2.4. Les sondes à fibres optiques.....	26
<b>3. L'identification par la chimiométrie .....</b>	<b>28</b>
3.1. Le principe.....	28
3.2. Le prétraitement spectral .....	28
3.3. Définition d'une méthode chimiométrique .....	30
3.4. La modélisation des données spectrales : Analyse en Composantes Principales contre Analyse en Longueurs d'Onde.....	31
3.5. L'analyse en composantes principales .....	31
3.6. Les méthodes chimiométriques incluses dans le logiciel VISION .....	33
3.7. La qualification .....	35

<b>PARTIE II : LA MISE EN PLACE DE LA METHODE D'IDENTIFICATION PAR SPIR AU SEIN DES LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER .....</b>	<b>36</b>
<b>1. La cartographie du développement.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Le spectrophotomètre en proche infrarouge .....</b>	<b>36</b>
<b>3. La qualification du matériel.....</b>	<b>38</b>
3.1. Test de performance .....	38
3.2. Test du gain .....	40
3.3. Test de linéarisation .....	40
3.4. Vérification de la linéarité photométrique .....	41
<b>4. L'étude préliminaire à la prise en charge des matières premières.....</b>	<b>41</b>
4.1. Sélection des matières premières potentiellement identifiables par SPIR .....	41
4.2. Recherche de substances challengeuses .....	43
4.3. Récupération des lots de matières premières .....	45
<b>5. Le développement et la validation des bibliothèques.....</b>	<b>46</b>
5.1. Les étapes de développement d'une méthode d'identification par SPIR.....	46
5.2. Le développement des bibliothèques d'un point de vue concret .....	54
5.3. Conclusion sur le développement .....	64
<b>6. La rédaction des documents qualité .....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>69</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>71</b>
1. Fiche pratique de l'Afssaps : <i>Identification des matières premières à réception par proche infrarouge</i> (juillet 2007).....	71
2. Table de localisation des bandes en proche infrarouge.....	72
3. Liste des matières premières et de leurs substances challengeuses retenues pour le développement de la méthode d'identification par SPIR.....	74
4. Confrontations de spectres de matières premières et de leurs substances challengeuses. 77	
5. Rapport de validation de la bibliothèque de la cellulose microcristalline PH101 .....	101
6. Gain de temps apporté par la SPIR dans l'identification de trois matières premières : le bicarbonate de sodium, le citrate d'alvéridine et la siméticone .....	104
<b>SERMENT DE GALIEN.....</b>	<b>105</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication

**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**CM** : Cellulose Microcristalline

**IR** : Infrarouge

**MP** : Matière Première

**SC** : Substance Challengeuse

**SPIR** : Spectrophotométrie dans le Proche Infrarouge



## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Les zones spectrales .....</i>	15
<i>Figure 2 : Evolution de l'énergie potentielle d'une molécule en fonction de la distance interatomique – cas d'un oscillateur harmonique .....</i>	17
<i>Figure 3 : Evolution de l'énergie potentielle d'une molécule en fonction de la distance interatomique – cas d'un oscillateur anharmonique .....</i>	17
<i>Figure 4 : Organisation des bandes spectrales en proche infrarouge .....</i>	19
<i>Figure 5 : Classification des spectrophotomètres PIR selon leur principe de fonctionnement (de D. Bertrand) .....</i>	21
<i>Figure 6 : Principe d'un spectrophotomètre à filtre optique .....</i>	23
<i>Figure 7 : Schéma d'un appareil à réseau et photographie d'un spectrophotomètre PIR de marque FOSS .....</i>	23
<i>Figure 8 : Principe d'une mesure en transmission .....</i>	25
<i>Figure 9 : Principe d'une mesure en réflexion .....</i>	25
<i>Figure 10 : Principe d'une mesure en transflexion .....</i>	26
<i>Figure 11 : Propagation d'un faisceau au travers d'une fibre optique .....</i>	27
<i>Figure 12 : Spectre brut du lactose (a), en dérivée première (b), en dérivée seconde (c) .....</i>	30
<i>Figure 13 : Construction d'un jeu de composantes principales dans un espace à 3 dimensions .....</i>	32
<i>Figure 14 : Cartographie du développement de la méthode d'identification par SPIR .....</i>	36
<i>Figure 15 : Spectrophotomètre FOSS NIR 5000 - vue de face .....</i>	37
<i>Figure 16 : Architecture d'une bibliothèque sous le logiciel VISION .....</i>	49

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Listes des matières premières incluses dans les bibliothèques préliminaires .....</i>	55
<i>Tableau II : Descriptif de la bibliothèque « liquide incolore » .....</i>	56
<i>Tableau III : Descriptif de la bibliothèque « liquide coloré » .....</i>	56
<i>Tableau IV : Descriptif de la bibliothèque « liquide incolore » après modification .....</i>	58
<i>Tableau V : Descriptif de la bibliothèque « liquide coloré » après modification .....</i>	59
<i>Tableau VI : Descriptif de la bibliothèque « Labrafil » .....</i>	59
<i>Tableau VII : Descriptif de la bibliothèque « extrait mou de cynara » .....</i>	59
<i>Tableau VIII : Descriptif de la bibliothèque « paraffine » .....</i>	59
<i>Tableau IX : Descriptif de la bibliothèque « siméticone » .....</i>	59
<i>Tableau X : Descriptif de la bibliothèque « poudre » après modification .....</i>	61
<i>Tableau XI : Descriptif de la bibliothèque « alvélerine citrate » .....</i>	61
<i>Tableau XII : Descriptif de la bibliothèque « extrait sec d'Erysimum » .....</i>	61
<i>Tableau XIII : Descriptif de la bibliothèque « amidon » .....</i>	61
<i>Tableau XIV : Descriptif de la bibliothèque « cellulose » .....</i>	61
<i>Tableau XV : Descriptif de la bibliothèque « gomme arabique » .....</i>	62
<i>Tableau XVI : Descriptif de la bibliothèque « acide citrique » .....</i>	62
<i>Tableau XVII : Descriptif de la bibliothèque « cire » .....</i>	64

## **INTRODUCTION**

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrications (BPF) <sup>[1]</sup>, « l'identité d'un lot entier de matières premières ne peut normalement être garantie que si des échantillons individuels sont prélevés dans tous les récipients contenant ce même lot et qu'un essai d'identification est effectué sur chaque échantillon ». Pour les matières premières dont les contenants sont de grandes capacités ou dont les volumes sont de faibles importances, les identifications sont facilement réalisables, mais dès que les volumes augmentent ou que les méthodes d'identification comportent plusieurs étapes, ces identifications deviennent lourdes à mettre en œuvre.

Mais depuis les années 90 une méthode analytique a fait son apparition dans l'industrie pharmaceutique, il s'agit de la Spectrophotométrie dans le Proche InfraRouge (SPIR). La SPIR est une technique multitâche permettant aussi bien le développement de méthodes quantitatives que qualitatives. Elle présente des avantages indéniables notamment lorsqu'elle est utilisée en tant que méthode d'identification. En effet :

- elle ne nécessite pas de préparation d'échantillon,
- c'est une technique non destructive,
- elle est simple d'utilisation, rapide, et d'un faible coût d'utilisation en routine,

Ces avantages en font une technique de choix pour les industries pharmaceutiques, leur permettant de répondre aux exigences liées aux BPF, tout en satisfaisant les contraintes industrielles.

Mais à l'heure actuelle, l'implantation de la SPIR dans les laboratoires pharmaceutiques est encore loin d'être généralisée, car même si la technique présente de nombreux avantages, elle compte tout de même quelques inconvénients dont l'investissement de départ et les garanties en termes de spécificité qu'il faut apporter.

L'objet de cette thèse est donc de présenter, au travers d'un cas concret, la mise en place de cette méthode d'identification des matières premières en remplacement des méthodes usuelles décrites dans les dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des médicaments. La première partie de ce document va présenter les données bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'identification par la SPIR, puis une deuxième partie décrira la phase de développement de cette méthode d'identification au sein des laboratoires MAYOLY SPINDLER.

## CONTEXTE REGLEMENTAIRE

Le développement de cette méthode d'identification a été réalisé en accord avec trois documents faisant actuellement force de réglementation :

- la Méthode générale de la **Pharmacopée Européenne** 6ème édition : chapitre 2.2.40. *Spectrophotométrie dans le proche infrarouge* <sup>[19]</sup>,
- un **guideline de l'EMA** : *Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations* (CPMP/QWP/3309/01 – février 2003) <sup>[13]</sup>,
- une **fiche pratique de l'Afssaps** : *Identification des matières premières à réception par proche infrarouge* (juillet 2007) (annexe 1) <sup>[2]</sup>,

## **HISTORIQUE** [3, 5, 10, 15, 17]

Le rayonnement infrarouge fut découvert par William Herschel en 1800. Celui-ci présenta devant la Royal Society deux travaux intitulés « Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects » et « Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun ». Il y démontra l'existence de radiations lumineuses calorifiques au-delà du domaine du visible, radiations qui présentaient les mêmes propriétés d'absorption, transmission, réflexion et réfraction que les radiations visibles.

Cette découverte resta longtemps au stade expérimental et il fallu attendre le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle pour que des industriels comme Kodak ou encore Shell ne s'intéressent réellement au domaine du proche infrarouge. C'est en 1954 qu'apparut le premier spectrophotomètre double faisceaux travaillant à la fois dans le domaine de l'UV-visible et du proche infrarouge : le Cary 14 de chez Applied Physics Corp. Celui-ci permit le développement de nombreux travaux de recherche et de manière concomitante l'essor de l'analyse dans le proche infrarouge.

La première application analytique concrète du proche infrarouge est à mettre au crédit de Karl Norris, ingénieur au ministère de l'agriculture des États-Unis, qui, en 1962, décrivit une méthode permettant la détermination de la teneur en eau dans des céréales. Dans cette méthode, l'eau était d'abord extraite par du méthanol et ensuite dosée par transmission. La technique fut ensuite améliorée et l'analyse directe en réflexion diffuse fut rendue possible. Le panel de composés dosables issus de l'agroalimentaire fut également élargi à d'autres substances.

Mais du fait de la complexité des spectres dans la zone du proche infrarouge, les applications analytiques restaient cantonnées au dosage de certains constituants, car ce type d'application ne nécessitait que quelques longueurs d'onde pour être efficace. Il fallu un développement concomitant de l'optique, de l'électronique, mais surtout de l'informatique et l'introduction des techniques chimiométriques pour que d'autres applications analytiques de la SPIR puissent émerger. Grâce à ces nouvelles avancées, d'autres secteurs d'activité s'intéressèrent à cette technique prometteuse, tels que la pétrochimie, la chimie fine... et la pharmacie. C'est à partir des années 90 que des travaux virent le jour dans le domaine de l'industrie

pharmaceutique, mais il faut attendre 1997 et la troisième édition de la Pharmacopée Européenne pour qu'une méthode générale sur la spectrophotométrie dans le proche infrarouge soit rédigée.

## PARTIE I : THEORIE ET PRINCIPE DE LA SPIR

### 1. La théorie du proche infrarouge

#### 1.1. La zone du proche infrarouge

Le domaine du proche infrarouge est délimité par celui du visible et de l'infrarouge moyen. Il s'étend de 700 à 2 500nm. (cf. figure 1)



*Figure 1 : Les zones spectrales*

#### 1.2. Qui absorbe dans le proche infrarouge ? <sup>[15, 17]</sup>

Ce sont les liaisons covalentes qui absorbent les radiations du proche infrarouge. Ces absorptions sont matérialisées sous la forme de bandes. Pour qu'il y ait absorption il faut que cette liaison soit asymétrique. C'est-à-dire de type Y-H, avec Y, un atome dont la masse atomique est beaucoup plus importante que celle de H, par exemple : C-H, N-H, O-H ...

#### 1.3. Le phénomène vibratoire <sup>[15, 20]</sup>

Les atomes d'une molécule sont reliés entre eux par des liaisons covalentes flexibles. Ces liaisons évoluent selon deux phénomènes antagonistes d'attraction et de répulsion atomique qui entraînent un allongement ou un rétrécissement de la liaison autour d'une position moyenne. En conséquence de quoi la liaison est assimilée à un oscillateur électrique suivant un phénomène vibratoire.

Tout comme pour un ressort, un système diatomique présente un niveau d'équilibre pour lequel son énergie potentielle d'interaction est minimale. L'apport d'énergie au système va alors générer une vibration qui éloignera la liaison de cet état d'équilibre. Dans le cas d'une

liaison covalente l'énergie de vibration est apportée par les radiations lumineuses émises uniquement dans la zone de l'infrarouge. Toutes les radiations n'entraînent pas pour autant ce phénomène vibrationnel et seules certaines valeurs d'énergie peuvent être absorbées par une liaison donnée.

#### 1.4. L'origine des bandes en proche infrarouge <sup>[6, 15, 17, 20]</sup>

##### 1.4.1. Les harmoniques

La fréquence ou l'énergie nécessaire à l'excitation d'une liaison est propre à la liaison et au groupement fonctionnel dans lequel elle est insérée. De plus, des radiations d'énergies différentes peuvent exciter une même liaison. Ce phénomène est rendu possible grâce à l'existence de plusieurs niveaux d'excitation par liaison diatomique.

Ces variations énergétiques peuvent être modélisées par la formule suivante :

$$\Delta E = E_n - E_0 = h\nu$$

Avec  $\Delta E$  : variation d'énergie

$E_n$  : niveau d'énergie excité

$E_0$  : niveau d'énergie fondamental

$h$  : constante de Planck

$\nu$  : fréquence du rayonnement lumineux absorbé

En première approximation afin d'expliquer le comportement d'une liaison diatomique, le modèle de l'oscillateur harmonique a été développé. Dans ce cas la courbe des énergies potentielles à l'allure de la parabole décrite à la figure 2. Les paliers énergétiques à atteindre pour chaque niveau d'excitation y sont également représentés.

Le passage du niveau  $\nu_0$  à  $\nu_1$  correspond à la transition fondamentale. Il s'agit de l'énergie la plus faible permettant le passage de l'état d'équilibre à l'état excité. Pour les autres niveaux, l'énergie requise pour les atteindre est un multiple de l'énergie requise pour la transition fondamentale. Dans ce cas il ne s'agira plus de transitions fondamentales, mais d'harmoniques : 1<sup>ère</sup> harmonique, 2<sup>ème</sup> harmonique, 3<sup>ème</sup> harmonique... Ce sont ces harmoniques qui seront visibles dans le proche infrarouge, alors que les fondamentales, qui sont des bandes de plus faible énergie, seront observées dans l'infrarouge moyen.

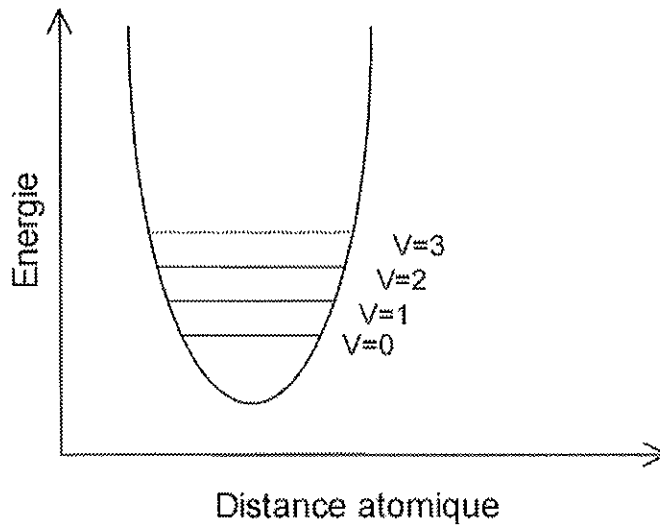


Figure 2 : Evolution de l'énergie potentielle d'une molécule en fonction de la distance interatomique – cas d'un oscillateur harmonique

Mais l'oscillateur harmonique n'offre pas une description fidèle du comportement de ces liaisons, car d'autres forces interférentes peuvent entrer en jeu et ne sont pas prises en compte par ce modèle. C'est pourquoi le modèle de l'oscillateur anharmonique a été développé. Celui-ci tient compte de l'approximation de Morse dans le calcul de l'énergie potentielle d'interaction, dont l'évolution est modélisée sur la figure 3. Dans ce cas les énergies d'excitation ne seront plus des multiples de l'énergie de la transition fondamentale. Même si elles restent proches, elles seront en réalité légèrement inférieures.

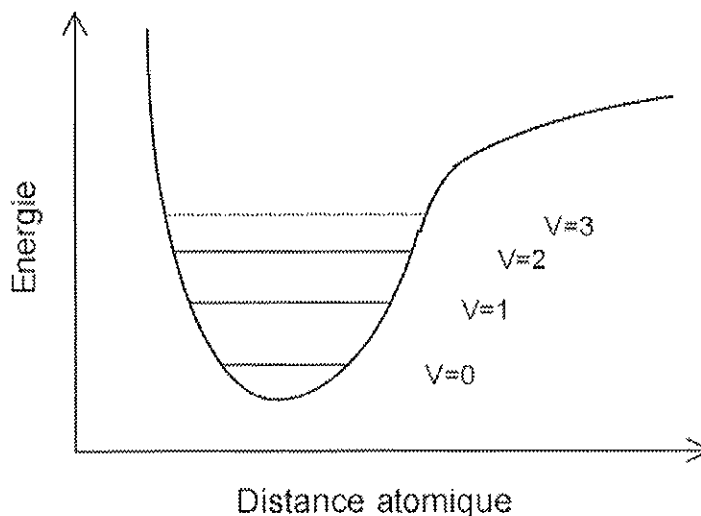


Figure 3 : Evolution de l'énergie potentielle d'une molécule en fonction de la distance interatomique – cas d'un oscillateur anharmonique



### **1.4.2. Les bandes de combinaisons**

Les bandes harmoniques ne sont pas les seuls éléments constitutifs des spectres en proche infrarouge. Des bandes de combinaisons sont également visibles en proche infrarouge. Ces bandes sont le résultat de l'interaction entre plusieurs vibrations portées par un même groupe fonctionnel. Dans ce cas une radiation lumineuse agit sur plusieurs oscillateurs en parallèle. Pour ce faire la radiation doit avoir une énergie correspondant à la somme des énergies de vibrations de ces liaisons présent indépendamment.

### **1.4.3. Les phénomènes de résonance**

D'autres phénomènes sont observables en spectroscopie dans le proche infrarouge, notamment un certain nombre de résonances, exemples : de Fermi ou de Darling-Dennison.

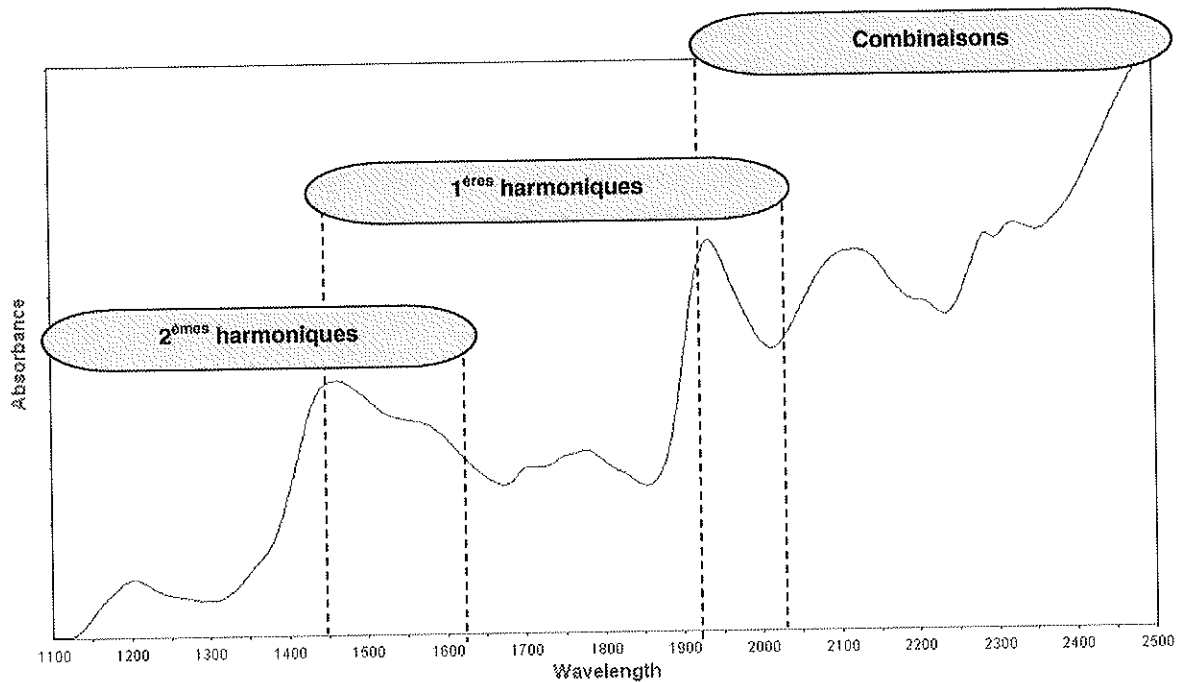
La résonance de Fermi est une interaction entre une vibration fondamentale et une bande harmonique ou une bande de combinaison d'énergies proches et appartenant au même groupe de symétrie. Cette interaction se traduit sur le spectre par l'apparition de deux bandes qui s'éloigneront d'une même distance de leur valeur normale, mais dans un sens opposé. De plus leur intensité s'en trouvera modifiée avec un accroissement pour la bande la plus faible et une diminution pour la bande la plus intense.

La résonance de Darling-Dennison est une interaction entre des bandes de vibrations d'énergies identiques, exemple : harmonique – harmonique ou harmonique – combinaison.

## **1.5. Allure du spectre <sup>[20]</sup>**

Contrairement à l'infrarouge moyen, le spectre en proche infrarouge est beaucoup plus complexe. Comme il a été dit, l'origine des bandes est dans ce domaine spectral beaucoup plus variée : harmoniques, combinaisons, phénomènes de résonances... A cela vient s'ajouter un élargissement de bandes et une dérive de la ligne de base beaucoup plus prononcée que pour l'infrarouge moyen. Tous ces éléments concourent à un chevauchement des bandes et à la complexification des spectres. Malgré cet imbroglio apparent, les spectres en proche infrarouge peuvent tout de même être sectorisés selon l'origine des bandes comme indiqué sur

la figure 4. De plus des tables de localisation des bandes ont également été réalisées (cf. annexe 2).



*Figure 4 : Organisation des bandes spectrales en proche infrarouge*

C'est cette complexité spectrale qui a rendu indispensable l'emploi d'outils mathématiques, tels que les prétraitements des spectres et les algorithmes de classification afin de rendre exploitable la multitude d'informations fournies par les spectres. Mais cette richesse est aussi à l'origine du regain d'intérêt pour cette technique qui offre ainsi de nombreuses applications dans le domaine du contrôle.

## 1.6. Autres caractéristiques d'intérêt dans le proche infrarouge <sup>[11]</sup>

### 1.6.1. L'intensité des bandes

L'intensité des bandes spectrales dans le proche infrarouge est moindre que dans l'infrarouge moyen. Les harmoniques et bandes de combinaison ont une intensité 10 à 1000 fois moins importantes que celle des bandes fondamentales. Le spectre d'une matière peut donc directement être acquis sans préparation d'échantillon.

## 1.6.2. La transparence au verre

Le rayonnement infrarouge n'est pas absorbé par le quartz, le verre... ce qui offre un certain nombre de facilités analytiques :

- utilisation de portes-échantillons en verre bon marché,
- analyse directe au travers d'un contenant sans l'ouvrir,
- analyse directe dans un contenant par utilisation d'une fibre optique...

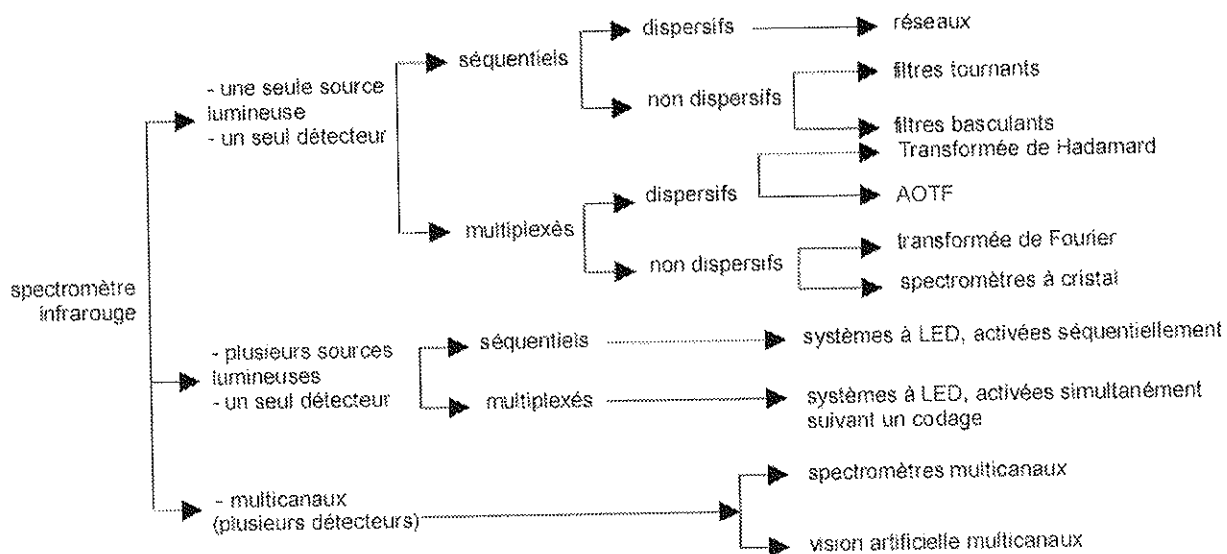
## 2. L'appareillage

### 2.1. Les technologies disponibles sur le marché <sup>[5, 17]</sup>

Au début, l'analyse dans le proche infrarouge n'était pas réalisée à l'aide d'un appareil dédié et se faisait uniquement à l'aide de spectrophotomètres analysant déjà dans l'UV-visible ou dans l'infrarouge. Ce n'est qu'une fois le potentiel du proche infrarouge réellement reconnu qu'ont été développés des spectrophotomètres travaillant uniquement dans le domaine du proche infrarouge. Depuis différentes technologies se partagent le marché.

Toutes les technologies sont représentées sur l'arbre de la figure 5. Elles sont réparties selon l'un des trois principes de fonctionnement suivant :

- **séquentiels** : les mesures des absorbances à plusieurs longueurs d'onde se font une à une,
- **multiplexés** : les mesures des absorbances à plusieurs longueurs d'onde se font en simultané par un capteur unique,
- **multicanaux** : les mesures des absorbances à plusieurs longueurs d'onde se font également en simultané, mais à l'aide de plusieurs capteurs indépendants.



*Figure 5 : Classification des spectrophotomètres PIR selon leur principe de fonctionnement (de D. Bertrand)*

## 2.2. Les spectrophotomètres : « une source et un détecteur »

### 2.2.1. Une structure commune

Tous les spectrophotomètres appartenant à cette branche technologique ont en commun une structure générale architecturée autour de quatre éléments :

- la source lumineuse,
- un disperser, système permettant la séparation de la lumière polychromatique en faisceaux monochromatiques,
- un système de présentation des échantillons,
- un système de détection.

### 2.2.2. La source lumineuse

La source lumineuse est généralement une lampe halogène-tungstène qui émet une lumière polychromatique couvrant toute la gamme de longueurs d'onde du proche infrarouge et plus encore.

### **2.2.3. Le système de détection <sup>[12]</sup>**

Le détecteur est de type photoélectrique. Il est constitué d'un matériau semi-conducteur qui transforme le signal lumineux en signal électrique d'intensité proportionnelle. Plusieurs matériaux sont disponibles sur le marché et offrent des plages de longueurs d'onde de travail différentes, exemple : Silice (400 à 1100 nm), PbS (900 à 2500 nm), InGaAs (de 800 à 1700 nm), InSb (850 à 5500 nm), PbSe (1000 à 5000 nm).

### **2.2.4. Les trois principaux types d'appareillage**

Il existe trois principaux modèles de spectrophotomètres travaillant dans le proche infrarouge et utilisés en contrôle qualité :

#### **2.2.4.1. Les appareils à filtre <sup>[5]</sup>**

Il s'agit du premier type de spectrophotomètre proche infrarouge mis sur le marché et largement utilisé en contrôle en ligne dans le domaine agro-alimentaire.

C'est un spectrophotomètre séquentiel qui ne permet des analyses que sur un nombre restreint de longueurs d'onde (2 à 20).

Le faisceau issu de la source lumineuse est décomposé en un faisceau monochromatique à l'aide d'un filtre. C'est le nombre de filtres qui détermine le nombre de longueurs d'onde de travail. Ces filtres sont montés sur une roue, permettant ainsi un balayage continu à des longueurs d'onde préalablement déterminées (cf. figure 6).

Ce type d'appareil est caractérisé par une grande robustesse et un bon rapport signal/bruit.

Ces spectrophotomètres sont donc parfaits pour des applications dédiées de contrôle en ligne ou en routine.

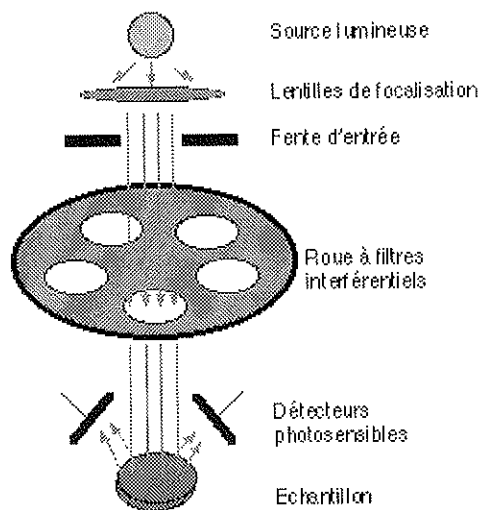


Figure 6 : Principe d'un spectrophotomètre à filtre optique

### 2.2.4.2. Les appareils à monochromateur <sup>[5, 20]</sup>

Il s'agit toujours d'un spectrophotomètre séquentiel, mais l'acquisition n'est plus limitée à un nombre restreint de longueurs d'onde. La lumière émanant de la source lumineuse est décomposée de manière séquentielle en ses différentes composantes spectrales. La décomposition est réalisée par le monochromateur qui est constitué d'un prisme ou d'un réseau (miroir holographique). C'est l'inclinaison de ce dernier qui permet l'obtention de telle ou telle longueur d'onde. (cf. figure 7)

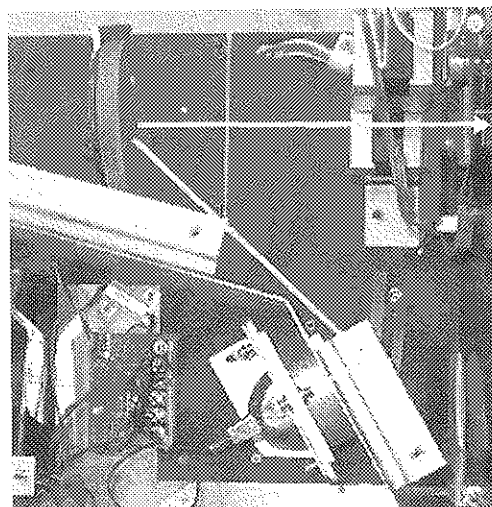
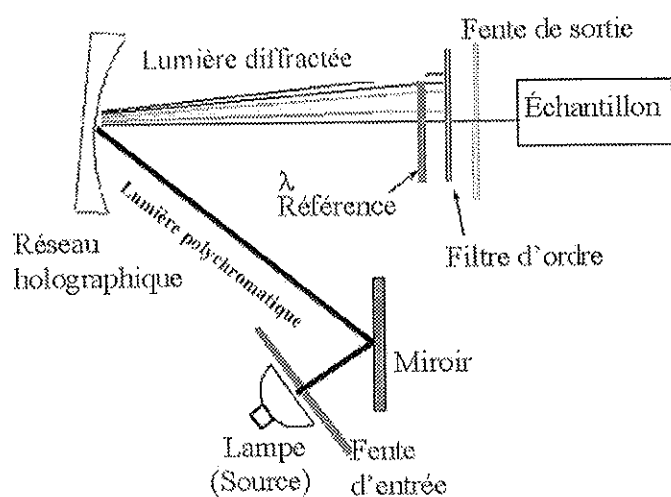


Figure 7 : Schéma d'un appareil à réseau et photographie d'un spectrophotomètre PIR de marque FOSS

### **2.2.4.3. Les appareils à transformée de Fourier** [5, 17, 20]

Ces spectrophotomètres sont de type multiplexé. Le disperseur est un interféromètre, exemple interféromètre de Michelson ou à polarisation. Le faisceau lumineux est envoyé dans l'interféromètre où il subit un codage spectral. Ce codage est réalisé par une différence de trajet optique dans l'interféromètre, soit à l'aide d'une séparatrice et deux miroirs (un fixe et un mobile) pour l'interféromètre de Michelson, soit à l'aide de deux cristaux bi-réfringents pour l'interféromètre à polarisation. Le faisceau traverse ensuite l'échantillon, puis est capté par le détecteur. Le signal est enregistré sous la forme d'un interférogramme (intensité lumineuse en fonction de la différence de trajet optique dans l'interféromètre). C'est la transformée de Fourier qui permet ensuite la traduction en un spectre classique (intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde).

Ces appareils, d'abord utilisés en infrarouge moyen, présentent l'avantage d'avoir une grande résolution, une grande vitesse d'acquisition et une bonne reproductibilité.

### **2.3. Les 3 modes d'acquisition** [10]

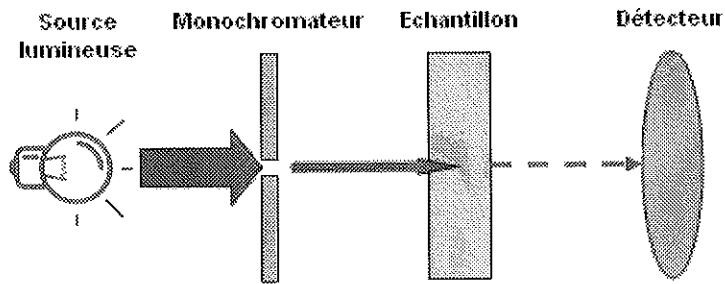
Quelque soit le type d'appareillage, tous permettent de travailler selon au moins un des modes d'acquisition suivant :

- Transmission,
- Réflexion,
- Transflexion.

#### **2.3.1. Analyse par transmission**

L'échantillon est placé dans l'axe du faisceau entre la source lumineuse et le détecteur. Le faisceau traverse l'échantillon et le détecteur récupère le rayonnement qui n'a pas été absorbé par l'échantillon (cf. figure 8)

Ce mode est utilisé pour l'analyse de liquides.



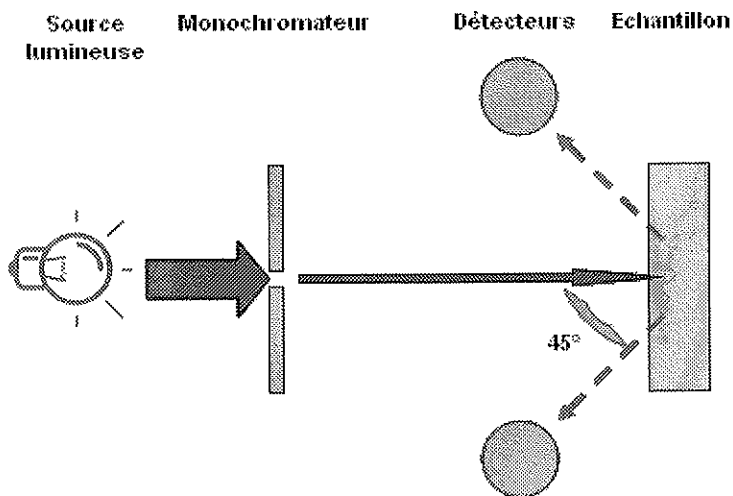
*Figure 8 : Principe d'une mesure en transmission*

### 2.3.2. Analyse par réflexion

Les capteurs sont disposés de telle sorte qu'ils détectent le rayonnement réfléchi par l'échantillon à analyser. Ils sont donc situés du même côté que la source lumineuse, de part et d'autre du rayon incident selon un angle de  $45^\circ$ .

Le rayonnement pénètre perpendiculairement la matière sur une épaisseur pouvant aller jusqu'à un demi centimètre. Le rayonnement est réfléchi de manière diffuse dans toutes les directions et l'énergie non absorbée par la matière est récupérée par les capteurs (cf. figure 9).

Ce mode est employé pour l'analyse de solides.



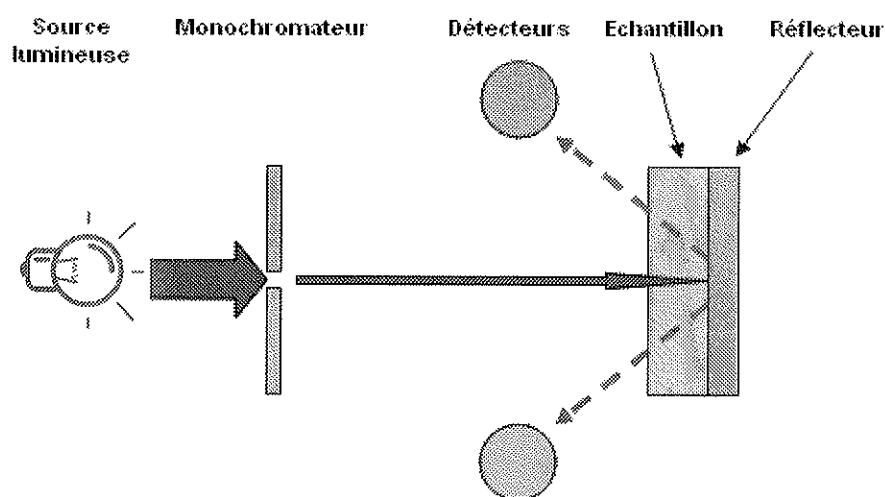
*Figure 9 : Principe d'une mesure en réflexion*



### 2.3.3. Analyse par transfexion

Les capteurs présentent la même disposition que celle décrite pour l'analyse en réflexion.

Ce mode de collecte est dédié à l'analyse des liquides. Ces derniers n'ont pas les mêmes propriétés réfléchissantes que les solides. C'est pourquoi un réflecteur est disposé dans l'axe du faisceau lumineux, juste après que celui-ci ait traversé l'échantillon. Le réflecteur permet une réflexion totale du rayonnement incident sans aucune absorption d'énergie. Ainsi avec un même appareil il est possible de travailler en réflexion ou en transfexion (cf. figure 10)



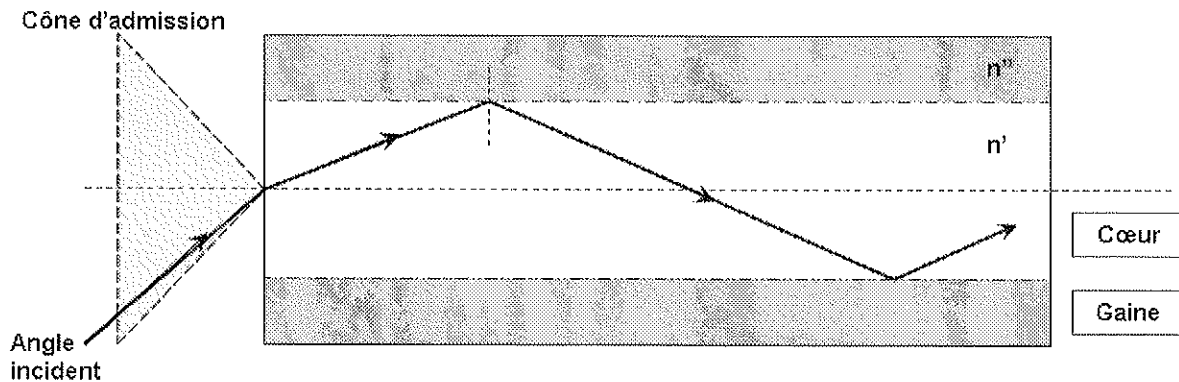
*Figure 10 : Principe d'une mesure en transfexion*

### 2.4. Les sondes à fibres optiques <sup>[4, 12]</sup>

Les sondes sont de plus en plus utilisées, car elles permettent d'analyser le produit directement à la source, par exemple dans le fût pour une matière première. Elles limitent ainsi l'échantillonnage et permettent ainsi un gain de temps non négligeable. Ces sondes sont reliées à un spectrophotomètre par l'intermédiaire d'une fibre optique qui achemine le faisceau lumineux jusqu'à la sonde, où la matière absorbe une partie du flux, et la fibre le ramène ensuite jusqu'au détecteur.

Ces fibres optiques ont la propriété de transporter le rayonnement dans le proche infrarouge sur de longues distances, grâce notamment à leur faible coefficient d'atténuation. Elles fonctionnent selon le principe de la multiréflexion totale atténuée. Pour qu'il y ait propagation

du faisceau lumineux, il faut que l'angle d'incidence du faisceau soit inférieur ou égale à l'angle d'admission autorisé par la fibre, le faisceau est ensuite réfléchi par le revêtement de la fibre et parcourt ainsi la fibre d'un bout à l'autre. C'est la différence d'indice de réfraction entre la zone centrale et le revêtement qui permet la réflexion au cœur de la fibre (cf. figure 11).



*Figure 11 : Propagation d'un faisceau au travers d'une fibre optique*

Les fibres les plus courantes ont un cœur en silice fondue, mais d'autres matières peuvent être employées : verre, plastique, chalogéniure... certaines fibres ont même un cœur liquide et un revêtement en plastique.

La fibre peut être constituée d'un seul brin de 100 $\mu$ m à 1mm de diamètre ou bien d'une mèche constituée de plusieurs brins agencés de manière ordonnée ou aléatoire. La géométrie peut elle-même varier : cylindrique, rectangulaire... Ces fibres à mèche ont pour avantage d'améliorer le rapport signal/bruit, car l'énergie, l'angle d'éclairage et de collection sont plus importants.

Les sondes peuvent permettre le travail selon différents mode d'acquisition : transmission, réflexion, transflexion, avec ou sans contact avec le produit. Le trajet optique peut être ajustable selon le type de sonde.

### 3. L'identification par la chimiométrie

La spectrophotométrie dans le proche infrarouge ne s'appréhende pas comme son homologue dans l'infrarouge moyen. Ainsi lors de l'identification d'une matière première il n'est plus question d'une observation visuelle d'un spectre. La spectrophotométrie dans le proche infrarouge fait appel à un traitement informatique des données et à une interprétation logicielle des spectres. De même, l'identification d'une matière ne se fait plus par comparaison du spectre à analyser par rapport à un spectre de référence, mais par rapport à un panel de spectres représentatifs des variabilités de la matière et préalablement enregistrés dans l'appareil.

#### 3.1. Le principe

Lors du développement d'une méthode par SPIR, des bibliothèques spectrales de produits vont être créées. Pour cela, il est nécessaire de se procurer un grand nombre de lots d'une matière première afin d'avoir une représentation la plus fidèle possible des variations que l'on peut rencontrer dans sa fabrication. Les différents spectres qui seront ainsi obtenus vont servir à la constitution d'un spectre moyen qui intégrera toutes ces variables et, lors de l'identification, le spectre de la matière à analyser va être comparé à ce spectre moyen. La comparaison est réalisée par le logiciel dédié selon la méthode chimiométrique développée pour la bibliothèque.

#### 3.2. Le prétraitement spectral <sup>[8, 10, 11, 17]</sup>

La SPIR est une technique très sensible qui est affectée par de nombreux paramètres liés ou non au produit et qui peuvent avoir une influence plus ou moins importante sur la qualité des spectres. C'est pourquoi il est nécessaire d'appliquer un prétraitement aux spectres avant leur incorporation dans une bibliothèque. Ces prétraitements vont répondre à trois objectifs principaux :

- corriger la ligne de base,
- réduire la variabilité spectrale au sein d'un même produit,
- et à l'inverse augmenter les différences spectrales entre des composés différents.

Il faut toutefois garder en tête que l'application de certains prétraitements peut entraîner une perte d'informations ou générer des artefacts.

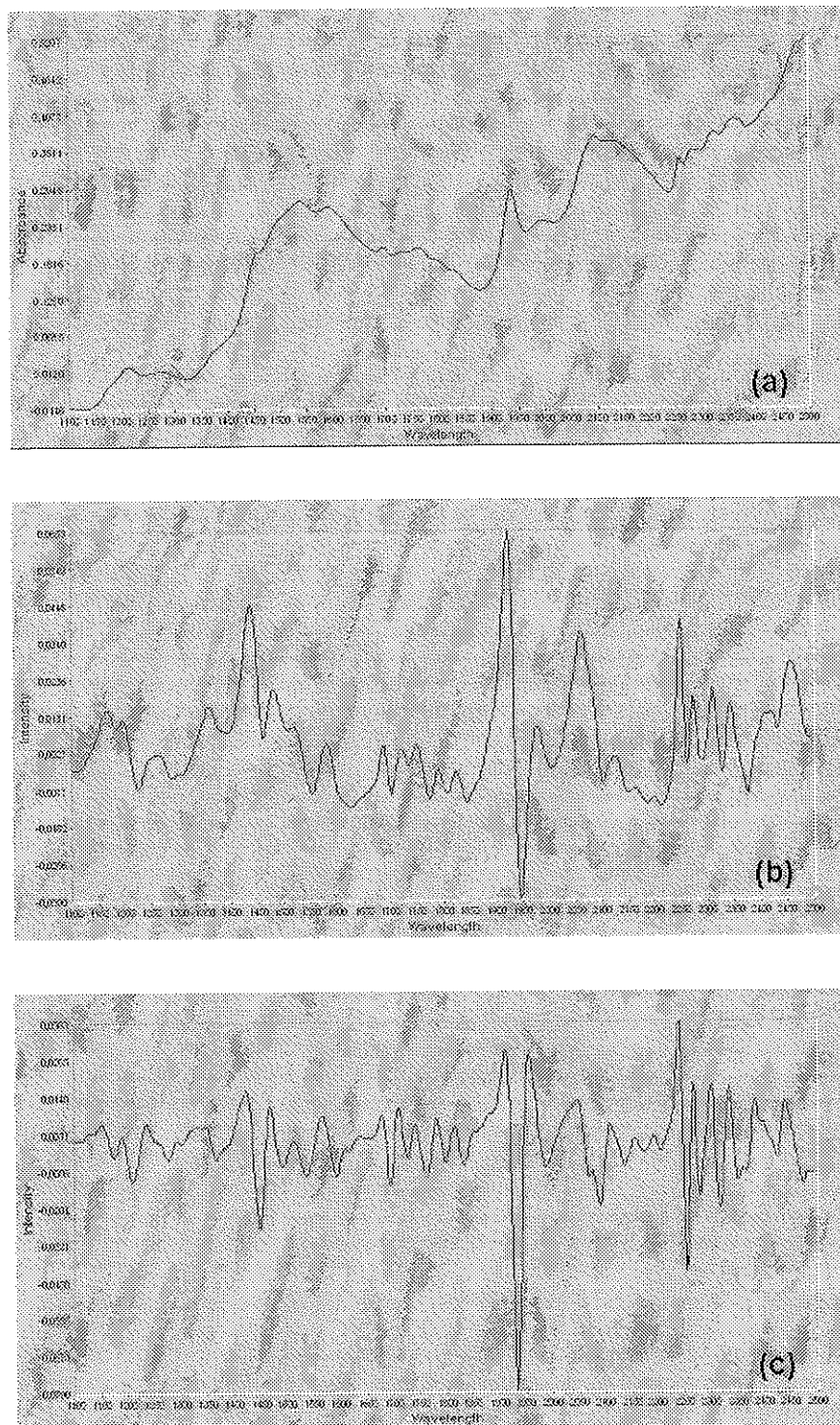
Seuls les prétraitements les plus courants vont être décrits.

- **le lissage sur N-points :**

Les spectres présentent souvent des microirrégularités qui peuvent être apparentées à du bruit de fond. Afin d'améliorer l'aspect du spectre il est possible de gommer ces irrégularités par la technique du lissage sur N-point. Pour cela le spectre est divisé en segments de N nanomètres (en général de 2 à 10 nm). La moyenne des absorbances de chaque segment est calculée pour, au final, réduire chaque segment à un point unique dont l'absorbance correspond à sa moyenne.

- **les dérivations :**

La ligne de base d'un spectre en proche infrarouge présente une déviation constante sur toute la plage des longueurs d'onde. La dérivée première d'un spectre permet de s'affranchir de cette déviation, car la dérivée d'une constante est nulle. Mais la dérivation première modifie également l'allure du spectre en créant des pics et des puits aux points où la pente des bandes du spectre brut était maximale ou minimale et en donnant une valeur nulle aux pics et puits originaux. L'application d'une dérivation seconde permet de retrouver des pics et des puits aux longueurs d'ondes initiales, sauf que par rapport au spectre brut : un pic sera devenu un puit et inversement. La figure 12 illustre ces différences. L'application d'une dérivation au spectre permet également de séparer plus clairement les bandes d'absorption.



*Figure 12 : Spectre brut du lactose (a), en dérivée première (b), en dérivée seconde (c)*

### 3.3. Définition d'une méthode chimiométrique

Une méthode chimiométrique est définie par deux éléments : un algorithme et un seuil d'acceptation. Pour chaque bibliothèque, une méthode chimiométrique va être choisie et validée.

Cette méthode chimiométrique est l'outil qui va permettre l'appréciation de la proximité spectrale d'un produit inconnu par rapport aux produits contenus dans une bibliothèque lors d'une analyse de routine. Elle va aussi permettre la validation de cette même bibliothèque en s'assurant que chaque produit est bien différencié des autres.

### **3.4. La modélisation des données spectrales : Analyse en Composantes Principales contre Analyse en Longueurs d'Onde <sup>[11]</sup>**

Deux modes de travail sont disponibles sur le logiciel VISION :

- en longueurs d'onde,
- en composantes principales.

Le premier se contente de travailler avec les données brutes, c'est à dire les absorbances à chaque longueur d'onde, alors que le deuxième procède à un changement de référentiel. Ce changement de référentiel permet une réduction de la quantité de données spectrales en ne gardant que les informations les plus pertinentes. Ces informations ne sont pas des longueurs d'onde, mais les principaux axes de variations entre les spectres.

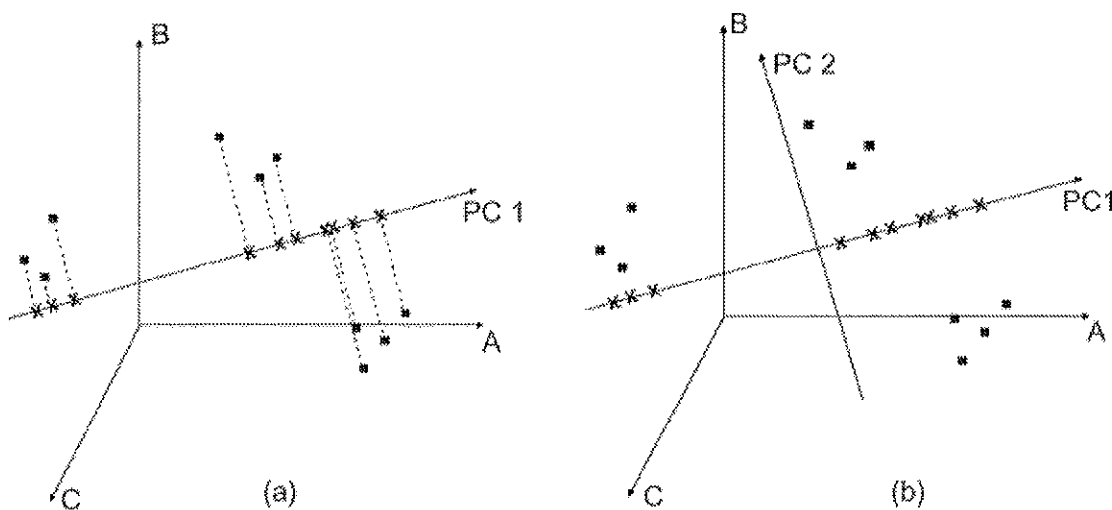
### **3.5. L'analyse en composantes principales**

#### **3.5.1. L'analyse en composantes principales d'un point de vue mathématique <sup>[17]</sup>**

La création de cet espace débute par une factorisation des données spectrales. Ces facteurs sont calculés par une série d'opérations matricielles. Une fois l'ensemble des facteurs déterminés, il est procédé à une réduction du nombre de ces facteurs, afin de ne garder que les facteurs les plus discriminants. Le nombre de facteurs qui serviront à modéliser l'espace en composantes principales est déterminé selon le pourcentage de variations dans les spectres que l'on souhaite au final obtenir. Ce pourcentage va le plus souvent de 95 à 99%. Ces facteurs gardés seront appelés composantes principales. Ils seront agencés selon leur ordre d'importance et définiront des directions privilégiées de variations qui permettront de définir des classes de produits. Au final les spectres sont représentés dans un espace à n dimensions où n est le nombre de composantes principales.

### 3.5.2. La modélisation en analyse en composante principale <sup>[16]</sup>

Soit le repère décrit à la figure 13 et défini par les variables A, B et C. Un certain nombre de points sont reportés dans ce repère. Le vecteur représentant au mieux la plus grande variation commune à tous ces points va être tracé. Il sera nommé PC1 pour principal component 1. Chacun des points va être projeté sur ce nouvel axe et de nouvelles coordonnées vont leur être attribuées, appelées « score » (a). Ce nouveau référentiel représenté par un seul vecteur, décrit déjà une grande partie des variations entre les points initiaux, mais il subsiste tout de même une quantité importante de l'information initiale qui n'a pas été traduite dans ce nouveau repère. Une seconde composante principale va donc être tracée. Celle-ci doit être perpendiculaire à la précédente et représenter l'axe décrivant au mieux la variation la plus importante parmi celles restantes (b). PC2 est donc tracé et un score est de nouveau déterminé pour chaque point. D'autres composantes principales vont ensuite être tracées selon les mêmes règles jusqu'à atteindre le pourcentage souhaité de variations. Au final un espace à n dimensions (n composantes principales) est ainsi généré dans lequel chaque point initial va être défini par des coordonnées (score) selon chaque composante principale.



*Figure 13 : Construction d'un jeu de composantes principales dans un espace à 3 dimensions*

### 3.5.3. Remarques sur l'analyse en composantes principales :

- chaque composante principale décrit une variabilité sur la totalité des spectres
- la première composante est plus importante que la seconde, la seconde est plus importante que la troisième...
- la seconde composante est construite perpendiculairement à la première, ainsi que la troisième par rapport à la seconde...
- l'ajout d'une donnée initiale (en l'occurrence un spectre) modifiera l'ensemble des composantes principales

### 3.5.4. Analyse globale contre analyse locale <sup>[9, 14]</sup>

En identification par analyse en composantes principales le mode de travail le plus simple est de créer un espace en composantes principales où tous les produits seront inclus. Le calcul des composantes est alors effectué à partir des variations entre les spectres de tous les produits. Un autre mode de traitement des données est également possible. Dans ce cas des modèles locaux sont calculés pour chaque produit. L'espace est donc créé à partir des variations au sein de chaque produit. On parle d'analyse en mode SIMCA pour Soft Independent Modeling of Class Analogy ou modélisation indépendante des analogies de classes. Lors de l'identification le spectre inconnu sera alors transposé dans l'espace en composantes principales de chaque produit de la bibliothèque afin de procéder à sa reconnaissance.

## 3.6. Les méthodes chimiométriques incluses dans le logiciel VISION

Ces méthodes ont été développées pour travailler soit en longueurs d'onde, soit en composantes principales et sont au nombre de quatre :

- la corrélation dans l'espace en longueurs d'onde,
- la distance maximale dans l'espace en longueurs d'onde,
- la distance de Mahalanobis dans l'espace en composantes principales,
- la variance résiduelle dans l'espace en composantes principales.



### **3.6.1. La corrélation dans l'espace en longueurs d'onde**

Dans le cas de la corrélation dans l'espace en longueur d'onde, un coefficient de corrélation est calculé entre le spectre à identifier et les spectres moyens. Si ce coefficient est supérieur au seuil d'acceptation pour l'un des spectres moyens, alors le produit inconnu est identifié comme étant la matière première dont le spectre moyen est issu.

### **3.6.2. La distance maximale dans l'espace en longueurs d'onde**

Pour la distance maximale dans l'espace en longueur d'onde, le spectre inconnu est retranché au spectre moyen et divisé par la déviation standard du spectre moyen à chaque longueur d'onde. L'opération est reproduite pour tous les spectres moyens de la bibliothèque et le spectre inconnu est identifié comme une des matières premières dès lors que la valeur maximale obtenue pour chaque spectre moyen est inférieure au seuil d'acceptation.

### **3.6.3. La distance de Mahalanobis dans l'espace en composantes principales**

Pour la distance de Mahalanobis dans l'espace en composantes principales, un modèle local en composantes principales est calculé pour chaque produit inclus dans la bibliothèque. Les « scores » du spectre inconnu sont calculés pour chacun de ces modèles locaux, puis la distance de Mahalanobis est calculée. Si la distance de Mahalanobis est inférieure au seuil pour l'un des produits alors le spectre inconnu est identifié en tant que ce produit.

### **3.6.4. La variance résiduelle dans l'espace en composantes principales**

Enfin pour la variance résiduelle dans l'espace en composantes principales, tout comme pour son homologue précédemment cité, un modèle local en composantes principales est d'abord calculé pour chaque produit de la bibliothèque. Chaque modèle local est utilisé pour reconstruire un spectre moyen. La différence entre le spectre original et celui reconstruit est utilisée pour déterminer la variance résiduelle. Le spectre inconnu est classifié en tant que l'un des produits dès lors que la variance résiduelle du modèle de ce produit est inférieure au seuil d'acceptation.

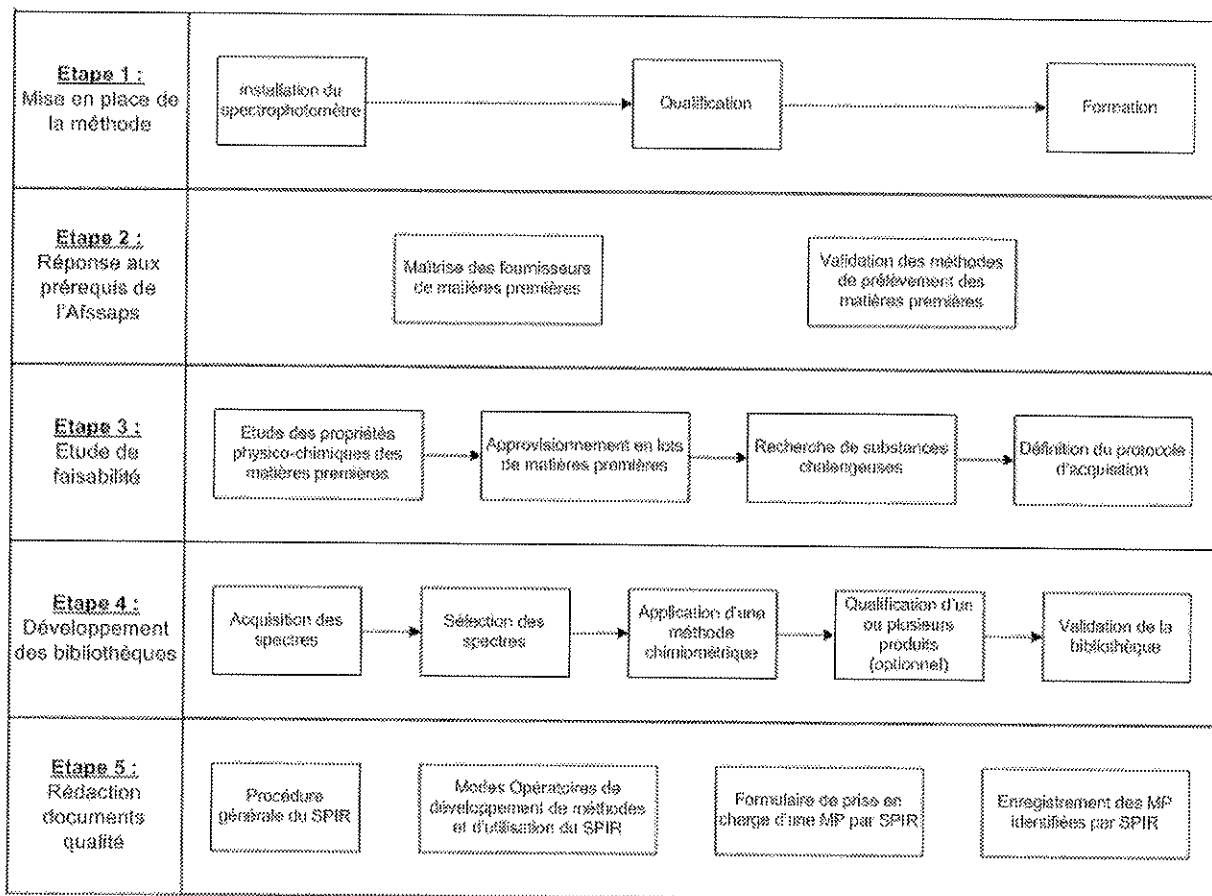
### **3.7. La qualification**

La qualification est une identification plus discriminante appliquée à un produit au sein d'une bibliothèque. Dans une même bibliothèque plusieurs produits peuvent avoir leur propre qualification. Il faut voir la qualification comme une identification secondaire, permettant de différencier les grades d'un même produit (ex : différentes granulométries) qui ne peuvent être différenciés par la méthode chimiométrique choisie dans la bibliothèque. Pour cela le produit qualifié possède sa propre méthode chimiométrique qui est appliquée en plus de celle développée pour la bibliothèque. Ces méthodes sont les mêmes que celles énoncées précédemment.

## PARTIE II: LA MISE EN PLACE DE LA METHODE D'IDENTIFICATION PAR SPIR AU SEIN DES LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER

### 1. La cartographie du développement

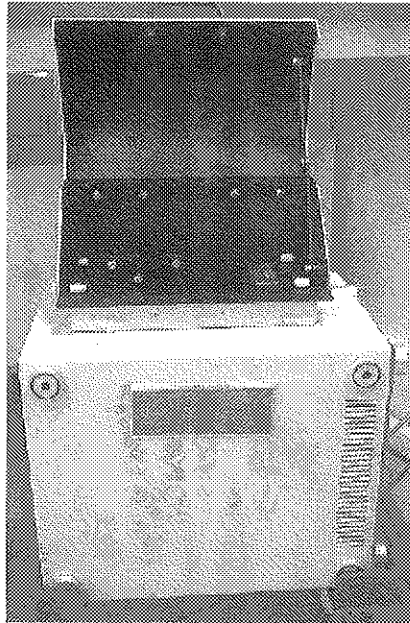
Le développement de la méthode d'identification par SPIR se décompose en cinq étapes dont le détail est exposé sur la cartographie de la figure 14.



*Figure 14 : Cartographie du développement de la méthode d'identification par SPIR*

### 2. Le spectrophotomètre en proche infrarouge

Le spectrophotomètre utilisé pour la conduite de ce projet est de marque **FOSS** et de type **NIRS 5000** (cf. figure 15). Il s'agit d'un appareil de conception relativement ancienne, l'année de mise en service étant 1993.



*Figure 15 : Spectrophotomètre FOSS NIR 5000 - vue de face*

Caractéristiques matérielles :

- lampe halogène-tungstène
- monochromateur à réseau
- capteur au PbS
- analyse en réflexion ou transflexion

Autres caractéristiques techniques :

- plage de longueurs d'onde de travail : 1100 à 2500nm,
- résolution : 2nm.

Les acquisitions se font par rapport à une référence qui est l'air. Pour cela l'appareil dispose d'un module amovible constitué d'une céramique qui permet la réflexion totale du faisceau lumineux vers les capteurs.

Les portes-échantillons sont de deux types et dépendent de la nature du contenu :

- liquide : Cellule en verre calibrée (diamètre = 45 mm et hauteur = 27,5 mm)
- solide : Bécher en verre de contenance  $\approx$  50 mL

De plus dans le cas de l'analyse de liquide par transfexion un réflecteur en plaqué or est utilisé.

La partie traitement des données est assurée par le logiciel VISON version 3.4.0.0 fourni avec le spectrophotomètre et dédié à l'exploitation des spectres en proche infrarouge.

### **3. La qualification du matériel**

La qualification a pour but de vérifier la conformité de l'appareil aux spécifications constructeur. Ces spécifications sont en accord avec les exigences de la Pharmacopée Européenne 5<sup>ème</sup> édition, décrites au chapitre relatif à la spectrophotométrie dans le proche infrarouge (2.2.40). <sup>[19]</sup>

La Pharmacopée Européenne requiert les tests suivants :

- vérification de l'échelle de longueur d'onde,
- vérification de la répétabilité de la longueur d'onde,
- vérification de la linéarité photométrique et de la stabilité de la réponse,
- vérification du bruit photométrique.

Tous ces tests sont regroupés dans des protocoles de tests développés par la société FOSS au travers du logiciel VISION. D'autres essais sont également inclus en plus de ceux énoncés dans la Pharmacopée Européenne. Ces vérifications sont réalisées selon des périodicités différentes.

#### **3.1. Test de performance**

Ce test est réalisé par l'utilisateur après chaque démarrage du spectrophotomètre. Il comprend trois items :

- évaluation du bruit photométrique,
- test de largeur de bande,
- vérification de l'exactitude et de la précision des longueurs d'onde.

En cas de défaillance de l'un de ces tests il sera nécessaire d'identifier l'appareil comme « non conforme » et de faire intervenir la maintenance fournisseur.

### **3.1.1. Evaluation du bruit photométrique**

Il s'agit de la mesure du bruit interne de l'appareil et des effets environnementaux qui peuvent survenir lors des acquisitions, mais qui ne sont pas liés à l'échantillon lui-même.

Le bruit est évalué sur une céramique réfléchissante. L'acquisition de son spectre est réalisée à deux reprises. La première acquisition est considérée en tant que référence et la deuxième comme échantillon. Les deux spectres sont alors soustraits et la différence correspond au bruit photométrique. Cet essai est reproduit pour 10 « échantillons » afin d'obtenir une moyenne de ce bruit.

Les résultats sont exprimés sous la forme de 3 indicateurs :

- « Peak-to-Peak » (= crête-à-crête) qui correspond à la différence d'intensité entre le puit de plus faible intensité et le pic de plus haute intensité sur toute la gamme de longueurs d'onde. Cette valeur s'apparente donc à l'amplitude d'intensité maximale du bruit photométrique. Selon la plage de longueurs d'onde de travail : 1100 à 1700nm ou 1700nm à 2500nm, la valeur doit être respectivement inférieure à 0,2500mA (milliabsorbance) et à 0,3000mA.
- « bias » (= biais) qui correspond à l'écart par rapport à l'absorbance 0. Il doit être inférieur à 0,1000 quelque soit la plage d'analyse.
- « Root Mean Square » (= racine carrée de la moyenne des carrés) qui correspond à la moyenne quadratique du bruit ou l'écart moyen du bruit sur toute la gamme de longueurs d'onde. Sa valeur doit être inférieure à 0,200mA sur la plage 1100-1700nm et inférieure à 0,0250mA sur la plage 1700-2500nm.

### **3.1.2. Test de largeur de bande et vérification de l'exactitude et de la précision des longueurs d'onde**

Les deux autres essais sont réalisés concomitamment par un balayage à 10 reprises sur une référence interne en polystyrène.

Pour le test de largeur de bande, une mesure de la largeur à mi-hauteur du pic situé à 2166,72nm est effectuée. Celle-ci doit être égale à  $10,00 \pm 1,0$ nm.

L'exactitude des longueurs d'onde est, elle, obtenue par comparaison des positions réelles des sommets de quatre pics de la référence et les positions retrouvées par la mesure. Ces sommets sont choisis pour leur dispersion sur la gamme spectrale et ont pour valeur nominale 1143,63nm, 1680,90nm, 2166,72nm et 2306,10nm. L'écart toléré autour de ces valeurs est de  $\pm 1,0$ nm.

Enfin la précision est assimilée à la répétabilité en longueurs d'onde. Elle est obtenue par calcul de la différence entre la longueur d'onde maximale et minimale entre les 10 spectres du polystyrène et ceci pour chacun des pics précédemment cités. La valeur de cette différence pour chacun des pics doit être inférieure à 0,010nm.

### **3.2. Test du gain**

Il s'agit d'une mesure du réglage de l'amplification du signal lors de la lecture de la céramique de référence. Le signal doit être compris entre 4,260 et 4,500Volts. En cas de valeur hors spécification, il est possible de procéder à un ajustement manuel du gain. Si la modification ne permet pas de revenir dans la plage de tensions souhaitée, c'est le signe que la source lumineuse nécessite d'être remplacée. Ce test est réalisé en plus du test de performance à chaque allumage du spectrophotomètre.

### **3.3. Test de linéarisation**

Ce test est réalisé avec une périodicité mensuelle. C'est un test à visée corrective qui permet le recalage de l'appareil en longueurs d'onde. Pour cela les positions des pics connus de la référence interne (polystyrène) sont comparées à celles mesurées. De cette comparaison est extraite une équation mathématique permettant le réalignement de ces positions entre valeurs théoriques et valeurs mesurées.

### **3.4. Vérification de la linéarité photométrique**

Ce test est réalisé deux fois par an en alternance entre l'utilisateur et le fabricant lors de la maintenance préventive. Il permet de s'assurer de la linéarité de la réponse de l'appareil sur l'échelle des absorbances photométriques. Pour cela une série d'étalons dopés au carbone est utilisée. Chaque étalon correspond à un pourcentage d'absorbance : 99, 80, 40, 20, 10 et 2% permettant une bonne couverture de la gamme des absorbances de travail. Celle-ci va s'étendre sur une amplitude de l'ordre de 2 UA (Unité d'Absorbance).

Les absorbances vont donc être mesurées pour ses six étalons à trois longueurs d'onde : 1200, 1600 et 2000nm. A partir des valeurs de ces absorbances et de leur pourcentage d'absorbance de référence, une droite de régression va être tracée pour chacune de ses longueurs d'onde. La pente de chacune de ces droites va être calculée, ainsi que leur ordonnée à l'origine. Les tolérances admises par le constructeur et la Pharmacopée Européenne sont de  $1,00 \pm 0,05$  pour la pente et  $0,00 \pm 0,05$ UA pour l'ordonnée à l'origine.

A la même fréquence que ce contrôle une vérification de l'exactitude des longueurs d'ondes est exécutée, mais cette fois-ci sur un étalon externe, contrairement à la vérification à chaque démarrage qui est faite sur un étalon interne. La matière de référence est un mélange d'oxydes de terre rare (dysprosium, holmium et erbium). Les calculs d'exactitude sont appliqués sur 3 sommets à 1261,00, 1681,00 et 1935,00nm et sur 10 acquisitions spectrales. La tolérance est de  $\pm 1,00$  pour les 2 premières longueurs d'onde et  $\pm 1,50$  pour la troisième.

## **4. L'étude préliminaire à la prise en charge des matières premières**

### **4.1. Sélection des matières premières potentiellement identifiables par SPIR**

Il faut savoir que l'identification par SPIR ne pourra être mise en place pour toutes les matières premières. Afin de gagner du temps dans la phase de développement il est important de bien sélectionner dès le départ les produits qui pourront être potentiellement pris en charge.



Cette sélection s'opère selon deux critères qui sont :

- le nombre de contenants par livraison,
- les propriétés physicochimiques de la matière.

En effet l'identification par SPIR n'est envisageable que pour les matières premières présentant un nombre suffisant de contenants par livraison. Ceci s'explique par l'obligation de maintenir les identifications usuelles sur le(s) échantillon(s) moyen(s). Donc il n'y a aucun intérêt à mettre en place ce type d'identification pour des matières pour lesquelles les livraisons se font à l'unité ou dans de faibles quantités. Dans certains cas, même si le nombre de contenants est relativement faible, il peut tout de même être intéressant d'opter pour une identification par SPIR, notamment lorsque les identifications usuelles sont particulièrement lourdes et les livraisons récurrentes dans l'année, ce qui peut notamment être le cas de produits d'origine naturelle à péremption courte.

Si la matière première répond au critère de quantité minimale, ses propriétés physicochimiques doivent également être compatibles avec une identification par SPIR. Pour que son identification soit envisageable la matière doit présenter les caractères suivants :

- des caractéristiques spectrales suffisamment importante et discriminante dans le domaine du proche infrarouge,
- une reproductibilité dans la présentation de l'échantillon.

Ces deux critères ont donc été appliqués aux 68 matières premières utilisées par le laboratoire. A la suite de quoi, 28 produits ont été retirés de la liste des matières à identifier par SPIR : 19 pour des raisons de quantité minimale insuffisante et les 9 autres pour des raisons liées aux propriétés physicochimiques.

A titre d'exemple, les produits qui ont été exclus à cause de leurs propriétés physicochimiques sont les suivants :

- Le gaïazulène qui présente une variabilité de forme du fait d'un point de fusion proche de la température ambiante et donc un état qui varie entre la poudre et le solide pâteux ;
- Le benjoin du Laos qui est sous forme d'amas grossiers dont la taille et la forme présentent une grande variabilité ;

- La vaseline, la lanoline et le beurre de muscade qui sont tous trois des substances pâteuses dont la viscosité en fait des produits difficiles à présenter de manière reproductible dans le porte-échantillon ;
- Le fluorure de sodium et la silice colloïdale, pour leur « absence » de caractéristiques spectrales dans le proche infrarouge ;
- L'éthanol à 96% et la triéthanolamine à 99% qui sont disponibles dans le commerce sous différents pourcentages entraînant des problèmes de différenciation.

#### **4.2. Recherche de substances challengeuses**

La deuxième étape consiste en la recherche de substances dites « challengeuses ». Ces produits vont être les garants de la spécificité de la méthode.

En effet ces substances vont être utilisées lors de la validation pour tenter de mettre en défaut la méthode d'identification par la mise en évidence de faux positifs. Si un tel évènement survient il sera alors nécessaire de réajuster les paramètres de la méthode chimiométrique jusqu'à obtenir une différenciation correcte de ces produits. Si le problème de discrimination persiste les substances incriminées devront être considérées comme interférentes. Le cas échéant, la reconnaissance de ces substances pourra soit être envisagée comme une limite de la méthode et donc nécessiter un test d'identification complémentaire pour les différencier clairement de la matière première, soit empêcher tout simplement l'utilisation de la SPIR en tant que méthode d'identification pour la matière en conflit.

Ces produits sont donc choisis pour leurs caractéristiques qui devraient leur conférer une similarité spectrale avec une des matières premières à analyser. Classiquement le choix s'oriente vers des matières présentant un risque d'être livré par erreur. Elles sont donc recherchées en première intention parmi les catalogues des fournisseurs. Mais afin d'anticiper une éventuelle évolution dans la production des fournisseurs ou pour définir les limites de discrimination de la méthode, il est préférable d'élargir leur recherche à toutes les substances couramment disponibles dans le commerce.

Il est également important de bien comprendre la méthode d'identification usuelle de la matière première et l'intérêt des spécifications établies pour chaque matière. Ceci va

permettre d'une part de se fixer des axes de recherche, mais également de prouver que l'identification par SPIR recouvre au moins le même domaine que celui des méthodes d'identifications usuelles.

C'est donc une des étapes les plus fastidieuses et les plus chronophages surtout lorsqu'il s'agit du développement initial d'une méthode d'identification par SPIR.

Suivant ce raisonnement, les principaux axes de recherche ont été :

- des isoméries,
- des structures proches,
- des sels ou bien des formes moléculaires,
- des origines différentes,
- des dénominations proches,
- des compositions proches,
- des degrés d'hydratations différents,
- des caractéristiques physiques proches...

Dans le cas de certaines matières, l'approvisionnement en substances challengeuses a pu s'avérer problématique. Ce fut notamment le cas pour les huiles essentielles et les arômes pour lesquels les fabricants produisent à la commande et selon le cahier des charges du client. Ces fournisseurs ont donc un catalogue fluctuant en fonction des commandes des divers clients.

D'autres causes ont également été à l'origine d'un défaut d'approvisionnement en substances challengeuses :

- un coût rédhibitoire,
- une toxicité.

A la suite de ce constat la pertinence des substances challengeuses non récupérables a été réévaluée, tout comme l'intérêt de la prise en charge de l'identification de la matière par la SPIR. Selon la réponse à ces deux questions des matières premières ont du être de nouveau exclues de la liste des substances identifiables, soit 9 matières premières supplémentaires.

La liste des matières premières et de leurs substances challengeuses retenues sont consultables en annexe 3. A titre d'exemple, les spectres bruts des matières premières confrontées à leurs substances challengeuses ont été reportés en annexe 4.

### **4.3. Récupération des lots de matières premières**

La SPIR, pour être efficace, nécessite un minimum de lots différents d'une même matière première afin de représenter au mieux sa variabilité de production. Ce nombre minimale de lots n'est donc pas le même d'une matière à l'autre et est susceptible d'évoluer en fonction de la variabilité rencontrée entre les lots.

Par défaut, l'EMEA <sup>[13]</sup> fixe une limite basse à trois lots. Sachant qu'au moins un lot supplémentaire est nécessaire pour la validation de la bibliothèque. Il n'y a par contre pas d'exigence quant au nombre de lots utilisés pour la validation. Le minimum total nécessaire est donc porté à quatre lots. Le nombre maximal de lots a été établi à treize (dix pour construire la bibliothèque et trois pour la valider). D'après les essais menés en prévision, un nombre supérieur serait superflu.

Deux règles sont imposées aux matières premières utilisées pour l'établissement de la bibliothèque ou sa validation. Elles doivent :

- être conformes aux spécifications établies dans le dossier d'AMM,
- ne pas avoir dépassé leur date limite d'utilisation.

Les sources principales d'approvisionnement ont donc été l'échantillothèque du laboratoire et celles des autres laboratoires du groupe. De plus afin de compléter les bibliothèques en certains produits il a été nécessaire de commander des échantillons supplémentaires auprès des fournisseurs habituels de matières premières. Mais pour ces derniers, un contrôle analytique complet selon les spécifications requises est indispensable avant de pouvoir les intégrer dans les bibliothèques.

## 5. Le développement et la validation des bibliothèques

### 5.1. Les étapes de développement d'une méthode d'identification par SPIR

Le développement d'une méthode d'identification par SPIR se décompose en six étapes :

- acquisition des spectres,
- création de la bibliothèque,
- sélection des spectres,
- application d'une méthode chimiométrique,
- qualification d'un ou plusieurs produits (optionnel),
- validation de la bibliothèque.

#### 5.1.1. L'acquisition des spectres

Le protocole d'acquisition des spectres est une étape importante dans la constitution des bibliothèques. Il doit donner lieu à une réflexion sur ce que l'on va attendre comme degré de discrimination par la méthode d'identification. En effet, outre le fait d'inclure dans les bibliothèques les variations liées à la fabrication des matières premières, il va pouvoir être intéressant d'inclure d'autres sources de variations qui pourront améliorer la robustesse de la méthode lors de son utilisation en routine.

Par contre il faut éviter de tomber dans l'excès inverse. En voulant inclure trop de variations on augmente le risque d'interférences entre les produits de la bibliothèque ou avec les substances challengeuses, ce qui conduit à compliquer le choix de la méthode chimiométrique.

Voici quelques facteurs liés à l'acquisition et susceptibles de modifier les spectres en proche infrarouge :

- température
- humidité
- épaisseur de l'échantillon
- la présentation de l'échantillon
- la qualité du porte-échantillon
- l'appareil et son outil d'acquisition... [18]

De ce constat est sorti un protocole d'acquisition des spectres afin de répondre aux attentes en matière de robustesse lors de l'identification en routine.

- a) Les acquisitions ont toutes été réalisées à proximité de la salle de prélèvement afin d'être dans des conditions environnementales les plus proches de celles retrouvées lors des analyses de routine.
- b) L'acquisition des spectres des lots de chaque matière première contenue dans l'échantillothèque a été répartie sur trois jours, pas forcément consécutifs, et selon trois tranches horaires différentes : matin, début d'après-midi et fin d'après-midi. Ce qui donne un planning d'acquisitions de type : J1 - matin, J2 - début d'après-midi et J3 - fin d'après-midi. Ce calendrier n'a été applicable que dans le cas où le produit comportait suffisamment de lots. Afin de discerner les variations spectrales liées aux conditions d'acquisition de celles liées à la conservation de l'échantillon, les lots de matières ont été analysés suivant un ordre permettant l'alternance de lots récents et d'autres plus anciens. De plus des acquisitions ont été réalisées pendant toute la durée du développement en fonction de l'arrivée des matières premières, ce qui agrémentait encore plus la variabilité environnementale.
- c) Chaque lot de poudre a été analysé à trois reprises. A chaque acquisition le bécher servant de porte-échantillon a été changé et la poudre a subi un tassement croissant. Pour les liquides, le porte-échantillon est une cellule calibrée, il n'a donc pas été nécessaire de la remplacer par une autre. L'acquisition de chaque lot n'a donc été reproduite qu'à deux reprises. Entre chaque, la cellule a tout de même été déplacée perpendiculairement au faisceau et le réflecteur a subi une rotation d'un angle de  $90^\circ$ , afin de tenir compte de la variabilité dans la présentation de l'échantillon.
- d) Enfin pour les liquides le trajet optique est maîtrisé du fait de l'utilisation d'un réflecteur calibré, mais dans le cas des poudres c'est l'épaisseur qui conditionne le trajet optique. D'après la littérature, l'épaisseur minimale est de 0,5cm pour les poudres pour lesquelles le rayonnement est fortement pénétrant, mais afin de se ménager une marge de sécurité l'épaisseur de travail a été portée au minimum à 1cm.

### **5.1.2. La création de la bibliothèque**

Les différents produits et leurs spectres vont être organisés en bibliothèque. Idéalement une bibliothèque va regrouper des produits selon des caractères organoleptiques communs afin de limiter le nombre de bibliothèques tout en orientant sur le choix de la bibliothèque à utiliser en routine grâce à l'observation de la matière première. Malheureusement dans la pratique le regroupement va surtout dépendre de la variabilité spectrale du produit et de la proximité de ses substances challengeuses.

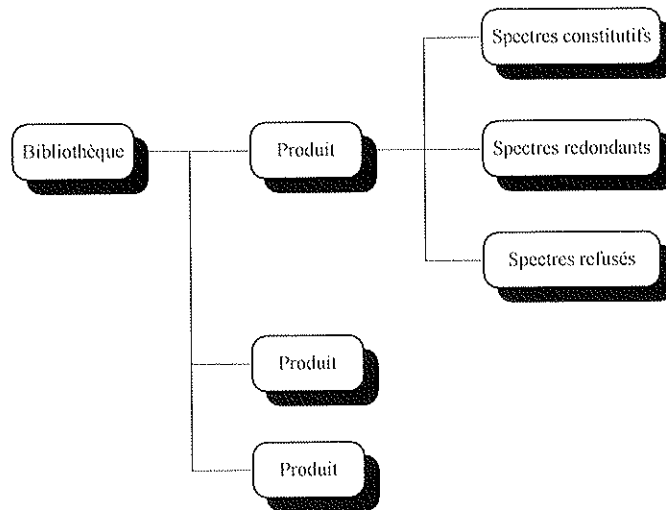
Il n'existe pas de nombre minimal ou maximal de produits par bibliothèque. Ce choix dépend de plusieurs paramètres liés à la phase de développement et/ou à l'utilisation en routine :

- la facilité d'utilisation : un nombre restreint de bibliothèques contenant un grand nombre de produits, limitera le préleveur dans ses choix lors de l'identification,
- la rapidité d'exécution : une bibliothèque chargée nécessitera des calculs plus nombreux et donc plus longs, surtout lors du développement de la méthode,
- la recherche d'une méthode chimométrique adéquate : plus le nombre de produit inclus dans une bibliothèque est grand plus il est difficile de trouver une méthode chimométrique qui convienne à tous les produits.

Il n'y a donc pas vraiment de règle à proprement parlé, le choix des bibliothèques va dépendre des matières premières à prendre en charge. Dans le cas présent la facilité d'utilisation en routine a été privilégiée et donc le nombre de bibliothèque limité au maximum.

### **5.1.3. La sélection des spectres**

Les spectres inclus dans les bibliothèques sont rattachés au produit auquel ils appartiennent et répartis en 3 catégories comme indiqué sur l'organigramme de la figure 16.



*Figure 16 : Architecture d'une bibliothèque sous le logiciel VISION*

Les spectres dits « spectres constitutifs » vont être utilisés afin de construire la bibliothèque et seront représentatifs de la variabilité du produit. Les « spectres redondants » sont choisis pour leur similarité avec ceux déjà inclus dans la bibliothèque et serviront lors de la validation. Enfin les « spectres refusés » sont en réalité les spectres des substances challengeuses et serviront également en validation.

La répartition des spectres peut se faire selon deux procédés de sélection : automatisé ou manuel.

Dans le cas d'une répartition automatisée, c'est le logiciel qui détermine les spectres constitutifs, redondants et refusés à l'aide d'une méthode chimiométrique, qui peut être :

- la distance maximale en longueurs d'onde,
- la distance de Mahalanobis en composantes principales.

Ainsi un spectre sera classé dans l'une de ces trois catégories selon la valeur qu'il obtient par la méthode chimiométrique choisie.

Malheureusement dans le cas de ce projet et des choix faits dans le protocole d'acquisition spectrale, cette méthode n'est pas applicable. En effet les autorités compétentes <sup>[13, 19]</sup> imposent que les lots de matières premières utilisés pour construire la bibliothèque ne servent pas lors de la validation. Or s'il est procédé à un tri automatique des spectres, il n'est pas possible de répondre correctement à cette exigence de répartition, les spectres d'un même lot



se retrouvant classiquement dispatchés entre les groupes « spectres constitutifs » et « spectres redondants ». A cela trois raisons :

- Le logiciel VISION n'est pas capable de relier entre eux les spectres d'un même lot.
- Les lots de matière première comptent au moins deux ou trois spectres selon qu'il s'agit d'un liquide ou d'un solide.
- La variabilité spectrale d'une matière est souvent plus liée à des différences de présentation qu'à une variabilité de production (surtout pour les poudres).

La répartition des spectres a donc été laissée à la charge de l'utilisateur.

Dans le cas d'une répartition manuelle les mêmes méthodes chimiométriques peuvent être employées, mais c'est à l'utilisateur de repérer les spectres redondants. Pour ce faire le logiciel fournit plusieurs options de visualisation :

- classement des spectres selon leur valeur obtenue avec la méthode chimiométrique,
- représentation de la population spectrale sous la forme d'un histogramme avec en abscisse les valeurs obtenues avec la méthode chimiométrique et en ordonnée l'effectif,
- pour la distance de Mahalanobis en composantes principales uniquement, une représentation des spectres entre eux dans un espace à 3 dimensions selon leur valeur calculée d'après les composantes principales.

Dans la mesure du possible, un ratio de trois lots constitutifs pour un lot redondant a été appliqué. Ce rapport a été respecté si la représentation de la variabilité du produit était suffisante.

#### **5.1.4. L'application d'une méthode chimiométrique :**

La méthode chimiométrique comprend : un prétraitement des spectres (optionnel), un algorithme et une valeur seuil.

##### **5.1.4.1. Le prétraitement**

Le prétraitement des spectres a un caractère optionnel, mais est fortement conseillé, même pour différencier des matières éloignées chimiquement et spectralement.

Plusieurs méthodes de prétraitement sont disponibles dans le logiciel VISION :

- lissage sur N points,
- dérivations d'ordre 1 à 4,
- « standard normal variate »,
- « baseline correction »,
- « detrend »,
- « Savintzky-Golay »,
- « Thickness correction ».

Certaines de ces méthodes peuvent être associées entre elles afin d'obtenir un effet synergique dans la discrimination. Mais toutes ces méthodes génèrent, dans une plus ou moins grande mesure, des artefacts et des pertes d'information. L'addition de méthodes de prétraitement doit donc se faire avec une grande prudence et certaines associations sont plus conseillées que d'autres <sup>[8]</sup>. A noter également que l'ordre d'application des prétraitements est à prendre en compte.

Seul le traitement par dérivation de second ordre a été généralisé à toutes les matières premières. L'apport de ce prétraitement a été significatif sur les interférences qui pouvaient survenir entre des matières pourtant éloignées.

D'autres prétraitements ont pu être employés en sus de la dérivation, mais de manière beaucoup plus anecdotique et qu'en cas de besoin.

#### **5.1.4.2. La méthode chimiométrique**

Le choix de l'algorithme se porte donc sur l'un des quatre suivant :

- la corrélation dans l'espace en longueurs d'onde,
- la distance maximale dans l'espace en longueurs d'onde,
- la distance de Mahalanobis dans l'espace en composantes principales,
- la variance résiduelle dans l'espace en composantes principales.

En première intention le choix a été orienté vers ceux travaillant dans un espace en longueurs d'onde, c'est en effet les méthodes conseillées par l'EMEA <sup>[13]</sup> dans son guide sur l'utilisation de la SPIR.

D'après l'expérience acquise durant ce projet, un classement en termes de pouvoir discriminant croissant peut être établi de la manière suivant :

- (1) la corrélation dans l'espace en longueurs d'onde,
- (2) la distance maximale dans l'espace en longueurs d'onde,
- (3) la variance résiduelle dans l'espace en composantes principales.

La distance de Mahalanobis dans l'espace en composantes principales n'a pas été incluse, car les produits pour lesquels elle a été testée présentaient selon cette méthode des valeurs d'une grande disparité. Un ou deux lots de matière première se trouvaient régulièrement avec des valeurs atypiques, supérieures à celles obtenues par les substances challengeuses. Ainsi dans la pratique, elle a été impossible à mettre en œuvre. Les bibliothèques pour lesquelles cette méthode a été tentée sont peu nombreuses, donc cette observation nécessiterait une investigation plus poussée. Toutefois là où la distance de Mahalanobis échouait, la méthode de calcul en variance résiduelle a donnée entière satisfaction.

Le choix d'une méthode chimiométrique dépend de la variabilité des matières premières et de la proximité spectrale avec leurs substances challengeuses. Les méthodes chimiométriques ont été appliquées une à une selon l'ordre croissant de pouvoir discriminant. En premier lieu la méthode par corrélation est essayée, si elle échoue celle par la distance maximale est appliquée et en dernier recourt la variance résiduelle en composantes principales. De plus les spectres redondants n'étant pas forcément les mêmes d'une méthode à l'autre, des remaniements dans la sélection des spectres ont pu être nécessaires.

La solution de facilité serait de prendre toujours la méthode la plus discriminante, mais la discrimination n'en serait pas pour autant meilleure. En effet les disparités entre les matières premières s'en retrouveraient exacerbées et deviendraient difficilement conciliables au sein d'une même bibliothèque. Par exemple dans certaines bibliothèques peuvent se côtoyer :

- des produits présentant une variabilité de fabrication moyenne et des substances challengeuses éloignées,

- des produits dont la variabilité est beaucoup plus modérée et les substances challengeuses plus proches.

Dans ce cas une méthode par corrélation en longueurs d'onde permettrait une bonne séparation là où la distance maximale ne permettrait pas de trouver un seuil pouvant convenir à toutes les matières.

#### **5.1.4.3. La valeur seuil**

Le seuil de reconnaissance doit être compris entre la valeur maximale obtenue par les spectres de la matière première et la valeur minimale obtenue par les spectres des substances challengeuses.

L'utilisateur est ensuite libre de choisir la valeur seuil au sein de cet intervalle. Toutefois il est important de tenir compte lors de son établissement de :

- la robustesse de la méthode et notamment des augmentations des valeurs spectrales qui ne manqueront pas de se produire lors de l'utilisation en routine,
- la variabilité de fabrication des substances challengeuses qui n'est pas prise en compte lors du développement.

#### **5.1.5. La validation de la bibliothèque**

La validation des bibliothèques consiste en une vérification de la spécificité. Cette validation se déroule en deux étapes.

La première étape, appelée validation interne, correspond à la validation des spectres ayant servi à la construction des bibliothèques. Ils sont donc tour à tour confrontés aux spectres moyens de chaque produit inclus dans la bibliothèque. L'objectif est de confirmer leur appartenance au produit à partir duquel ils ont été acquis et de s'assurer qu'ils ne présentent pas d'ambiguïté de reconnaissance avec d'autres produits inclus dans la bibliothèque.

La deuxième étape est appelée la validation externe. Durant cette étape vont être confrontés les spectres inclus dans les groupes « spectres redondants » et « spectres rejetés » qui ont été définis dans la phase de sélection des spectres. Le but va donc être de reconnaître les spectres dits redondants et à l'inverse de rejeter ceux provenant des substances challengeuses.

## **5.2. Le développement des bibliothèques d'un point de vue concret**

Le développement des bibliothèques a été réalisé en plusieurs étapes avec un affinement progressif de leur capacité de discrimination.

Au premier abord cet affinement ne suit pas forcément un ordre « logique », mais il est représentatif des réalités rencontrées lors du développement de la méthode. En effet le développement a porté sur des matières premières de fournisseurs aussi nombreux que différents. Les substances challengeuses ont donc mis un temps plus ou moins conséquent avant d'être réceptionnées. De plus l'enrichissement des bibliothèques en lots de matières premières dépendit de l'importance que ces produits occupaient dans la production des mois précédant et durant le projet.

### **5.2.1. Création de bibliothèques préliminaires**

Au départ les matières premières ont été regroupées en bibliothèques selon un caractère organoleptique majeur : leur état. Trois bibliothèques ont donc été créées : « liquides », « poudres » et « cires ». Cet axe de regroupement répondait au mieux à l'exigence de facilité d'utilisation en routine et séparait les matières premières selon les différences de variabilités inhérentes à l'acquisition (mode d'acquisition et présentation de l'échantillon). Les produits ont donc été répartis comme décrit au tableau I.

*Tableau I : Listes des matières premières incluses dans les bibliothèques préliminaires*

<b>Bibliothèque "poudre"</b>	<b>Bibliothèque "cire"</b>	<b>Bibliothèque "liquide"</b>
ATP disodique	cire d'abeille blanche modifiée	arôme framboise naturel
acide borique	cire d'abeille blanche	baume du Pérou
acide citrique monohydraté	Téfosé 63	glycérine
acide salicylique		Labrafil M1944CS
alvérine citrate		paraffine liquide épaisse
amidon de blé		paraffine liquide légère
aspartate de magnésium dihydraté		salicylate de méthyle
bicarbonate de sodium		siméticone
cellulose microcristalline PH101		
extrait sec d'Erysimum		
gomme arabique		
lévomenthol		
parahydroxybenzoate de méthyle		
parahydroxybenzoate de propyle		
saccharose		
talc		

Malheureusement ce premier regroupement resta au stade de l'ébauche. En effet les bibliothèques liquides et solides sont l'illustration parfaite des difficultés de conciliation pouvant être rencontrées lorsque des produits de variabilités différentes sont inclus dans une même bibliothèque.

### **5.2.2. Optimisation de la bibliothèque « liquide »**

La première bibliothèque à évoluer fut celle des liquides. Elle est en effet composée de produits dont la nature est très diverse :

- des substances extraites d'un matériel végétal,
- des substances chimiquement définies ou dont la production est régulière.

Donc deux types de matière qui vont présenter une variabilité de production totalement opposée.

Certaines de ces matières sont également chimiquement très proches ou possèdent des substances challengeuses très proches. C'est surtout le cas pour les paraffines.

Ces deux éléments incompatibles ont conduit à une impossibilité de valider la bibliothèque. Celle-ci a du être scindée en deux afin d'isoler les produits inconciliables. Cette scission a été réalisée selon un autre caractère organoleptique majeur : la couleur. Les bibliothèques : « liquide incolore » et « liquide coloré » ont donc été créées et leur composition est décrite dans le tableau II et III.

*Tableau II : Descriptif de la bibliothèque « liquide incolore »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>liquide incolore</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 3,5
<b>Matières premières</b>	glycérine Labrafil M1944CS paraffine liquide épaisse paraffine liquide légère salicylate de méthyle siméticone

*Tableau III : Descriptif de la bibliothèque « liquide coloré »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>liquide coloré</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,99
<b>Matières premières</b>	arôme framboise naturel baume du Pérou

Ce caractère coloré ou non présente le double avantage de :

- renseigner sur le choix de la bibliothèque à utiliser grâce à une observation visuelle de la matière,
- séparer les matières selon les critères énoncés précédemment.

Pour ces deux nouvelles bibliothèques deux méthodes chimiométriques ont pu être définies :

- distance maximale en longueur d'onde avec un seuil de 3,5 pour la bibliothèque « liquide incolore »,
- corrélation en longueur d'onde avec un seuil de 0,99 pour la bibliothèque « liquide coloré ».

Dans le cas de la bibliothèque « liquide incolore », tous les produits qui la compose présentent une très faible variabilité de production et certains produits peuvent rencontrer des problèmes d'interférences avec une autre matière première, c'est notamment le cas des paraffines

liquides entre elles. Un algorithme plus discriminant et un seuil restreint ont donc été appliqués.

La bibliothèque « liquide coloré » nécessite elle un algorithme beaucoup plus souple, car les deux produits qui la composent sont des extraits d'origine naturelle.

Malheureusement l'intégration de nouvelles substances challengeuses et un changement de la lampe du spectrophotomètre ont révélé les limites de ces bibliothèques.

Premier point, le changement de la lampe du spectrophotomètre a eu un effet catastrophique en termes de robustesse de la méthode. Ce changement se traduisait de manière visuelle par un accroissement des intensités d'absorbance ou une diminution selon la lampe de remplacement. D'un point de vue chimiométrique, les valeurs des spectres nouvellement acquis se trouvaient toutes augmentées et hors seuil. L'incidence n'a pas été la même pour tous les produits : allant de la légère augmentation à « un bond » qui en rendait la bibliothèque invalable en raison de valeurs trop proches de celles des substances challengeuses.

Il semblerait d'après le constructeur de l'appareil que ce problème soit plus marqué sur ce type d'appareil de conception ancienne et qui présente un système de réglage manuel de l'amplification du signal lumineux. Malheureusement le changement de lampe doit intervenir tous les ans lors de la maintenance préventive. Il a donc paru indispensable de prendre en considération ce risque afin d'améliorer la robustesse de la méthode.

Deux possibilités ont été envisagées :

- Acquérir des spectres avec la nouvelle lampe et les intégrer dans la bibliothèque afin de retrouver des valeurs plus faibles. L'inconvénient est que ce recadrage pourra n'être qu'éphémère et devra peut être être reproduit lors du prochain changement de lampe. Cette hypothèse s'est vérifiée à la suite d'un nouveau changement volontaire de la lampe.
- Remodeler les bibliothèques et modifier leur méthode chimiométrique pour qu'elle tienne compte de ce type de déviation.

C'est ce dernier point qui a été privilégié. En effet il s'avère que certains algorithmes paraissent moins sensibles au changement de lampe que d'autres, en réalité c'est surtout la



distance maximale en longueurs d'onde qui souffre le plus de ce changement. C'est pourquoi dans le cas où les matières premières étaient fortement impactées par le changement de lampe, un autre algorithme a été choisi.

Parallèlement les bibliothèques ont été de nouveau modifiées afin de regrouper les matières pour les lesquelles des méthodes chimiométriques et des seuils du même ordre de grandeur peuvent être appliqués. Bien sur l'influence du changement de lampe sur le spectre d'une matière a été prise en compte lors l'appréciation de la puissance de discrimination que peut tolérer le produit.

De nouveaux seuils ont ainsi été déterminés tenant compte:

- des valeurs actuelles des spectres au sein des bibliothèques,
- de l'impact variable du changement de lampe sur les produits.

Une marge a ainsi été aménagée et déterminée à partir des écarts de valeurs qui pouvaient être observés entre les spectres acquis avec une première lampe et ceux acquis avec une deuxième. Le laboratoire disposant de trois lampes, cette évaluation a été faite entre les lampes donnant les valeurs les plus extrêmes.

Toutefois, malgré ces précautions, il pourra être important de vérifier la robustesse de la méthode lors d'un changement de lampe. Cette vérification sera surtout nécessaire pour les bibliothèques dont la méthode chimiométrique est la distance maximale en longueurs d'onde. Il suffira pour cela de procéder à la réacquisition d'un spectre d'un lot ayant déjà été identifié par SPIR et d'apprécier l'évolution de sa valeur de reconnaissance.

Au final ce sont six bibliothèques qui ont été créées. Certaines matières premières ont du être isolées de part leur caractère organoleptique et/ou chimiométrique unique. Les détails de ces bibliothèques ainsi que leur méthode chimiométrique sont reportés dans les tableaux IV à IX.

*Tableau IV : Descriptif de la bibliothèque « liquide incolore » après modification*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>liquide incolore</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,99
<b>Matières premières</b>	glycérine salicylate de méthyle

*Tableau V : Descriptif de la bibliothèque « liquide coloré » après modification*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>liquide coloré</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,992
<b>Matières premières</b>	arôme framboise baume du Pérou

*Tableau VI : Descriptif de la bibliothèque « Labrafil »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>Labrafil</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,998
<b>Matière première</b>	Labrafil M1944CS

*Tableau VII : Descriptif de la bibliothèque « extrait mou de cynara »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>Extrait mou de cynara</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,98
<b>Matière première</b>	Extrait mou de cynara

*Tableau VIII : Descriptif de la bibliothèque « paraffine »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>paraffine</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 7
<b>Matières premières</b>	paraffine liquide épaisse paraffine liquide légère

*Tableau IX : Descriptif de la bibliothèque « siméticone »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>siméticone</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,999
<b>Matière première</b>	siméticone

Ce remodelage des bibliothèques a également été l'occasion d'introduire une nouvelle matière : l'extrait mou de Cynara qui faute d'un nombre suffisant de lots et surtout d'une date de péremption trop courte, n'avait pas pu être inclus précédemment. De plus ce produit qui ne présente pas de substances challengeuses clairement identifiées, a été inclus dans une bibliothèque qui lui est propre. Un seuil le plus étroit possible a été appliqué à cette bibliothèque de sorte à maintenir un indice de confiance élevé dans sa méthode d'identification. Par ailleurs le risque de confusion est maîtrisé grâce notamment au dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) entrepris sur les échantillons moyens.

Au final six bibliothèques ont été créées pour identifier neuf matières premières. On est loin de la bibliothèque unique de départ espérée, mais au moins la robustesse de ces méthodes ne devrait pas être mise en défaut au premier changement de lampe.

A titre informatif un essai de robustesse a été mis en œuvre pour apprécier l'influence de la température de la matière sur son identification par SPIR. Pour cela un produit jugé sensible à la température a été choisi : l'arôme framboise naturel (extrait hydroalcoolique). La matière a été stockée selon quatre conditions de température allant de 12 à 30°C (température directe du liquide). L'impact s'est révélé négligeable comparé à ce qu'avait pu entraîner le changement de lampe.

### **5.2.3. Optimisation de la bibliothèque « poudre »**

Au départ la bibliothèque poudre avait pu être constituée en faisant fi des variabilités de fabrication grâce notamment à une méthode chimiométrique moyennement discriminante : la distance maximale en longueur d'onde avec un seuil de 4 qui permettait d'éviter les interférences entre toutes les matières incluses dans la bibliothèque et leurs substances challengeuses.

Mais, tout comme pour les liquides, deux facteurs ont conduit à répartir les poudres en plusieurs bibliothèques :

- intégration de nouvelles substances challengeuses,
- changement de lampe.

Le changement de lampe a tout de même eu une importance moindre dans le cas des poudres. Il n'a d'ailleurs pas été directement décelable, car les différences d'intensité d'absorbance se sont retrouvées masquées par la variabilité de présentation de l'échantillon qui est beaucoup plus importante que dans le cas d'un liquide. Ce n'est que lors de l'application d'une méthode chimiométrique que l'incidence du changement de lampe a été décelée.

La bibliothèque poudre a donc engendré six bibliothèques d'importance inégale. Il y a une bibliothèque majeure qui a gardé l'intitulé original et cinq autres bibliothèques propriétaires.

La liste des matières premières incluses et la méthode chimiométrique employée dans les bibliothèques sont décrites dans les tableaux X à XVI.

*Tableau X : Descriptif de la bibliothèque « poudre » après modification*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>poudre</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,96
<b>Matières premières</b>	acide borique acide salicylique aspartate de magnésium dihydraté ATP disodique bicarbonate de sodium lévométhol parahydroxybenzoate de méthyle parahydroxybenzoate de propyle saccharose talc

*Tableau XI : Descriptif de la bibliothèque « alvéine citrate »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>alvéine citrate</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 6
<b>Matière première</b>	alvéine citrate

*Tableau XII : Descriptif de la bibliothèque « extrait sec d'Erysimum »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>extrait sec d'erysimum</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + variance résiduelle en CP avec un seuil = 0,5
<b>Matière première</b>	extrait d'erysimum

*Tableau XIII : Descriptif de la bibliothèque « amidon »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>amidon</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + variance résiduelle en CP avec un seuil = 0,8
<b>Matière première</b>	amidon de blé

*Tableau XIV : Descriptif de la bibliothèque « cellulose »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>cellulose</b>
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 7
<b>Matière première</b>	cellulose microcristalline PH101

*Tableau XV : Descriptif de la bibliothèque « gomme arabique »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	gomme arabique
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + corrélation en longueurs d'onde avec un seuil = 0,99
<b>Matière première</b>	gomme arabique

*Tableau XVI : Descriptif de la bibliothèque « acide citrique »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	acide citrique
<b>Méthode chimiométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 10
<b>Matière première</b>	acide citrique

La bibliothèque majoritaire possède une méthode chimiométrique dont le pouvoir discriminant est faible. Ceci apporte une grande robustesse à la méthode d'identification et permet d'incorporer des matières dont l'hétérogénéité de fabrication est relativement importante. Par contre elle ne contient que des poudres dont les substances challengeuses sont nettement distinguables des matières premières.

Ce choix de créer une bibliothèque multiproduit a conduit à exclure un certain nombre de produits pour deux raisons :

- interférence avec une ou plusieurs substances challengeuses,
- absence de substances challengeuses.

Afin de palier à l'absence de substances challengeuses, tout comme pour l'extrait mou de cynara, des bibliothèques propriétaires ont été créées avec un seuil restreint. C'est le cas de l'extrait sec d'Erysimum et du citrate d'alvéine.

Pour le premier, les substances challengeuses ne sont pas réellement inexistantes, bien au contraire leur nombre est trop important pour en faire un inventaire exhaustif et ne sont pas forcément disponibles. En effet il semblerait que le ballaste utilisé dans les extraits (ex : maltodextrine), par définition présent en grande quantité, joue un rôle notable dans l'allure des spectres des extraits. De ce fait la nature et la quantité du ballaste auraient une influence plus grande dans la reconnaissance de la matière que la plante dont l'extrait est issu. D'où face à l'impossibilité d'avoir un catalogue précis et fixe sur les extraits commercialisés par le fabricant, il a été décidé de fixer un seuil aussi restreint que possible pour la reconnaissance

de la matière par SPIR, tout en justifiant d'un dosage par CLHP sur les échantillons moyens constitués d'un nombre limité de prélèvements unitaires.

Pour l'alvérine citrate, il existe bien une substance challengeuse : l'alvérine sous sa forme moléculaire ou alvérine base, mais celle-ci se trouve à l'état liquide. Donc en l'absence d'autres challengeurs clairement identifiés et afin de limiter le risque éventuel de confusion, l'alvérine a été incluse dans une bibliothèque à part avec un seuil également restreint.

L'amidon de blé, la cellulose microcristalline et la gomme arabique ont tous trois été écartés à cause des interférences qu'engendraient leurs substances challengeuses lorsqu'ils étaient inclus dans la bibliothèque « poudre ». Ces substances interférentes étaient respectivement :

- les amidons issus d'autres plantes,
- les différents grades de la cellulose microcristalline et dans une moindre mesure les mélanges binomiques de cellulose et d'une autre substance,
- les différents types de gomme.

La création de bibliothèques uniques avec des seuils ou des méthodes plus contraignantes ont ainsi permis de résoudre les problèmes d'interférences. Par contre la différenciation des différents grades de cellulose microcristalline (surtout le grade PH101 par rapport au PH102) a été sacrifiée au profit d'une robustesse accrue. La distinction entre les différents grades de cellulose microcristalline n'est pas une exigence réglementaire et n'est pas requis dans la monographie de la Pharmacopée Européenne. A titre d'exemple le rapport de validation de la bibliothèque de la cellulose microcristalline avec la valeur obtenue par chaque spectre a été inclus en annexe 5.

Enfin l'exclusion de l'acide citrique ne fait pas suite à un problème d'interférence. C'est une trop grande variabilité spectrale entre les lots de matière qui a conduit à développer une bibliothèque spécifiquement pour ce produit. De plus la reconnaissance par corrélation en longueurs d'onde aurait nécessité un seuil trop faible, le choix s'est donc porté sur la distance maximale en longueurs d'onde qui, avec un seuil de 10, permet de combler le manque de représentativité tout en maintenant une spécificité largement suffisante.

### 5.2.4. Optimisation de la bibliothèque « cire »

La bibliothèque des cires n'a pas nécessité de restructuration et a pu garder son intégrité. Les trois produits qu'elle contient présentent tous une variabilité modérée de fabrication et des substances challengeuses suffisamment éloignées pour permettre une discrimination par la distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil de 7 (cf. tableau XVII).

*Tableau XVII : Descriptif de la bibliothèque « cire »*

<b>Intitulé bibliothèque</b>	<b>cire</b>
<b>Méthode chimométrique</b>	dérivation seconde + distance maximale en longueurs d'onde avec un seuil = 7
<b>Matières premières</b>	Apifil cire d'abeille blanche Téfose 63

La cire d'abeille et son dérivé sont mutuellement leur propre substance challengeuse avec un risque d'ambiguïté qui survient pour un seuil d'identification supérieur à 10. A noter que la méthode chimométrique employée n'est pas capable de différencier la cire d'abeille blanche de son homologue jaune. Il serait pour cela nécessaire de diminuer le seuil au dépend de la robustesse. Mais la cire d'abeille jaune ne doit pas pour autant être considérée comme une interférence vu la différence d'aspect que présentent ces deux produits.

### 5.3. Conclusion sur le développement

Au cours de ce projet quatorze bibliothèques ont été développées :

- six pour les liquides,
- sept pour les poudres,
- une pour les cires.

Ces bibliothèques regroupent au total vingt-huit matières premières pour lesquelles la méthode a été validée ou est en instance de validation. En effet des réserves sont tout de même à émettre pour l'ATP disodique et l'aspartate de magnésium pour lesquels certaines substances challengeuses sont toujours en attente de confrontation.

Des matières premières sont également en attente d'intégration au sein d'une bibliothèque. Il s'agit de la chondroïtine sulfate sodique (origine bovine), le stéarate de magnésium et le

thymol. Ces matières ne disposent actuellement pas d'une représentativité suffisante en terme de lots pour être intégrées dans une bibliothèque.

Abstraction faite des matières pour lesquelles le nombre de lots est encore insuffisant ou pour lesquelles des substances challengeuses sont encore en attente d'intégration, le développement a été mené à son terme pour toutes les matières premières sélectionnées à la suite de l'étude de faisabilité. Aucune substance challengeuse ne s'est réellement révélée interférente. La diversité des méthodes chimiométriques et de leur pouvoir discriminant a donc permis de faire face à tous les cas de figure offerts par les matières premières du laboratoire.

Un point critique a tout de même été mis en exergue : le changement de lampe et l'impact qu'il pouvait avoir sur les spectres et à plus forte raison sur leur valeur d'identification.

Le plus difficile est donc de déterminer des seuils qui permettent d'assurer spécificité et robustesse à la méthode, surtout dans le cas où les substances challengeuses sont proches et la bibliothèque sensible aux changements de lampe. C'est pourquoi, au moins lors des premiers changements de lampe, une vérification de la robustesse de la méthode pourrait éviter des défauts de reconnaissance en routine.

## **6. La rédaction des documents qualité**

La rédaction de documents qualité concernant l'utilisation du SPIR est une exigence des BPF <sup>[1]</sup> (chapitre 4. documentation). L'objectif est d'encadrer au mieux la méthode d'identification des matières premières par SPIR et leur prise en charge.

Ces documents ont été rédigés en accord avec la procédure des procédures des laboratoires MAYOLY SPINDLER et sont de quatre types :

- La procédure générale intitulée « Méthodologie générale du SPIR », qui décrit le processus de prise en charge de l'identification d'une matière première par SPIR : les actions à entreprendre, les décisions à prendre et les personnes concernées...



- Les modes opératoires :
  - o « utilisation et vérification du SPIR »,
  - o « création et ajout d'un produit dans une bibliothèque ».Ces deux documents sont des instructions précises de travail concernant l'utilisation du SPIR.
  
- Le formulaire de « prise en charge d'une matière première par SPIR ». C'est le document support qui va permettre de regrouper toutes informations relatives à la prise en charge de l'identification d'une matière donnée : les informations générales sur la matière, la réponse aux prérequis, les paramètres de développement de la méthode d'identification et enfin la décision de prise en charge.
  
- L'enregistrement des matières premières identifiées ou non par SPIR. Cet enregistrement est intimement lié au formulaire. Il synthétise en un même tableau toutes les informations majeures renseignées dans le formulaire de prise en charge de chacune des matières premières du site.

## CONCLUSION

D'un point de vue général, la conduite de ce projet a révélé qu'il est utopique d'espérer pouvoir mettre en place cette méthode pour toutes les matières premières. En effet, de nombreux paramètres sont susceptibles d'exclure la prise en charge d'une matière première : propriétés physico-chimiques, approvisionnement en substances challengeuses... mais surtout cette méthode ne peut s'appliquer qu'à des produits dont l'utilisation est relativement fréquente et les livraisons importantes en nombre de contenants. Cette condition est liée à la fois à la nécessité d'avoir un nombre suffisant de lots de matière pour avoir une bonne représentation de sa variabilité de fabrication, mais également au fait qu'il est nécessaire de maintenir la méthode d'identification usuelle sur un échantillon moyen.

L'autre inconvénient majeur de la méthode est sa phase de développement. Elle nécessite une lourde étude bibliographique, notamment pour la sélection des substances challengeuses. En effet la SPIR ne s'appréhende pas de la même manière que les techniques analytiques classiques, la SPIR travaille plus par discrimination que par identification. La bonne discrimination d'une matière première va donc être conditionnée par la pertinence de la sélection des substances challengeuses qui garantiront ainsi la spécificité de la méthode.

Le principe de l'identification par SPIR est également à l'origine d'exigences plus prononcées que dans le cas des techniques d'identifications usuelles. Ces exigences sont celles qui ont été introduites récemment dans la fiche pratique de l'Afssaps <sup>[2]</sup> (annexe 1) et qui imposent que les fabricants soient maîtrisés et les méthodes de prélèvement validées.

Au final le bilan de ce développement est tout de même plus que positif. En effet, une fois ses contraintes acceptées, la technique révèle son potentiel réel en routine.

Les gains de temps lors des identifications sont importants comme en attestent les exemples présentés en annexe 6. Le bénéfice temporel peut d'ailleurs être encore plus conséquent en cas de couplage avec une sonde à fibre optique, surtout pour les liquides, pour lesquels l'analyse en transflexion est obligatoire (exemple : la siméticone).

Le protocole d'utilisation en analyse de routine est simplifié à l'extrême et ne nécessite pas les compétences humaines requises par les méthodes d'identifications usuelles, d'où le transfert des identifications au contenant des techniciens de laboratoire aux préleveurs. Les préleveurs nécessitent tout de même une formation à son utilisation, aussi basique soit elle.

Enfin argument plus écologique, la méthode ne nécessite pas l'emploi de solvant, ni réactif pour sa réalisation et les échantillons identifiés peuvent être réutilisés afin de constituer l'échantillon moyen, la technique ne génère donc pas de déchet.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps), Bonnes Pratiques de Fabrication Bulletin officiel n°2007/1 bis fascicule spécial. Paris : Direction des Journaux Officiels, 2007, 112 p.
2. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps), Fiche pratique : Identification des matières premières à réception par proche infrarouge, juillet 2007
3. BARTON F.E., Theory and principles of near infrared spectroscopy, Spectroscopy Europe, 2002, 14, 1, p. 12-18
4. BENALI S., LACHENAL G., TRE LI, Les fibres optiques et l'analyse PIR, [en ligne], disponible sur <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/spectroscopie/fibres/fibre.html>, document consulté le 26 décembre 2007
5. BERTRAND D., La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale, INRA Productions Animales, 2002, 15, p. 209-219
6. BODSON C., Application de la technologie analytique des procédés dans l'étude de l'homogénéité de mélanges de poudres pour compression directe, Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Liège : Université de Liège, 2007, 295 p.
7. CHAMINADE P., BAILLET A., FERRIER D., Data treatment in near infrared spectroscopy, Analisis magazine, 1998, 26, 4, p. 33-37
8. CANDOLFI A., DE MAESSCHALCK R., JOUAN-RIMBAUD D., The influence of data pre-processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 21, p. 115-132
9. CANDOLFI A., DE MAESSCHALCK R., MASSART D.L., Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 19, p. 923-935
10. COURBOULAY C., Analyse par spectroscopie dans le proche infrarouge : qualification de l'appareillage – Application à l'identification de matières premières et validation de la méthode, Thèse de doctorat en pharmacie, Chatenay-malabry : Université de Paris XI, 1997, 93 p.
11. DEFFRENNE M., Analyse des matières premières par spectrophotométrie proche infrarouge ; validation de la méthode, Thèse de doctorat en pharmacie, Chatenay-malabry : Université de Paris XI, 1994, 80 p.
12. ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE RENNES, Spectroscopie proche infrarouge, [en ligne], disponible sur <http://membres.lycos.fr/nirspectroscopy/>, document consulté le : 26 décembre 2007

13. EMEA, Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, CPMP/QWP/3309/01, février 2003, 15 p.
14. KRAMER K., EBEL S., Application of NIR reflectance spectroscopy for the identification of pharmaceutical excipients, *Analytical Chimica Acta*, 2000, 420, p. 155-161
15. LACHENAL G., Analyse par spectroscopie proche infrarouge et applications aux polymères, *Analisis Magazine*, 1998, 26, 4, p. 20-23
16. LUYPAERT J., MASSART D.L., VANDER HEYDEN Y., Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 2007, 72, 3, p. 865-883
17. NOEL V-A., Développement et validation d'une méthode d'identification des matières premières par spectrophotométrie proche infrarouge à transformée de Fourier, Thèse de doctorat en pharmacie, Chatenay-malabry : Université de Paris XI, 2001, 142 p.
18. Pharmaceutical Analytical Sciences Group (PASG), Guideline for the development and validation of near infrared (NIR) spectroscopic methods, 2001, 39 p.
19. Pharmacopée Européenne édition 5.8, Strasbourg : EDQM, 2006
20. ROGGO Y., Détermination de la qualité de la betterave sucrière par spectroscopie proche infrarouge et chimiométrie, Thèse de doctorat d'université, Lille : Université de Lille I, 2003, 189 p.
21. UNIVERSITE DE LYON I, ressources documentaires sur la spectroscopie dans le proche infrarouge, [en ligne], disponible sur <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/spectroscopie/>, document consulté le: 26 décembre 2007
22. VREDENBREGT M.J., CASPERS P.W.J., HOOPERBRUGGE R., Choice and validation of near infrared spectroscopic application for identity control of starting materials. Practical experience with the EU draft Note For Guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data to be forwarded in part II of the dossier for a marketing authorization, *European Journal of Pharmaceutics an Biopharmaceutics*, 2003, 56, p. 789-499

## ANNEXES

### 1. Fiche pratique de l'Afssaps : *Identification des matières premières à réception par proche infrarouge (juillet 2007)*



#### IDENTIFICATION DES MATIERES PREMIERES A RECEPTION PAR PROCHE INFRA-ROUGE

##### 1. Définition :

- 1.1. Dans le cadre de l'identification de matières premières à réception, le Proche Infra Rouge (PIR) est une méthode qualitative permettant de démontrer **que les produits issus de chaque contenant d'une même réception sont identiques entre eux** et correspondent au spectre moyen du produit servant de référence.
- 1.2. L'identification de la matière première reçue à l'aide des techniques décrites dans la monographie d'une Pharmacopée ou d'un dossier d'AMM doit être maintenue sur un échantillon moyen après vérification de l'identité de chaque contenant par PIR.

##### 2. Règles nécessaires pour l'utilisation du PIR :

- 2.1. L'utilisation du PIR ne dispense pas des pré-requis relatifs au respect des BPF tels que :
  - o Maîtrise des fournisseurs (fabricants de matières premières).
  - o Validation de la méthode de prélèvement, notamment pour les contenants de grande capacité.
- 2.2. Élaboration de la base de spectres de référence :
  - o Organisation de la bibliothèque de référence, prenant en compte d'éventuelles similarités de produits chez le fabricant de matières premières et sur le site. Chaque spectre constituant la bibliothèque spectrale doit correspondre à un lot préalablement reconnu conforme par la technique d'analyse officielle (Pharmacopée ou AMM) ;
  - o Validation de la technique selon les critères d'acquisition et de calcul définis : spécificité et robustesse (cf. PE 2.2.40) ;
  - o Revalidation de la bibliothèque spectrale dès l'introduction d'un nouveau produit.

##### 3. Méthodologie d'identification à réception par PIR :

- 3.1. Acquisition d'un spectre PIR de chaque échantillon individuel.
- 3.2. Comparaison du spectre PIR de chaque échantillon individuel au spectre moyen du produit contenu dans la bibliothèque spectrale de référence qui apporte la preuve de l'homogénéité du lot lorsqu'il y a exacte similitude des spectres.

##### 4. Conclusion :

- 4.1. Dans la mesure où l'ensemble des règles précitées est respecté, il est possible de mettre en œuvre la méthode d'identification à réception des contenants d'une matière première par la technique du PIR sans déposer cette méthode dans le dossier d'AMM.
- 4.2. Cependant, la technique d'identification décrite dans l'AMM ou une Pharmacopée devra être effectuée sur le ou les échantillons moyens. Tous les contenants doivent être prélevés afin d'obtenir un ou plusieurs échantillons moyens.
- 4.3. La méthode d'identification par PIR, si elle est utilisée seule, devient une méthode alternative qui devra être décrite et approuvée dans le dossier d'AMM.

## 2. Table de localisation des bandes en proche infrarouge

(source Bruker\*)

Overtones combination	Wavelength/nm		Wavenumber/cm <sup>-1</sup>		Remarks
<b>(1) Groups containing only C and H atoms</b>					
<b>(1) C-H (methyl)</b>					
combination	2275	2285	4400	4380	C-H stret.+CH bend
	1388	1365	7380	7330	2xCH stret.+CH bend
	1040	1020	9900	9800	2xCH stret.+3xCH bend
first overtone	1710	1730	5850	5720	first overtone of asym.stret.
	1770	1785	5650	5600	first overtone of sym.stret.
second overtone	1160	1165	8700	8580	second overtone of asym.stret.
	1190	1200	8400	8330	second overtone of sym.stret.
third overtone	870	885	11490	11300	third overtone of asym.stret.
	900	915	11100	10990	third overtone of sym.stret.
<b>(2) C-H (methylene)</b>					
combination	2320	2330	4310	4290	C-H stret.+CH bend
	2305	2315	4340	4320	
	1430	1420	7000	7040	2xCH stret.+CH bend
	1390	1400	7190	7140	
	1050	1060	9520	9430	
first overtone	1735	1760	5760	5710	first overtone of anti-sym.stret.
	1700	1730	5820	5570	first overtone of sym.stret.
second overtone	1170	1180	8550	8470	second overtone of anti-sym.stret.
	1200	1210	8330	8260	second overtone of sym.stret.
third overtone	885	895	11300	11170	third overtone of anti-sym.stret.
	910	920	10990	10870	third overtone of sym.stret.
<b>(3) C=C</b>					
first overtone	1750	1775	5710	5630	
second overtone	1185	1195	8440	8370	
third overtone	900	910	11100	10990	
<b>(4) C=C with C-H and/or C=C asymmetric</b>					
combination	2340	2350	4270	4260	C-H stret.+C=C bend
	2185	2195	4580	4560	C-H stret.+C=C stret.
	2135	2145	4680	4660	=C-H stret.+C=C stret.
first overtone	1675	1695	5970	5900	
	1645	1660	6080	6020	vinyl group
second overtone	1130	1145	8850	8730	
	1140	1120	8690	8630	vinyl group
third overtone	860	870	11630	11490	
	840	850	11800	11760	vinyl group
<b>(5) C=C-H (alkyne) (C≡C-H)</b>					
first overtone	1535	1545	6510	6470	
second overtone	1035	1045	9660	9570	
third overtone	780	790	12820	12660	
<b>(6) C=C (aromatic)</b>					
combination	1440	1450	6940	6900	2xCH stret.+CH bend
	1410	1420	7090	7040	2xCH stret.+CH bend
	1070	1085	9390	9270	2xCH stret.+2xC-C stret.
first overtone	1620	1690	5990	5920	
second overtone	1130	1140	8650	8720	
third overtone	850	860	11760	11630	
<b>(7) O-H (alcohol + acids)</b>					
combination	1930	1940	5180	5150	O-H stret.+OH bend
	1375	1385	7270	7250	O-H anti-sym. stret.+OH sym. stret.
first overtone	1460	1480	6850	6850	
second overtone	975	985	10260	10150	
third overtone	740	750	13510	13330	
<b>(8) O-H (phenols)</b>					
combination	2060	2090	4850	4780	O-H stret.+OH bend
first overtone	1395	1425	7170	7020	
second overtone	2370	2380	4220	4180	second overtones of OH bend
	940	950	10640	10470	second overtones of OH stret.
third overtone	730	745	13700	13420	



Overtones combination	Wavelength (nm)		Wave number (cm <sup>-1</sup> )		Remarks
<b>9) bound - OH alcohols</b>					
first overtone	1435	1480	6970	6760	intermolecular hydrogen bond
	1500	1595	6670	6270	intramolecular hydrogen bond
second overtone	990	990	10200	10100	intermolecular hydrogen bond
	1035	1045	9660	9570	intramolecular hydrogen bond
<b>10) COOH carboxylic acids, COOR esters</b>					
second overtone	1830	1920	5290	5210	2x C=O stret. (carboxylic acids)
	1930	1950	5180	5130	2x C=O stret. (esters)
<b>11) C=O ketones</b>					
second overtone		1950		5130	
<b>12) C=C alkenes</b>					
combination	2100	2210	4570	4520	CH stret.+C=C stret.
<b>13) C≡C alkynes</b>					
first overtone	1640	1650	6100	6060	first overtone of CH stret.

<b>14) N-H amide and imine groups</b>					
<b>14) -NH- primary amines</b>					
combination	1970	2010	5080	4980	NH stret.+NH bend.
first overtone	1520	1540	6580	6480	first overtone of NH, sym.stret.
	1500	1520	6670	6580	first overtone of NH, anti-sym.stret.
	1450	1480	6900	6780	AsNH.
second overtone	1020	1040	9800	9620	second overtone of NH, sym.stret.
	1000	1020	10000	9800	second overtone of NH, anti-sym.stret.
	990	1020	10200	9800	AsNH.
third overtone	800	820	12500	12200	third overtone of NH, sym.stret.
	790	810	12630	12500	AsNH.
	770	790	12990	12660	third overtone of NH, anti-sym.stret.
<b>15) -NH- secondary amines</b>					
first overtone	1490	1545	6710	6470	
second overtone	1010	1040	9900	9820	
<b>16) -CONH- primary amides</b>					
combination	2140	2170	4670	4610	2x amide+amide
	2100	2130	4760	4690	NH stret.+amide
	2040	2080	4900	4850	NH stret.+amide
	1950	1970	5130	5080	NH stret.+amide
first overtone	1680	1620	6020	6170	intermolecular hydrogen bond
	1510	1530	6620	6540	intermolecular hydrogen bond
	1490	1510	6710	6620	first overtone of NH, sym.stret.
	1440	1480	6940	6850	first overtone of NH, anti-sym.stret.
second overtone	2020	2040	4950	4900	second overtone of amide
	1070	1090	9350	9170	intramolecular hydrogen bond
	1015	1035	9850	9680	intramolecular hydrogen bond
	1000	1020	10000	9800	second overtone of NH, sym.stret.
	970	990	10310	10100	second overtone of NH, anti-sym.stret.
<b>17) -CONH- secondary amides</b>					
combination	2140	2170	4650	4610	2 x amide+amide
	2100	2120	4760	4720	NH stret.+amide
	1930	2010	5530	4980	NH stret.+amide
first overtone	1530	1670	6540	5900	hydrogen bond
	1480	1510	6850	6620	free
second overtone	1910	1930	5240	5180	second overtone of amide
	1035	1120	9660	8930	hydrogen bond
	1000	1050	10000	9520	free

<b>18) S or P atom containing group</b>					
<b>18) -SH (thiols)</b>					
first overtone	1735	1745	5750	5730	
<b>19) P-OH (phosphonic acids, phosphonic acids, phosphinic acids)</b>					
first overtone	1900	1910	5260	5240	first overtone of OH stret.
<b>20) P-H (phosphines, phosphonic acid esters)</b>					
first overtone	1890	1900	5290	5280	



**3. Liste des matières premières et de leurs substances challengeuses retenues pour le développement de la méthode d'identification par SPIR.**

Matière Première	Substances Challengeuses (SC)	Provenance des SC
acide borique	acide métaborique tétraborate de potassium tétrahydraté tétraborate de sodium décahydraté pentaborate d'ammonium octahydraté hexaborate de zinc 3,5 hydraté octaborate de sodium tetrahydraté	ALDRICH Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
acide citrique monohydraté	acide citrique anhydre citrate monosodique citrate trisodique acide isocitrique acide homocitrique acide malique acide adipique acide tartrique	Fabricant Fabricant Fabricant <i>pas de source</i> <i>pas de source</i> Fabricant RIEDEL-DE-HAEN ALDRICH
acide salicylique	acide 5-chlorosalicylique acide métahydroxybenzoïque acide parahydroxybenzoïque salicylate de sodium	FLUKA FLUKA FLUKA FLUKA
alvérine citrate	alvérine base	Fabricant
amidon de blé	amidon de pomme de terre amidon de riz amidon de maïs amidon de blé prégélatinisé amidon de blé estérifié maltodextrine	FLUKA SIGMA Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
Apifil (=cire d'abeille blanche modifiée)	cire d'abeille blanche	Autre fabricant
arôme framboise naturel	aucune	<i>non applicable</i>
L-aspartate de magnésium dihydraté	acide L-aspartique DL-aspartate de Mg tétrahydraté L-aspartate de potassium et magnésium (10.5-13% K; 5-6% Mg) L-aspartate de potassium et magnésium (12-14% K; 3.5-4 % Mg) L-aspartate de zinc DL-aspartate de potassium hémihydraté L-glutamate de Mg tétrahydraté	FLUKA FLUKA Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
ATP disodique	adénosine-5'-diphosphate disodique 2'-désoxyadénosine-5'-triphosphate disodique adénine-β-D-arabinofuranoside-5'-phosphate guanosine-5'-triphosphate disodique	Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
baume du Pérou	baume de Tolu baume de Copahu baume gurjum	SAFC Fabricant Fabricant

Matière Première	Substances Challengeuses (SC)	Provenance des SC
bicarbonate de sodium	carbonate de sodium anhydre carbonate de sodium monohydraté Bicarbonate de potassium	FLUKA FLUKA Fabricant
cellulose microcristalline PH101	cellulose microcristalline autres grades cellulose microcristalline + gomme guar cellulose microcristalline + Carboxyméthylcellulose poudre de cellulose croscarmellose sodique cellulose microcristalline silifiée	Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
chondroïtine sulfate sodique origine bovine	chondroïtine sulfate sodique origine porcine chondroïtine sulfate sodique origine requin hyaluronate de sodium	Fabricant Fabricant Fabricant
cire d'abeille blanche	cire d'abeille jaune cire de candelilla cire de carnauba cire microcristalline ozokerite ceresine	Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant
extrait mou de Cynara	aucune	<i>non applicable</i>
extrait sec d'Erysimum	aucune	<i>non applicable</i>
glycérine Ph. Eur	glycérine à 88,66% 2-méthyl-1,3-propandiol 1,3-propanediol Propylène glycol	Fabricant ALDRICH FLUKA Autre fabricant
gomme arabique	gomme guar gomme « locust beam » gomme xanthane agar-agar carragène gomme tragacathe gomme karaya	Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant SIGMA FLUKA
Labrafil M 1944	Labrafil M 2125 CS	Fabricant
lévomenthol	DL-menthol D-menthol isomenthol	FLUKA ALDRICH FLUKA
paraffine liquide épaisse	paraffine liquide légère paraffines liquides autres grades	Fabricant Fabricant
paraffine liquide légère	paraffine liquide épaisse paraffines liquides autres grades	Fabricant Fabricant
parahydroxybenzoate de méthyle	parahydroxybenzoate d'éthyle parahydroxybenzoate de propyle parahydroxybenzoate de benzyle parahydroxybenzoate de sodium parahydroxybenzoate de méthyle sodique 3,5-dibromoparahydroxybenzoate de méthyle	Fabricant Fabricant Fabricant SIGMA Fabricant ALDRICH
parahydroxybenzoate de propyle	parahydroxybenzoate de méthyle parahydroxybenzoate d'éthyle parahydroxybenzoate de butyle parahydroxybenzoate de benzyle parahydroxybenzoate de Na parahydroxybenzoate de propyle sodé	Fabricant Fabricant Fabricant Fabricant SIGMA FLUKA

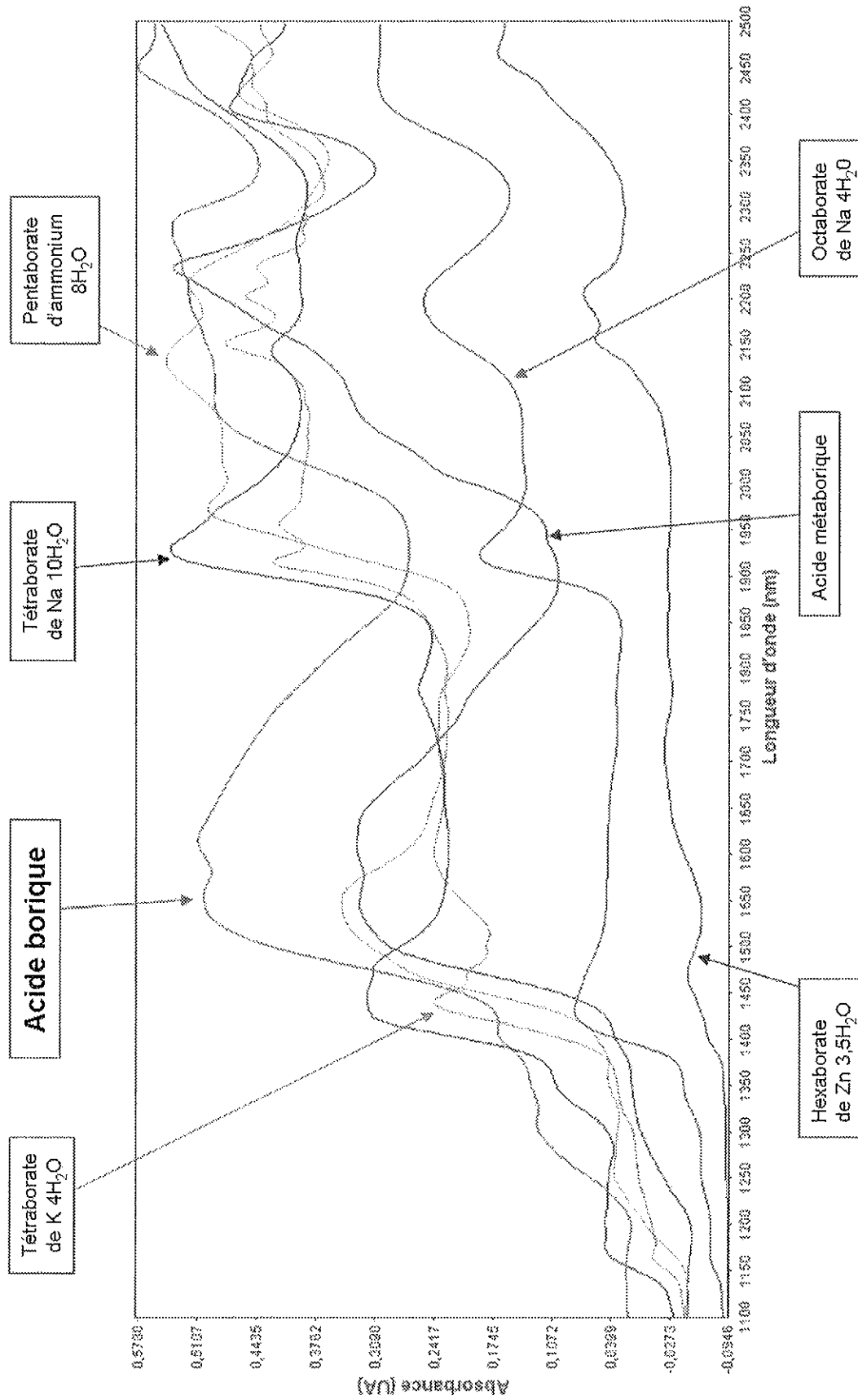
Matière Première	Substances Challengeuses (SC)	Provenance des SC
saccharose	D-fructose D-glucose anhydre D-glucose monohydraté lactose monohydraté	RIEDEL-DE-HAEN FLUKA RIEDEL-DE-HAEN Autre fabricant
salicylate de méthyle	salicylate d'amyle salicylate d'éthyle	Fabricant ALDRICH
siméticone V500	siméticone autres grades émulsion siméticone 35% diméticone V500	Fabricant Fabricant Fabricant
stéarate de magnésium MF-2-V	stéarate de magnésium MF-3-V stéarate de calcium CPR-2-V mélange d'acides stéarique/palmitique palmitate de lithium	Fabricant Fabricant FLUKA FLUKA
talc	oxyde de magnésium oxyde d'aluminium hydroxycarbonate de magnésium hydraté bentonite kaolin trisilicate de magnésium	FLUKA MERCK ALDRICH SIGMA FLUKA FLUKA
Tefose 63	Tefose 1500	Fabricant
thymol	4-isopropyl-3-méthylphénol lévomenthol D-camphre	ALDRICH Autre fabricant ALDRICH

#### **4. Confrontations de spectres de matières premières et de leurs substances challengeuses.**

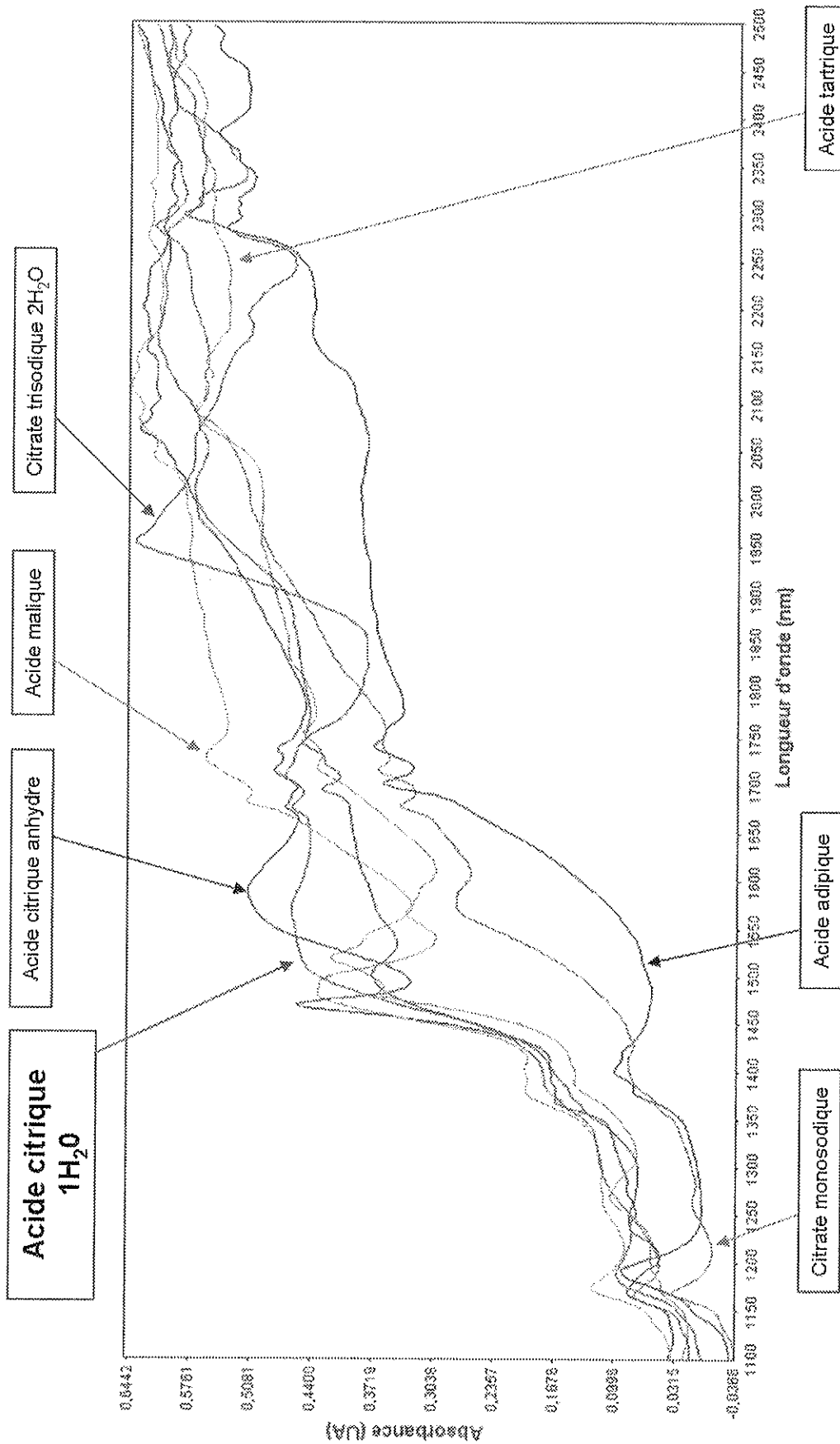
Liste des matières premières concernées :

- acide borique
- acide citrique monohydraté
- acide salicylique
- amidon de blé
- APIFIL
- L-aspartate de magnésium dihydraté
- baume du Pérou
- bicarbonate de sodium
- cellulose microcristalline PH101
- cire d'abeille blanche
- glycérine Ph. Eur.
- gomme arabique
- LABRAFIL M 1944
- lévomenthol
- parahydroxybenzoate de méthyle
- parahydroxybenzoate de propyle
- saccharose
- salicylate de méthyle
- stéarate de magnésium MF-2-V
- talc
- TEFOSE 63
- thymol

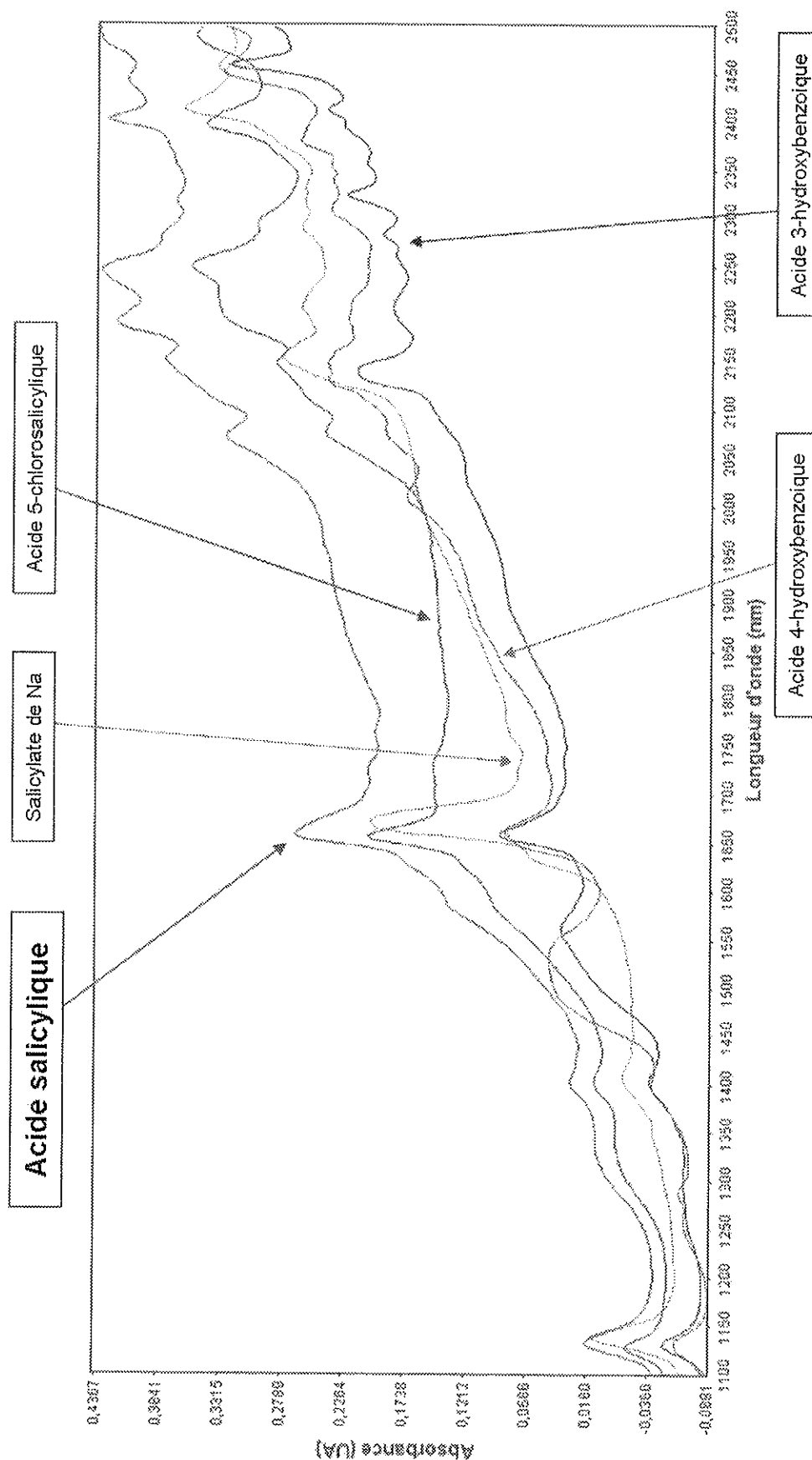
a) Spectres bruts de l'acide borique et de ses substances challengeuses



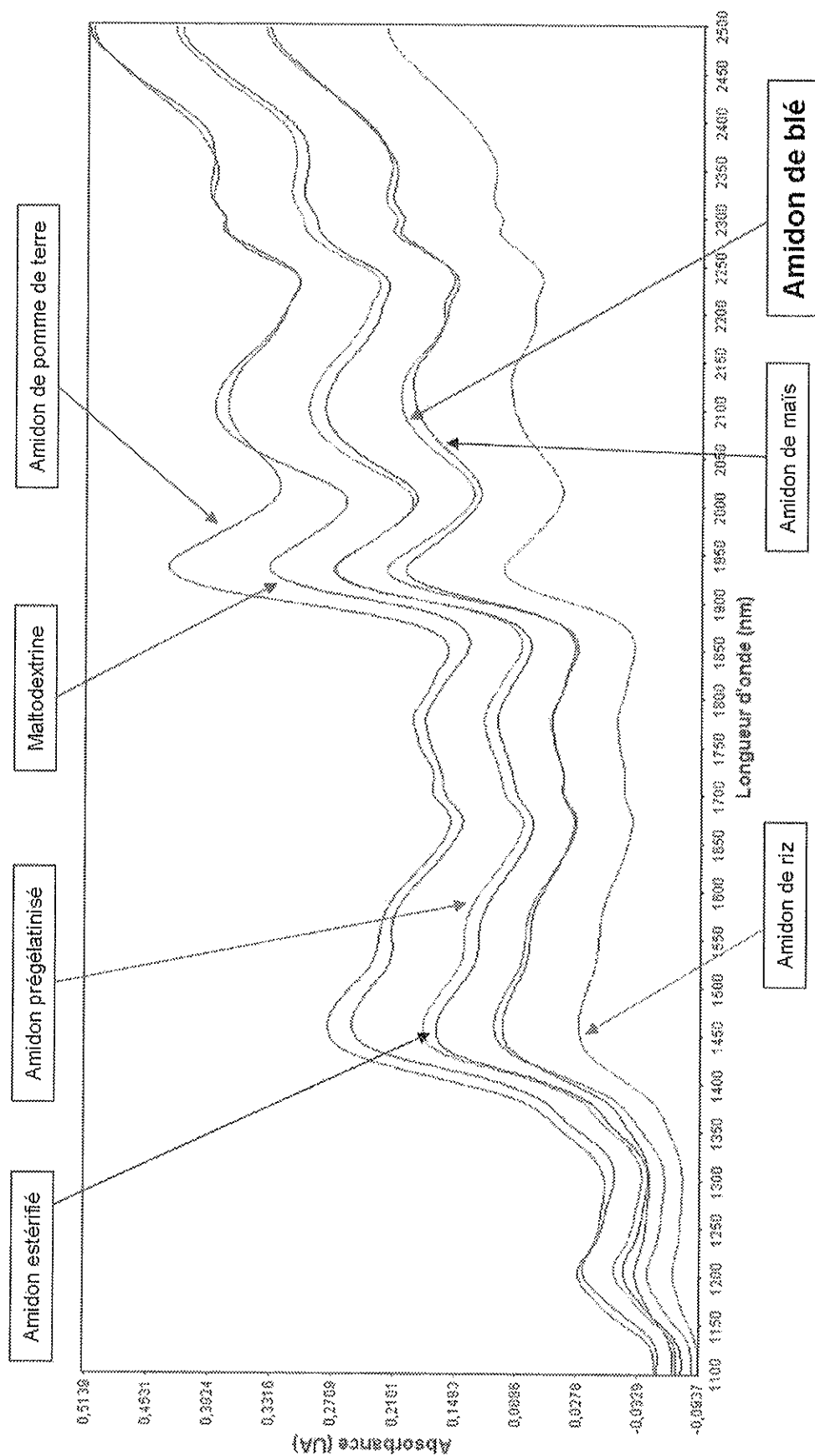
b) Spectres bruts de l'acide citrique monohydraté et de ses substances challengeuses



c) Spectres bruts de l'acide salicylique et de ses substances challengeuses

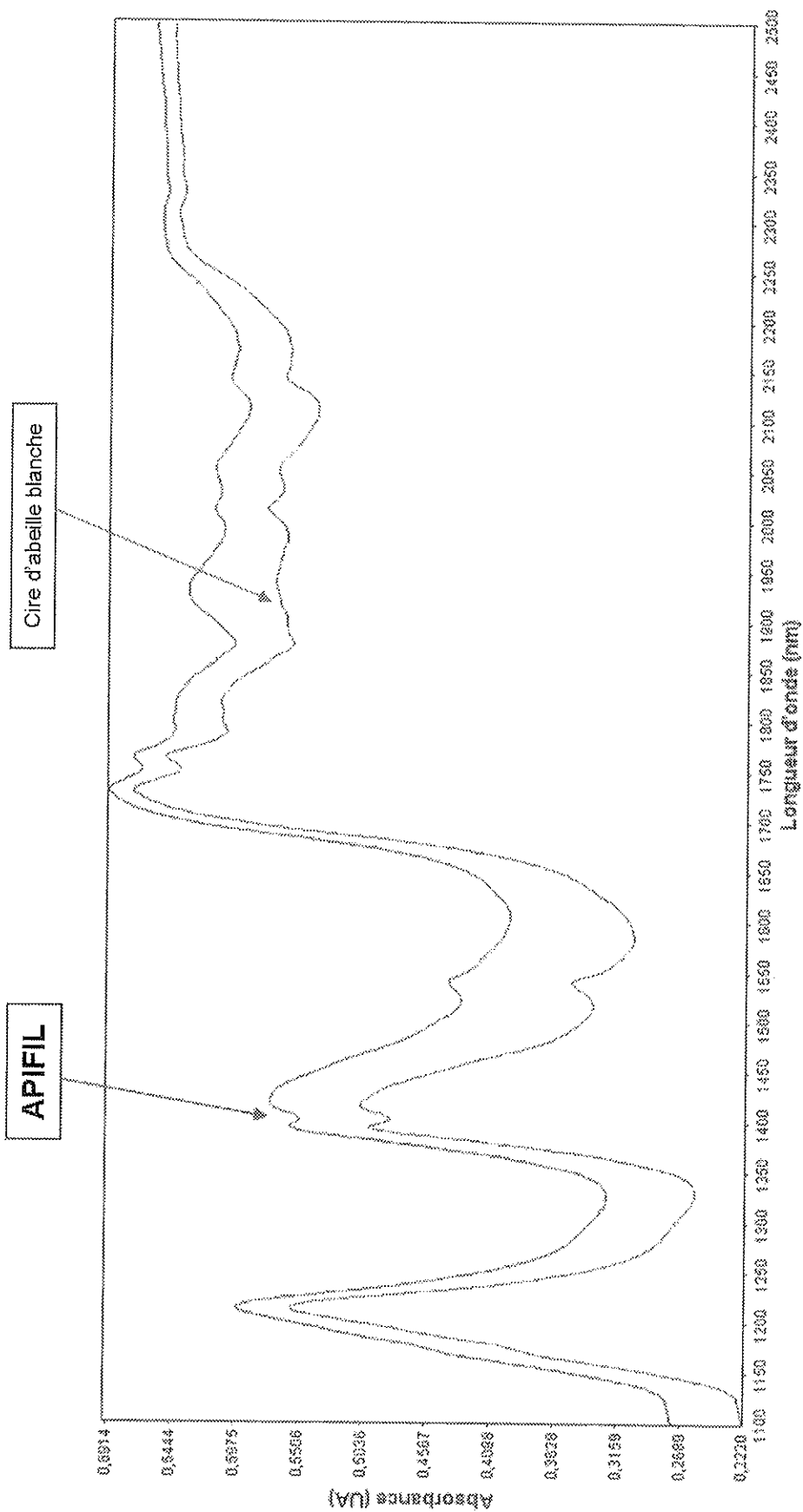


d) Spectres bruts de l'amidon de blé et de ses substances challengeuses

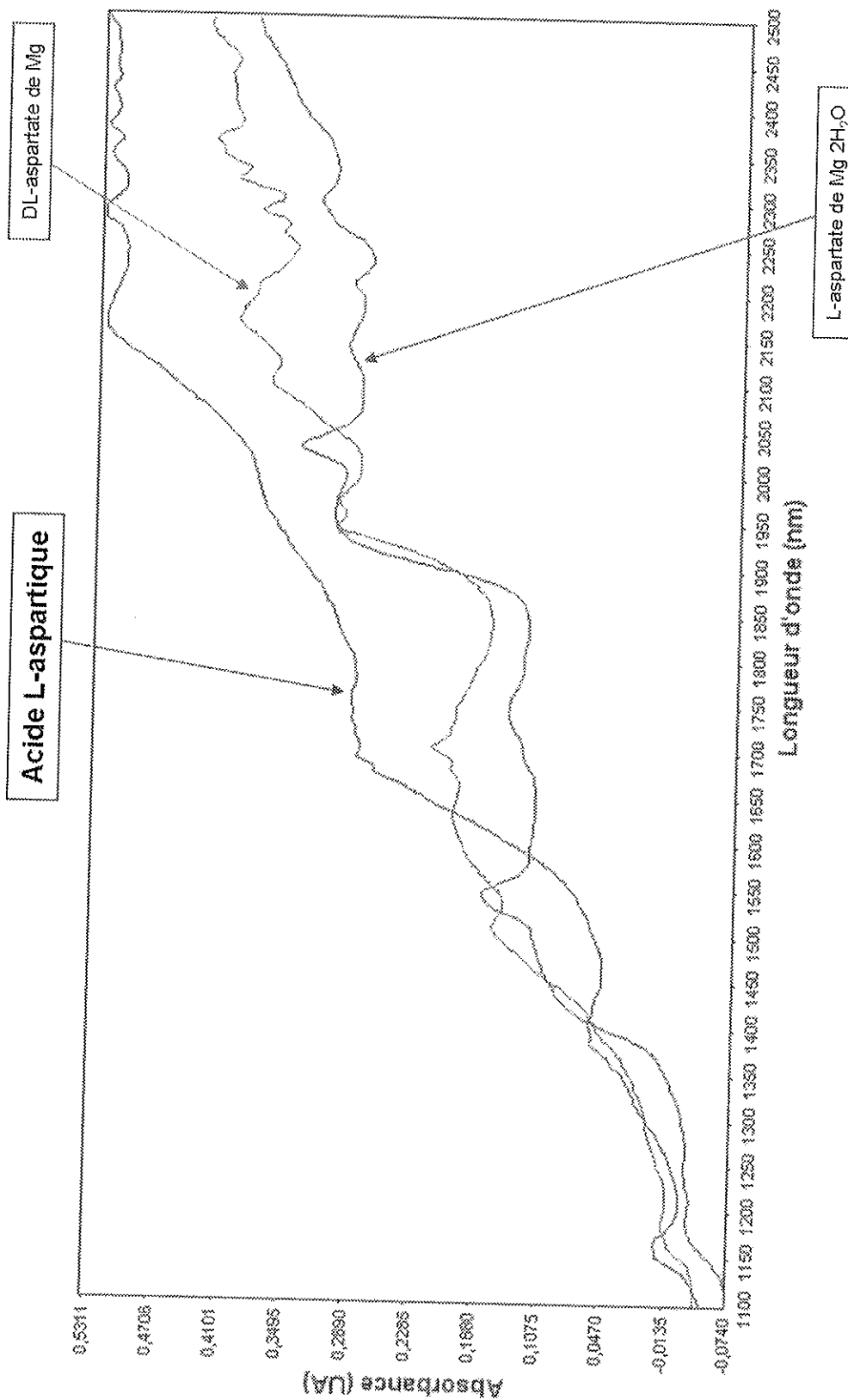




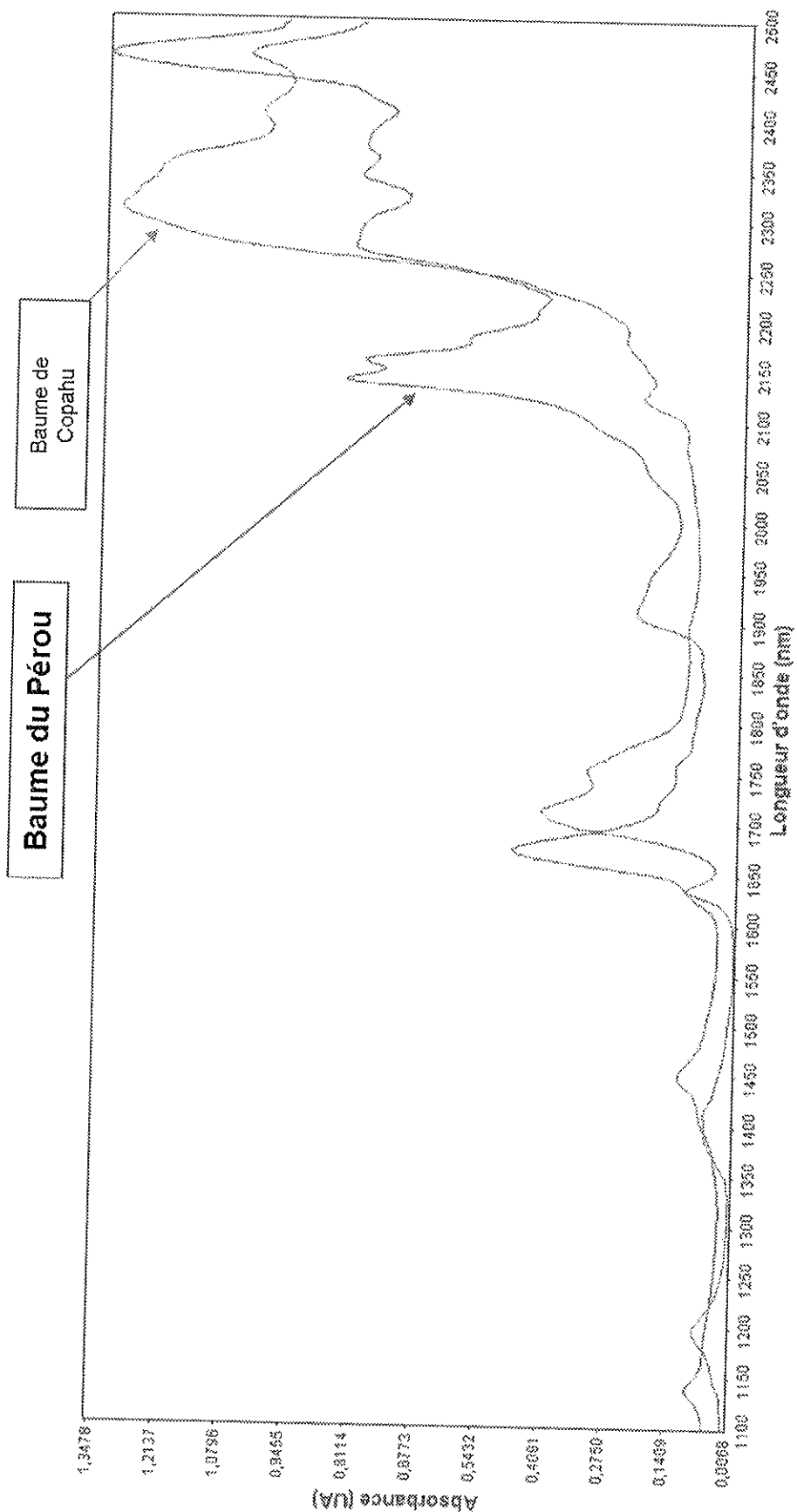
e) Spectres bruts de l'APIFIL et de ses substances challengeuses



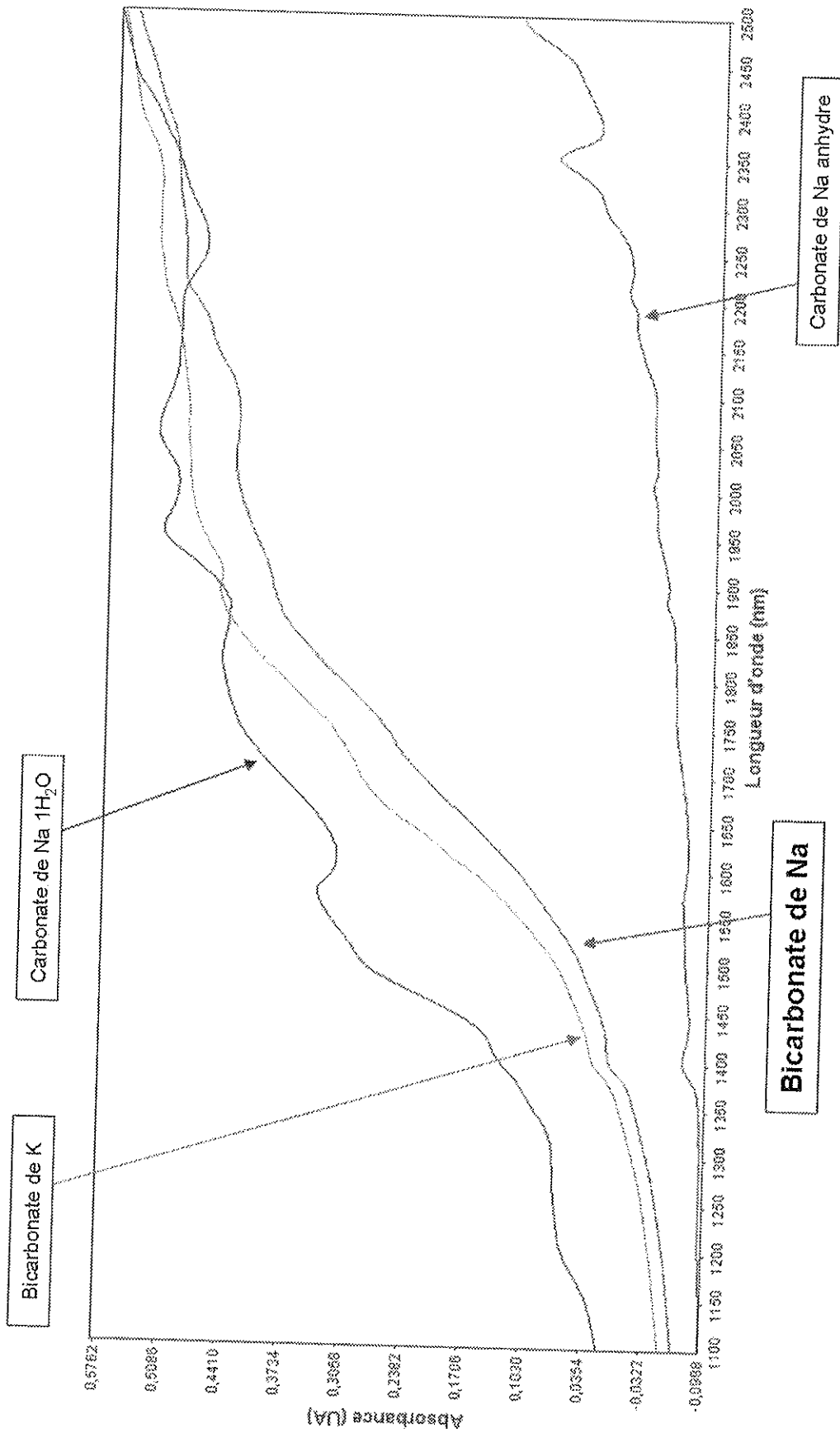
f) Spectres bruts du L-aspartate de magnésium dihydraté et de ses substances challengeuses



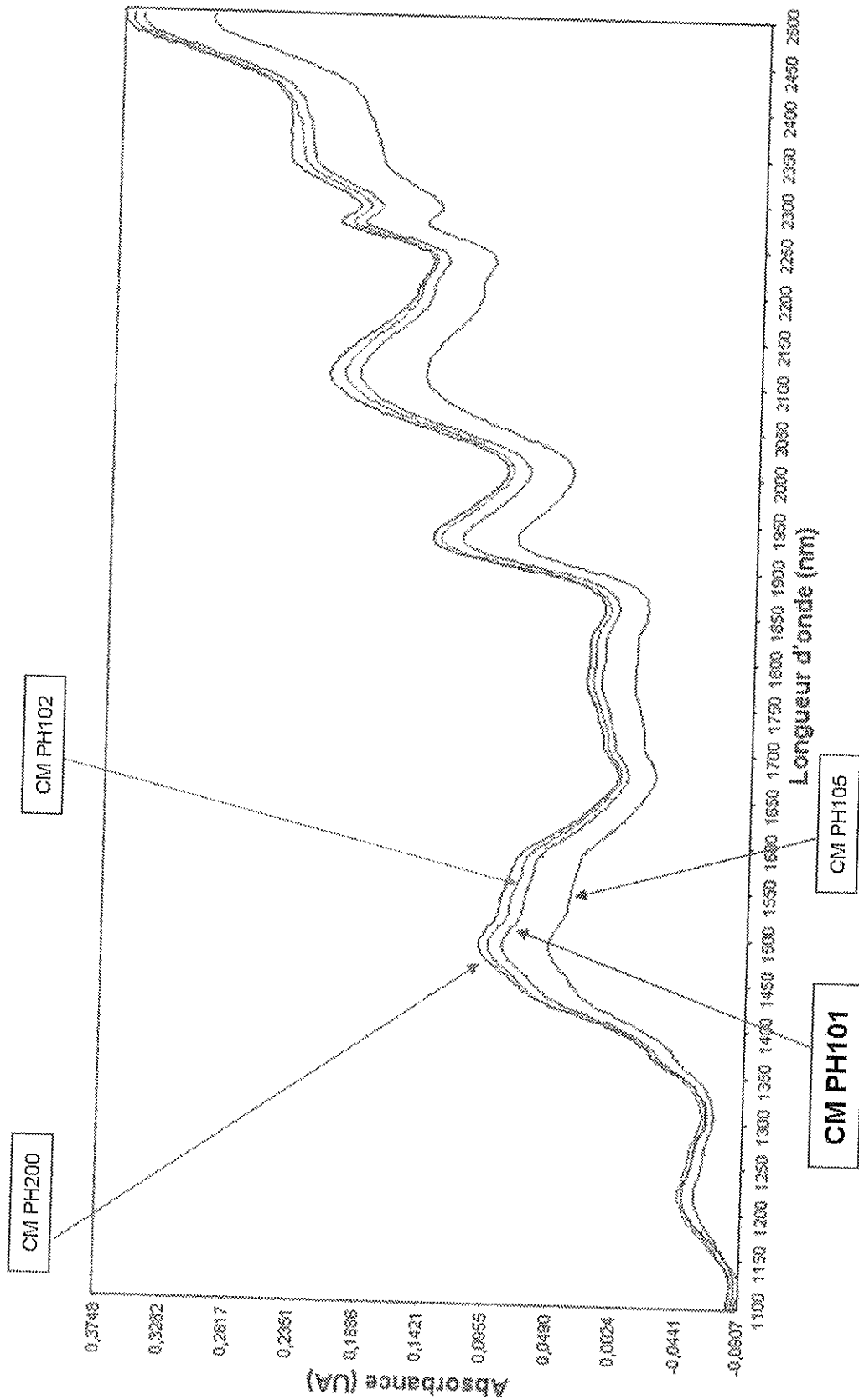
g) Spectres bruts du baume du Pérou et de ses substances challengeuses



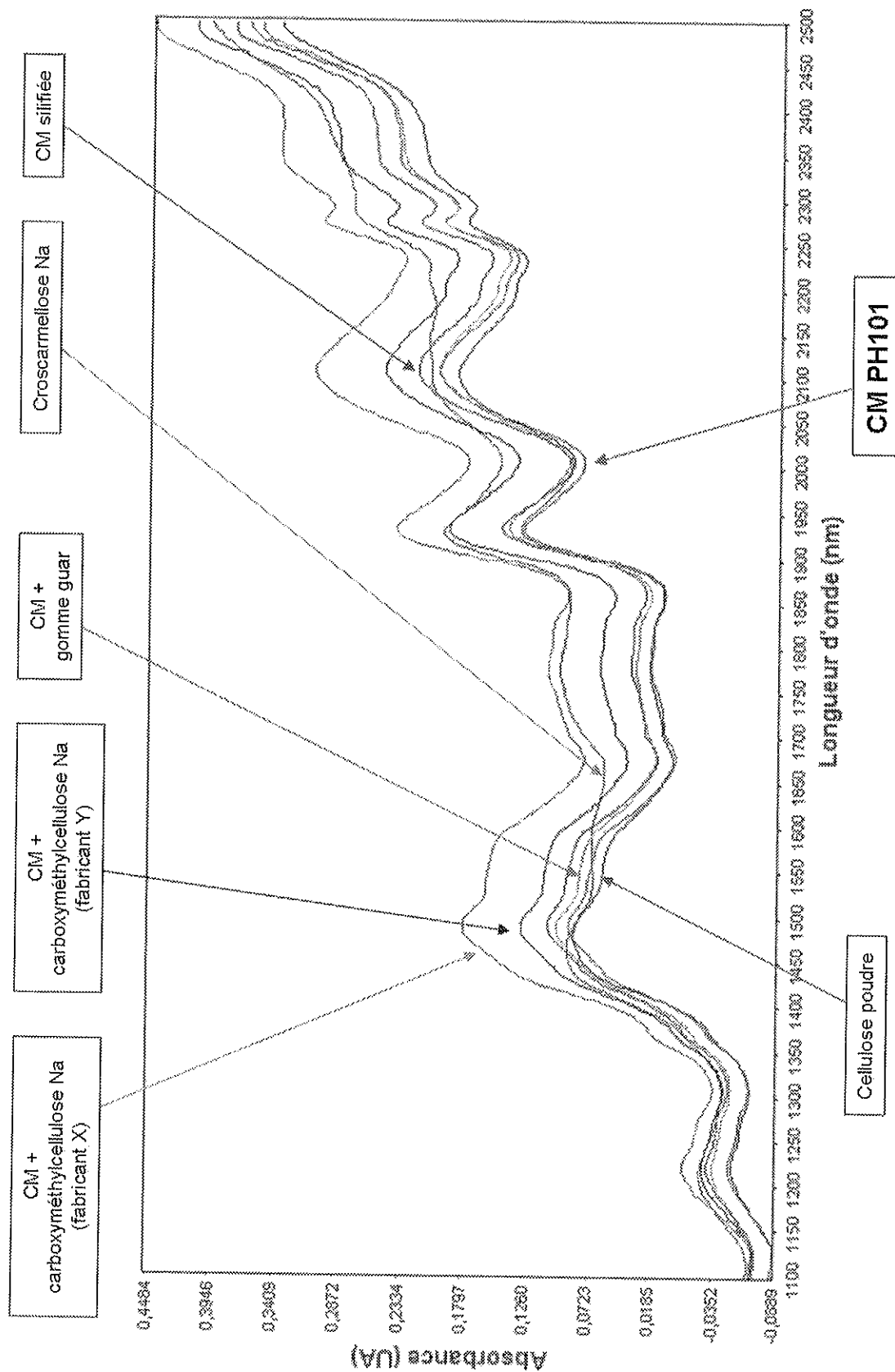
h) Spectres bruts du bicarbonate de sodium et de ses substances challengeuses



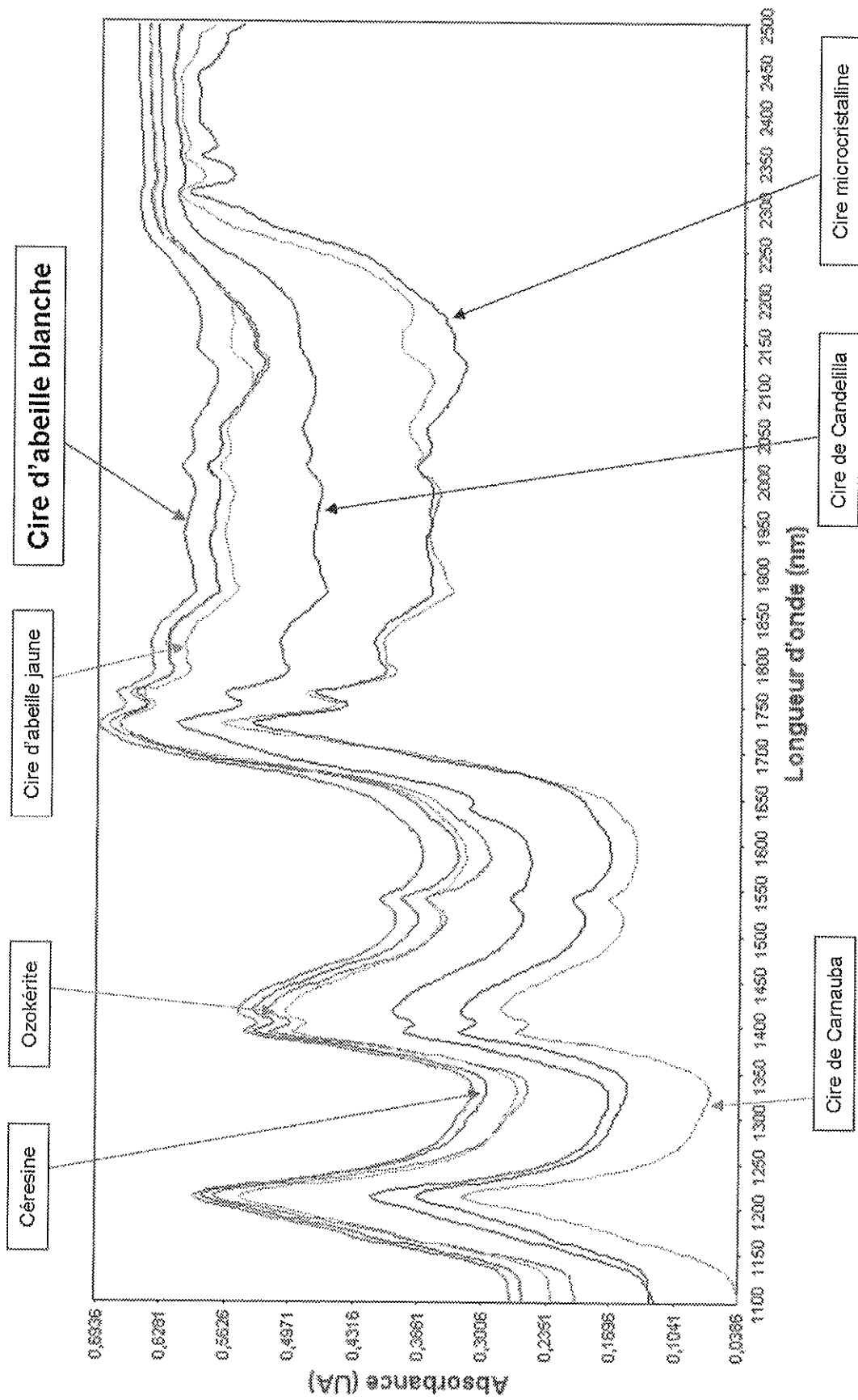
i) Spectres bruts de la cellulose microcristalline (CM) PH101 et de ses substances challengeuses – partie 1



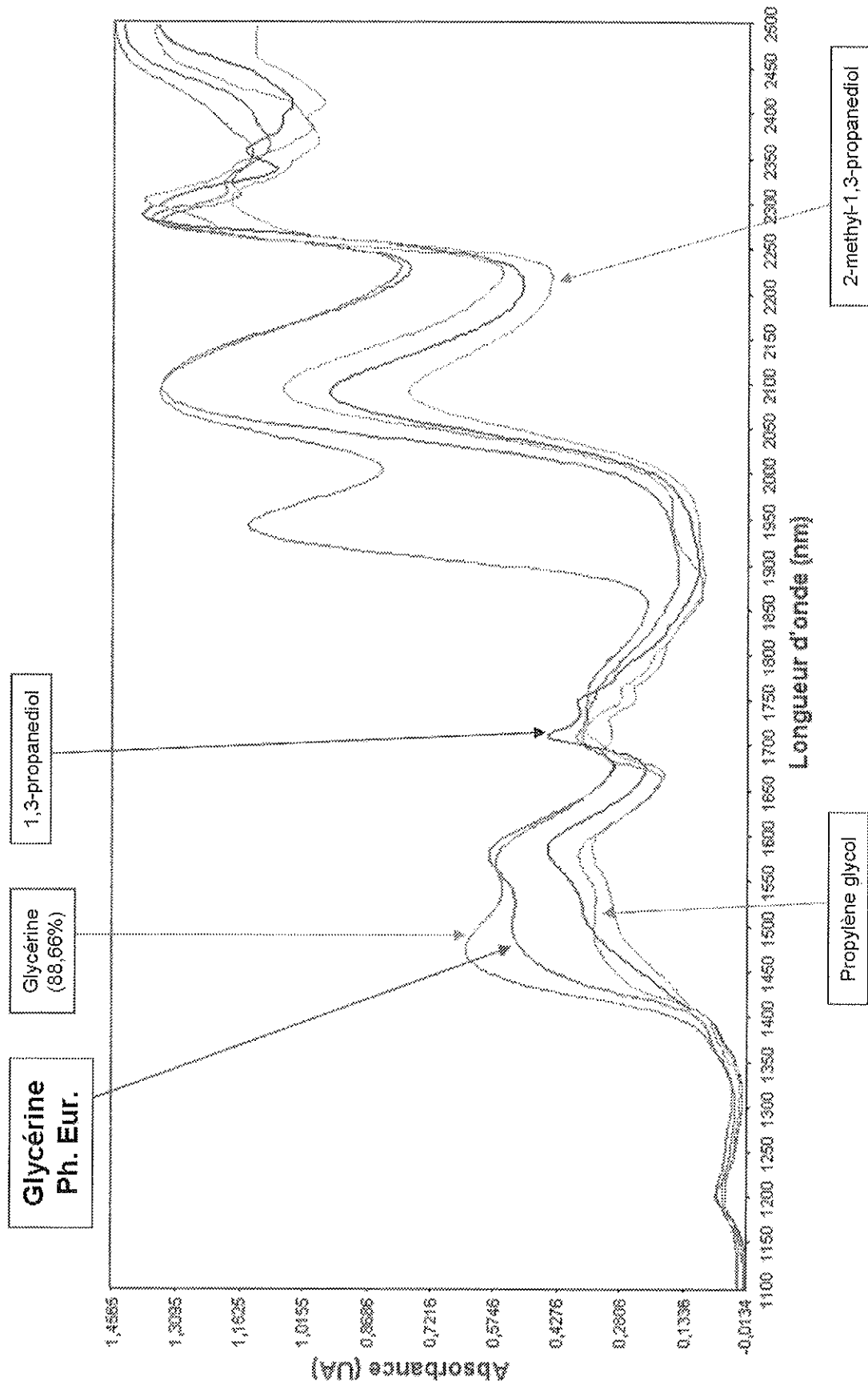
j) Spectres bruts de la cellulose microcristalline (CM) PH101 et de ses substances challengeuses – partie 2



k) Spectres bruts de la cire d'abeille blanche et de ses substances challengeuses

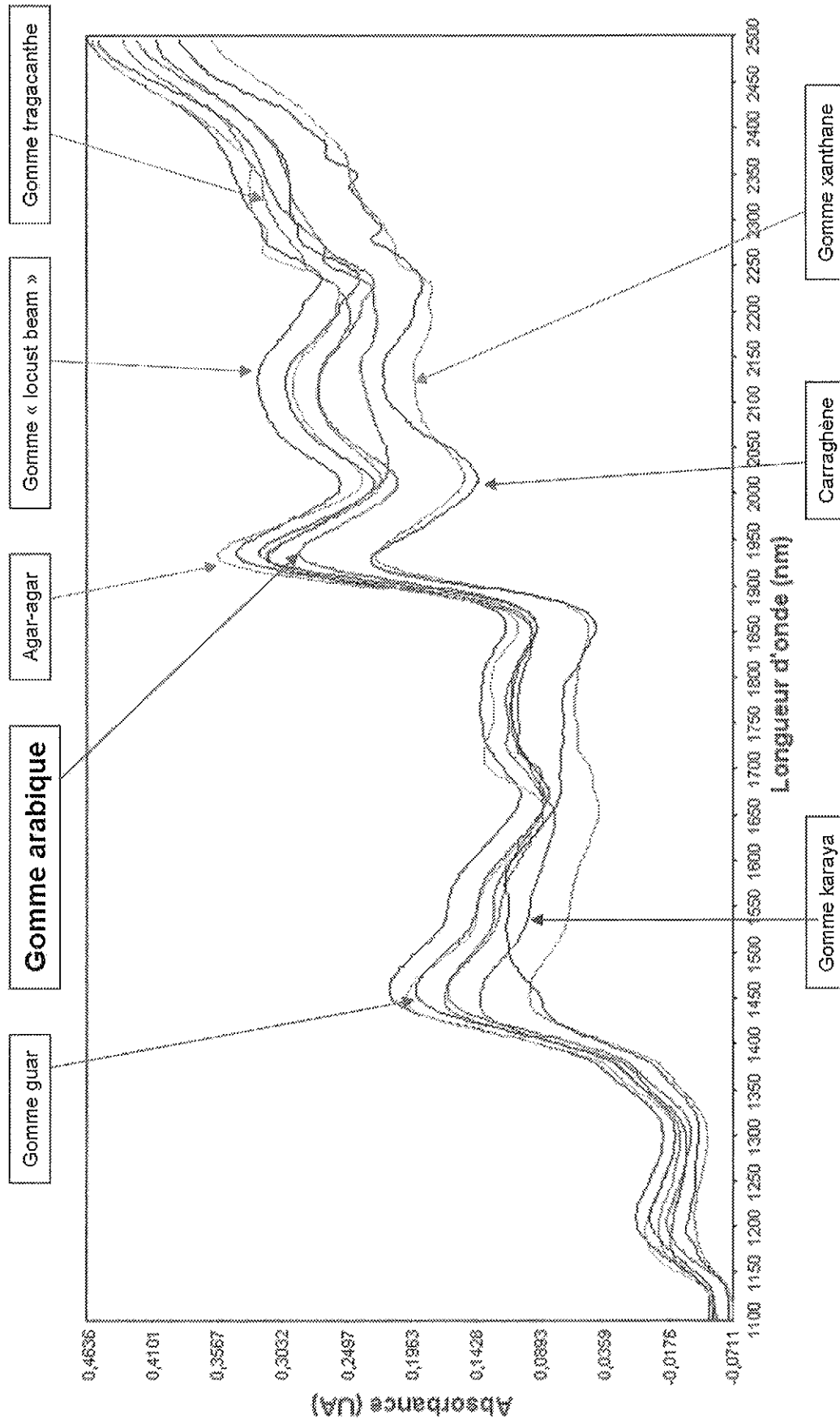


1) Spectres bruts de la glycérine Ph. Eur. et de ses substances challengeuses

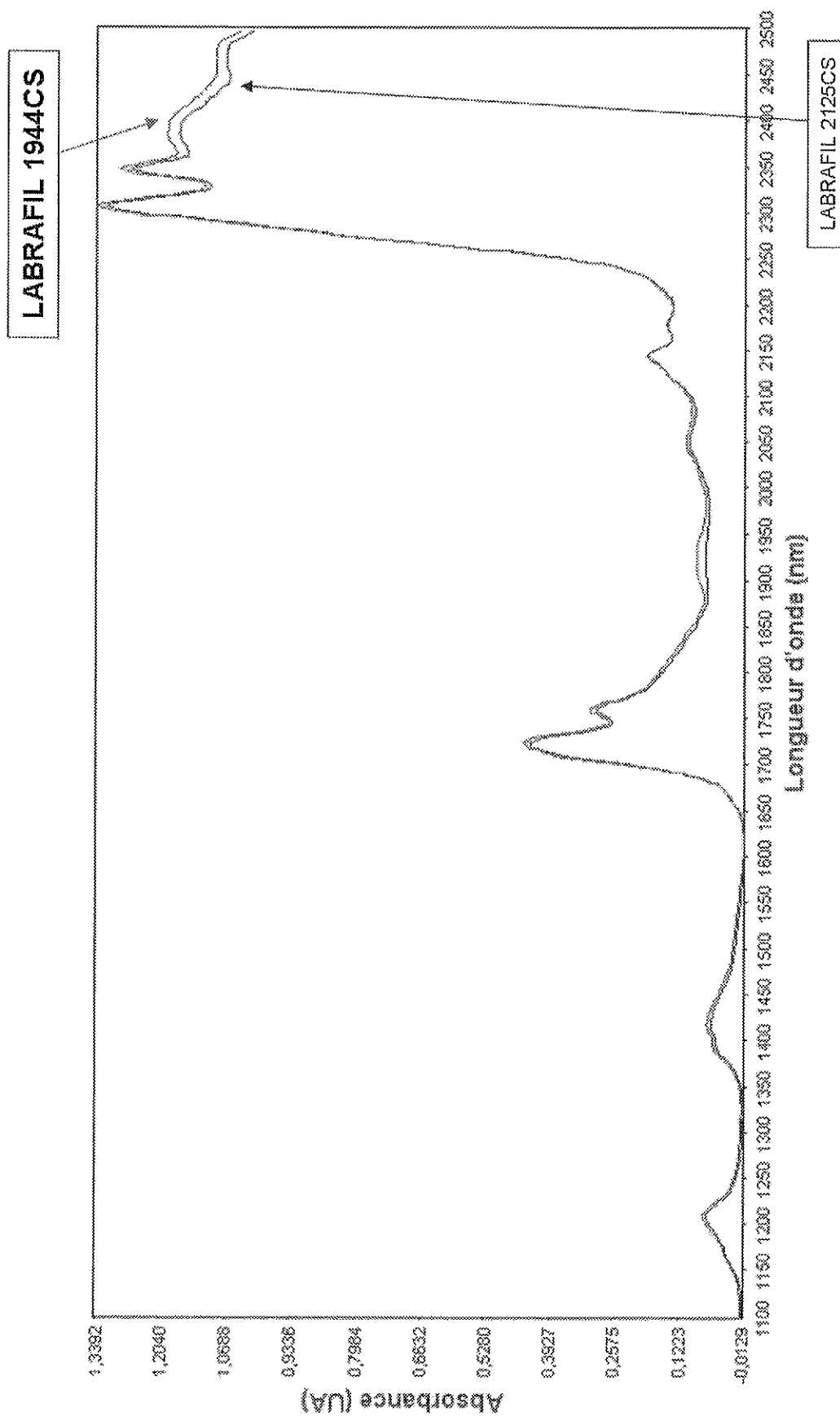




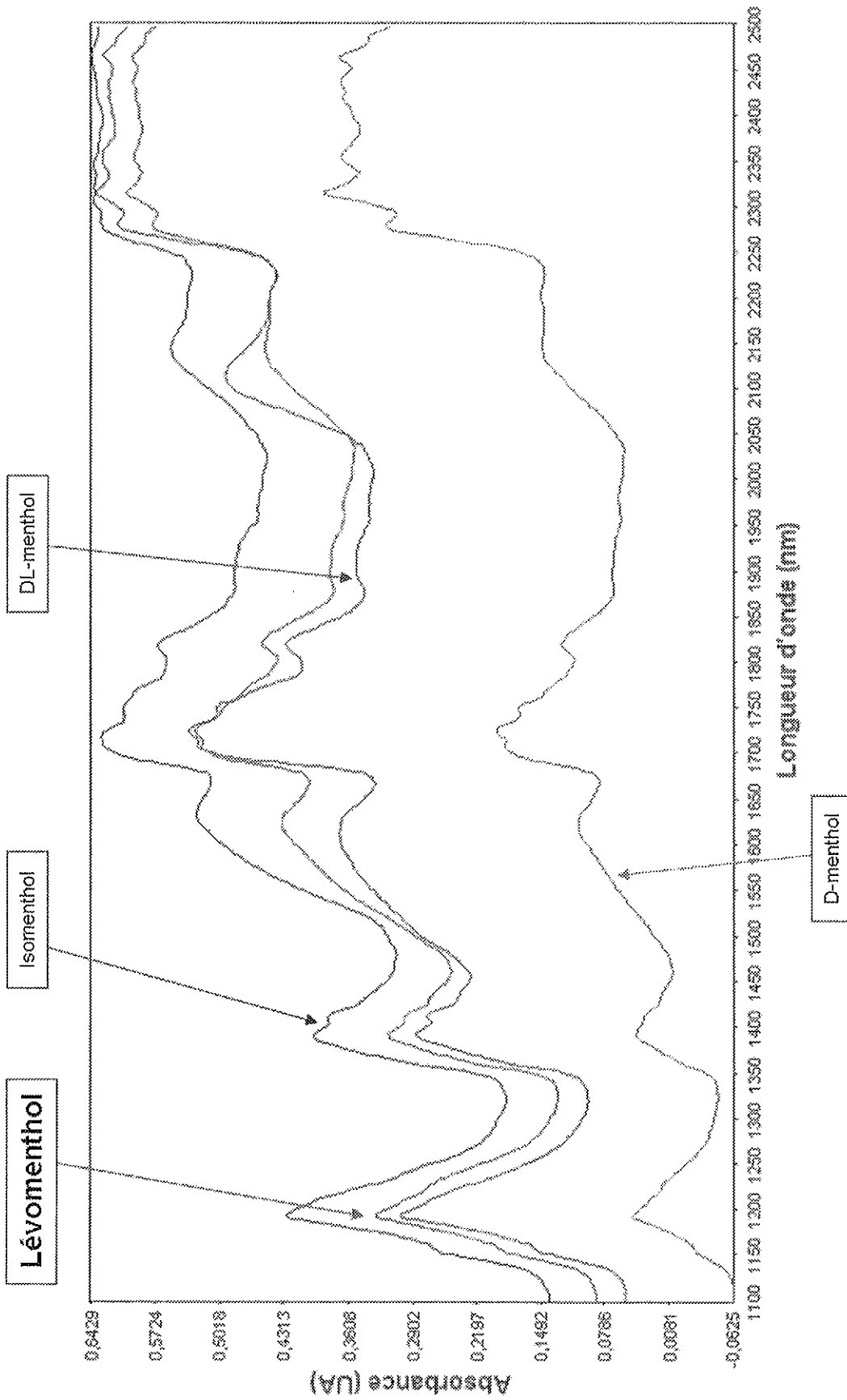
m) Spectres bruts de la gomme arabique et de ses substances challengeuses



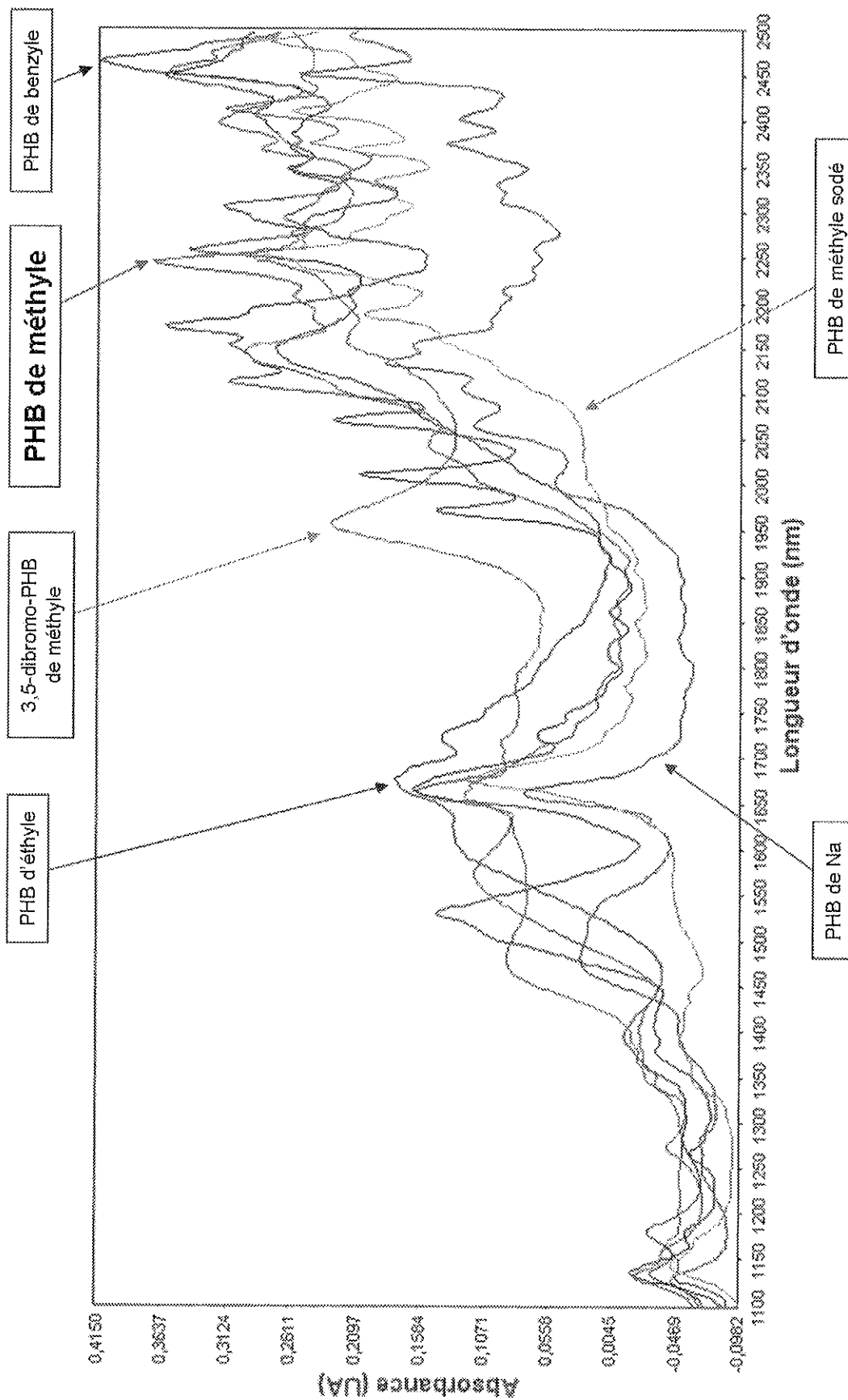
n) Spectres bruts du LABRAFIL M 1944 et de ses substances challengeuses



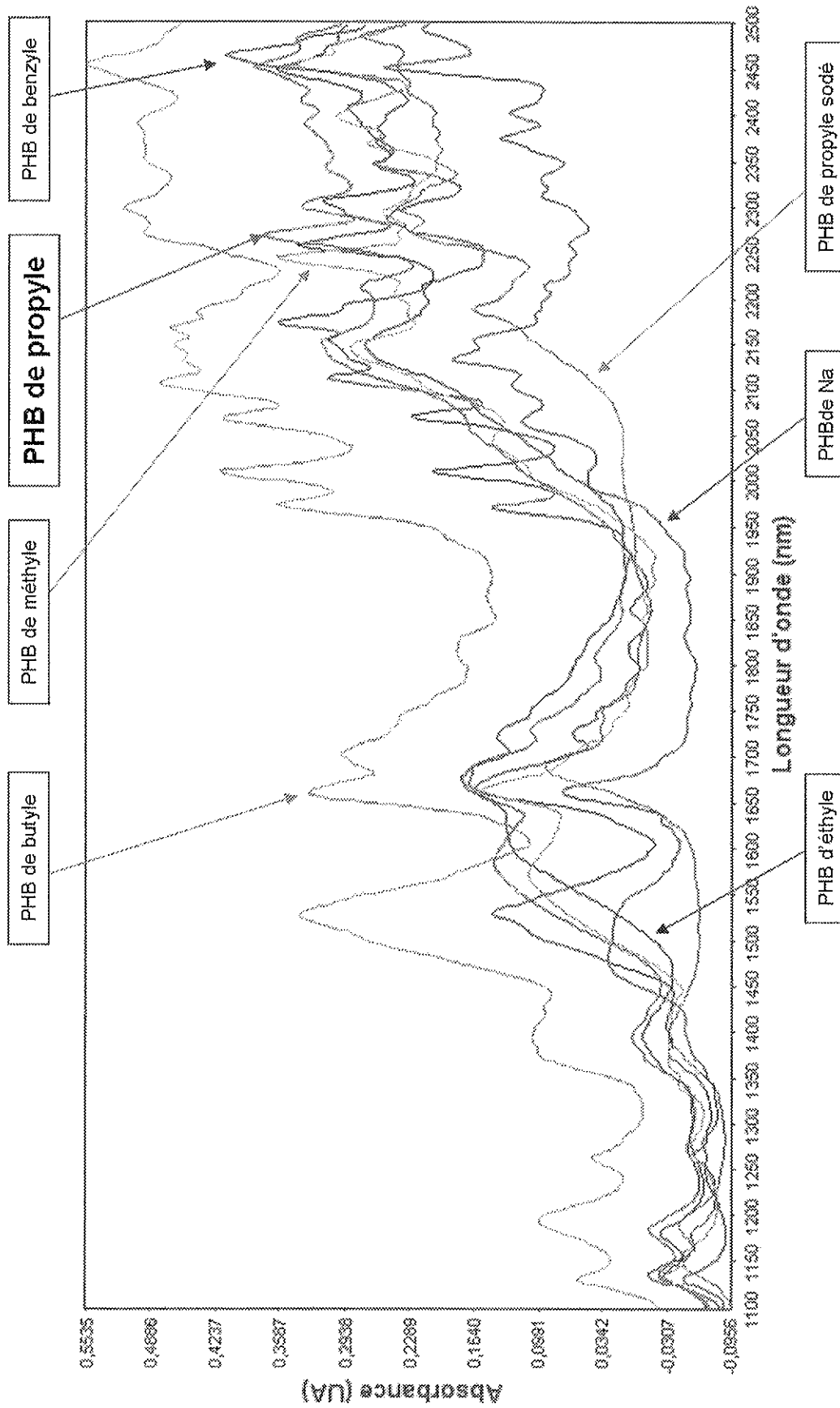
o) Spectres bruts du lévomenthol et de ses substances challengeuses



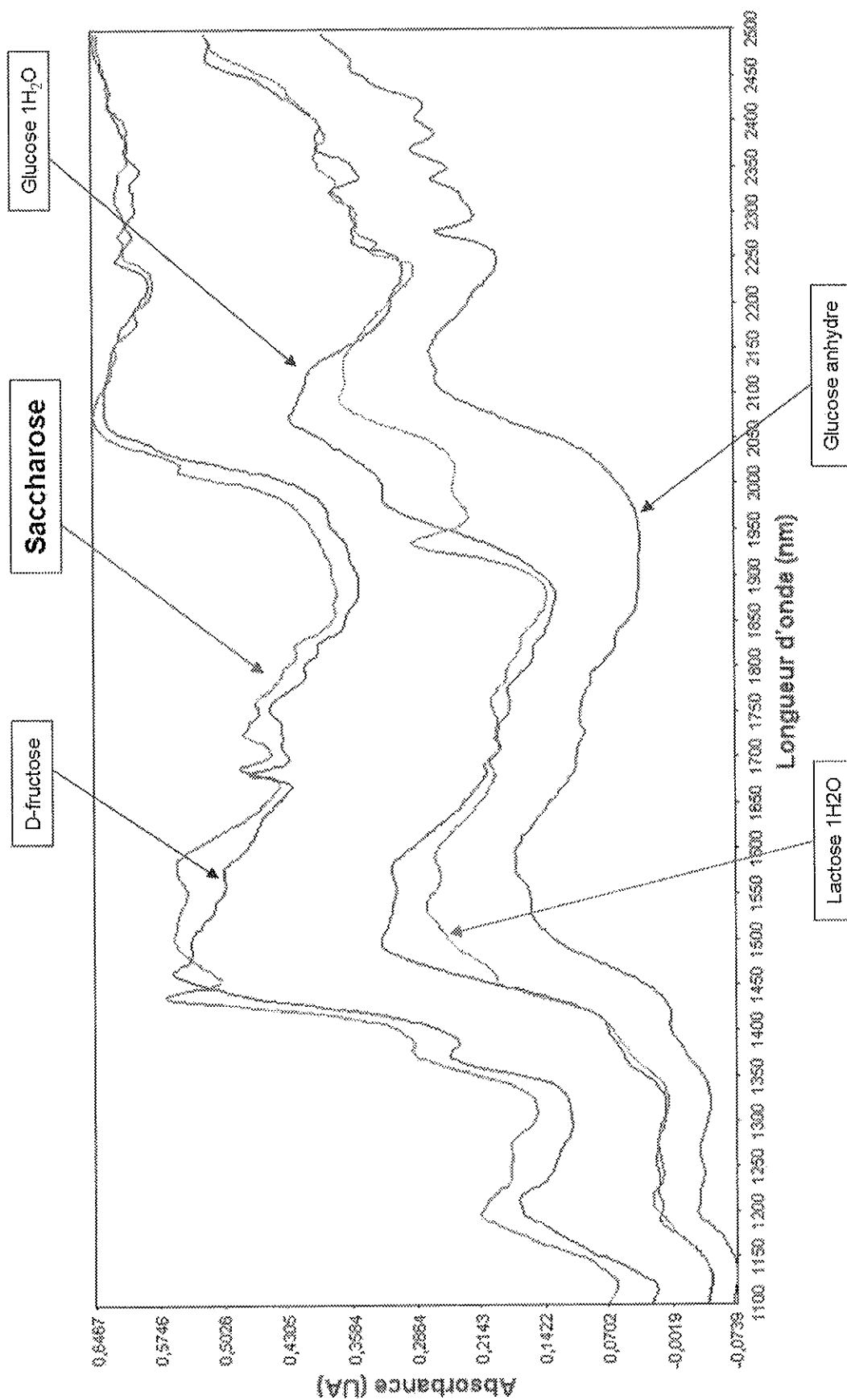
p) Spectres bruts du parahydroxybenzoate de méthyle et de ses substances challengeuses



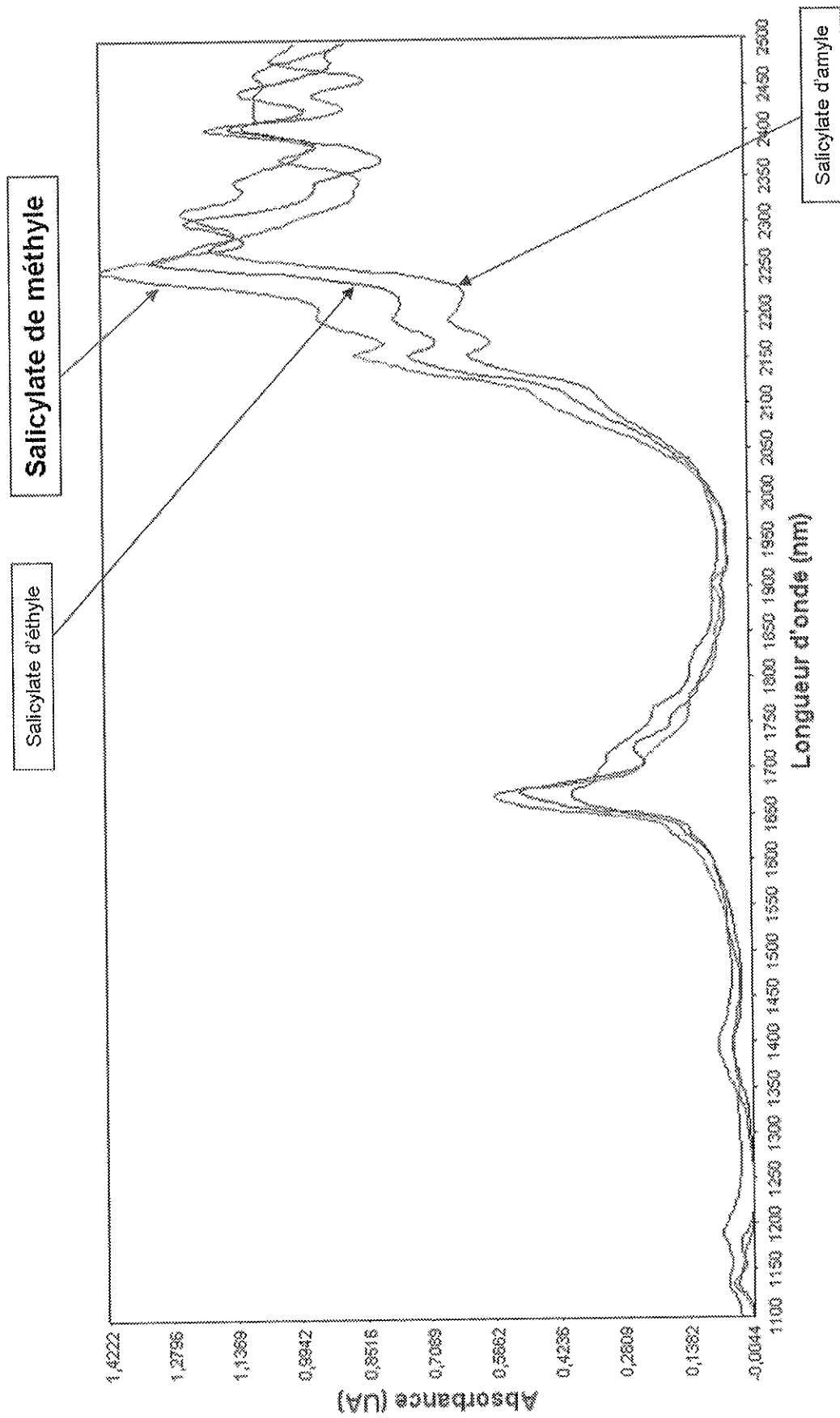
q) Spectres bruts du parahydroxybenzoate de propyle et de ses substances challengeuses



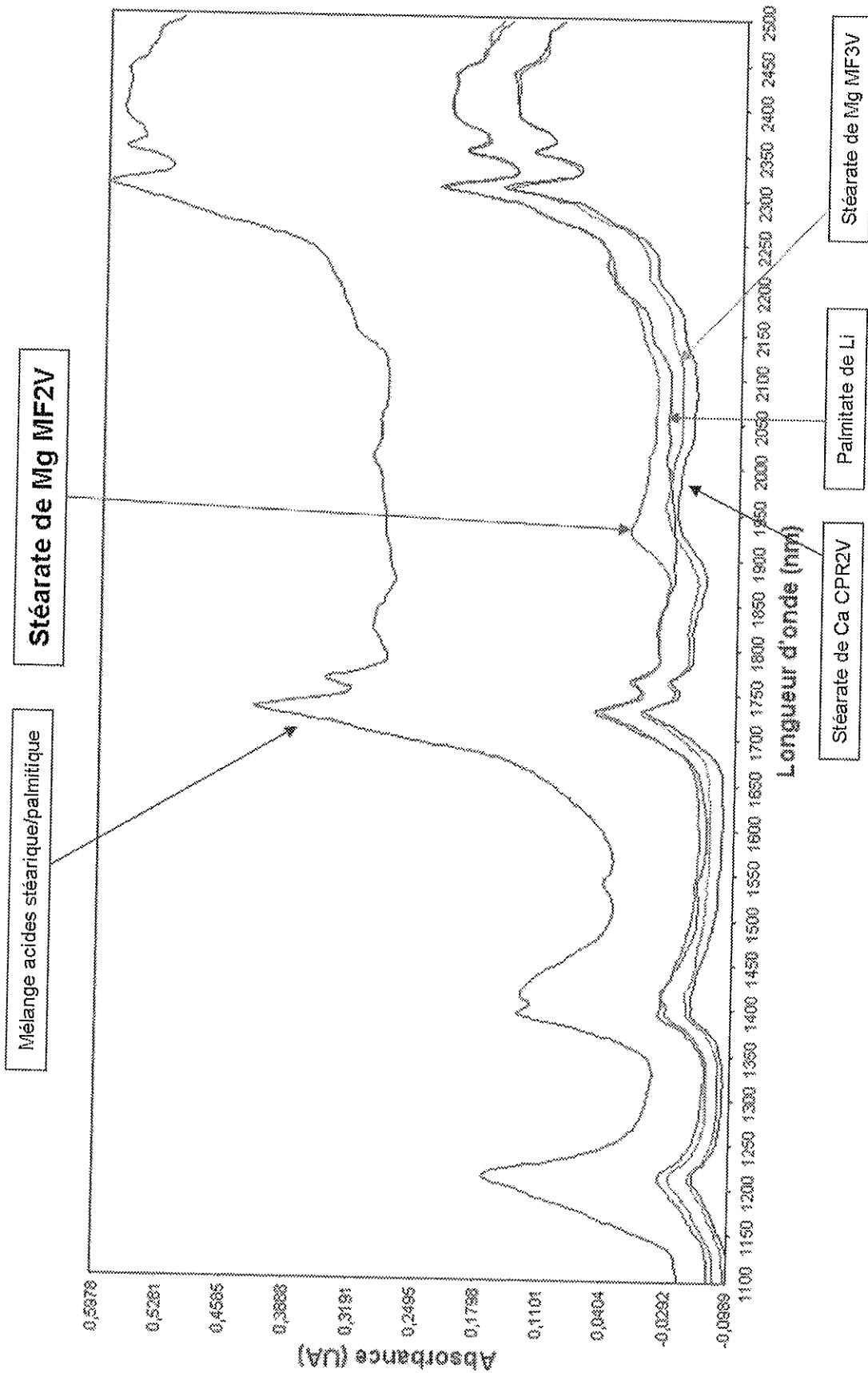
r) Spectres bruts du saccharose et de ses substances challengeuses



s) Spectres bruts du salicylate de méthyle et de ses substances challengeuses

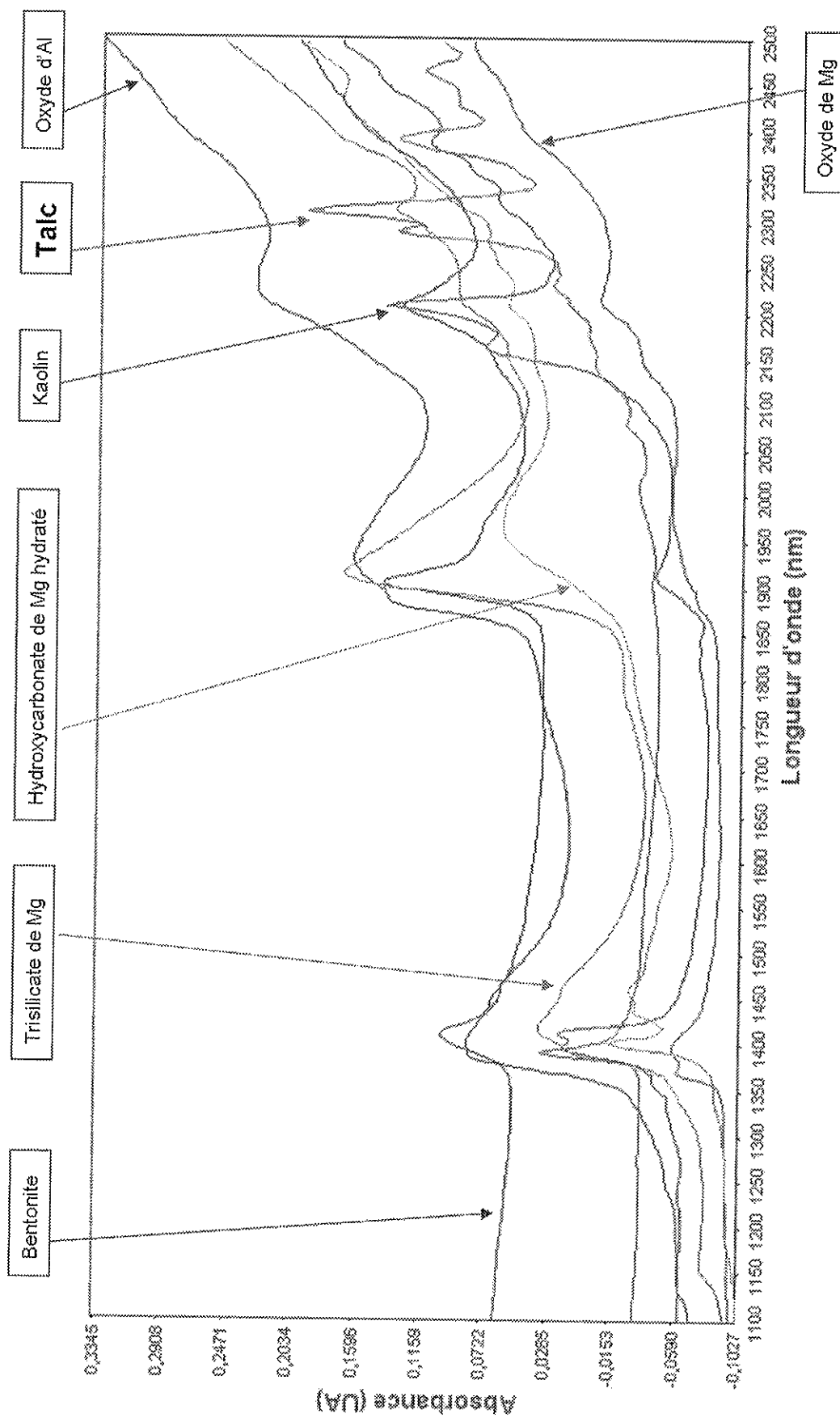


t) Spectres bruts du stéarate de magnésium MF-2-V et de ses substances challengeuses

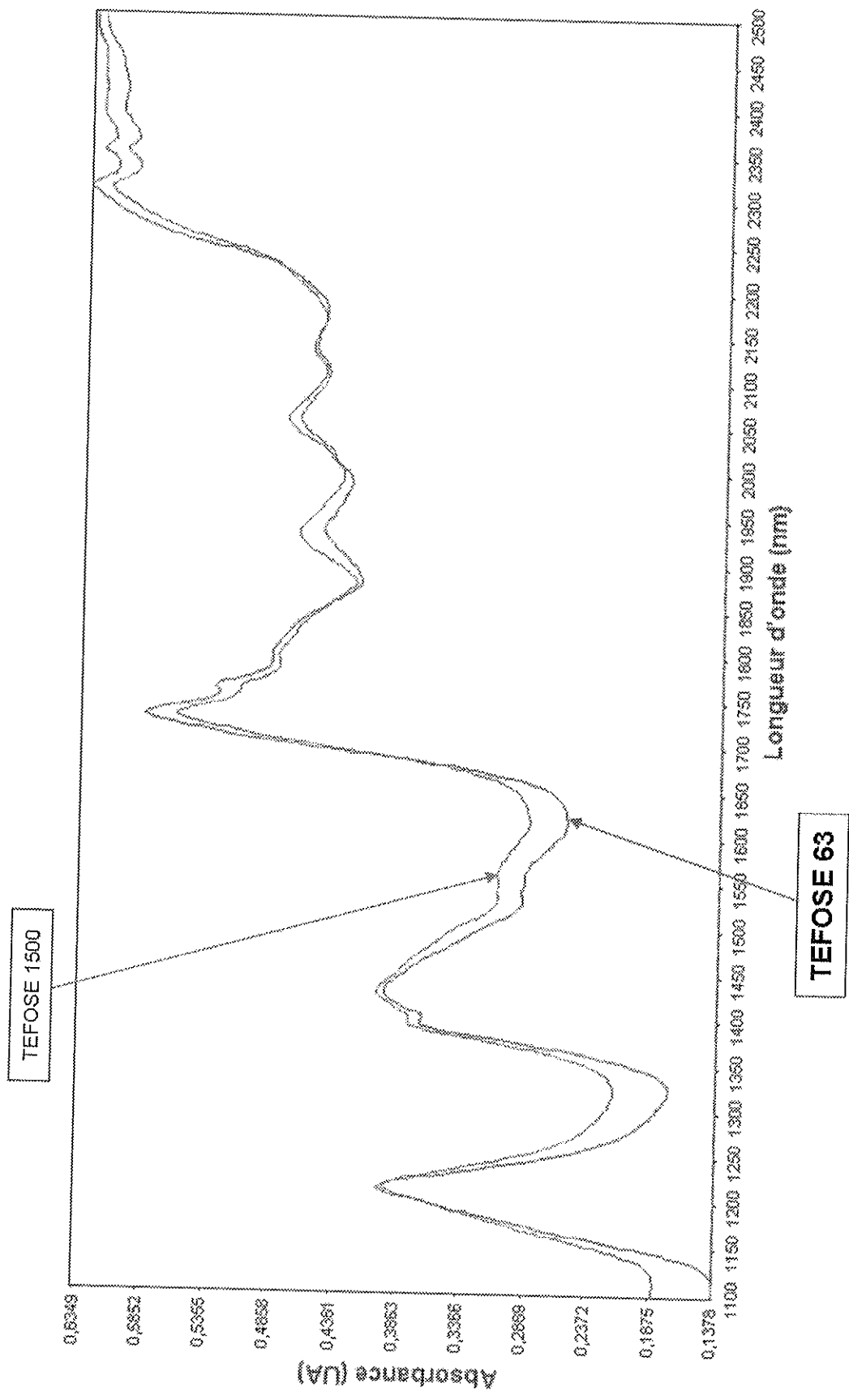




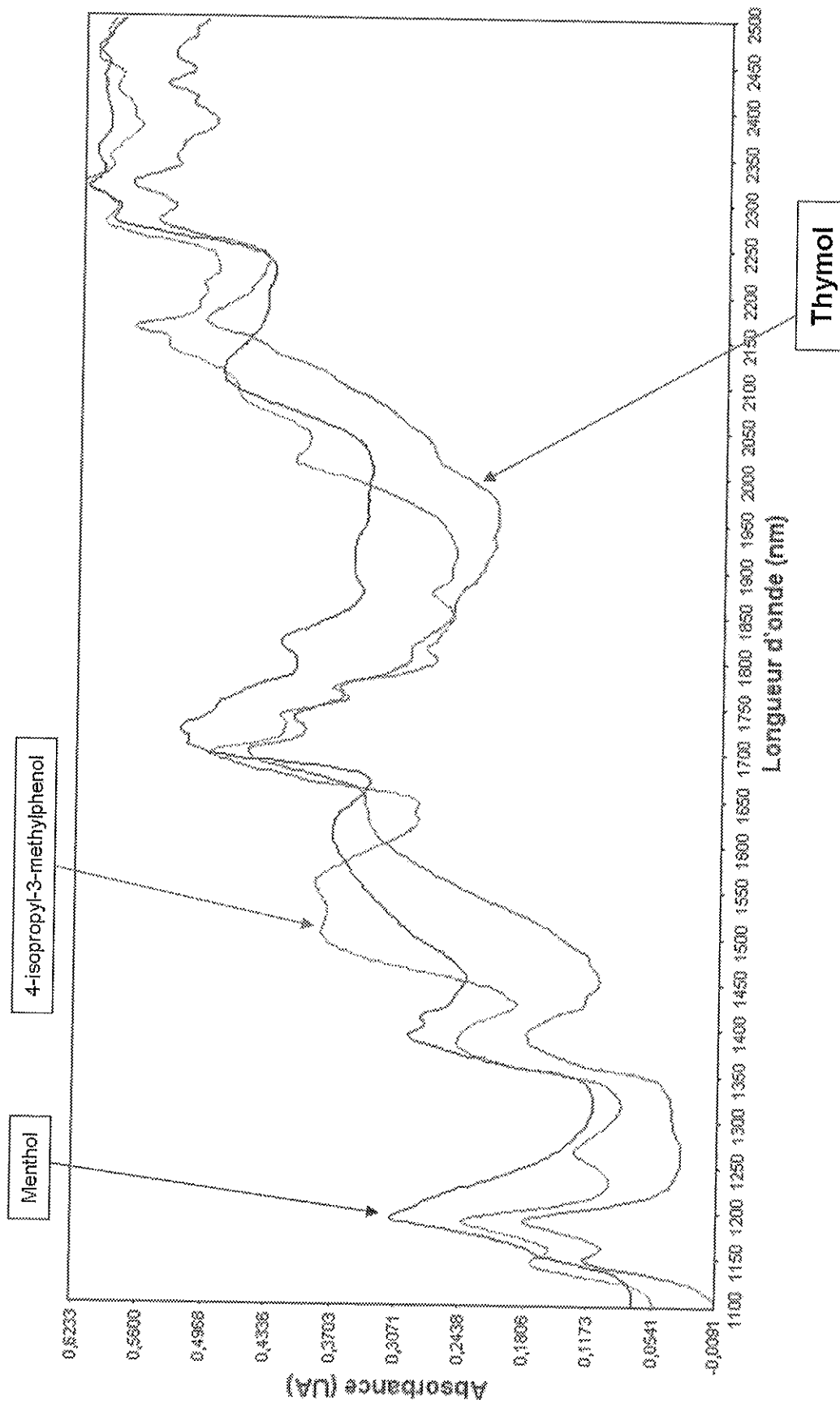
u) Spectres bruts du talc et de ses substances challengeuses



v) Spectres bruts du TEFOSE 63 et de ses substances challengeuses



w) Spectres bruts du thymol et de ses substances challengeuses



**5. Rapport de validation de la bibliothèque de la cellulose microcristalline PH101**

**Spectral Library Validation Report**

General Information

Operator	lib-cellulose	Sample
Library	1	48
Version	NIRSystems Default User	
Printed	27/12/2007	
Time	14:58:18	

Summary Results by Set

Set	Pass	Fail	Reject
PH101	271	12	9
PH101	0	0	0
PH101	0.09	0.06	0.09

Library Development Method Keys

Method	MD
MD	MD
RV	RV
VFC	VFC
WB	WB

Global Library Methods

Method	MD
MD	MD
RV	RV
VFC	VFC
WB	WB

Method Pre-Treatments Used

Method	MD
MD	MD
RV	RV
VFC	VFC
WB	WB

Threshold Time Keys

Method	MD
MD	MD
RV	RV
VFC	VFC
WB	WB

Sample Score Results

Sample	Method	Training	Pass	Fail	Reject	MD
32 086-2	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	2.623	Cellulose microcristalline PH101	N/A
32 085-2	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	1.829	Cellulose microcristalline PH101	N/A
32 233-1	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	2.024	Cellulose microcristalline PH101	N/A
32 425-2	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	2.377	Cellulose microcristalline PH101	N/A
32 086-1	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	2.129	Cellulose microcristalline PH101	N/A
32 786-2	Cellulose microcristalline PH101	Training	Pass	2.667	Cellulose microcristalline PH101	N/A

Sample Score Results

Sample ID	Material	Method	Result	Score	Reference	Material	Method	Result	Score	Reference
31 006-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.154	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 796-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	3.164	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 796-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	3.129	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 426-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.623	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 462-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.791	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 727-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.428	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 727-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.752	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 797-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.557	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 333-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.268	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 366-2	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.207	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 462-2	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.353	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 305-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.853	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 348-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.639	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 233-2	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.042	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 365-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	1.349	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 348-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.134	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
31 462-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.626	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 348-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.189	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 625-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.267	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 426-1	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.070	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 085-3	Cellulose microcrystalline	Training	Pass	2.631	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				
32 906 - 3	Cellulose microcrystalline	Acceptance	Pass	4.066	7.000	Cellulose microcrystalline	WD(MV)	N/A	N/A	N/A
	PH101					PH101				

Sample Score Results

Sample ID	Material	Acceptance	Score	Reference	Result	Material	Acceptance	Score	Reference	Result
32 201 -5	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,459	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,459	7,000	Pass
32 966-1	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,279	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,279	7,000	Pass
32 966-3	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	1,984	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	1,984	7,000	Pass
32 966 -6	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	3,283	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	3,283	7,000	Pass
32 701 -8	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,594	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,594	7,000	Pass
32 966 -4	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	5,779	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	5,779	7,000	Pass
32 701 -4	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,389	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	4,389	7,000	Pass
32 701-3	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,473	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,473	7,000	Pass
32 701-3	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	3,702	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	3,702	7,000	Pass
32 701-3	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,359	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	2,359	7,000	Pass
32 966-3	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	5,832	7,000	Pass	Cellulose microcrystalline PH101	Pass	5,832	7,000	Pass
Avicel ACS41	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	30,433	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	30,433	No Match	Reject
Avicel PH102	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	9,269	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	9,269	No Match	Reject
Avicel PH105	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	11,766	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	11,766	No Match	Reject
Avicel ACS4	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	42,837	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	42,837	No Match	Reject
Avicel CEL5	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	33,934	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	33,934	No Match	Reject
Escoma	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	58,333	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	58,333	No Match	Reject
Avicel PH204	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	15,795	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	15,795	No Match	Reject
PrimoV SMCC	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	12,455	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	12,455	No Match	Reject
Vivasol	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	118,372	No Match	Reject	Cellulose microcrystalline PH101	Reject	118,372	No Match	Reject

## 6. Gain de temps apporté par la SPIR dans l'identification de trois matières premières : le bicarbonate de sodium, le citrate d'alvéine et la siméticone

### - le bicarbonate de sodium (poudre) :

Ce produit n'a pas forcément une grande fréquence dans ses réceptions (8 l'année précédente), par contre le nombre de contenants par livraison est important : au moins une centaine de sacs à chaque livraison.

La méthode d'identification usuelle est également lourde et effectuée en trois étapes :

- (4) réaction de dégagement de CO<sub>2</sub>,
- (5) réaction des carbonates et des bicarbonates,
- (6) réaction du sodium.

La réalisation de toutes ces identifications requiert donc un temps conséquent estimé à plus de 8h par livraison. La méthode d'identification par SPIR permet de réduire ce temps d'analyse à environ 40min, soit un **gain de temps supérieur à 7h**.

### - le citrate d'alvéine (poudre) :

Il s'agit d'une des matières premières utilisée dans la fabrication d'un des produits phare des laboratoires MAYOLY SPINDLER : le METEOSPASYL<sup>®</sup>. Son « turnover » est donc très important avec 16 livraisons l'année précédente et un volume de 35 fûts par livraison.

La méthode usuelle d'identification est la spectrophotométrie infrarouge. Ce qui représente un temps d'analyse par livraison d'environ 3h. Pour une même livraison le temps d'analyse par SPIR est d'environ 25min, soit un **gain de temps supérieur à 2h30**.

### - siméticone (liquide) :

La siméticone est l'autre principe actif composant le METEOSPASYL<sup>®</sup>. Le laboratoire réceptionne 22 livraisons par an à raison de 20 fûts pour chaque.

L'identification usuelle consiste en une spectrophotométrie dans l'infrarouge, une réaction colorée et la réaction des silicates, soit un temps d'analyse estimé à 3h. L'identification par SPIR est elle d'environ 1h20, soit un **gain de temps supérieur à 1h30**. Le gain est ici moindre du fait du mode d'acquisition en transflexion et de son réflecteur unique qui requiert un nettoyage entre chaque acquisition.

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



BON A IMPRIMER N° 3303

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

## **RESUME**

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication, « l'identité d'un lot entier de matières premières ne peut normalement être garantie que si des échantillons individuels sont prélevés dans tous les récipients contenant ce même lot et qu'un essai d'identification est effectué sur chaque échantillon ».

Malheureusement la satisfaction de cette exigence monopolise un grand nombre de ressources au sein des laboratoires de contrôle des industries pharmaceutiques. La spectrophotométrie dans le proche infrarouge dont le champ d'application est vaste et l'exécution en routine rapide peut être envisagée comme une réponse alternative à cette exigence.

L'objet de cette thèse est donc de présenter la mise en place d'une méthode d'identification des matières premières par spectrophotométrie dans le proche infrarouge. La première partie de ce document est consacrée à la théorie et au principe de cette méthode analytique. La deuxième partie est une description étape par étape de la mise en place de la méthode au travers d'un exemple concret.

---

## **TITLE**

**IMPLEMENTATION OF AN IDENTIFICATION METHOD OF STARTING MATERIALS BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY**

---

## **SUMMARY**

According to Good Manufacturing Practice, "the correct identity of a supply of starting materials can only be guaranteed if individual samples are taken from all the containers and an the identity of each sample is tested."

Unfortunately the implementation of this requirement monopolizes a lot of resources within the control laboratories of pharmaceutical industries. The near infrared spectroscopy whose scope is broad and routine execution is fast, can be viewed as an alternative response to this requirement.

The purpose of this thesis is to present the development of an identification method of raw materials by near infrared spectroscopy. The first part of this document is dedicated to the theory and the principle of this analytical method. The second part is a step-by-step description of the implementation of the methodology through a concrete example.

---

## **DISCIPLINE – SPECIALITE DOCTORALE**

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

---

## **MOTS-CLES**

Identification, matière première, méthode chimiométrique, proche infrarouge, spectrophotométrie.

---

## **FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES**

**2 rue du Docteur Marcland  
87025 LIMOGES Cedex**