



HAL
open science

Utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme un outil PAT pour la quantification de substances en solution

Laura Fatela

► To cite this version:

Laura Fatela. Utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme un outil PAT pour la quantification de substances en solution. Sciences pharmaceutiques. 2012. dumas-00764264

HAL Id: dumas-00764264

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00764264v1>

Submitted on 16 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci – La Tronche

Année : 2012

N°

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

**UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE PROCHE
INFRAROUGE COMME OUTIL PAT POUR LA
QUANTIFICATION DE SUBSTANCES EN SOLUTION**

Laura FATELA

Née le 16 mai 1988 à Echirolles (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 7 décembre 2012

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury :

le Pr Denis WOUESSIDJEWÉ

Directeur de thèse :

le Dr Luc PISARIK

Membre du jury :

le Dr Catherine GROSSET

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Directeur de l'UFR : **M. Pr. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2011-2012

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH) (Eméritat)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROULLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

Dernière mise à jour : 05/09/11

Rédacteur : L.FAURE, Secrétaire du Directeur

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Directeur de l'UFR : **M. Pr. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2011-2012

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 35)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Dernière mise à jour : 08/09/2011/24/02/2012

Rédacteur : L.FAURE; Secrétaire du Doyen

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
VAN NOOLEN	Laëtitia	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

ATER (n= 6)

BIROS Camille	ATER	Anglais Master ISM (JR)
DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
EL BAKKALI Abdellatif	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
HENRI Marlon	ATER	Physiologie (HP2.LER)
NGO TOM Esther	½ ATER	Pharmacologie (HP2.LER)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=10)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 08/09/201124/02/2012

Rédacteur : L.FAURE; Secrétaire du Doyen

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

REMERCIEMENTS

Au Pr Denis WOUESSIDJEWE, pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir la pharmacie industrielle lors de ma formation notamment à travers le projet médicament de cinquième année.

Au Dr Luc PISARIK, pour m'avoir fait confiance pour ces six mois de stage et pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils.

Au Dr Catherine GROSSET, pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

A mes parents, je vous remercie pour votre soutien, votre présence et vos encouragements tout au long de mes études. Merci de m'avoir permis de faire un métier qui me plaît.

A Fabien pour ta présence, ton soutien, tes encouragements et ton amour au quotidien. Nous voilà prêt à commencer cette nouvelle étape de notre vie !

A mon frère, pour tous ces bons petits plats...

A ma famille.

A Tiphaine, Séverine et Evelyne pour leur présence pendant ces six années de pharmacie et pour les mémorables voyages réalisés ensemble... Un grand merci tout particulièrement à Tiphaine pour ses relectures et ses conseils.

A mon binôme de cœur, Céline, à ma responsable de pharmacovigilance, Laura et à Sophie pour votre amitié et votre présence au cours de ces années de pharmacie.

A Lucile, Philippine et Alexandre pour cette agréable année toulousaine en votre compagnie.

A toute l'équipe de la pharmacie Le Palladium qui m'a accueillie chaleureusement pour mes différents stages universitaires, les samedis et les vacances scolaires. Un grand merci pour cette expérience enrichissante et votre passion du métier de pharmacien.

A l'ensemble du service ATP pharma de Merial, particulièrement à Jérôme et à Sandrine pour leurs précieux conseils tout au long de mon stage. C'est un peu grâce à eux que ce travail a pu être réalisé.

A toutes les personnes présentes aujourd'hui, et à toutes celles que j'ai oubliées.

TABLES DES MATIERES

Remerciements	6
Tables des matières	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures	12
Abréviations et symboles	15
INTRODUCTION.....	16
1. Introduction à la spectroscopie proche infrarouge	18
1.1. Historique et origine de la spectroscopie	18
1.2. Natures et propriétés des radiations infrarouges	18
1.3. Propriétés des ondes électromagnétiques.....	19
1.4. Notions d'optique appliquées à la propagation d'une onde.....	21
1.5. La spectroscopie vibrationnelle	22
1.5.1. La molécule diatomique.....	22
1.5.2. La molécule poly-atomique	24
2. La mesure spectrale.....	27
2.1. Acquisition et traitement du signal	27
2.1.1. Mesure de la transmission	28
2.1.2. Phénomène de diffusion de la lumière	28
2.2. Instrumentation.....	29
2.2.1. La source lumineuse : laser de type He-Ne	29
2.2.2. Détecteurs photosensible : Photodiode AsIn.....	29
2.2.3. Principe de l'appareil.....	29
3. La chimiométrie appliquée à la spectroscopie proche infrarouge	32
3.1. La chimiométrie : généralités	33
3.2. Les méthodes prédictives.....	34
3.2.1. La régression linéaire	34
3.2.2. La régression PLS	35

4.	Un outil PAT pour l'industrie pharmaceutique	36
4.1.	Définition des PAT	36
4.2.	La SPIR comme un outil PAT pour l'industrie pharmaceutique	38
4.2.1.	Les analyses qualitatives	38
4.2.2.	Les analyses quantitatives	39
4.2.3.	Le contrôle en ligne par la SPIR.....	40
MATERIELS ET METHODES.....		45
1.	Le produit.....	46
1.1.	Caractéristiques des matières premières	46
1.2.	Consignes de sécurité spécifiques au produit	46
1.3.	Le plan d'expériences	47
1.4.	Les procédés de fabrication	48
1.4.1.	La fabrication complète du produit (lot de 2000 g).....	49
1.4.2.	Le procédé de fabrication pour un lot de 380 g.....	50
1.4.3.	La documentation associée à la fabrication de lot	52
2.	Le dosage par CLHP	52
2.1.	La conformité du système chromatographique	53
2.2.	Le déroulement des analyses.....	53
2.3.	Les systèmes chromatographiques utilisés	53
2.4.	Bilan.....	54
3.	Le dosage par spectrophotométrie proche infrarouge	54
3.1.	Le spectrophotomètre infrarouge ABB Bonem®	54
3.2.	L'acquisition des spectres en proche infrarouge.....	55
3.3.	Le prétraitement des données spectrales	55
3.3.1.	La correction de la ligne de base	56
3.3.2.	La normalisation.....	56
3.3.3.	La sélection de la région spectrale	56
3.3.4.	L'évaluation des résultats	57
RESULTATS.....		59

1.	Le modèle de calibration de la substance A	60
1.1.	Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance A ...	60
1.2.	La préparation des données brutes.....	60
1.2.1.	Les prétraitements.....	61
1.2.2.	La corrélation.....	61
1.2.3.	La correction de la ligne de base	62
1.2.4.	La normalisation.....	62
1.2.5.	La sélection de la région spectrale d'intérêt.....	63
1.3.	Les résultats de l'expérience la plus pertinente	64
1.4.	Le bilan du modèle de calibration de la substance A	66
2.	Le modèle de calibration de la substance B	67
2.1.	Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance B ...	67
2.2.	La préparation des données brutes.....	67
2.3.	Les résultats de l'expérience la plus pertinente	68
2.4.	Le bilan du modèle de calibration de la substance B	70
3.	Le modèle de calibration de la substance C	71
3.1.	Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance C ...	71
3.2.	La préparation des données brutes.....	71
3.3.	Les résultats de l'expérience la plus pertinente	72
3.4.	Le bilan du modèle de calibration de la substance C	74
4.	Le modèle de calibration de la substance D.....	74
4.1.	Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance D ...	74
4.2.	La préparation des données brutes.....	75
4.3.	Les résultats de l'expérience la plus pertinente	76
4.4.	Le bilan du modèle de calibration de la substance D	78
	DISCUSSION.....	80
	CONCLUSION	85
	BIBLIOGRAPHIE	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Longueurs d'ondes et fréquences de la région infrarouge du spectre électromagnétique	19
Tableau II : Grandeurs caractéristiques des ondes électromagnétiques.....	20
Tableau III : Caractéristiques des matières premières utilisées (extrait de documents internes)	46
Tableau IV : Procédé de fabrication pour un lot de 2 000g	50
Tableau V : Procédé de fabrication pour un lot de 380g	51

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Spectre électromagnétique.....	19
Figure 2 : représentation d'une onde électromagnétique.....	20
Figure 3 : Spectre d'absorption dans le proche infrarouge.....	21
Figure 4 : Schéma de la loi de réfraction.....	21
Figure 5 : Modèle simple d'une molécule diatomique : les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k^5	23
Figure 6 : Vibrations d'élongation symétrique.....	25
Figure 7 : Vibrations d'élongation asymétrique ⁵	25
Figure 8 : Vibration de déformation dans le plan par cisaillement ⁵	25
Figure 9 : Vibration de déformation dans le plan par rotation plane ⁵	25
Figure 10 : Vibration de déformation perpendiculaire au plan par balancement....	26
Figure 11 : Vibration de déformation perpendiculaire au plan par torsion ⁵	26
Figure 12 : Représentation des harmoniques sur un spectre proche infrarouge....	27
Figure 13 : Principe d'un spectromètre à transformée de Fourier, interféromètre de Michelson	30
Figure 14 : Interférence entre lumière de même fréquence.....	31
Figure 15 : Exemple d'acquisition d'un spectre infrarouge par transformée de Fourier ⁵	31
Figure 16 : Installation du poste de travail pour les lots de 2 000 g.....	49
Figure 17 : Installation du poste de travail pour les lots de 380 g	51
Figure 18 : Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier, modèle MB 160, ABB Bonem®	54
Figure 19 : Conception intérieure de l'interféromètre proche infrarouge à transformée de Fourier, MB 106 ABB Bomem®	55
Figure 20 : Exemple du graphe Sample leverage vs Studentized residual.....	58
Figure 21 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance A	60
Figure 22 : Collection spectrale des échantillons pour la substance A	61
Figure 23 : Zoom sur la région spectrale d'intérêt (substance A)	61
Figure 24 : Collection spectrale avec l'affichage de la corrélation pour la substance A (courbe bleue).....	62
Figure 25 : Zoom sur la région spectrale d'intérêt avec l'affichage de la corrélation pour la substance A	62

Figure 26 : Correction de la ligne de base pour la substance A	62
Figure 27 : Zoom sur la correction de la ligne de base pour la substance A	62
Figure 28 : Sélection du pic pour la normalisation pour la substance A	63
Figure 29 : Zoom sur la sélection du pic pour la normalisation pour la substance A	63
Figure 30 : Sélection de la région d'information pour la substance A	63
Figure 31 : Zoom sur la sélection de la région d'information pour la substance A .	63
Figure 32 : Evolution de la corrélation après les prétraitements et la sélection de la région d'information pour la substance A	64
Figure 33 : Evolution de la corrélation après les prétraitements et le zoom sur la sélection de la région d'information pour la substance A	64
Figure 34 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance A	64
Figure 35 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour le facteur A	64
Figure 36 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance A (5 facteurs)	65
Figure 37 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance A (5 facteurs)	65
Figure 38 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par la CLHP pour la substance A.....	66
Figure 39 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance B	67
Figure 40 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance B	68
Figure 41 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance B	69
Figure 42 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour la substance B	69
Figure 43 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance B (5 facteurs)	69
Figure 44 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance B (5 facteurs)	70
Figure 45 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par CLHP pour la substance B	70
Figure 46 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance C	71

Figure 47 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance C	72
Figure 48 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance C	73
Figure 49 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance C (7 facteurs).....	73
Figure 50 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance C (7 facteurs).....	74
Figure 51 : Représentation graphique des échantillons de laboratoire de la substance D.....	75
Figure 52 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance D.....	76
Figure 53 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance D	77
Figure 54 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour la substance D.....	77
Figure 55 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance D (9 facteurs).....	77
Figure 56 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance D (9 facteurs).....	78
Figure 57 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par CLHP pour la substance D	78

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

A : Angstrom

As-In : Arséniure d'indium

ATP Pharma : Assistance Technique de la Production Pharmaceutique

cm : centimètre

EPI : Equipement de Protection Individuel

FDA : Food and Drug of Administration

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

He-Ne : Hélium - Néon

Hz : Hertz

ICH : International Conference of Harmonization

m : mètre

nm : nanomètre

PAT : Process Analytical Technology

PLS : Partial Least Squares

PRESS : Predicted Error Sum of Squares

RCP : Régression en Composante Principale

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

s : seconde

SECV : Standard Error of Cross Validation

SPIR : Spectroscopie Proche InfraRouge

USDA : United States Department of Agriculture

INTRODUCTION

L'industrie pharmaceutique est confrontée à deux enjeux majeurs : développer et produire des médicaments de qualité sans danger pour les patients et optimiser la production des médicaments. En effet, elle doit développer de nouvelles molécules avec de brefs délais et fabriquer les médicaments tout en limitant les dépenses et en maîtrisant la qualité du produit fini.

Cette maîtrise repose sur un système : l'assurance qualité et des mesures conduites par le contrôle qualité, à partir d'échantillons prélevés au cours ou à la fin de la production. Le contrôle qualité est incontournable mais il est consommateur de temps et de moyens humains. Ces opérations doivent être réalisées judicieusement tout au long du processus de fabrication afin de garantir la qualité du produit fini tout en essayant de réduire au maximum le coût d'analyse.

Au début du 21^{ème} siècle, la Food and Drug Administration (FDA) a initié la démarche Process Analytical Technology (PAT) auprès des industries et des laboratoires pharmaceutiques. L'objectif de la FDA est de proposer une nouvelle approche pour mettre en place des outils efficaces et performants au service de la mesure et de la maîtrise des procédés de production. Elle se traduit par l'utilisation d'outils analytiques permettant d'assurer le contrôle des produits en temps réel dans le but de maîtriser de façon objective les différents paramètres critiques. Cela permet de garantir la qualité du produit et ainsi optimiser la productivité d'une usine.

Suite à cette démarche, des techniques analytiques peu utilisées dans l'industrie pharmaceutique font leur apparition. La Spectroscopie Proche InfraRouge (SPIR) s'est fortement développée depuis les années 1960 dans les industries pétrochimiques et agroalimentaires. Néanmoins, elle commence depuis ces dix dernières années à être utilisée dans l'industrie pharmaceutique suite à l'initiative de la FDA. En comparaison, les techniques chromatographiques sont utilisées en routine depuis de nombreuses années.

Dans le cadre de la mise en place d'outil PAT en production, la SPIR est l'outil analytique privilégié. *La SPIR peut-elle être une méthode alternative à la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) pour quantifier plusieurs substances en solution pour libérer un produit à l'issue de sa répartition ?*

1. Introduction à la spectroscopie proche infrarouge

1.1. Historique et origine de la spectroscopie

Historiquement, la découverte de la région proche infrarouge est attribuée à Sir William Herschel (astronome, 1738-1822) en 1800. Il a démontré qu'en déplaçant un thermomètre à alcool sur le spectre solaire, du violet vers le rouge, la température augmente et présente un maximum au-delà du rouge où l'œil ne discerne aucun éclaircissement. Herschel a donc montré que le spectre électromagnétique s'étendait au delà du rouge vers les grandes longueurs d'ondes^{1,2}.

De nombreuses expériences sur le proche infrarouge ont été conduites dans les années 1920, mais ce n'est qu'au milieu des années 1960 que la spectrophotométrie en proche infrarouge a été couramment utilisée. Karl Norris de l'United States Department of Agriculture (USDA) a identifié le potentiel de cette méthode analytique et a introduit son utilisation dans les pratiques industrielles. Il a notamment étudié l'influence de la température sur la mesure du taux de protéines et de l'humidité présente dans le blé par la SPIR³.

La SPIR est généralement choisie pour sa rapidité, son faible coût et son caractère non destructif². Ces dernières années, la spectroscopie proche infrarouge a donc pris une place importante dans l'industrie pharmaceutique pour le contrôle qualité des matières premières et du produit fini, ainsi que pour le suivi des procédés de fabrication³.

1.2. Natures et propriétés des radiations infrarouges

La lumière infrarouge est une radiation de nature électromagnétique. Le spectre électromagnétique est généralement divisé en plusieurs régions : les rayons gamma, les rayons X ; l'ultraviolet, le visible, l'infrarouge, les micro-ondes et les ondes radios fréquences (figure 1).

¹ Hadni A. L'infrarouge. Paris: Presses universitaires de France; 1975

² Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

³ Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. Adv. Drug Deliv. Rev. 2005;57:1109-1143

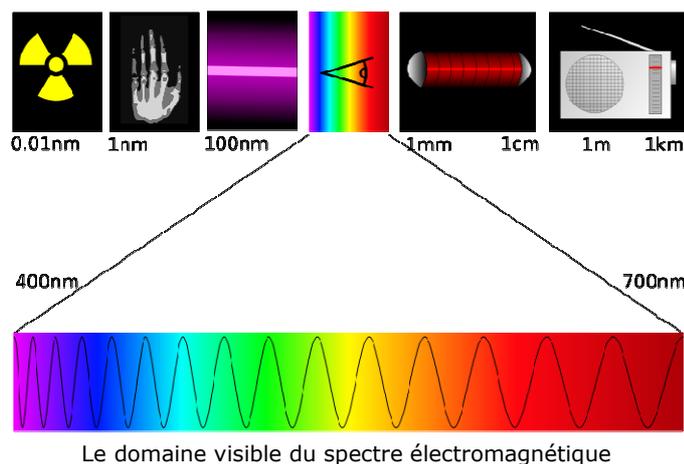


Figure 1 : Spectre électromagnétique⁴

La région de l'infrarouge peut être décomposée en trois parties présentées dans le tableau ci-dessous (tableau I).

	Longueur d'onde λ (cm)	Nombre d'ondes ν' (cm ⁻¹)
Infrarouge Proche	$0,78 \cdot 10^{-4}$ à $2,5 \cdot 10^{-4}$	12 800 à 4 000
Infrarouge Moyen	$2,5 \cdot 10^{-4}$ à $5 \cdot 10^{-3}$	4 000 à 200
Infrarouge Lointain	$5 \cdot 10^{-3}$ à $1 \cdot 10^{-1}$	200 à 10

Tableau I : Longueurs d'ondes et fréquences de la région infrarouge du spectre électromagnétique

1.3. Propriétés des ondes électromagnétiques

Les ondes électromagnétiques correspondent à la propagation d'énergie grâce aux variations périodiques de fréquence ν , d'un champ électrique (E) et d'un champ magnétique (B). Le champ électromagnétique, c'est-à-dire l'association d'un champ électrique et d'un champ magnétique, définit une onde lorsqu'il se propage. Le mouvement du champ électrique ou magnétique peut être représenté comme un mouvement ondulatoire de forme sinusoïdale. Ce mouvement est caractérisé par différents paramètres (figure 2) :

- λ , la longueur d'onde : distance linéaire entre deux minima ou deux maxima successifs,
- ν , la fréquence : caractéristique liée à la longueur d'onde.

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

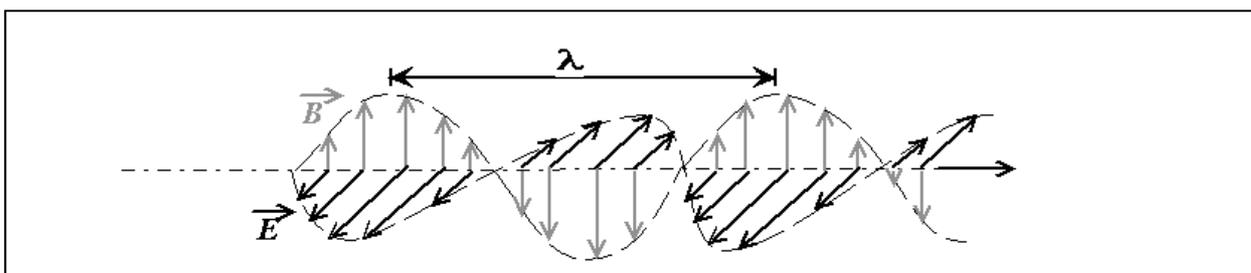


Figure 2 : représentation d'une onde électromagnétique⁵

De manière générale, les ondes électromagnétiques sont caractérisées par quatre grandeurs : la période, la fréquence, la longueur d'onde et le nombre d'onde (tableau II).

	Période	Fréquence	Longueur d'onde	Nombre d'onde
Symbole	T	ν	λ	ν'
Unité	Seconde (s)	Hertz (Hz)	Mètre (m) Nanomètre (nm) Angstrom (Å)	Centimètre moins un (cm^{-1})
Définition	Temps nécessaire pour qu'une vibration sinusoïdale se retrouve dans la même position	Nombre de périodes par seconde	Distance parcourue par une onde pendant une période T	Nombre d'oscillations de l'onde par centimètre
Relation		$\nu = 1/T$	$\lambda = c / \nu$	$\nu' = 1/\lambda = \nu/c$

Tableau II : Grandeurs caractéristiques des ondes électromagnétiques

L'énergie vaut : $E = h\nu$ et la fréquence vaut $\nu = \frac{c}{\lambda}$, ce qui donne $E = \frac{hc}{\lambda}$. La longueur d'onde λ est donc inversement proportionnelle à l'énergie E.

Le nombre d'onde est la grandeur caractéristique préférentiellement utilisée en spectroscopie infrarouge.

Un échantillon soumis à la lumière infrarouge peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Cette absorption est caractéristique des liaisons chimiques et physicochimiques du produit. Le spectre infrarouge est donc composé de bandes d'absorption⁴ (figure 3).

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

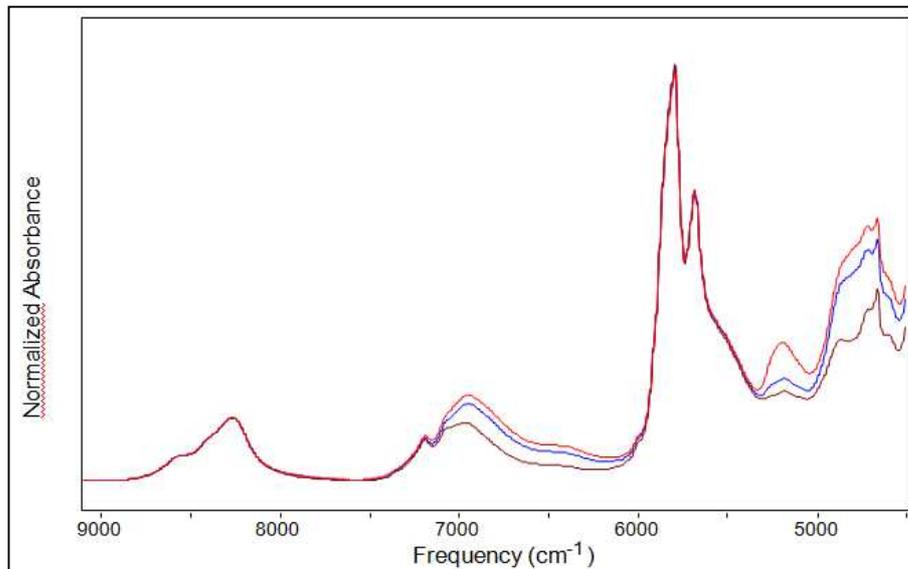


Figure 3 : Spectre d'absorption dans le proche infrarouge⁵

1.4. Notions d'optique appliquées à la propagation d'une onde

La loi de la réfraction ou loi de Snell-Descartes exprime le changement de direction que subit un faisceau lumineux lors de son passage entre deux milieux différents (figure 4). Chaque milieu est caractérisé par sa capacité à ralentir la lumière qui est modélisée par l'indice de réfraction (n).

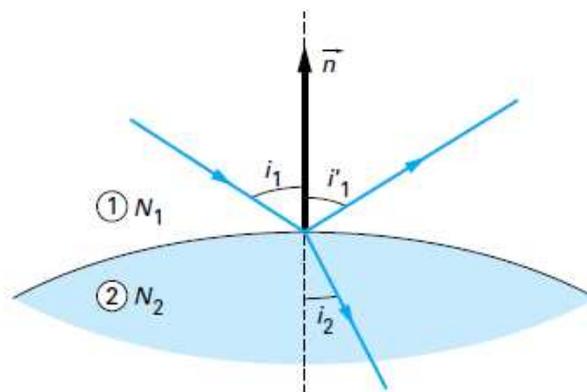


Figure 4 : Schéma de la loi de réfraction⁶

La loi s'énonce ainsi : $n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$

Avec :

- n_1 et n_2 les indices de réfraction dans lesquels se propagent, respectivement le rayon incident et le rayon réfracté,
- θ_1 l'angle incident,
- θ_2 l'angle de réfraction.

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

⁶ Dalibert M, Servant L. Spectroscopie dans l'infrarouge. Les techniques de l'ingénieur P2 845. 2000

La loi de réfraction est applicable au modèle de la propagation des ondes électromagnétiques. L'échantillon placé dans le faisceau du spectrophotomètre se comporte comme un élément optique. Le spectre obtenu est donc le résultat de deux contributions :

- celle escomptée, due aux variations moléculaires du produit étudié
- celle due à l'application des lois de l'optique. Celle-ci modifie l'intensité du faisceau soit de manière globale, soit en fonction de la longueur d'onde incidente.

Pour le cas d'un échantillon dispersé dans une matrice non absorbante, le spectre de transmission dépend du produit dispersé mais aussi de l'état de surface, de l'homogénéité et des indices de réfraction du produit notamment. La préparation de l'échantillon joue donc un rôle important sur la forme du spectre obtenu. Ceci implique une préparation rigoureuse et surtout standardisée des échantillons afin d'obtenir des analyses reproductibles et fiables⁴.

1.5. La spectroscopie vibrationnelle

1.5.1. La molécule diatomique

La spectroscopie est l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. La région proche infrarouge correspond à une partie de la spectroscopie vibrationnelle.

Une molécule peut être modélisée de façon simplifiée par un ensemble d'atomes reliés entre eux par des ressorts. Les liaisons sont le résultat d'un équilibre de forces de répulsions et d'attractions :

- répulsion entre les noyaux chargés positivement ;
- répulsion entre les nuages d'électrons chargés négativement ;
- attraction entre le noyau d'un atome et les électrons d'un autre atome et vice-versa.

La nature des groupes chimiques impliqués conditionne la fréquence de vibration de chaque ressort. Une molécule peut absorber l'énergie d'un rayon lumineux incident uniquement si la fréquence de la lumière est identique à la fréquence de la liaison

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris : Lavoisier ; 2006

intermoléculaire⁷. Ce phénomène peut être expliqué par deux modèles : l'oscillateur harmonique et l'oscillateur anharmonique.

1.5.1.1. L'oscillateur harmonique

Pour expliquer le principe de la spectroscopie infrarouge, le modèle de la molécule diatomique en vibration est le plus simple. Dans ce modèle on considère deux masses m_1 et m_2 reliées par un ressort dont la force est égale à k (figure 5).

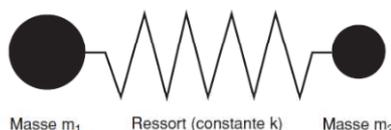


Figure 5 : Modèle simple d'une molécule diatomique : les deux masses m_1 et m_2 sont liées par un ressort caractérisé par la constante de force k ⁵

On suppose que la liaison suit la loi de Hooke donnée par la formule suivante :

$$F = -k(r - r_{eq})$$

Avec :

- F , la force qui s'exerce sur la particule
- r , la position de la particule
- r_{eq} , la position de la particule à l'équilibre

Dans ces conditions, la courbe de l'énergie est parabolique et symétrique autour de la position d'équilibre r_{eq} . L'énergie est donnée par l'équation suivante :

$$E = \frac{1}{2}k(r - r_{eq})^2$$

La fréquence (ν) propre de la vibration de la liaison est donnée par l'équation :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Avec μ , la masse réduite, calculée avec la formule : $\mu = \frac{m_1 * m_2}{m_1 + m_2}$

Cette équation permet de calculer la position approximative d'une bande fondamentale dans le moyen infrarouge. Toutefois en pratique, la corrélation entre la position calculée et la position observée expérimentalement n'est pas

⁷ Bertrand D. La spectroscopie porche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim. 2002;15(3):209-219

satisfaisante. En effet, dans ce modèle on considère qu'une liaison a une seule fréquence propre alors que les liaisons interatomiques ont en réalité plusieurs fréquences de vibration⁷.

1.5.1.2. L'oscillateur anharmonique

Les liaisons atomiques ne suivent pas réellement les lois décrites par le modèle harmonique :

- si la liaison est très fortement comprimée, son énergie augmente plus que ce qui est décrit par la loi de Hooke ;
- si la liaison est très fortement étirée, la force de liaison diminue jusqu'à ce que la molécule se dissocie et libère ses atomes.

La conséquence principale de l'anharmonicité est qu'une liaison vibre généralement à plusieurs fréquences : la fondamentale et les harmoniques. Les fréquences sont données par les relations suivantes :

- fondamentale : $\nu_1 = \nu_0 (1 - 2 x_e)$
- première harmonique : $\nu_2 = 2 \nu_0 (1 - 3 x_e)$
- deuxième harmonique : $\nu_3 = 3 \nu_0 (1 - 4 x_e)$

Avec : ν_0 = fréquence de référence qui dépend de la nature de la liaison

x_e = la constante d'anharmonicité

Comme x_e prend de petites valeurs, la fréquence fondamentale est voisine de ν_0 , la première harmonique de $2 \nu_0$ et la deuxième harmonique de $3 \nu_0$. Avec la relation $\lambda = c/\nu$, les longueurs d'ondes correspondantes se situent respectivement à λ_0 , $\lambda_0/2$, $\lambda_0/3$ ⁵.

1.5.2. La molécule poly-atomique

Pour décrire au mieux la réalité, il faut élargir la théorie à une molécule poly-atomique. Une molécule avec N atomes a $[3N - 6]$ degrés de liberté de vibration ($[3N - 5]$ pour les molécules linéaires). Toutes les liaisons interatomiques ne peuvent pas absorber l'énergie lumineuse infrarouge, même si la fréquence de la lumière est la même que celle de la liaison atomique. En effet, pour que la lumière infrarouge puisse agir sur une liaison atomique, il faut que cette liaison présente

⁷ Bertrand D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim. 2002;15(3):209-219

une asymétrie électrique ou moment dipolaire. Lorsque la fréquence de la lumière incidente correspond à la fréquence de vibration moléculaire d'une liaison, la liaison entre en résonance et absorbe ainsi l'énergie lumineuse⁸.

Les vibrations atomiques peuvent être divisées en deux groupes :

- les vibrations de valence ou vibrations d'élongation : il s'agit du mouvement des atomes le long de l'axe de leur liaison. Ce mouvement entraîne une modification de la distance interatomique. Les vibrations d'élongation peuvent être symétriques ou asymétriques (figures 6 et 7).

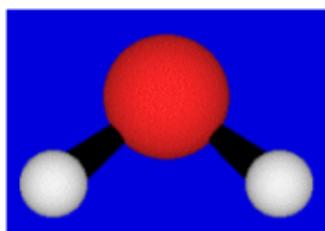


Figure 6 : Vibrations d'élongation symétrique⁵

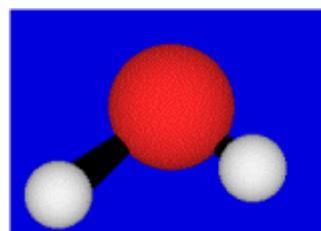


Figure 7 : Vibrations d'élongation asymétrique⁵

- les vibrations de déformation (dans le plan ou en dehors du plan de la liaison) : mouvement des atomes en dehors de l'axe de la liaison. Ce mouvement n'entraîne pas de modification de la distance interatomique. Les vibrations de déformation sont elles-mêmes divisées en deux types :
 - o vibrations de déformation dans le plan : par cisaillement (modification de l'angle entre les liaisons) ou par rotation plane (sans modification de l'angle entre les liaisons) (figures 8 et 9).

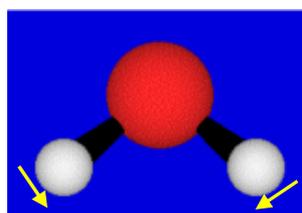


Figure 8 : Vibration de déformation dans le plan par cisaillement⁵

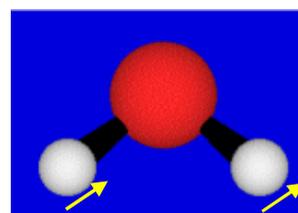


Figure 9 : Vibration de déformation dans le plan par rotation plane⁵

⁸ Barthelmé B. Mémoire de la CNAM en sciences techniques industrielles option techniques pharmaceutiques. 2009

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

- vibrations de déformation perpendiculaire au plan : par balancement (les atomes se déplacent simultanément du même côté du plan) ou par rotation (les deux atomes se déplacent de chaque côté du plan) (figures 10 et 11).

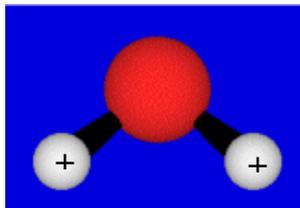


Figure 10 : Vibration de déformation perpendiculaire au plan par balancement⁵

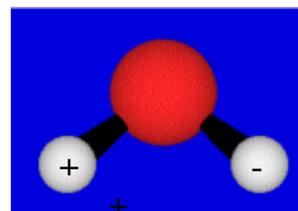


Figure 11 : Vibration de déformation perpendiculaire au plan par torsion⁵

A chaque mode de vibration correspond une fréquence fondamentale et plusieurs autres fréquences associées aux harmoniques. Les bandes de combinaisons sont le résultat d'interactions entre les modes de vibration d'une liaison particulière avec ceux des autres liaisons. La combinaison linéaire des fréquences des bandes fondamentales permet d'estimer la fréquence des bandes de combinaison.

La fréquence d'une bande de combinaison est donnée par la formule :

$$\nu_{\text{comb}} = \alpha\nu_1 + \beta\nu_2$$

Avec : ν_1 et ν_2 = fréquence des deux modes de vibration formant la combinaison

α et β = nombres entiers (généralement 1, 2 ou 3)

Comme pour les harmoniques, les bandes de combinaisons apparaissent à des fréquences plus élevées et donc à des longueurs d'onde inférieures aux bandes fondamentales. Les bandes harmoniques et les bandes de combinaisons appartiennent donc à la région spectrale du proche infrarouge (figure 12).

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

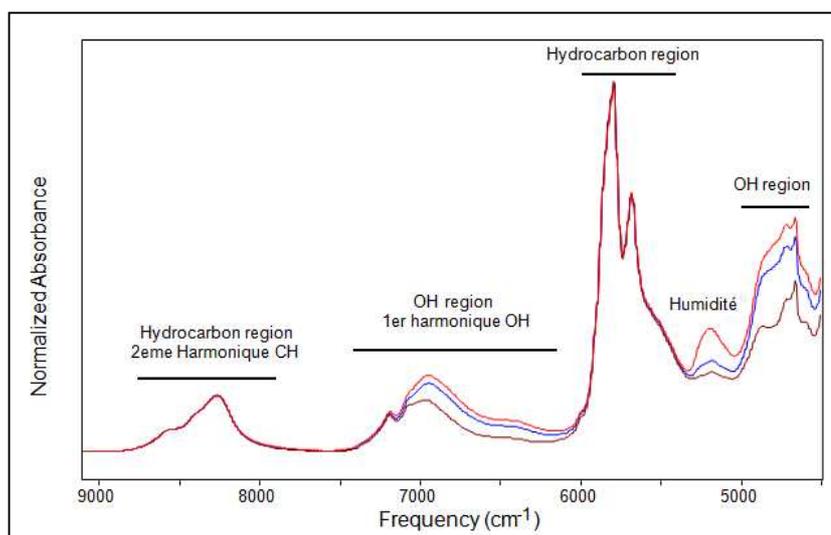


Figure 12 : Représentation des harmoniques sur un spectre proche infrarouge⁵

De manière générale, il est plus difficile d'interpréter un spectre dans le proche infrarouge qu'un spectre dans le moyen infrarouge. Néanmoins, la région du proche infrarouge est adaptée pour des applications analytiques pour deux raisons principales :

- les bandes de combinaisons et les harmoniques sont moins intenses que les fondamentales correspondantes car la lumière est moins absorbée dans le proche infrarouge par rapport au moyen infrarouge. La lumière pénètre de plusieurs millimètres à l'intérieur du produit étudié. Il n'est pas nécessaire de diluer le produit pour obtenir des résultats exploitables.
- les bandes d'absorption en proche infrarouge forment de larges pics. Une petite dérive dans l'échelle des longueurs d'onde ne changerait pas réellement l'intensité de la lumière absorbée⁷.

2. La mesure spectrale

2.1. Acquisition et traitement du signal

L'analyse chimique par spectrométrie infrarouge repose sur l'acquisition et le traitement des données spectrales d'absorption concernant les molécules constitutives des produits analysés. Une radiation qui entre en contact avec de la matière peut être à la fois absorbée, transmise et réfléchi.

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

⁷ Bertrand D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim. 2002;15(3):209-219

Selon le principe de la conservation de l'énergie, l'intensité des radiations incidentes (I_0) doit être égale à la somme des intensités des radiations absorbées (I_A), transmises (I_T) et réfléchies (I_R). L'application de ce principe en spectrométrie permet de calculer la proportion d'énergie lumineuse absorbée par les molécules à partir des mesures de l'intensité transmise I_T ou de l'intensité réfléchie I_R .

2.1.1. Mesure de la transmission

2.1.1.1. Transmittance

La transmittance T est la mesure de l'atténuation du faisceau lumineux. Elle est basée sur la comparaison de l'intensité transmise I_T et de l'intensité incidente I_0 , selon si l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique.

La transmittance T qui peut être exprimée en pourcentage est égale au rapport :

$$T = I_T / I_0.$$

2.1.1.2. Absorbance

L'absorbance A est définie comme étant le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance T , selon les équations :

$$A = \text{Log}_{10} 1/T = \text{Log}_{10} I_0/I_T$$

L'absorbance est une valeur positive sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

2.1.2. Phénomène de diffusion de la lumière

La diffusion intervient lorsque la lumière est défléchiée par les particules du milieu de manière à ne pas atteindre l'autre côté de l'échantillon. La diffusion de la lumière réunit trois processus qui sont la réfraction, la diffraction et la réflexion. Ces processus influencent fortement l'absorbance de la majorité des échantillons liquides ou solides.

La conséquence de la diffusion s'observe sur les spectres proches infrarouges à deux niveaux :

- sur la ligne de base : plus le processus de diffusion est présent, plus le niveau général d'absorbance est élevé sur l'ensemble du spectre. La dispersion des radiations lumineuses dans toutes les directions diminue l'intensité de lumière mesurée à toutes les longueurs d'onde par le détecteur de transmission.

- sur le profil des spectres : plus le processus de diffusion est présent, plus l'allure du spectre est « accidentée ». Ce phénomène s'explique par l'allongement du chemin optique moyen des radiations lumineuses traversant l'échantillon.

2.2. Instrumentation

2.2.1. La source lumineuse : laser de type He-Ne

Le laser He-Ne (Hélium-Néon) est utilisé comme source lumineuse dans les appareils à transformée de Fourier, pour repérer avec précision la position du miroir mobile. Les lasers permettent d'obtenir une longueur d'onde de sortie variable, et peuvent couvrir de très larges plages spectrales⁷.

2.2.2. Détecteurs photosensible : Photodiode AsIn

La photodiode à l'arséniure d'indium (AsIn) est un détecteur photosensible, à semi-conducteur, sensible entre 1 500 et 4 000 nm.

Lorsqu'on illumine la photodiode, la radiation absorbée excite les électrons de manière à former des paires « électron-trou ». Celles-ci sont séparées par l'action d'un champ électrique, et le déplacement de ces charges produit un petit potentiel le long de la jonction. L'absorption de la radiation libère un nombre d'électrons proportionnel à l'intensité reçue. Le courant mesuré est donc proportionnel à l'intensité de la lumière incidente⁴.

2.2.3. Principe de l'appareil

2.2.3.1. Le spectromètre à transformée de Fourier : interféromètre de Michelson

Les spectromètres à transformée de Fourier sont les plus utilisés dans la recherche et l'industrie.

L'interféromètre de Michelson est le dispositif principal de ce type de spectromètre. Dans ce système le rayon lumineux peut prendre deux trajets optiques différents ce qui crée alors une interférence.

⁷ Bertrand D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim. 2002;15(3):209-219

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

Le rayon lumineux frappe un miroir semi-transparent appelé « séparatrice ». La séparatrice a la capacité de réfléchir 50% de l'intensité lumineuse et de transmettre 50% de l'intensité lumineuse.

- la partie réfléchi (50%, en vert sur la figure 13) atteint le miroir fixe. La lumière réfléchi par le miroir fixe rencontre à nouveau la séparatrice. 50% de cette lumière est alors transmise vers le détecteur et 50% est réfléchi vers la source. Le détecteur reçoit donc 25% de l'intensité lumineuse de départ (en bleu sur la figure 13).
- la partie transmise (50%, en vert sur la figure 13) atteint le miroir mobile. Ce dernier peut se déplacer d'une distance X dans les directions indiquées par la flèche en pointillés (figure 13). La lumière réfléchi par le miroir mobile rencontre à nouveau la séparatrice. 50% de cette lumière est alors transmise vers le détecteur et 50% vers la source. Le détecteur reçoit donc à nouveau 25% de l'intensité lumineuse de départ (en rouge sur la figure 13).

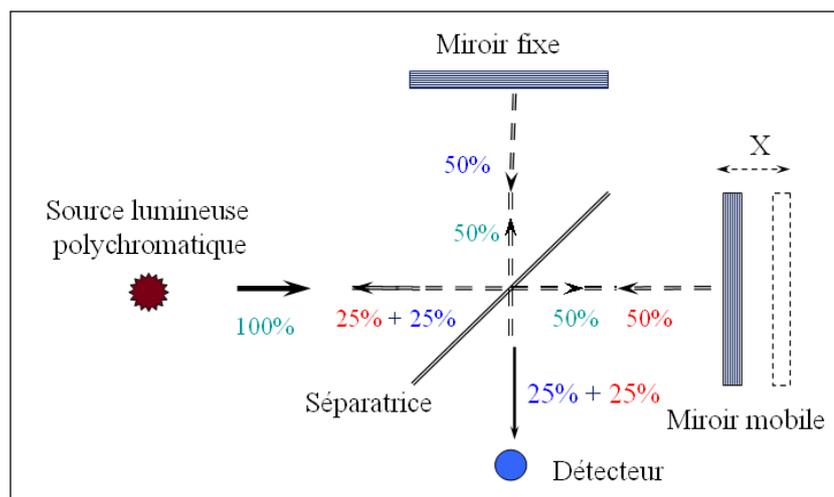


Figure 13 : Principe d'un spectromètre à transformée de Fourier, interféromètre de Michelson⁵

Le déplacement du miroir mobile permet de changer la longueur d'un des trajets optiques. Lorsque les trajets ont la même distance, l'interférence est constructive. L'interférence est également constructive quand la différence des trajets appelée δ est un multiple de λ (longueur d'onde d'un rayon monochromatique). A l'opposé les rayons interfèrent de manière destructive lorsque $\delta = k \cdot (\lambda/2)$, k entier naturel (figure 14).

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

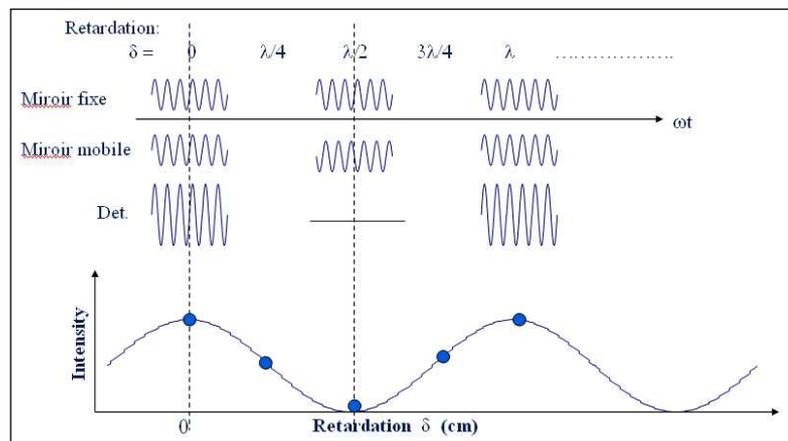


Figure 14 : Interférence entre lumière de même fréquence⁵

L'échantillon est placé dans le trajet des rayons lumineux à proximité du détecteur. Si le miroir mobile se déplace à vitesse constante, un rayon lumineux monochromatique est à l'origine d'un signal électrique sinusoïdal. Pour une lumière polychromatique, le signal enregistré est appelé interférogramme. L'interférogramme est la somme de fonctions sinusoïdales. Lorsque $\delta=0$, toutes les longueurs d'ondes interfèrent positivement et l'interférogramme prend alors sa valeur maximale. A contrario lorsque δ augmente l'interférogramme tend vers zéro. L'application de la transformée de Fourier permet d'obtenir les intensités en fonction des fréquences (figure 15).

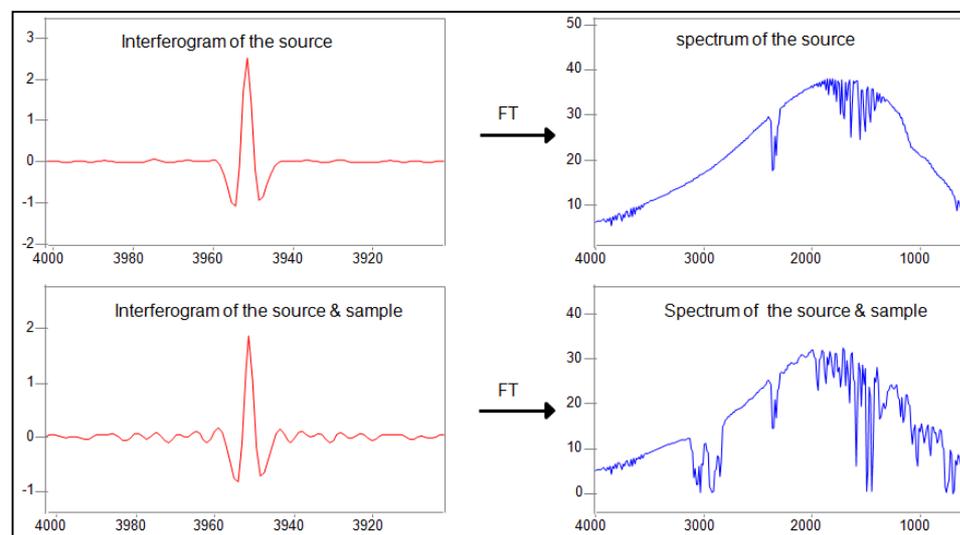


Figure 15 : Exemple d'acquisition d'un spectre infrarouge par transformée de Fourier⁵

⁵ Bertrand D. La spectroscopie porche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim. 2002;15(3):209-219

2.2.3.2. Acquisition d'un spectre

La lumière divergente émise par la source est modulée par l'interféromètre qui, par les mouvements du ou des miroirs mobiles, produit le motif d'interférence (interférogramme). La lumière modulée passe à travers l'échantillon. Il absorbe les fréquences selon sa composition modifiant ainsi la forme de l'interférogramme. L'interférogramme est mesuré par le détecteur.

Pour donner au spectre sa forme classique (variation de l'intensité en fonction du nombre d'onde), il est nécessaire d'appliquer la transformée de Fourier.

2.2.3.3. Les paramètres pouvant modifier un spectre infrarouge

Une bande d'absorption infrarouge est due à la résonance d'une liaison polarisée. Tout ce qui peut modifier la polarisation de la liaison va influencer le spectre. La reproductibilité d'un spectre en proche infrarouge peut être modifiée par de nombreux facteurs :

- le changement d'éléments ou de radicaux près de la liaison étudiée. Cela va modifier la position de la bande d'absorption.
- la température. Elle modifie l'agitation moléculaire et donc le spectre en proche infrarouge. Un élargissement des bandes est alors observé.
- la polarité d'une liaison. Elle peut être modifiée par les polarités des molécules environnantes.

Ces variations entraînent des déplacements de bandes et des modifications d'intensités qui peuvent influencer fortement sur les mesures et les quantifications⁵.

3. La chimométrie appliquée à la spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge est une méthode d'analyse secondaire ce qui la différencie des outils d'analyses conventionnels. Les spectres acquis font l'objet d'un traitement et d'une analyse poussée afin de permettre l'obtention d'une

⁵ Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

information pertinente et exploitable. La chimiométrie est la méthode d'extraction de l'information pour l'interprétation des données spectrales⁹.

Le terme « chimiométrique » vient de l'anglais « chemometrics ». C'est la réalisation de calculs performants sur des mesures de résultats chimiques. Elle s'applique aussi bien au pH, à la mesure de l'activité d'un ion hydrogène ou à l'interpolation d'un spectre par la transformée de Fourier.

La chimiométrie est un outil utilisé pour extraire de l'information pertinente et utile à partir de données physico-chimiques, mesurées ou connues. Elle est basée sur la construction et l'exploitation d'un modèle de comportement à l'aide d'outils statistiques¹⁰.

3.1. La chimiométrie : généralités

La chimiométrie est une discipline mathématique. Elle peut être définie comme l'ensemble des méthodes statistiques, graphiques ou symboliques permettant d'améliorer la compréhension d'informations obtenues dans le domaine de la chimie. Elle inclut le traitement du signal et les méthodes statistiques adaptées aux données spectrales. Le développement des méthodes analytiques, notamment celles basées sur la spectroscopie proche infrarouge, est étroitement lié aux progrès chimiométriques.

Les spectres en proche infrarouge de substrats naturels ou de matières premières sont riches en informations intéressantes d'un point de vue analytique. Cependant, l'extraction de ces informations n'est pas immédiate et demande un traitement mathématique assez complexe. En effet, les spectres sont les résultats d'une interaction de la lumière avec la matière non complètement décrite sur le plan théorique. Afin de tenir compte des lacunes théoriques et des variations non contrôlées, il est nécessaire d'accumuler des spectres de nombreux échantillons et de traiter la collection spectrale ainsi obtenue par des méthodes chimiométriques. Des méthodes prédictives globales incluant l'ensemble des variables disponibles dans le modèle prédictif peuvent être développées. Les deux principales sont la Régression en Composantes Principales (RCP) et la méthode des « Partial Least Squares » (PLS ou moindres carrés partiels). Cette dernière est actuellement la méthode la plus couramment mise en œuvre dans les applications analytiques.

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. *Spectra Analyse*. 2009;269:27-35

¹⁰ Formation ABB. Analyse quantitative chimiométrique. Réalisée le 14/02/2012

Les méthodes chimiométriques peuvent avoir trois objectifs principaux : la description des données, la prédiction ou la planification expérimentale. Seule la méthode prédictive sera développée par la suite car c'est celle utilisée lors de l'étude¹⁰.

3.2. Les méthodes prédictives

L'objectif principal d'une méthode prédictive est d'estimer au mieux à partir de données, les valeurs d'une ou plusieurs variables pour de nouveaux échantillons. Dans les applications analytiques le cas le plus fréquemment rencontré correspond à la prédiction d'une variable quantitative, comme la concentration d'un composant présent dans le produit étudié.

Avant d'appliquer une méthode chimiométrique, il est nécessaire de créer une collection homogène de spectres. Il est important de numériser les spectres afin de changer un signal continu en une suite de nombres (valeur de la mesure spectrale à une longueur d'onde donnée par exemple).

L'acquisition de plusieurs dizaines de spectres est nécessaire à l'établissement d'un modèle. Ils sont regroupés dans un tableau et traités par la méthode chimiométrique la plus adaptée.

3.2.1. La régression linéaire

L'analyse par spectroscopie nécessite un étalonnage permettant d'établir la liaison entre une variable à prédire Y et les spectres des individus considérés, représentés par les mesures spectrales aux différentes longueurs d'onde.

La régression linéaire est une technique qui permet d'établir des équations de prédiction (ou modèles) permettant de relier la variable Y (teneur en Principe Actif (PA) par exemple) et des variables x_1, x_2, \dots, x_p (absorbance à une longueur d'onde donnée). Les méthodes de régression sont basées sur le principe des moindres carrés et s'appuient sur les statistiques.

3.2.1.1. La régression linéaire simple

Pour le modèle par régression linéaire simple, l'ensemble des variables indépendantes est réduit à une seule variable. L'absorbance à une seule longueur d'onde est retenue comme variable X. Une représentation graphique de Y en fonction de X est réalisée. Si les points apparaissent alignés, la régression linéaire

¹⁰ Formation ABB. Analyse quantitative chimiométrique. Réalisée le 14/02/2012

par la méthode des moindres carrés permet de rechercher la fonction affine qui passe au plus près des points.

L'objectif est de définir la relation affine suivante : $y = a x_i + b$. Pour cela on doit estimer les valeurs de a et b et évaluer la validité de cette relation. Ensuite, le coefficient de corrélation r permet d'évaluer la force de la linéarité entre X et « y », et par conséquent, la validité du modèle. La validité du modèle peut aussi être évaluée à l'aide du coefficient de détermination R^2 ⁴.

3.2.1.2. La régression linéaire multiple

En pratique l'utilisateur dispose des valeurs spectrales pour différentes longueurs d'ondes et souhaite prédire une variable Y en tenant compte de toute l'information disponible.

L'objectif est de prédire une variable Y à partir des variables x_1, x_2, \dots, x_p qui sont des variables spectrales prises à différentes longueurs d'ondes. Le modèle est donné par l'équation : $y_i = a_0 + a_1x_{i1} + a_2x_{i2} + \dots + a_px_{ip} + e_i$

La généralisation de la régression linéaire simple pour p variables explicatives. e_i correspondant à l'erreur du modèle exprime ou résume l'information manquante dans l'explication linéaire des valeurs de y_i à partir des x_{i1}, \dots, x_{ip} . La qualité d'ajustement au modèle de la régression linéaire multiple peut être mesurée à l'aide du coefficient de détermination R^2 ⁴.

3.2.2. La régression PLS

En alternative à la méthode de régression linéaire multiple, la méthode de régression PLS est la méthode la plus connue et la plus utilisée dans le domaine de la spectroscopie infrarouge.

Cette méthode est basée sur la répétition de trois étapes :

- la première étape correspond à l'analyse des facteurs. L'algorithme PLS génère un jeu de composantes principales ou facteurs, basé sur les données spectrales. Une combinaison linéaire de ces facteurs est utilisée pour reconstruire les spectres d'étalonnage. La quantité de chaque facteur nécessaire est appelé score. Après reconstruction, la comparaison entre le spectre reconstruit et le spectre réel n'est jamais parfaite. Il subsiste donc un spectre résiduel.

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

- la seconde étape est l'analyse des moindres carrés. Les valeurs des scores sont mises en rapport avec les valeurs des références conduisant par régression au vecteur de régression :

$$\text{Référence A} = 100\% = (2 \times \text{facteur 1}) + (3 \times \text{facteur 2}) + \text{résiduel}$$

$$\text{Référence B} = 50\% = (1 \times \text{facteur 1}) + (2 \times \text{facteur 2}) + \text{résiduel}$$

- la troisième étape correspond à la prédiction de l'échantillon. La quantification de la propriété est obtenue par multiplication du spectre observé par le vecteur de régression.

Dans l'algorithme PLS les trois étapes sont réalisées un très grand nombre de fois. Pour chaque niveau de facteur un échantillon du jeu d'étalonnage est mis de côté et les étapes 1 et 2 sont réalisées. L'échantillon mis de côté est alors quantifié selon le modèle calculé avec les autres échantillons. Cela est répété pour chaque échantillon d'étalonnage^{4,10}.

4. Un outil PAT pour l'industrie pharmaceutique

4.1. Définition des PAT

Au début des années 2000, la FDA a incité les industriels à mettre en place la démarche PAT lors du développement et de l'industrialisation de produits pharmaceutiques. La mise en place de ce concept a pour objectif de faciliter la compréhension et la meilleure maîtrise des formulations et/ou des procédés de fabrication afin d'assurer la qualité finale du produit⁹.

Pour guider les industries pharmaceutiques, la FDA a rédigé un document officiel où le PAT est défini comme étant « *a system for designing, analyzing, and controlling manufacturing through timely measurements (i.e., during processing) of critical quality and performance attributes of raw and in-process materials and processes, with the goal of ensuring final product quality* ».

⁴ Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

¹⁰ Formation ABB. Analyse quantitative chimiométrique. Réalisée le 14/02/2012

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. Spectra Analyse. 2009;269:27-35

Le terme « Analytical » dans cette définition des PAT est à considérer au sens large. Il inclut les analyses chimiques, physiques, microbiologiques, mathématiques et les analyses de risques¹¹.

Le contrôle qualité des produits pharmaceutiques intermédiaires ou finis est basé essentiellement sur des tests réalisés en laboratoire de contrôle, à partir d'échantillons prélevés au cours de la production. Cette approche du contrôle est consommatrice de temps, de réactifs et de moyens humains. De plus, elle ne permet pas de suivre en continu les paramètres critiques du procédé de fabrication¹².

Le développement de l'approche PAT au sein de l'industrie pharmaceutique présente un réel intérêt en permettant trois types de mesures :

- at-line : tests réalisés à proximité du procédé de fabrication,
- on-line : mesures réalisées au niveau d'une boucle d'échantillonnage,
- in-line : mesures réalisées directement au cœur du procédé pouvant ou non être intrusives par rapport au procédé.

L'échantillonnage et les analyses en laboratoires sont ainsi réduits¹³.

L'intégration des PAT au sein de l'industrie pharmaceutique visent à¹⁰ :

- réduire les cycles de production grâce aux contrôles on-line, in-line ou at-line,
- améliorer l'efficacité des procédés,
- prendre des actions correctives en temps réel, pour limiter au maximum la production de lots défectueux ou hors spécifications,
- libérer les lots de façon paramétrique. La libération est réalisée en temps réel immédiatement à la fin du processus de fabrication,
- conduire des investigations en cas de non conformité.

¹¹ Food and Drug Administration. Guidance for industry, 2004. PAT - A Framework For Innovative Pharmaceutical, Development, Manufacturing and Quality Assurance

¹² Gendre C. Process Analytical Technology, Suivi en temps réel d'une opération d'enrobage et de curing et nouvelles avancées dans la caractérisation du film polymère [thèse]. Chatenay-Malabry: faculté de pharmacie; 2012

¹³ De Beer T, Burggraeve A, Fonteyne M, Saerens L, Remon J.P, Vervaet C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. Int. J. Pharm. 2011;417:32-47

La méthodologie PAT n'a pour l'instant aucun caractère obligatoire mais pourrait constituer la référence réglementaire en termes de normalisation de l'industrie pharmaceutique dans les années à venir.

4.2. La SPIR comme un outil PAT pour l'industrie pharmaceutique

La spectroscopie proche infrarouge est une technique qui s'est révélée particulièrement adaptée pour la mise en place du PAT dans l'industrie pharmaceutique¹⁴. La SPIR permet de réaliser des analyses qualitatives et quantitatives sur les produits pharmaceutiques afin de garantir la qualité tout au long de la fabrication des médicaments.

4.2.1. Les analyses qualitatives

L'analyse qualitative par la SPIR peut se décliner selon deux axes principaux : l'identification et la qualification de matière première et l'analyse du polymorphisme. C'est un outil intéressant pour lutter contre la contrefaçon.

4.2.1.1. Identification de matières premières

L'identification des matières premières est une réelle nécessité dans l'industrie pharmaceutique. L'importance de ces tests d'identification est décrite dans les guidelines International Conference on Harmonization (ICH)¹⁵, Q2A, Q2B, Q6A et Q7A.

La spectroscopie infrarouge est une méthode particulièrement adaptée pour identifier rapidement les matières premières. En effet, à l'arrivée de la matière première il suffit de réaliser le spectre infrarouge de la matière et de le comparer au spectre de la substance de référence¹⁶. Cette acquisition de spectre peut même se faire directement à travers le contenant (sachet plastique, flacons,...). La SPIR permet donc un gain du temps comparativement aux techniques classiques de contrôle comme la CLHP. Elle limite aussi les problèmes d'inter-contamination et les longues procédures de nettoyage^{9,17}.

¹⁴ Maurer L, Leuenberger H. Terahertz pulsed imaging and near infrared imaging to monitor the coating process of pharmaceutical tablets. *Int. J. Pharm.* 2009;370:8-16

¹⁵ ICH (consulté le 29 octobre 2012)

<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>

¹⁶ Laloum E. Le proche infrarouge gagne du terrain en pharmacie. *Info pharma magazine.* 2003;6:66-68

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. *Spectra Analyse.* 2009;269:27-35

4.2.1.2. Le polymorphisme

Le polymorphisme est un paramètre important à évaluer au cours du développement d'un produit. La SPIR permet de caractériser les formes polymorphes d'une substance de manière simple et rapide en comparaison avec les méthodes plus classiques telles que la diffraction aux rayons X ou la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)².

4.2.1.3. Détection des contrefaçons

Hors de la démarche PAT, la SPIR peut aider de façon intéressante à lutter contre la contrefaçon des médicaments. La contrefaçon engendre une réelle perte financière aux industries pharmaceutiques mais elle pose surtout un véritable problème de sécurité sanitaire pour les patients.

Le spectre proche infrarouge d'un produit est le reflet de ses propriétés physiques et chimiques qui découlent de l'ensemble du procédé de fabrication et qui lui sont spécifiques. Le spectre est donc la signature d'une chaîne de production donnée. L'analyse de celui-ci permet de confirmer l'utilisation des bonnes matières premières et de la fabrication du produit dans une des usines du groupe pharmaceutique. Un médicament contrefait peut donc être repéré simplement⁹ par cette technique.

4.2.2. Les analyses quantitatives

Les applications quantitatives de la SPIR dans l'industrie pharmaceutique sont de plus en plus nombreuses et variées.

4.2.2.1. Etudes des paramètres physiques

La SPIR est utilisée dans le milieu de l'industrie pharmaceutique pour obtenir un très grand nombre de caractéristiques physiques sur les poudres ou les comprimés. De nombreux paramètres pharmaceutiques peuvent donc être analysés quantitativement par spectroscopie proche infrarouge. Cela permet le plus souvent d'évaluer les propriétés physiques des comprimés en mesurant leur dureté et leur porosité, deux paramètres clés pour maîtriser la cinétique de dissolution du

² Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

¹⁷ Van der Vlies C. The use of NIR spectrometry in the pharmaceutical QC laboratory. Eur. J. Pharm. Sci. 1994;2:79-81

comprimé⁹. La SPIR est aussi utilisée pour déterminer la répartition granulométrique et la taille médiane des particules d'une poudre ou de granulé¹⁸.

4.2.2.2. Détermination de l'uniformité de teneur

La SPIR permet également la quantification des principes actifs et des excipients présents dans différentes formes pharmaceutiques : poudres, granulé, comprimé, liquides, gels et flacons lyophilisés². Un exemple d'utilisation de la SPIR dans la quantification des substances en solution est présenté dans la suite de ce mémoire.

4.2.3. Le contrôle en ligne par la SPIR

La spectroscopie en proche infrarouge est de plus en plus utilisée sur les lignes de production des formes sèches pour contrôler toutes les étapes du procédé de fabrication.

4.2.3.1. Le mélange

L'étape de mélange des principes actifs avec les excipients est une étape critique dans la fabrication des formes pharmaceutiques solides unitaires. En général un ou plusieurs prélèvements en fin de mélange sont analysés pour vérifier l'homogénéité du mélange. L'analyse donne une teneur qui peut être affectée d'une incertitude liée à l'échantillonnage (localisation, méthode,...). La SPIR est un outil indiqué pour le contrôle en ligne en temps réel de cette étape critique. La stabilisation du spectre mesuré indique que le mélange est homogène et signe la fin du mélange¹⁹. La SPIR permet de s'affranchir des problèmes liés à l'échantillonnage et détermine le moment idéal pour arrêter le procédé. Le suivi en temps réel des différents paramètres chimiques et physiques permet de détecter les problèmes de démixage ou d'hétérogénéité des produits. Néanmoins, le positionnement de la sonde et la synchronisation de la mesure avec les mouvements au sein du

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. Spectra Analyse. 2009;269:27-35

¹⁸ Blanco M, Cueva-Mestanza R, Peguero A. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010;51:797-804

² Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

¹⁹ El-Hagrasy A.S, Drennen J.K. A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part III. Quantitative near-infrared calibration for predicting of blend homogeneity and characterization of powder mixing kinetics. J. Pharm. Sci. 2006;95(2):422-434.

mélangeur sont les deux principales difficultés pour la mise en place d'une mesure in-line par SPIR⁹.

4.2.3.2. La granulation

La granulation sèche ou humide est une étape souvent présente dans le procédé de fabrication des formes sèches.

La granulation humide est une étape critique où la quantité de solution mouillante doit être suffisante pour avoir un grain de la taille voulue. Elle ne doit pas être en excès pour ne pas surmouiller la poudre. Pour cette étape clé la SPIR présente deux avantages. Elle permet d'obtenir de l'information physique comme la taille des particules et de l'information chimique comme par exemple la concentration en eau⁹. Le signal de l'eau dans le proche infrarouge est très important au niveau de deux bandes caractéristiques : 1450nm (6896cm⁻¹) et 1940nm (5154cm⁻¹)². Un spectre complet en proche infrarouge n'est pas nécessaire pour déterminer la teneur en eau. En effet, l'utilisation de quelques longueurs d'onde autour des bandes d'absorption de l'eau est suffisante pour déterminer rapidement l'humidité de la poudre²⁰. L'humidité est donc un paramètre facile à étudier.

La SPIR peut aussi être utilisée pour suivre la granulation sèche par compacteur. La force de compaction et la distribution de taille des particules peuvent être déterminés après l'analyse des spectres acquis par SPIR²¹.

4.2.3.3. Le séchage

Dans les procédés de fabrication le séchage est le plus souvent une étape critique, comme lors d'une granulation humide ou d'une lyophilisation. De manière générale pour contrôler cette étape, l'eau est dosée selon la méthode de Karl Fischer sur un échantillon représentatif. Cependant il s'agit d'une méthode assez longue et destructive et il subsiste une incertitude sur le reste du lot produit qui n'est pas

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. Spectra Analyse. 2009;269:27-35

² Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

²⁰ Rantanen J, Räsänen E, Antikainen O, Mannermaa J.P, Yliruusi J. In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near-infrared sensor: an evaluation of process-related variables and a development of non-linear calibration model. Chemom. Intell. Lab. Syst. 2001;56:51-58.

²¹ Gupta A, Peck G.E, Miller R.W, Morris K.R. Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by Near-Infrared Spectroscopy. J. Pharm. Sci. 2004;93:1047-1053

contrôlé. La SPIR permet de suivre l'évolution de l'humidité relative au cours du séchage pour arrêter le séchage au bon moment réduisant ainsi fortement les risques de sur-séchage ou de sous-séchage^{9, 22}.

4.2.3.4. La compression

La compression est la principale étape de fabrication d'un comprimé. Elle est irréversible, il est donc important de s'assurer de la conformité du mélange introduit dans le système d'alimentation de la machine à comprimer. La SPIR est de plus en plus utilisée dans cet objectif et constitue le dernier point de contrôle du procédé avant la compression⁹.

La SPIR est une technique rapide et non destructive permettant de connaître l'uniformité de teneur du principe actif et de certains excipients, la force de compression et la dureté²³. Utilisée en ligne, la SPIR aide au pilotage de la machine à comprimer et permet de détecter rapidement d'éventuels problèmes de réglages⁹.

4.2.3.5. L'enrobage

Le pelliculage est l'une des dernières étapes de la fabrication des formes sèches. L'assurance de son intégrité et du contrôle de son épaisseur sont nécessaires pour assurer la libération de la substance active chez le patient ou la stabilité de la forme pharmaceutique². La SPIR est utilisée pour réaliser une analyse quantitative de l'enrobage des comprimés et pour déterminer son épaisseur²⁴.

4.2.3.6. La lyophilisation

La lyophilisation est une méthode de formulation très répandue dans l'industrie pharmaceutique. Elle permet de protéger certains produits de la dégradation en milieu aqueux. La SPIR permet de déterminer l'humidité résiduelle des échantillons

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. Spectra Analyse. 2009;269:27-35

²² Nieuwmeyer F.J.S, Damen M, Gerich A, Rusmini F, Van der Voort K, Vromans H. Granule characterization during fluid bed drying by development of a near infrared method to determine water content and median granule size. Pharm. Res. 2007;24:1854-1861.

²³ Tabasi S.H, Fahmy R, Bensley D, O'Brien C, Hoag S.W, 2008a. Quality by design, part I: application of NIR spectroscopy to monitor tablet manufacturing process. J. Pharm. Sci. 2008 ;97, 4040-4051.

² Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

²⁴ Andersson M, Folestad S, Gottfries J, Johansson M.O, Josefson M, Wahlund K.G. Quantitative analysis of film coating in a fluidized bed process by in-line NIR spectrometry and multivariate batch calibration. Anal. Chem. 2000;72:2099-2108

à travers les flacons en verre. C'est une technique rapide, non invasive et non destructive comparée à la titration par Karl Fischer, la thermogravimétrie ou encore la chromatographie gazeuse. Cela permet de ne pas ouvrir les contenants et donc de réduire le risque de contamination avec l'humidité atmosphérique².

La SPIR présente donc un grand potentiel pour le contrôle qualité des lyophilisats. C'est un outil de plus en plus utilisé en recherche et développement et pour la transposition d'échelle, mais les applications en production sont encore difficiles à mettre au point²⁵.

4.2.3.7. Le conditionnement

Le conditionnement est la dernière étape dans le procédé de fabrication des médicaments. Le contrôle final doit être performant. Par exemple la SPIR peut être utilisée pour vérifier à 100% la présence de comprimés dans chaque alvéole d'un blister²⁶.

4.2.3.8. Biotechnologie

Les produits biotechnologiques sont de plus en plus présents dans les industries pharmaceutiques. Les méthodes analytiques ont du et doivent s'adapter à ces nouveaux produits.

La spectroscopie en proche infrarouge est utilisée pour contrôler et maximiser la productivité des cultures cellulaires. Elle permet de mesurer la consommation des nutriments indispensables à la croissance des cellules et en parallèle, la production de déchets par les cellules².

Comme nous venons de le voir, la démarche PAT a permis à la SPIR et à la chimiométrie de se développer. Actuellement, la SPIR est principalement utilisée pour contrôler les formes solides et peu d'exemples existent pour son application aux formes liquides.

² Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007;44:683-700

²⁵ Brülls M, Folestad S, Sparen A, Rasmuson A. In-situ near-infrared spectroscopy monitoring of the lyophilization process. Pharm. Res. 2003;20:494-499

²⁶ Herkert T, Prinz H, Kovar K.A. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2001;51:9-16

L'objectif de ce travail est de mettre au point un modèle de quantification pour le dosage de substances en solution. La suite de ce mémoire explique les différentes étapes suivies pour construire l'étude : la fabrication des solutions, le dosage par la méthode de référence et le dosage par spectroscopie proche infrarouge.

MATERIELS ET METHODES

1. Le produit

Cette étude est conduite sur une solution à usage externe vétérinaire. Pour des raisons de confidentialité, la composition quantitative n'est pas donnée et les matières premières ne sont pas nommées mais appelées : A, B, C, D et E pour les constituants qui sont dosés et F et G pour les solvants utilisés.

1.1. Caractéristiques des matières premières

Le tableau ci-dessous (tableau III) regroupe les principales propriétés physicochimiques, les données de toxicité et les conditions de stockage des matières premières utilisées.

Composés	Propriétés physicochimiques	Toxicité	Stockage
A	Poudre humidifiée blanche à jaune clair Densité : 1550kg/m ³	Toxique Dangereux pour l'environnement	Protéger de l'humidité. Conserver à l'écart de la chaleur. Protéger de l'action directe des rayons de soleil. Protéger des températures supérieures à 40°C.
B	Solide jaune clair Densité : 150kg/m ³	Toxicité chroniques pour les milieux aquatiques	Bien fermer. A l'abri de la lumière.
C	Poudre cristalline, blanche, inodore Densité : 1.23g/cm ³	Toxique Dangereux pour l'environnement	Conserver en récipient bien fermé à l'abri de l'humidité et de la lumière. Conserver dans un endroit frais et bien ventilé. Stockage au froid (+2°C à +8°C) recommandé
D	Liquide clair Densité : 0.9261 à 20°C	Inflammable Dangereux pour l'environnement	Conservation à température ambiante. Température de stockage < 40°C.
E	Solide blanc Densité : 450kg/m ³	Sans danger	Conserver les récipients hermétiquement fermés, à l'abri de l'humidité dans un endroit frais et bien ventilé. Température de stockage < 40°C.
F	Liquide incolore	Non dangereux	Endroit sec et bien ventilé.
G	Liquide clair, odeur caractéristique Densité : 1.16 à 20°C	Non dangereux	Conserver hermétiquement fermé dans un endroit sec, frais et bien ventilé.

Tableau III : Caractéristiques des matières premières utilisées (extrait de documents internes)

1.2. Consignes de sécurité spécifiques au produit

Plusieurs matières premières utilisées sont toxiques pour l'homme. Les Equipements de Protection Individuels (EPI) suivants sont utilisés pour l'ensemble des étapes de fabrication du produit (pesées, fabrication, conditionnement) :

- Chaussures de sécurité,
- Combinaison Tyvek[®],
- Cagoule ventilée reliée à un caisson d'air respirable,
- Gants en nitrile double épaisseur : changer une paire entre chaque matière manipulée, en cas de souillures ou à défaut toutes les 20 minutes.

1.3. Le plan d'expériences

Le produit à analyser contient cinq substances à doser : A, B, C, D et E. Une gamme d'étalonnage pour chaque substance est réalisée afin d'établir un modèle performant dans le proche infrarouge. Pour les gammes d'étalonnage, cinq concentrations sont choisies : 80, 90, 100, 110 et 120% de la valeur nominale selon la guideline ICH Q2(R1)²⁷. En effet, pour la construction du modèle, il est nécessaire de faire varier chaque principe actif indépendamment des autres. Ainsi, il est plus aisé de déterminer la zone spectrale variant avec la concentration de la substance d'intérêt.

De plus, dix solutions où les concentrations des différentes matières dosées (substances A, B, C, D et E) varient de 80 à 120 % autour de la valeur nominale de 100% (m/m) sont ajoutées au modèle. Les concentrations de chaque substance sont choisies de façon aléatoire. Ces solutions apportent une variabilité supplémentaire nécessaire pour établir le modèle de quantification en proche infrarouge.

La mise en place des essais en proche infrarouge nécessite de collecter des échantillons titrés par la méthode de référence, la CLHP. Une bibliothèque spectrale est alors créée à partir de l'ensemble des solutions fabriquées et disponibles. Les signaux sont ensuite traités et analysés afin d'établir un modèle de quantification dans le proche infrarouge pour chaque substance.

Pour des raisons techniques, les solutions nécessaires sont fabriquées selon deux approches différentes :

- Pour la gamme de la substance C et pour les solutions aux concentrations variables : 2000 g de solution sont fabriqués d'après les premiers essais réalisés par Merial® en 2011. Pour cette fabrication le protocole suivi est détaillé au paragraphe : « 1.4.1 la fabrication complète du produit (lot de 2000 g) ». Cette option est longue, demande de nombreuses manipulations et de grande quantité de matières premières. Cela est néanmoins nécessaire pour arriver à dissoudre dans un temps convenable la substance C.
- Pour la gamme des substances A, B, D et E : une solution de 2000 g à 80% de la matière d'intérêt est fabriquée. La solution à 80% préalablement préparée a été supplémentée par 10, 20, 30 et 40% avec la matière d'intérêt

²⁷ ICH (consulté le 29/10/2012)

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

pour fabriquer 380 g. Pour cette fabrication le protocole suivi est détaillé au paragraphe : « 1.4 les procédés de fabrication ». Ce procédé est mis au point lors des premières fabrications de ces lots. Cette solution permet de réduire le temps de manipulation et de réaliser des lots plus petits. Cette option est possible car ces matières se dissolvent plus facilement même avec une agitation moins importante.

Les calculs suivants sont réalisés afin de construire les fiches de fabrication de chaque solution. La quantité centésimale de la matière à analyser est ajustée en fonction du point de la gamme d'étalonnage fabriqué. Puis, la quantité nécessaire pour un lot de 2000 g ou de 380 g est calculée pour enfin l'ajuster avec le titre de la matière utilisée.

- Calcul du point variable de la formule centésimale :

$$m_{\text{substance d'intérêt}} = \frac{\text{point de la gamme} * m_{\text{substance d'intérêt}} (100\%)}{100}$$

- Calcul de la quantité de matière pour un lot :

$$m_{\text{substance d'intérêt}} = \frac{m_{\text{substance d'intérêt}} (\text{formule centésimale}) * \text{taille du lot à fabriquer}}{100}$$

- Ajustement de la quantité de matière à peser avec son titre :

$$m_{\text{substance d'intérêt ajustée}} = \frac{m_{\text{substance d'intérêt à mettre en oeuvre}} * 100}{\text{titre de la matière}}$$

1.4. Les procédés de fabrication

Pour la fabrication des échantillons de laboratoire, l'étude des premiers essais réalisés à l'échelle « paillasse » au sein de l'Assistance Technique de Production (ATP) pharmaceutique l'année dernière a été réalisée. Le procédé de fabrication suit les étapes suivantes :

- pesée des matières premières,
- introduction des matières premières,
- mélange et homogénéisation de la solution,
- conditionnement et étiquetage,
- nettoyage.

1.4.1. La fabrication complète du produit (lot de 2000 g)

Des lots de 2 000 g sont réalisés pour tous les points de la gamme d'étalonnage de la substance C et pour les gammes avec les concentrations variables en principe actif. De plus une solution de 2 000 g est réalisée à 80% pour les substances A, B, D et E.

1.4.1.1. Installation du poste de travail

Les manipulations sont réalisées sous une hotte mobile avec filtre à solvants pour limiter les rejets de vapeur de solvants dans le laboratoire. L'Ultraturax[®] avec un rotor stator comme mobile d'agitation est utilisé pour réaliser les solutions. L'afficheur de vitesse est relié à l'Ultraturax[®] pour contrôler de façon précise la vitesse de rotation de l'agitateur. Une sonde de température est installée sous la hotte pour suivre la température de la solution au cours de la fabrication (figure 16).



Figure 16 : Installation du poste de travail pour les lots de 2 000 g.

1.4.1.2. Le procédé de fabrication pour un lot de 2 000 g

D'après les essais réalisés l'année dernière, le procédé de fabrication suivant est mis en œuvre (tableau IV) :

Opérations	N° de l'étape	Spécifications	Contrôles
Solvant (Substance G)	1		
Co-Solvant (Substance F)	2	900 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Conservateur (Substance E)	3	1500 tr/min 3000 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'introduction Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Principe actif (Substance B)	4	3000 tr/min 4000 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'introduction Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Principe actif (Substance A)	5	3000 tr/min 4000 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'introduction Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Principe actif (Substance C)	6	4000 tr/min 6000 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'introduction Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Principe actif (Substance D)	7	2000 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Conditionnement	8		Flacons 50 et 100 ml, verre brun de type 2 non siliconés

Tableau IV : Procédé de fabrication pour un lot de 2 000g

1.4.2. Le procédé de fabrication pour un lot de 380 g

Les lots de 380 g sont fabriqués en supplémentant une solution de produit préparée préalablement à 80% en substance d'intérêt. Ce procédé est appliqué pour la gamme d'étalonnage des substances A, B, D et E.

1.4.2.1. Installation du poste de travail

Les manipulations sont réalisées sous une hotte mobile avec un filtre à solvants afin de limiter les rejets de vapeur de solvants dans l'atmosphère. Une agitation magnétique avec un barreau aimanté est utilisée lors de la fabrication des lots. Une sonde de température est installée sous la hotte afin de suivre la température de la solution au cours de la fabrication (figure 17).

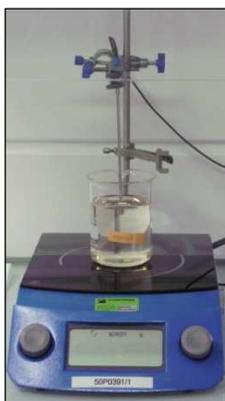


Figure 17 : Installation du poste de travail pour les lots de 380 g

1.4.2.2. Procédé de fabrication pour un lot de 380 g

Le procédé de fabrication suivant a été mis au point pour la fabrication des lots de 380 g (tableau V):

Opérations	N° de l'étape	Spécifications	Contrôles
Introduction de la solution à 80%	1		Température
Introduction de la matière d'intérêt	2	250 tr/min 350 tr/min	Température Vitesse de rotation Temps d'introduction Température Vitesse de rotation Temps d'agitation
Filtration	3	Filtre seringue Acrodisc® (5µm) avec une membrane Versapor®	
Conditionnement	4		Flacons 50 et 100 ml, verre brun de type 2 non siliconés

Tableau V : Procédé de fabrication pour un lot de 380g

1.4.3. La documentation associée à la fabrication de lot

Pour assurer une traçabilité de toutes les préparations réalisées un dossier de fabrication ATP est constitué en accord avec la procédure interne au service. Il contient les éléments suivants :

- une fiche de fabrication avec les informations suivantes :
 - o le nom du produit et son numéro de lot ;
 - o la forme galénique et la quantité mise en œuvre ;
 - o la date de pesée et de fabrication ;
 - o le nom et le visa des opérateurs ;
 - o l'objectif de l'essai ;
 - o la formule du produit (nom de la matière, titre, numéro de lot, formule centésimale, formule théorique à mettre en œuvre, formule réellement mise en œuvre) ;
 - o le vérificateur de la formule et du dossier ;
 - o le vérificateur du dossier complet.
- les tickets des pesées :
 - o nom du produit préparé ;
 - o numéro de lot du produit préparé ;
 - o date de la pesée ;
 - o nom de la matière ;
 - o visa du manipulateur.
- le détail des calculs ;
- les certificats d'analyses des matières premières ;
- la copie du cahier de laboratoire ou le dossier paillasse du suivi de fabrication qui explique et détaille la manipulation réalisée ;
- le certificat d'analyse du produit fabriqué.

2. Le dosage par CLHP

Les cinq substances (A, B, C, D et E) sont dosées par CLHP. Les substances B, C et E sont dosées sur une première chaîne de chromatographie et les substances A et D sont quantifiées sur une seconde chromatographie avec des caractéristiques différentes.

2.1. La conformité du système chromatographique

Avant d'effectuer les analyses des échantillons, la conformité du système ou « suitability test » est réalisée. La démarche est identique pour les deux systèmes chromatographiques utilisés. Sept tests sont ainsi réalisés au début de chaque séance. La conformité du système est validée si tous les tests sont satisfaisants. Au total 13 injections sont nécessaires pour cette première étape.

2.2. Le déroulement des analyses

Les analyses des échantillons sont réalisées par séance. Pour cela la séquence d'analyse suivie est :

- Injection de la première solution de référence
- Injection de huit échantillons au maximum lors d'une séance
- Injection de la première solution de référence.

Pour valider chaque séance, le pourcentage sur la différence des surfaces des deux injections de la solution de référence ne doit pas être supérieur à 2%.

Plusieurs séances peuvent être réalisées les uns à la suite des autres tant que le système chromatographique n'est pas arrêté.

2.3. Les systèmes chromatographiques utilisés

Le premier système chromatographique permet de doser les substances B, C et E. La colonne chromatographique utilisée est une colonne en acier inoxydable de 150 mm avec un diamètre intérieur de 3.0 mm, remplie d'une suspension de gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R. L'analyse chromatographique se fait à l'aide d'un gradient binaire de phase mobile.

Après l'équilibration de la colonne avec la phase mobile, 65 minutes sont nécessaires pour réaliser une analyse. Pour vérifier la conformité du système environ 15 heures d'analyses sont requises. Un « bracketing » avec huit échantillons demande lui environ 11 heures d'analyses.

Le second système chromatographique permet de doser les substances A et D.

La colonne chromatographique utilisée est une colonne en acier inoxydable de 150 mm avec un diamètre intérieur de 3.0 mm, remplie d'une suspension de gel de silice octadécylsilylée pour chromatographie R. L'analyse chromatographique se fait à l'aide d'un gradient binaire de phase mobile.

Après l'équilibration de la colonne avec la phase mobile, il faut 35 minutes pour réaliser une analyse. Pour vérifier la conformité du système il faut environ 8 heures. Un « bracketing » avec huit échantillons demande lui environ 6 heures d'analyses.

2.4. Bilan

La préparation des échantillons est simple pour analyser le produit fini. Cependant, le temps d'analyse est très long pour chaque échantillon. L'analyse des chromatogrammes quand à elle est longue et compliquée car de très nombreux pics sont présents sur les chromatogrammes. Les résultats sont vérifiés par deux techniciens de laboratoire avant d'être validés par le responsable des analyses.

3. Le dosage par spectrophotométrie proche infrarouge

3.1. Le spectrophotomètre infrarouge ABB Bonem®

Le spectrophotomètre infrarouge utilisé pour l'étude est le spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier, modèle MB 160 de la société ABB Bomem®(figure 18).

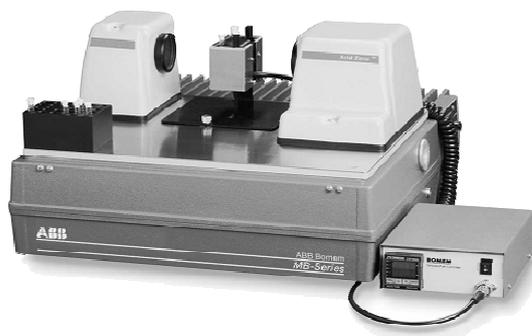


Figure 18 : Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier, modèle MB 160, ABB Bonem®

Les spécifications techniques du modèle MB 160 sont les suivantes (figure 19) :

- Une gamme spectrale comprise entre 3800 et 14000 cm^{-1}
- Une résolution spectrale (plus petite variation de mesure que peut déceler un appareil de mesure) maximale de 1 cm^{-1} .

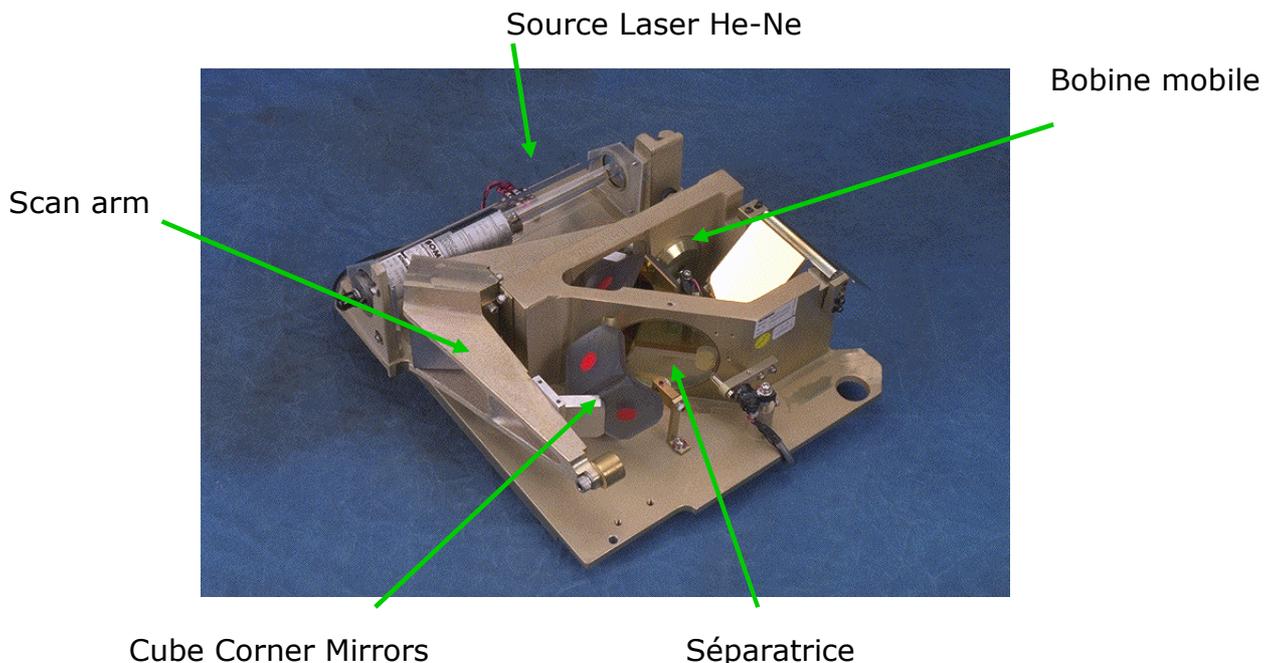


Figure 19 : Conception intérieure de l'interféromètre proche infrarouge à transformée de Fourier, MB 106 ABB Bomem®

3.2. L'acquisition des spectres en proche infrarouge

Aucune préparation des échantillons n'est nécessaire pour acquérir les spectres en proche infrarouge. La solution est prélevée avec une pipette pasteur pour remplir un tube en verre d'analyse fermé par un bouchon.

Les tubes contenant les solutions à analyser sont déposés dans un portoir thermorégulé à 28°C. Cela permet d'acquérir l'ensemble de la collection spectrale dans les mêmes conditions de température. Ainsi, le facteur température est maîtrisé et n'influence pas le spectre obtenu.

L'acquisition spectrale est réalisée avec une résolution de 32 cm^{-1} , 128 scans en mode absorbance. L'analyse de chaque échantillon dure environ une minute.

3.3. Le prétraitement des données spectrales²⁸

Un prétraitement des données spectrales est nécessaire pour réduire l'effet des déformations incontrôlées des spectres ou celui des déformations aléatoires (présence d'un bruit aléatoire par exemple). Le prétraitement des données permet d'améliorer le signal pour une bonne exploitation des données spectrales par les méthodes chimiométriques.

²⁸ Formation ABB. Etablissement d'un étalonnage Quantitatif / Qualitatif avec PLSplus/IQ. Réalisée le 15/02/2012

3.3.1. La correction de la ligne de base

Lors de l'acquisition spectrale d'un échantillon des dérives d'intensité apparaissent sur le spectre. Elles sont causées par des phénomènes intrinsèques ou étrangers à l'expérience (la lumière extérieure par exemple). Elles sont à l'origine d'une ligne de base.

La correction de la ligne de base est une modélisation du bruit de fond pour le soustraire au signal observé. En effet, le spectre observé est la somme d'un signal correspondant à des variations incontrôlées (fond) et d'un signal utile contenant l'information spectrale.

Il faut ainsi choisir les conditions qui donneront le meilleur spectre corrigé. Les points sont sélectionnés à un endroit du spectre où aucune bande d'absorption n'est observée.

3.3.2. La normalisation

De manière générale les spectres présentent des variations incontrôlées d'intensité générale. Ainsi l'intensité du signal mesurée des spectres de liquides acquise en transmission dépend principalement de la longueur du trajet optique à travers la cuve de mesure. Quand le trajet est très court il est difficile d'avoir des conditions d'acquisition parfaitement reproductibles.

Pour ce prétraitement il est important de choisir une bande isolée correspondant à un composant fixe ou à une bande qui ne varie pas d'intensité, quelque soit la concentration des échantillons.

La normalisation revient à diviser la valeur de chaque variable d'un spectre par un nombre représentatif de l'intensité générale de ce spectre. La normalisation réduit ainsi les variations d'intensité générale.

3.3.3. La sélection de la région spectrale

La sélection de la région spectrale permet de cibler la zone pertinente pour le calcul du modèle. Cette sélection est aidée par l'affichage de la corrélation sur les spectres entre la variation du signal et la propriété (substance d'intérêt) à doser. Ainsi les zones où les signaux sont faibles, inexistantes ou ne varient pas en fonction de la concentration de la substance à doser, sont exclues du modèle.

3.3.4. L'évaluation des résultats

Une fois les prétraitements et la sélection de la région spectrale réalisés le calcul de l'expérience peut être réalisé avec le logiciel mathématique. Dans le cadre de cette étude, le logiciel chimométrique utilisé est le logiciel AIRS PLS Plus IQ®.

L'analyse des résultats des expériences pour la sélection du meilleur modèle est basée sur l'exploitation de plusieurs graphiques : PRESS, SECV, Actual concentration vs Predicted concentration, Leverage vs Studentized residual ...

Ces graphiques sont permettent de déterminer le meilleur modèle. Il est donc possible de démontrer la corrélation entre la méthode de référence analytique (CLHP) et la méthode de prédiction par SPIR.

3.3.4.1. PRESS : Predicted Error Sum of Squares ou somme des carrés des erreurs d'estimation

Le graphique PRESS permet de suivre la somme des carrés des erreurs de prédiction en fonction du nombre de variables latentes introduites dans un modèle PLS pour la prédiction de la variable étudiée.

3.3.4.2. SECV : Standard Error of Cross-Validation ou erreur standard des validation croisées

Le graphique SECV permet de sélectionner le nombre de facteurs par validation croisée nécessaire pour établir un modèle de quantification. Il est le reflet de l'exactitude du modèle ou de l'estimation de l'incertitude (l'écart type des écarts).

3.3.4.3. Actual concentration Vs Predicted concentration : valeurs réelles contre valeurs estimées pour les variables expliquées

Le graphique Actual concentration vs Predicted concentration permet de visualiser la droite qui s'ajuste au mieux au nuage de points (représentation des données). La droite obtenue est celle qui rend minimale la somme des carrés des écarts des valeurs observées à la droite. Cet écart est aussi appelé résidu. Ce graphique donne aussi le coefficient de détermination R^2 . Il est également possible de repérer les points aberrants.

3.3.4.4. Sample leverage vs Studentized residual : valeurs leviers contre valeurs résiduelles étudiées

Les diagrammes des résidus permettent de détecter les points atypiques ou « outliers » qui pourraient nuire à la qualité de l'ajustement du modèle. Ce graphique montre le résidu d'un échantillon en fonction de son poids. Un point jugé comme aberrant possède un poids élevé et un fort résidu. Il contribuera fortement à la construction du modèle. Ces points se retrouvent en haut à droite et en bas à gauche sur le graphique (figure 20).

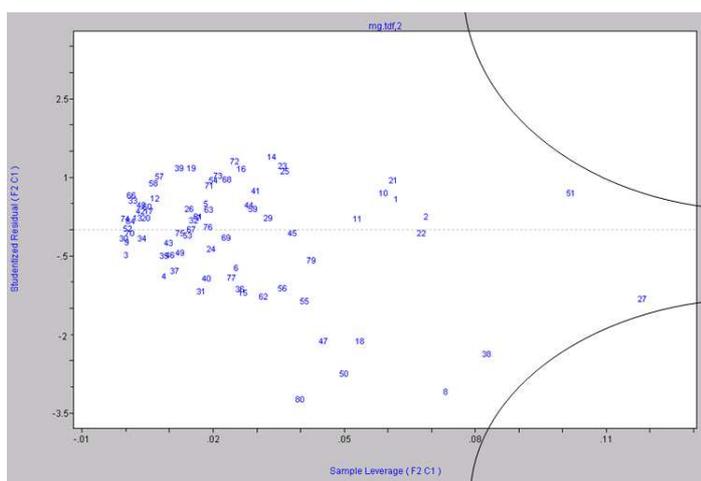


Figure 20 : Exemple du graphe Sample leverage vs Studentized residual

Nous venons de décrire la méthode suivie selon trois étapes principales : la fabrication des solutions, l'analyse des échantillons par CLHP et l'acquisition des spectres par SPIR.

La suite de ce travail explique de façon précise les différentes étapes à réaliser pour mettre au point le modèle de calibration de la substance A. La mise au point des modèles de calibration des substances B, C et D sera décrite dans un second temps plus succinctement.

RESULTATS

1. Le modèle de calibration de la substance A

1.1. Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance A

Les résultats sont donnés en pourcentage de la teneur théorique de l'échantillon. Les titres des 20 solutions fabriquées (2 gammes d'étalonnage avec 5 points et 10 solutions avec des concentrations variables) sont regroupés dans le graphique suivant (figure 21).

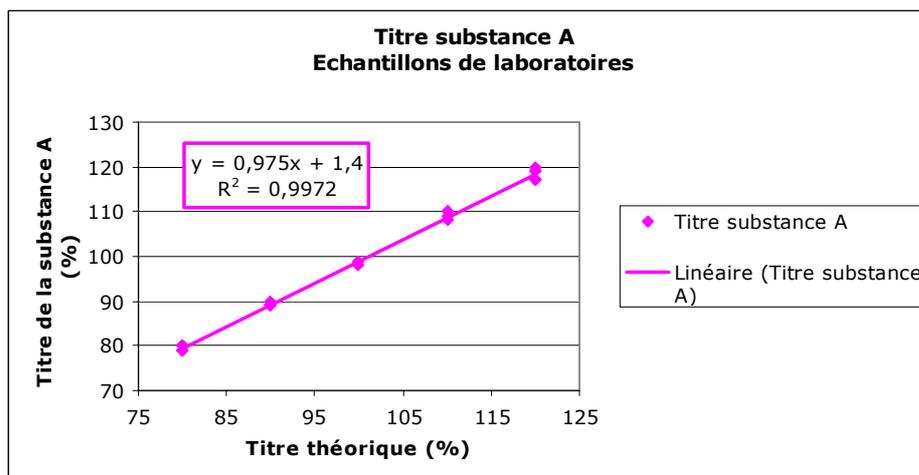


Figure 21 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance A

Il existe une forte corrélation entre le titre théorique et le titre mesuré ($R^2 = 0.9972$). L'équation de la droite est : $Y = 0.975x + 1.4$

1.2. La préparation des données brutes

La démarche pour la préparation des données brutes est expliquée pour la substance A. Seul le bilan des prétraitements sera décrit pour les autres substances.

A partir des spectres, un fichier Excel[®] reliant le nom des spectres au titre de la propriété (concentration de la substance A) mesurée par CLHP est généré. A l'aide du logiciel chimiométrique AIRS PLS PlusIQ[®], une matrice (extension « .tdf ») est créée à partir du fichier Excel.

Avant de débiter les prétraitements pour la détermination du modèle de la propriété, il convient, si le nombre de spectres n'est pas trop important, de les observer un à un (figures 22 et 23). Le spectre d'un échantillon est l'empreinte

digitale de ce dernier. Le spectre d'un échantillon contenant un mélange de produits représente l'addition des spectres de chaque molécule lorsqu'il n'y a pas de réaction chimique entre elles.

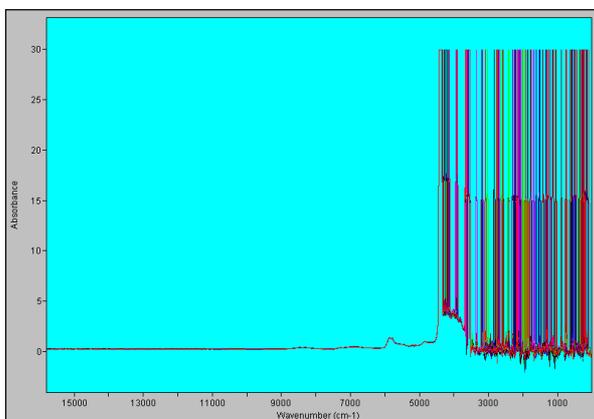


Figure 22 : Collection spectrale des échantillons pour la substance A

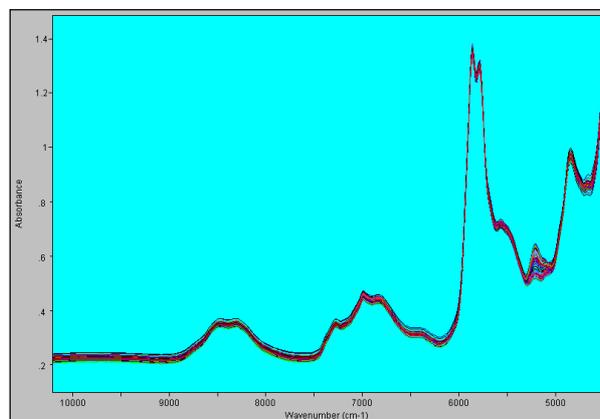


Figure 23 : Zoom sur la région spectrale d'intérêt (substance A)

1.2.1. Les prétraitements

Plusieurs expériences sont menées sur la collection de spectres de laboratoire et de production. Les expériences sont réalisées sur la matrice créée précédemment (fichier « .tdf »).

Certains paramètres restent identiques quelque soit l'expérience menée :

- la variation croisée,
- le nombre d'échantillons, ici 49
- le nombre de constituants, ici un, la substance A

La fonction PLS1 permet de réaliser une quantification de la propriété.

1.2.2. La corrélation

L'affichage de la corrélation permet d'aider à choisir les prétraitements et la région spectrale d'intérêt. La courbe bleue représente la corrélation entre les variations spectrales et la propriété à modéliser (figures 24 et 25).

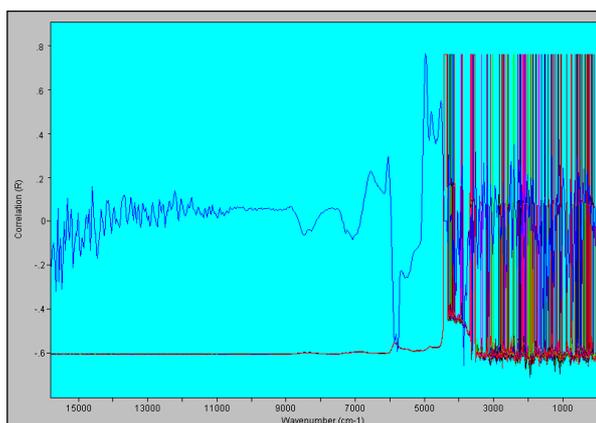


Figure 24 : Collection spectrale avec l'affichage de la corrélation pour la substance A (courbe bleue)

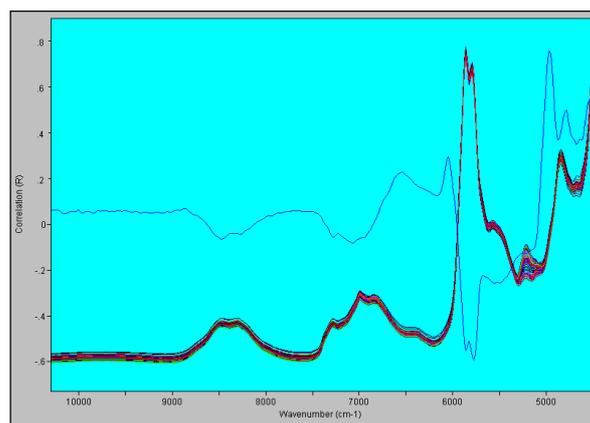


Figure 25 : Zoom sur la région spectrale d'intérêt avec l'affichage de la corrélation pour la substance A

1.2.3. La correction de la ligne de base

La correction de la ligne de base peut se faire en une ou deux régions sur le spectre, par le calcul de la moyenne des points sélectionnés. Après plusieurs essais, une seule correction de la ligne de base est réalisée de 10452.43 cm^{-1} à 8921.219 cm^{-1} (en bleu sur les graphiques) (figures 26 et 27).

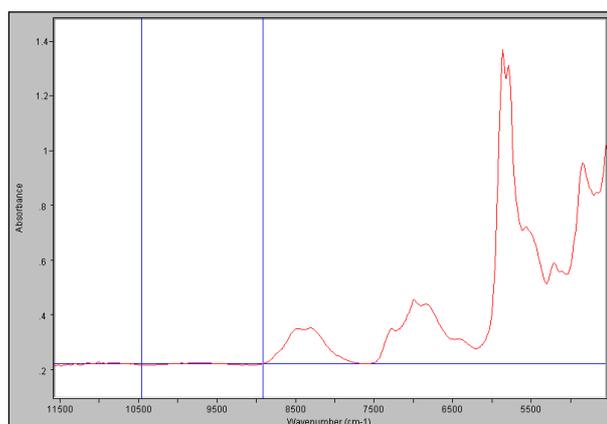


Figure 26 : Correction de la ligne de base pour la substance A

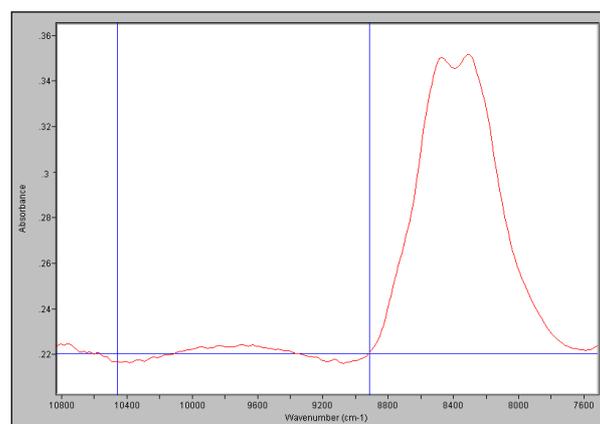


Figure 27 : Zoom sur la correction de la ligne de base pour la substance A

1.2.4. La normalisation

Ensuite, un second prétraitement est effectué : la normalisation. Elle est réalisée sur un pic du spectre dont la forme (l'intensité) ne varie pas en fonction des variations de la propriété étudiée.

Pour sélectionner la zone de normalisation, trois paramètres sont déterminés :

- la correction de la ligne de base à gauche du pic (moyenne des points) : de 9109.135 cm^{-1} à 8854.535 cm^{-1} (en bleu (figures 29 et 30)),
- la correction de la ligne de base à droite du pic (moyenne des points) : de 7750.55 cm^{-1} à 7475.936 cm^{-1} (en bleu (figures 29 et 30)),

- la sélection du pic pour la normalisation (calcul de l'aire) : de 8997.55 cm^{-1} à 7652.518 cm^{-1} (en vert (figures 28 et 29)).

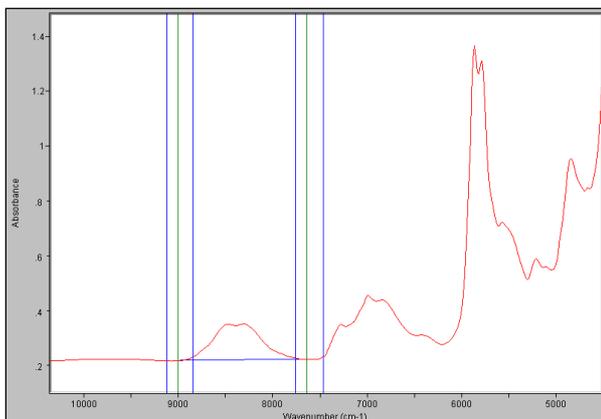


Figure 28 : Sélection du pic pour la normalisation pour la substance A

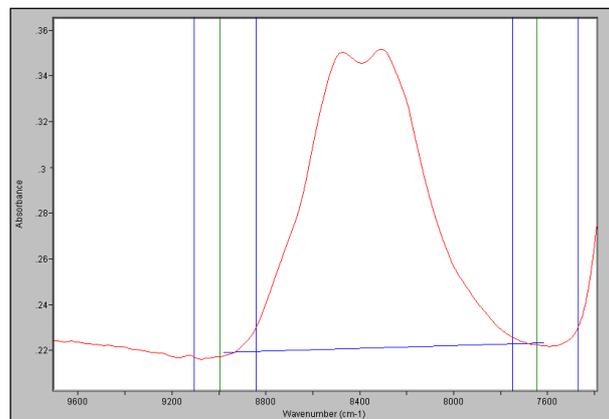


Figure 29 : Zoom sur la sélection du pic pour la normalisation pour la substance A

1.2.5. La sélection de la région spectrale d'intérêt

Enfin, lorsque les prétraitements (ligne de base et normalisation) sont effectués, il est nécessaire de sélectionner la région spectrale utilisée par le logiciel pour calculer le modèle. La corrélation permet de choisir la région spectrale la plus pertinente pour quantifier la propriété.

Après plusieurs essais, deux régions d'informations sont sélectionnées afin d'établir le modèle (figures 30, 31, 32 et 33) :

- de $6912.36884 \text{ cm}^{-1}$ à $5631.72907 \text{ cm}^{-1}$
- de $5307.71178 \text{ cm}^{-1}$ à $4659.67721 \text{ cm}^{-1}$

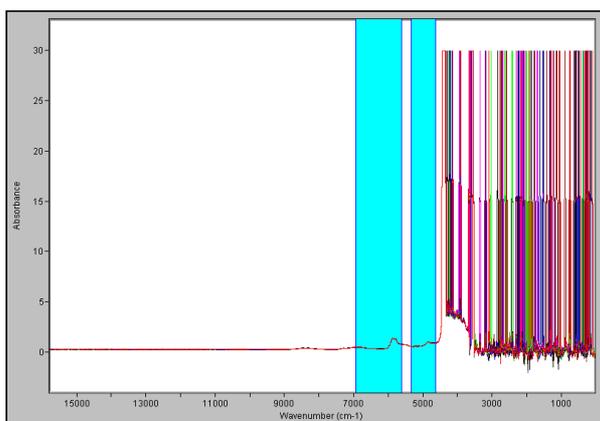


Figure 30 : Sélection de la région d'information pour la substance A

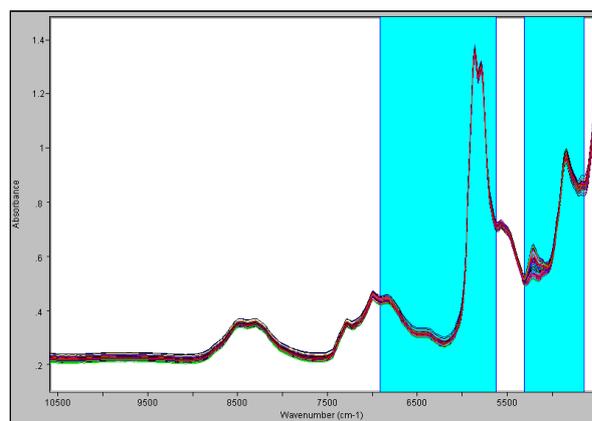


Figure 31 : Zoom sur la sélection de la région d'information pour la substance A

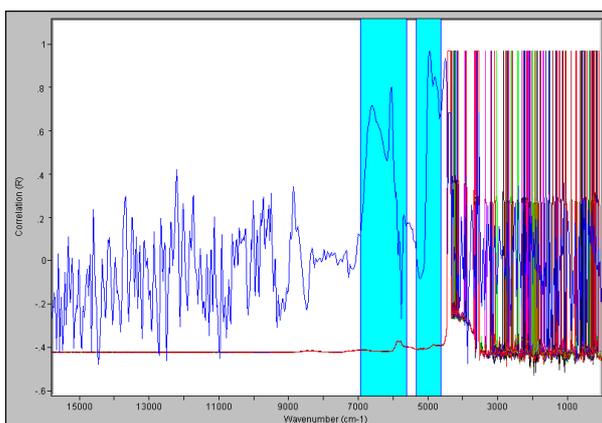


Figure 32 : Evolution de la corrélation après les prétraitements et la sélection de la région d'information pour la substance A

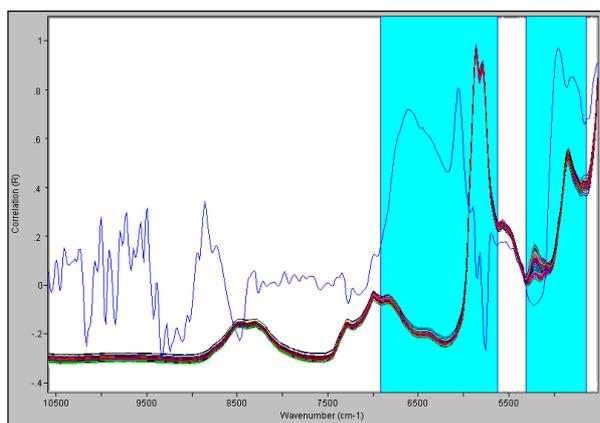


Figure 33 : Evolution de la corrélation après les prétraitements et le zoom sur la sélection de la région d'information pour la substance A

1.3. Les résultats de l'expérience la plus pertinente

Les graphiques PRESS et SECV (estimation de l'incertitude) permettent de déterminer le nombre de facteurs nécessaires à la création du modèle. Le modèle propose 5 facteurs pour cette expérience (figures 34 et 35).

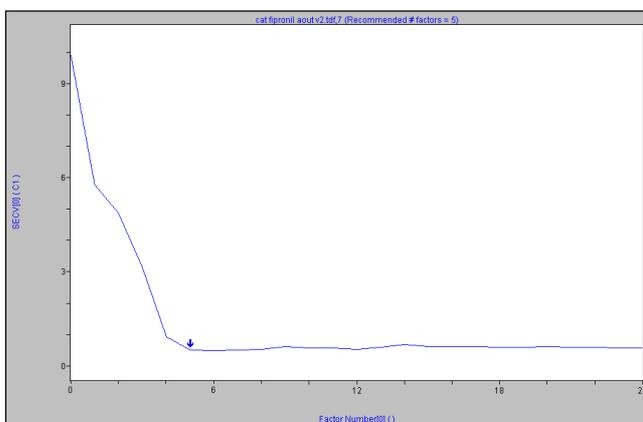


Figure 34 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance A

Factor Number	SECV(0)	F-Ratio (PRESS)	F-Test
0	9.92121644	405.775272	1
1	5.78076076	137.760821	1
2	4.87558081	97.9960221	1
3	3.17002236	41.4267038	1
4	.919122112	3.48258846	.99993
5	.500251073	1.03164858	.54209
6	.492518032	1	.5
7	.503001068	0	0
8	.530275481	0	0
9	.610303405	0	0
10	.566920894	0	0
11	.562736941	0	0
12	.525374754	0	0
13	.603289123	0	0
14	.678533145	0	0
15	.618453421	0	0
16	.612558643	0	0
17	.613194557	0	0

Figure 35 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour le facteur A

Le SECV est le reflet de l'exactitude du modèle. Sa valeur doit être faible. Il se stabilise pour un nombre de facteur égal à 5. Pour la suite de l'élaboration du modèle, 5 facteurs sont utilisés.

Le graphique Actual concentration vs Predicted concentration est la représentation des valeurs prédites par le modèle en fonction des valeurs de référence (figure 36).

Sur cette représentation, on peut repérer et éliminer les points aberrants. Cela permet également de mettre en évidence une corrélation entre les deux méthodes.

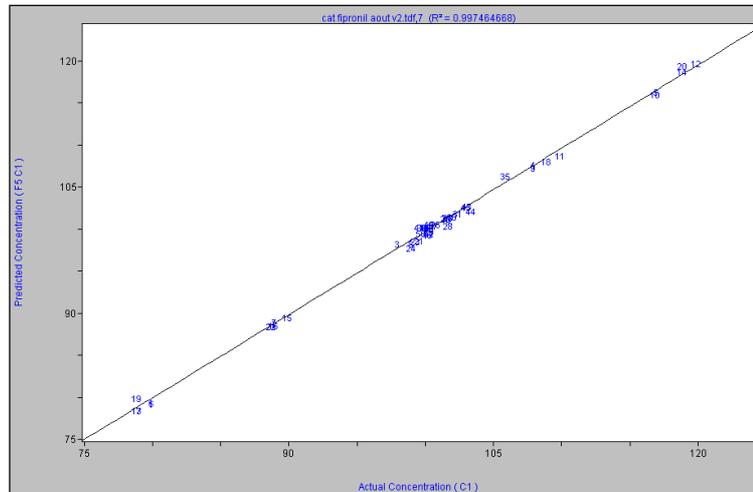


Figure 36 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance A (5 facteurs)

Le graphique Actual concentration vs Predicted concentration pour 5 facteurs indique un coefficient de détermination R^2 de 0.9975. Il semble donc y avoir une bonne corrélation entre les méthodes analytique CLHP et SPIR. Aucun point aberrant n'est repéré sur ce graphique (figure 36).

Enfin, le graphique leverage vs studentized residual montre le résidu d'un échantillon en fonction de son poids (contribution au modèle). C'est un autre moyen de repérer les points aberrants d'un modèle (figure 37).

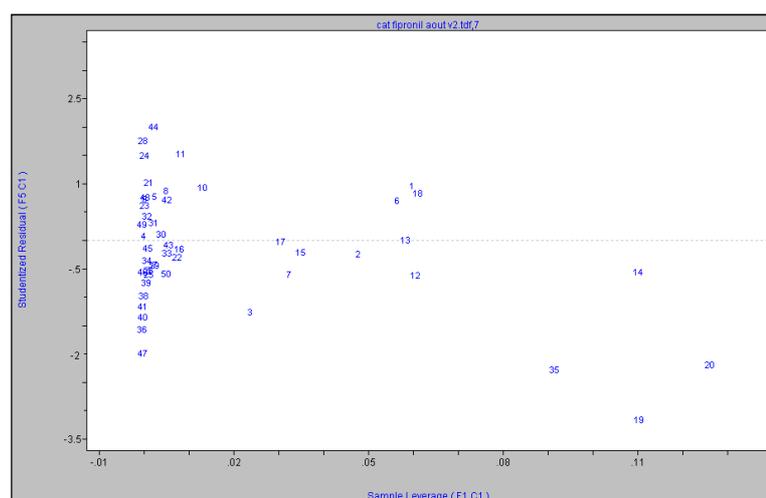


Figure 37 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance A (5 facteurs)

Le graphique sample leverage versus studentized residual pour 5 facteurs indique deux points comme aberrants le 19 et le 20. Néanmoins, ils n'ont pas été détectés comme aberrants sur le graphique Predicted concentration versus Actual concentration. De plus, ces points correspondent à des spectres de solution avec une valeur extrême en substance A (80% pour le 19 et 120% pour le 20). Les points correspondant aux concentrations extrêmes ont souvent un poids important dans la construction d'un modèle. Ces points ne sont pas exclus du modèle.

1.4. Le bilan du modèle de calibration de la substance A

Pour valider le modèle, il convient de faire la représentation graphique des valeurs prédites (données par le modèle de quantification) en fonction des valeurs de référence (déterminées par CLHP) (figure 38).

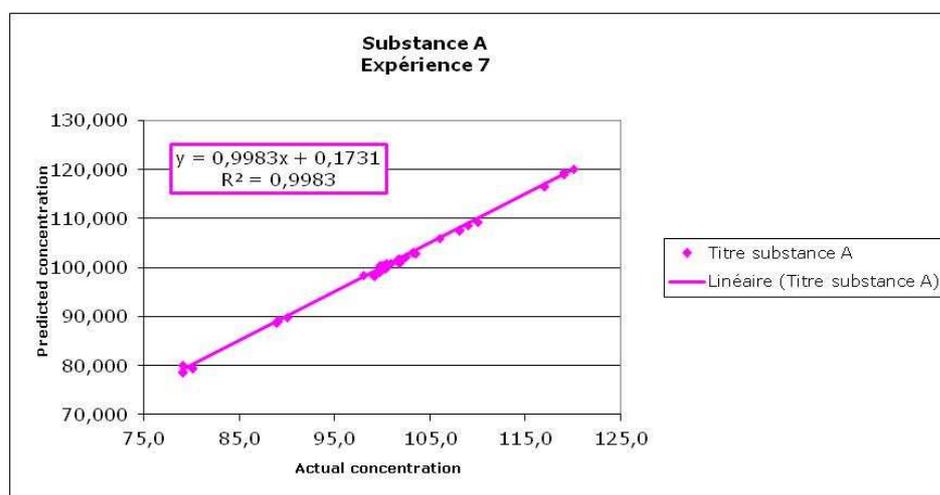


Figure 38 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par la CLHP pour la substance A

Le modèle de calibration de la substance A possède les caractéristiques suivantes :

- équation de la droite : $y = 0.9983x + 0.1731$
 - o Le coefficient directeur est proche de 1
 - o L'ordonnée à l'origine est proche de 0
- le coefficient de détermination : $R^2 = 0.9983$
- le nombre de facteurs : 5

2. Le modèle de calibration de la substance B

2.1. Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance B

Les résultats sont donnés en pourcentage de la teneur théorique de l'échantillon. Les titres des 20 solutions fabriquées (2 gammes d'étalonnage avec 5 points et 10 solutions avec des concentrations variables) sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure 39).

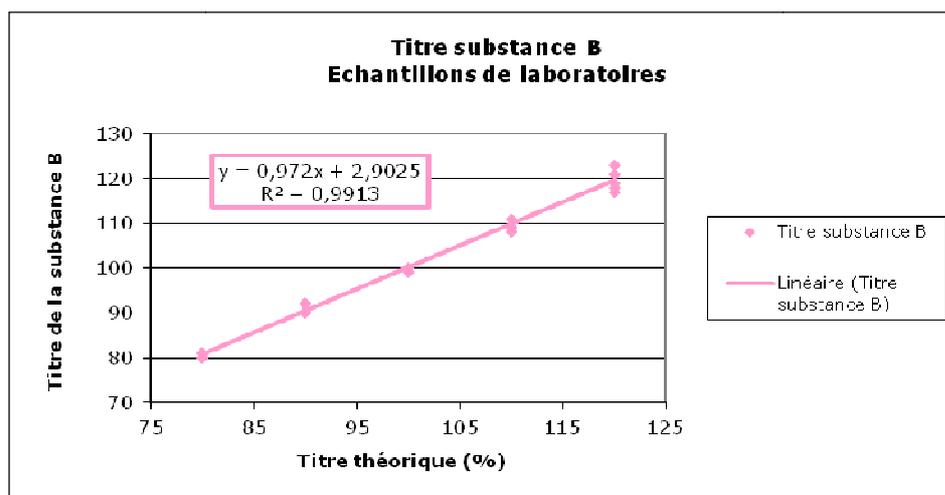


Figure 39 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance B

Il existe une forte corrélation entre le titre théorique et le titre mesuré ($R^2 = 0.9913$). L'équation de la droite est : $y = 0.972x + 2.9025$

2.2. La préparation des données brutes

Plusieurs expériences sont menées sur la collection de spectres de laboratoire et de production. Certains paramètres restent identiques quelque soit l'expérience menée :

- la variation croisée,
- le nombre d'échantillons, ici 50,
- le nombre de constituants, ici un, la substance B.

Plusieurs prétraitements sont nécessaires pour préparer et uniformiser les spectres.

- Dans un premier temps, la correction de la ligne de base peut être réalisée en un ou deux points sur le spectre. Pour le modèle de calibration de la

substance B, une seule correction de la ligne de base est réalisée de 6217.03 cm^{-1} à 6189.53 cm^{-1} .

- Un second prétraitement est réalisé, il s'agit de la normalisation. Elle est effectuée sur un pic du spectre dont la forme (l'intensité) ne varie pas en fonction des variations de la propriété étudiée. La normalisation est réalisée de 9004.52 cm^{-1} à 7639.415 cm^{-1} .
- Une fois les prétraitements réalisés, il faut sélectionner la région spectrale utilisée par le logiciel pour calculer le modèle. La corrélation permet de choisir la région spectrale la plus pertinente pour la propriété.

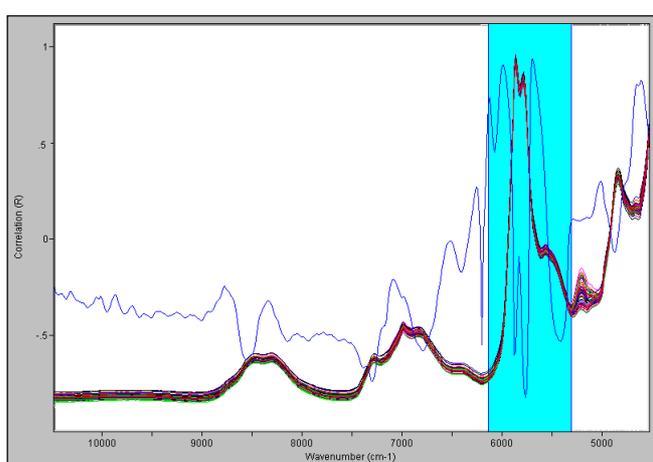


Figure 40 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance B

Deux régions d'informations sont sélectionnées pour établir le modèle (en bleu (figure 40) :

- de 6912.369 cm^{-1} à 5631.729 cm^{-1}
- de 5307.712 cm^{-1} à 4659.677 cm^{-1}

2.3. Les résultats de l'expérience la plus pertinente

Les graphiques PRESS et SECV (estimation de l'incertitude) permettent de déterminer le nombre de facteurs nécessaire pour créer le modèle. Le modèle propose 9 facteurs (figures 41 et 42).

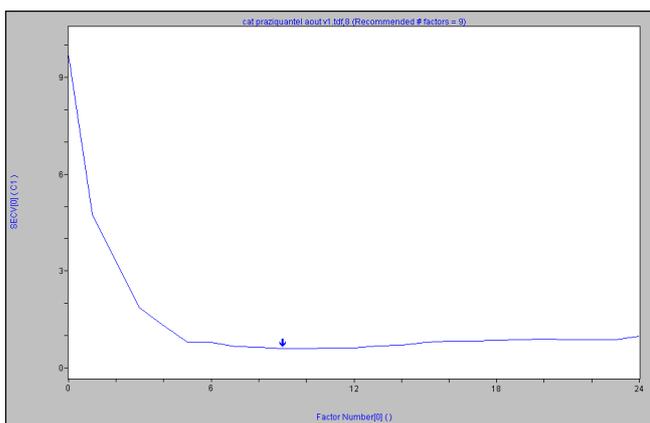


Figure 41 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance B

Factor Number	SECV[0]	F-Ratio (PRESS)	F-Test
0	9.63861587	261.980124	1
1	4.74987704	63.6214748	1
2	3.28943134	30.5127007	.99999
3	1.85416251	9.69470483	.99999
4	1.31068294	4.8443364	.99999
5	.80550234	1.82966934	.98074
6	.788261816	1.75218508	.97278
7	.675770915	1.28776907	.80793
8	.657910722	1.22059877	.75398
9	.597447169	1.00655617	.50888
10	.595498265	1	.5
11	.62058019	0	0
12	.635303345	0	0
13	.69565678	0	0
14	.718808995	0	0
15	.791336301	0	0
16	.83321264	0	0
17	.831839783	0	0

Figure 42 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour la substance B

Le SECV est le reflet de l'exactitude du modèle. Sa valeur doit être faible. On remarque que le SECV se stabilise pour un nombre de facteur égal à 9. Néanmoins, la différence du SECV pour 5 facteurs ou 9 facteurs est très faible. Pour la suite de l'élaboration du modèle, 5 facteurs seront donc utilisés.

Dans un second temps, le graphique Actual concentration versus Predicted concentration est étudié (figure 43).

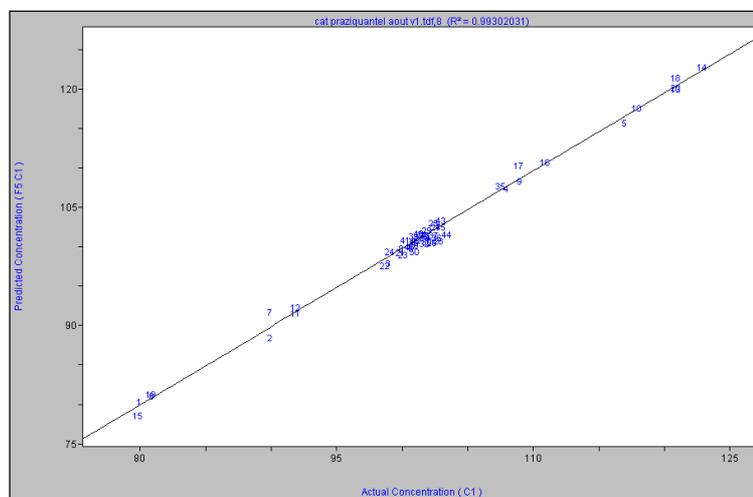


Figure 43 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance B (5 facteurs)

Le graphique Actual Concentration vs Predicted Concentration pour 5 facteurs indique un coefficient de détermination R^2 de 0.9930. Il semble avoir une bonne corrélation entre les méthodes analytique CLHP et SPIR. Sur ce graphique aucun point aberrant n'est repéré (figure 43).

Pour finir, le graphique Leverage vs Studentized residual est analysé (figure 44).

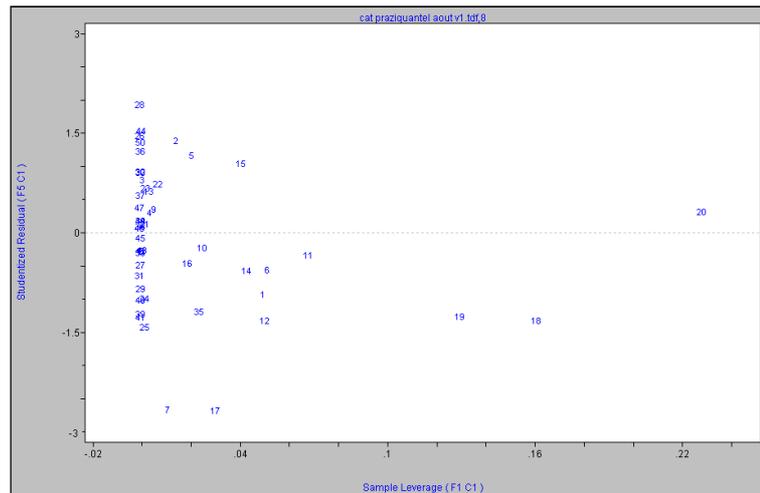


Figure 44 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance B (5 facteurs)

Le graphique Sample leverage versus Studentized residual pour 5 facteurs ne détecte aucun point aberrant.

2.4. Le bilan du modèle de calibration de la substance B

Pour valider le modèle, il convient de faire la représentation graphique des valeurs prédites (données par le modèle de quantification) en fonction des valeurs de référence (déterminées par CLHP) (figure 45).

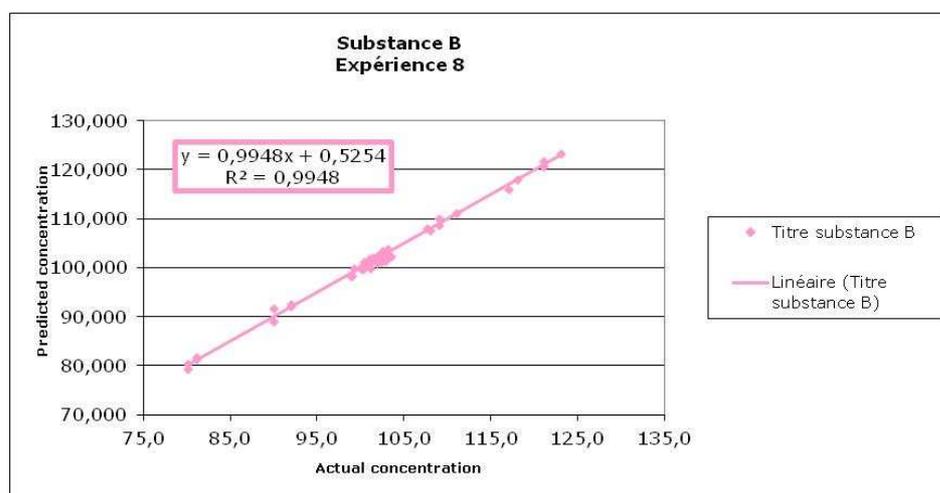


Figure 45 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par CLHP pour la substance B

Le modèle de calibration de la substance B a les caractéristiques suivantes :

- l'équation de la droite : $y = 0,9948x + 0,5254$
 - o le coefficient directeur est proche de 1

- l'ordonnée à l'origine est proche de 0
- le coefficient de détermination : $R^2 = 0.9948$
- le nombre de facteurs : 5

3. Le modèle de calibration de la substance C

3.1. Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance C

Les résultats sont donnés en pourcentage de la teneur théorique de l'échantillon. Les titres des 20 solutions fabriquées (2 gammes d'étalonnage avec 5 points et 10 solutions avec des concentrations variables) sont regroupés dans le graphique suivant (figure 46).

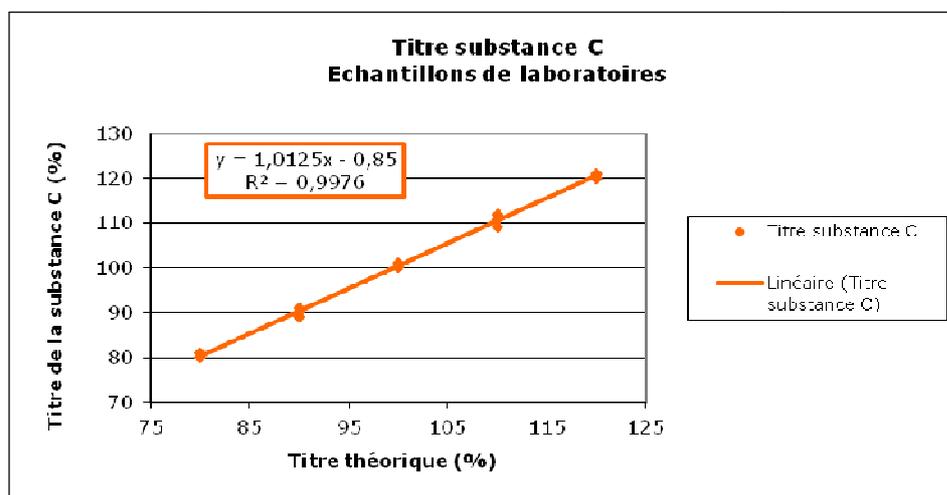


Figure 46 : Représentation graphique des échantillons de laboratoires de la substance C

Il existe une forte corrélation entre le titre théorique et le titre mesuré ($R^2 = 0.9976$). L'équation de la droite est : $y = 1.0125x - 0.85$

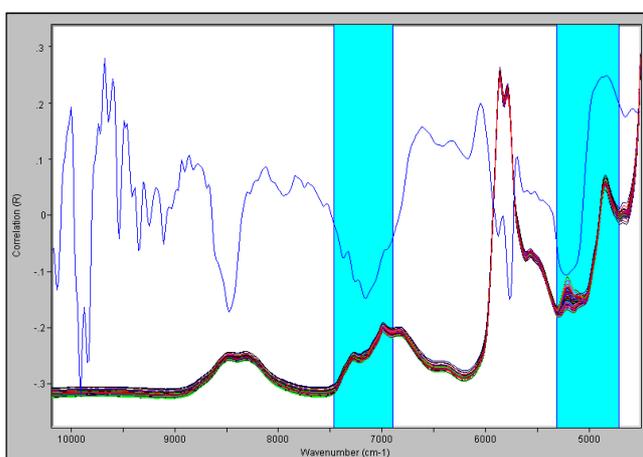
3.2. La préparation des données brutes

Plusieurs expériences sont menées sur la collection de spectres de laboratoire et de production. Certains paramètres restent identiques quelque soit l'expérience menée :

- la variation croisée,
- le nombre d'échantillons, ici 50,
- le nombre de constituants, ici un, la substance C.

Plusieurs prétraitements sont nécessaires pour préparer et uniformiser les spectres.

- dans un premier temps, la correction de la ligne de base peut être réalisée en un ou deux points sur le spectre. Pour le modèle de calibration de la substance B, une seule correction de la ligne de base est réalisée de 10463.29 cm^{-1} à 9050.81 cm^{-1} .
- un second prétraitement est effectué, il s'agit de la normalisation. Elle est effectuée sur un pic du spectre dont la forme (l'intensité) ne varie pas en fonction des variations de la propriété étudiée. La normalisation est réalisée de 9052.761 cm^{-1} à 7633.652 cm^{-1} .
- une fois que les prétraitements sont réalisés, il faut sélectionner la région spectrale utilisée par le logiciel pour calculer le modèle. La corrélation permet de choisir la région spectrale la plus pertinente pour la propriété.



Deux régions d'information sont sélectionnées pour établir le modèle (en bleu sur le graphique (figure 47)) :

- de 7452.397 cm^{-1} à 6896.939 cm^{-1}
- de 5307.712 cm^{-1} à 4721.395 cm^{-1}

Figure 47 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance C

3.3. Les résultats de l'expérience la plus pertinente

Les graphiques PRESS et SECV (estimation de l'incertitude) permettent de déterminer le nombre de facteurs nécessaire pour créer le modèle. Le modèle ne propose aucun facteur (figure 48).

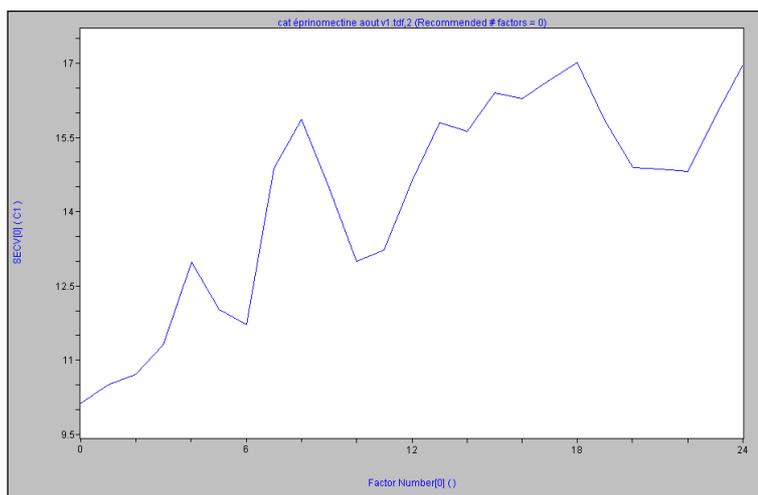


Figure 48 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance C

Le SECV est le reflet de l'exactitude du modèle. Sa valeur doit être faible. On remarque que le SECV ne se stabilise pour aucun nombre de facteur. Aucun modèle n'est donc exploitable.

Dans un second temps, le graphique Actual concentration versus Predicted concentration est analysé (figure 49).

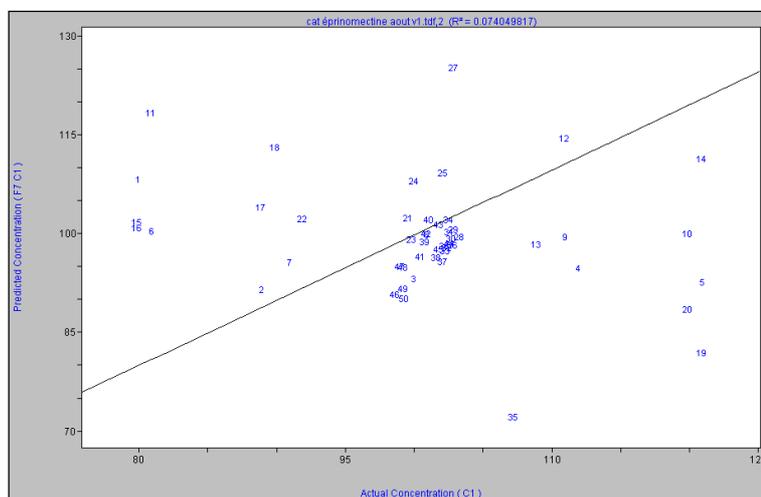


Figure 49 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance C (7 facteurs)

Le graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour 7 facteurs indique un coefficient de détermination R^2 de 0.074. Aucune corrélation ne peut être trouvée entre les valeurs prédites et les valeurs de référence quelque soit le nombre de facteurs choisis.

Enfin, le graphique Leverage vs Studentized residual est étudié (figure 50).

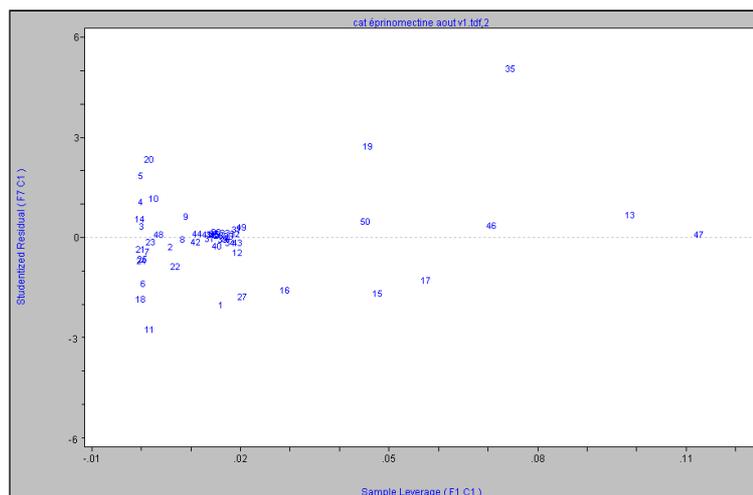


Figure 50 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance C (7 facteurs)

Le graphique Sample leverage versus Studentized residual pour 7 facteurs n'indique aucun point aberrant.

3.4. Le bilan du modèle de calibration de la substance C

Pour conclure, les prétraitements de l'expérience 2 ne permettent pas de créer un modèle de quantification pour la substance C.

4. Le modèle de calibration de la substance D

4.1. Le bilan des solutions fabriquées pour le modèle de la substance D

Les résultats sont donnés en pourcentage de la teneur théorique de l'échantillon. Les titres des 20 solutions fabriquées (2 gammes d'étalonnage avec 5 points et 10 solutions avec des concentrations variables) sont regroupés dans le graphique suivant (figure 51).

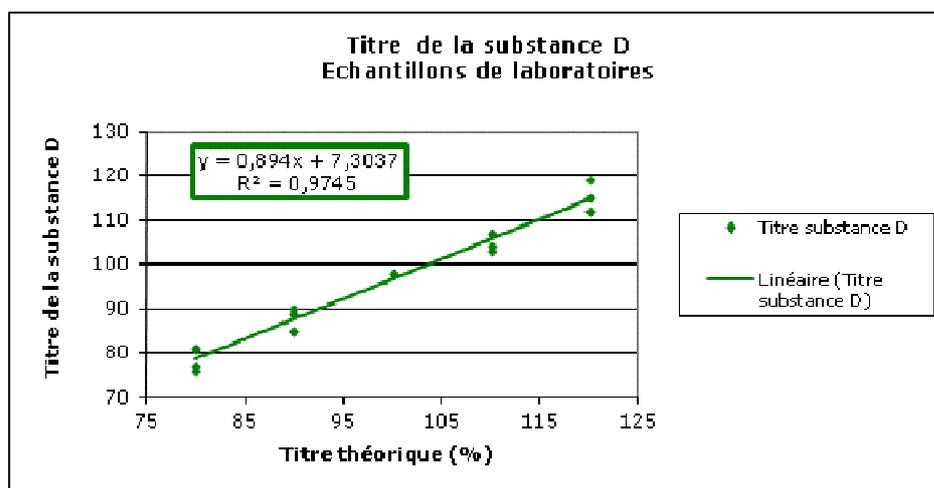


Figure 51 : Représentation graphique des échantillons de laboratoire de la substance D

Il existe une forte corrélation entre le titre théorique et le titre mesuré ($R^2 = 0.9745$). L'équation de la droite est : $y = 0.894x + 7.3037$

Sur plusieurs échantillons, le pourcentage de la substance D retrouvé par CLHP est inférieur au pourcentage attendu. Cette différence peut s'expliquer par un changement de lot de la substance D lors des différentes fabrications. Le premier lot utilisé de la substance D a été validé en mars 2011, la fabrication est réalisée avec la fin du lot. Le titre de la substance D n'est certainement plus correct et donc les pesées de la substance D étaient insuffisantes pour obtenir le pourcentage de la substance D voulu.

Néanmoins, cette différence ne pose pas de problème pour la suite de l'élaboration du modèle de calibration de la substance D. En effet, c'est le titre déterminé par CLHP qui est pris en compte pour la construction du modèle de calibration de la substance D.

4.2. La préparation des données brutes

Plusieurs expériences sont menées sur la collection de spectres de laboratoire et de production. Certains paramètres restent identiques quelque soit l'expérience menée :

- la variation croisée,
- le nombre d'échantillons, ici 50,
- le nombre de constituants, ici un, la substance D.

Plusieurs prétraitements sont nécessaires pour préparer et uniformiser les spectres.

- dans un premier temps, la correction de la ligne de base peut être effectuée en un ou deux points sur le spectre. Pour le modèle de calibration de la substance D, deux corrections de la ligne de base sont réalisées de 9821.078 cm^{-1} à 9571.438 cm^{-1} et de 7651.894 cm^{-1} à 7531.641 cm^{-1}
- un second prétraitement est réalisé, la normalisation. Elle est effectuée sur un pic du spectre dont la forme (l'intensité) ne varie pas en fonction des variations de la propriété étudiée. La normalisation est réalisée de 9731.174 cm^{-1} à 7617.955 cm^{-1}
- une fois les prétraitements réalisés, il faut sélectionner la région spectrale utilisée par le logiciel pour calculer le modèle. La corrélation permet de choisir la région spectrale la plus pertinente pour la propriété.

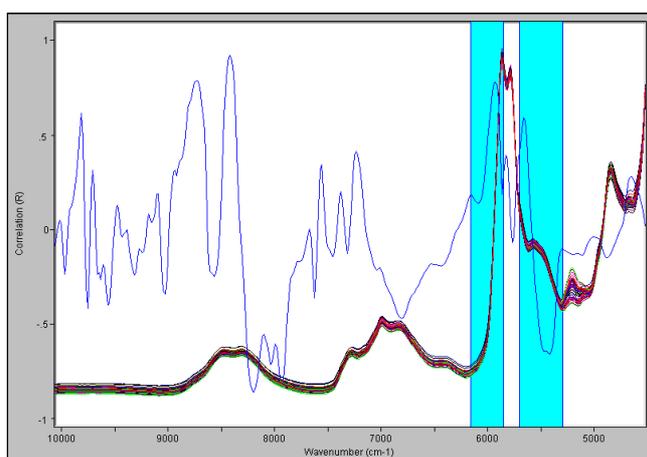


Figure 52 : Sélection des régions d'intérêts pour le modèle de la substance D

Deux régions d'information sont sélectionnées pour établir le modèle (en bleu sur le graphique (figure 52)) :

- de 6156.328 cm^{-1} à 5863.17 cm^{-1}
- de 5693.447 cm^{-1} à 5307.712 cm^{-1}

4.3. Les résultats de l'expérience la plus pertinente

Les graphiques PRESS et SECV (estimation de l'incertitude) permettent de déterminer le nombre de facteurs nécessaire pour créer le modèle. Le modèle propose 9 facteurs (figures 53 et 54).

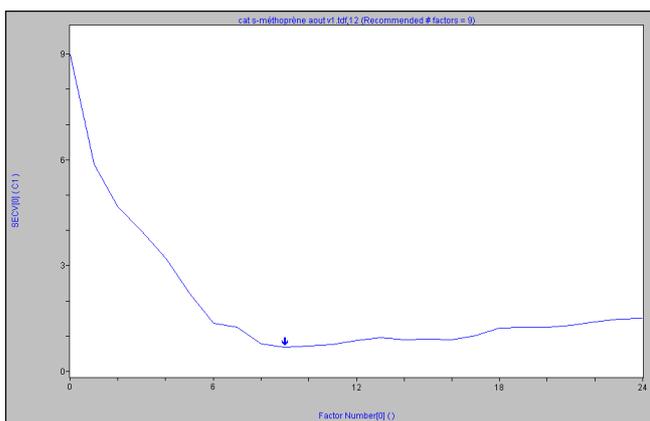


Figure 53 : Représentation graphique de l'évolution du SECV en fonction du nombre de facteur pour le modèle de calibration de la substance D

Factor Number	SECV[0]	F-Ratio (PRESS)	F-Test
0	8.97113142	175.461918	1
1	5.87633751	75.2838635	1
2	4.67381295	47.6245724	1
3	3.98996967	34.707843	1
4	3.20560256	22.403083	.99999
5	2.20119355	10.5634285	.99999
6	1.36470022	4.06034522	.99998
7	1.24441295	3.37611689	.99991
8	.784402112	1.3414236	.84114
9	.677260556	1	.5
10	.730958392	0	0
11	.771426632	0	0
12	.888997515	0	0
13	.966918058	0	0
14	.905093119	0	0
15	.918685635	0	0
16	.899537182	0	0
17	1.02120389	0	0

Figure 54 : Valeur chiffrées du SECV en fonction du nombre de facteurs pour la substance D

Le SECV est le reflet de l'exactitude du modèle. Sa valeur doit être faible. On remarque que le SECV se stabilise pour un nombre de facteur égal à 9. Pour la suite de l'élaboration du modèle, 9 facteurs seront utilisés.

Dans un second temps, le graphique Actual concentration versus Predicted concentration est étudié (figure 55).

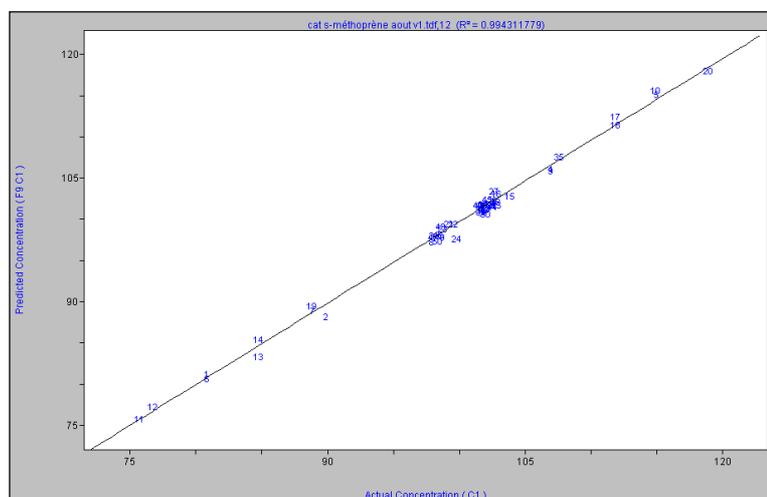


Figure 55 : Graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour le modèle de calibration de la substance D (9 facteurs)

Le graphique Actual concentration versus Predicted concentration pour 9 facteurs indique un coefficient de détermination R^2 de 0.9943. Il semble y avoir une bonne corrélation entre les méthodes analytique CLHP et SPIR. Sur ce graphique aucun point aberrant n'est repéré (figure).

Enfin, le graphique Leverage vs Studentized residual est analysé (figure 56).

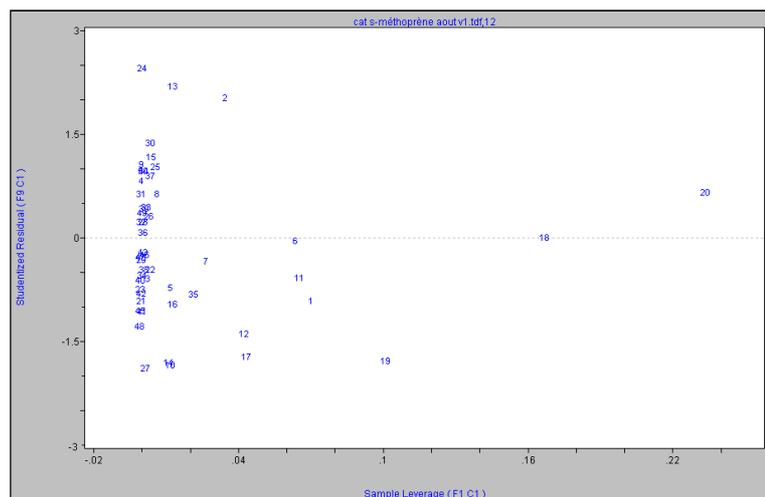


Figure 56 : Graphique sample leverage versus studentized residual pour le modèle de calibration de la substance D (9 facteurs)

Le graphique Sample leverage versus Studentized residual pour 9 facteurs ne repère aucun point aberrant.

4.4. Le bilan du modèle de calibration de la substance D

Pour valider le modèle, il convient de faire la représentation graphique des valeurs prédites (données par le modèle de quantification) en fonction des valeurs de référence (déterminées par CLHP) (figure 57).

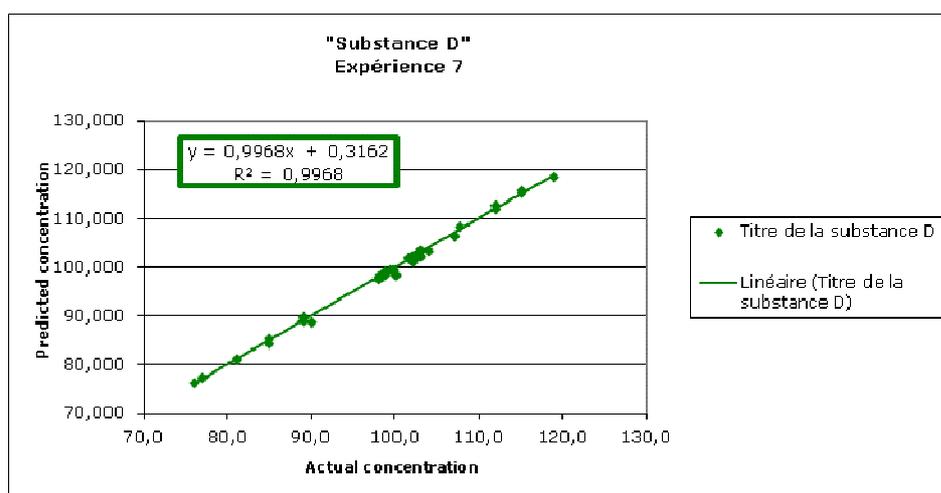


Figure 57 : Représentation graphique de la corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées par CLHP pour la substance D

Le modèle de calibration de la substance D a les caractéristiques suivantes :

- l'équation de la droite : $y = 0,9968x + 0,3162$
 - o Le coefficient directeur est proche de 1

- L'ordonnée à l'origine est proche de 0
- le coefficient de détermination : $R^2 = 0.9968$
- le nombre de facteurs : 9

Maintenant que les quatre modèles de calibration sont développés et optimisés, analysons ses résultats. La dernière partie de ce mémoire porte sur l'utilisation possible de la SPIR comme un outil PAT pour quantifier des substances en solution.

DISCUSSION

La santé est un enjeu majeur du 21^{ème} siècle, les dépenses annuelles en santé se chiffrent en milliard dans le monde. La qualité des médicaments doit être assurée tout au long des étapes du développement et de la fabrication. Dans ce contexte, la FDA dans les années 2000 a mis à disposition des industriels un guide pour implanter la démarche PAT afin de les aider à garantir la qualité des produits fabriqués tout en optimisant les procédés de production. Suite à cette initiative, de nouvelles techniques analytiques comme la SPIR commencent à se développer. Le travail réalisé rentre dans cette démarche.

Cette dernière partie a pour objectif de réaliser le bilan de l'étude et de valider l'utilisation de la SPIR comme une méthode alternative à la CLHP pour le dosage de quatre substances en solution.

Les travaux réalisés permettent de démontrer que les actifs contenus dans la solution étudiée ont tous une réponse spectrale dans la région du proche infrarouge. De plus, cette réponse se distingue de la matrice pour l'ensemble des constituants. Un modèle de quantification par spectroscopie proche infrarouge est développé uniquement pour les substances A, B et D. Aucun modèle de quantification n'est mis au point pour la substance C à cause de sa faible concentration dans le produit fini.

Les différents modèles pour les substances A, B et D montrent une forte corrélation linéaire entre les deux méthodes analytiques : la CLHP et la SPIR. La CLHP est la méthode libératoire de la solution. Pour valider ces résultats et le modèle de quantification, une analyse statistique des résultats entre les deux méthodes est nécessaire.

Cette étude devra être complétée avant de pouvoir utiliser cette technique en routine pour la quantification des substances A, B et D.

L'acquisition de spectres correspondants aux lots de production de routine lorsque celle-ci aura commencé sera nécessaire. Ils devront alors être ajoutés au modèle de quantification pour l'affiner et le rapprocher des conditions réelles. Un nombre beaucoup plus important de spectres dans la bibliothèque permet d'augmenter la finesse du modèle.

Pour la substance D, un modèle de quantification a été mis au point mais avec 9 facteurs. C'est un nombre élevé de facteurs pour un modèle de quantification. Des solutions avec des concentrations extrêmes (80 et 120%) devront être fabriquées

et ajoutées au modèle afin d'augmenter la précision de celui-ci. Lors de l'acquisition des prochains spectres il sera nécessaire de recalculer à nouveau le modèle de calibration pour la substance D.

Lorsque la collection spectrale sera satisfaisante et en accord avec les conditions réelles de production, le modèle devra alors être validé. Pour cette étape importante, des échantillons dont le titre de la substance d'intérêt est déterminé par CLHP et qui ne rentrent pas dans le modèle de calibration, devront être analysés selon le modèle précédemment créé. Une analyse statistique de ces résultats en comparaison avec les données de la méthode de référence devra être menée pour accepter la validation de ce modèle.

En parallèle, pour établir un modèle de calibration pour la substance C de nouveaux essais devront être réalisés. De nouveaux lots « pailles » devront être fabriqués et intégrés dans la collection spectrale de la substance C comme les spectres des lots de routine lorsque la production aura commencé. Le modèle de calibration devra alors être de nouveau mis au point avec l'ensemble de ces spectres. L'ensemble des prétraitements (normalisation, correction de la ligne de base,...) et la sélection des zones spectrales d'intérêts devront à nouveau être réalisés pour essayer de définir un nouveau modèle de calibration.

Néanmoins, le dosage de la substance C par spectroscopie proche infrarouge semble très compromis. Ce constat s'explique par la très faible concentration (0.3%) de la substance C dans le produit fini. En effet, une variation de la concentration de la substance C est très faiblement perceptible sur le spectre proche infrarouge de la solution. Cela complique fortement les chances d'établir un modèle de quantification de la substance C.

Dans le cadre des PAT, la spectroscopie en proche infrarouge semble être un outil intéressant pour contrôler la teneur de la substance A, B et D dans la solution. Néanmoins, son utilisation pour le dosage de la substance C semble plus difficile.

De manière plus générale, la spectroscopie proche infrarouge possède de nombreux avantages par rapport aux autres techniques analytiques utilisées dans l'industrie pharmaceutique.

Le principal avantage de cette technique est son aspect non destructif et non invasif. La mesure spectrale est par ailleurs très rapide. Moins d'une minute est nécessaire pour obtenir un spectre et la quantification de la propriété mesurée.

Le second avantage de cette technique est le faible coût de l'analyse au quotidien. En effet, l'échantillon ne nécessite aucune préparation, aucun réactif n'est utilisé pour l'analyse et peu de moyens humains sont nécessaires. Par exemple, dans le cadre de l'étude réalisée, l'analyse d'un échantillon par la SPIR coûte 50 fois moins cher que l'analyse par CLHP. Dans certains cas comme l'identification des matières premières, la SPIR peut être utilisée directement à travers le contenant pour gagner du temps. Cela permet de ne pas avoir recours à l'échantillonnage et aux problèmes de nettoyage.

Cette étude a démontré que la SPIR est une méthode qui permet de quantifier plusieurs substances en solution lors d'une seule analyse. Cette technique peut être utilisée dans toutes les étapes de la vie d'un médicament (le développement, la transposition d'échelle et la production) comme technique alternative aux méthodes de référence.

De manière plus générale, la SPIR commence à être utilisée pour réaliser des mesures on, in ou at-line grâce à des fibres optiques. En effet, c'est un outil analytique puissant et polyvalent qui peut : identifier et quantifier des substances, suivre un mélange de poudre, analyser des paramètres physiques (la dureté d'un comprimé par exemple) ou étudier la répartition granulométrique d'une poudre²⁹.

Néanmoins, la SPIR présente plusieurs inconvénients qui freinent son développement massif dans le monde industriel pharmaceutique. Si le coût de l'analyse au quotidien est faible, l'investissement initial lors de l'acquisition de l'appareillage est important (environ deux fois le prix d'une CLHP). La faible sensibilité du signal pour les constituants ayant une concentration inférieure à 0.5% est une deuxième limite au développement de la SPIR. En effet, dans les médicaments il n'est pas rare d'avoir certains constituants à ce niveau de concentration.

Le principal frein au développement de la SPIR vient de la complexité d'utilisation de celle-ci. En effet, le développement d'un modèle de calibration demande du personnel formé aux techniques de spectroscopie et à la chimométrie. La personne qui met au point le modèle doit maîtriser l'ensemble des prétraitements à réaliser

²⁹ Jamrogiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. J. Pharm. Biomed. Anal. 2012;66:1-10

ainsi que les étapes de calibration et de validation pour exploiter au mieux l'ensemble de la collection spectrale.

En parallèle, les autorités sanitaires françaises et européennes doivent développer leur expertise sur l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge et les outils chimiométriques. Ainsi, elles seront capables d'analyser de façon critique les dossiers d'autorisation de mise sur le marché pour permettre l'utilisation de cet outil PAT au sein des industries pharmaceutiques^{9, 29}.

L'obtention d'une calibration précise et robuste demande l'acquisition de très nombreuses données avec une large variation de tous les paramètres de production. Cela est souvent très difficile à obtenir lorsque le procédé de routine est optimisé et fonctionne sans problème. La bibliothèque spectrale acquise lors du développement de la calibration doit être en permanence mise à jour avec les nouveaux lots produits afin d'affiner le modèle. L'ensemble des fournisseurs d'une matière première à usage pharmaceutique doit être intégré au modèle de prédiction³⁰. La SPIR est une méthode analytique secondaire. Une analyse physique ou chimique avec la méthode de référence doit être réalisée préalablement sur chaque échantillon. Ainsi, chaque spectre de la collection spectrale sera associé au paramètre étudié (concentration d'une substance, dureté d'un comprimé,...). Un fort investissement du laboratoire d'analyse est nécessaire au moment du développement du modèle de prédiction²⁹.

⁹ Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. *Spectra Analyse*. 2009;269:27-35

³⁰ Bellon-Maurel V, Fernandez-Ahumada E, Palagos B, Roger J.M, McBratney A. Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. *Trends Anal. Chem.* 2010;29:1073–1081.

²⁹ Jamrogiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012;66:1-10

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Laura FATELA

**TITRE : UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE COMME OUTIL PAT
POUR LA QUANTIFICATION DE SUBSTANCES EN SOLUTION**

CONCLUSION

La production de produits de qualité et l'optimisation des procédés de production sont les principales priorités de l'industrie pharmaceutique. La démarche PAT mise en place par la FDA dans les années 2000 s'inscrit parfaitement dans ce contexte. Les industries pharmaceutiques sont amenées à utiliser de nouveaux outils analytiques pour garantir la qualité du produit fini, tout en maîtrisant les coûts et les procédés de production. La spectroscopie proche infrarouge est de plus en plus utilisée dans cet objectif. Cette méthode peut être utilisée pour des analyses qualitatives ou quantitatives et peut donner des informations sur les propriétés physiques et/ou chimiques du produit analysé.

L'étude de faisabilité réalisée sur les possibilités de dosage de quatre actifs en solution par spectroscopie proche infrarouge a permis de mettre au point deux modèles de calibrations (substances A et B) avec un nombre de facteurs satisfaisant. Ils serviront de base lors du développement du modèle pour une future utilisation en routine. Un modèle de calibration (substance D) a été développé mais avec un nombre de facteurs trop élevé. De nombreuses solutions et des essais supplémentaires devront être réalisés pour utiliser la SPIR en routine. Enfin, aucun modèle de calibration n'a été mis au point pour la substance C présente dans la solution. De nouvelles manipulations et analyses seront nécessaires pour espérer établir un modèle permettant d'utiliser la SPIR comme méthode de dosage en ligne. Les résultats concluants de cette étude nous permettent d'envisager l'utilisation de la SPIR dans un futur proche comme un outil de choix dans le cadre de la démarche PAT par les industries pharmaceutiques.

Les avantages de la SPIR sont multiples : méthode non invasive et non destructrice, pas de préparation de l'échantillon, acquisition spectrale à haute fréquence, et nombre élevé de substances pouvant être quantifiées.

Comme détaillé précédemment, la SPIR commence à être utilisée pour le contrôle en ligne des opérations unitaires lors de la production des formes pharmaceutiques solides. Elle permet d'obtenir diverses informations en temps réel et de contrôler à 100% l'ensemble d'une production afin d'assurer le contrôle et d'optimiser les processus de fabrication. Grâce à cette technique on peut doser ce que l'on veut et non plus ce que l'on peut.

Néanmoins, l'utilisation de la SPIR dans l'industrie pharmaceutique sera fortement corrélée à l'évolution des compétences techniques des experts. Les laboratoires pharmaceutiques devront se spécialiser dans les analyses mathématiques et instrumentales pour développer l'utilisation de la SPIR dans leurs entreprises. Une coopération entre les chimistes, les experts en production et les mathématiciens experts en chimiométrie sera donc indispensable. Les autorités devront aussi développer leur expertise sur la mise en œuvre de procédés basés sur la spectroscopie proche infrarouge et les outils chimiométriques afin d'autoriser son utilisation par l'industrie pharmaceutique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 23 / 12 / 2012

LE DOYEN

LE PRESIDENT DE LA THESE

Pr. Christophe RIBUOT
Directeur UFR Pharmacie
Université Joseph Fourier

Professeur Christophe RIBUOT

 UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Dépt. de Pharmacochimie Moléculaire - DPM
UMR 5063 - Pharmacotechnie
Pr. D. WOUESSIDJEWE
Bât E André Rassat
301, avenue de la Chimie - BP 53
38041 GRENOBLE Cedex 9

Professeur Denis WOUESSIDJEWE

BIBLIOGRAPHIE

ARTICLES DE PERIODIQUES :

[2] Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007;44:683-700

[3] Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57:1109-1143

[7] Bertrand D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *INRA Prod. Anim.* 2002;15(3):209-219

[9] Fontanges C, Chauchard F. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. *Spectra Analyse.* 2009;269:27-35

[13] De Beer T, Burggraeve A, Fonteyne M, Saerens L, Remon J.P, Vervaeet C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int. J. Pharm.* 2011;417:32-47

[14] Maurer L, Leuenberger H. Terahertz pulsed imaging and near infrared imaging to monitor the coating process of pharmaceutical tablets. *Int. J. Pharm.* 2009;370:8-16

[16] Laloum E. Le proche infrarouge gagne du terrain en pharmacie. *Info pharma magazine.* 2003;6:66-68

[17] Van der Vlies C. The use of NIR spectrometry in the pharmaceutical QC laboratory. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1994;2:79-81

[18] Blanco M, Cueva-Mestanza R, Peguero A. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010;51:797-804

- [19] El-Hagrasy A.S, Drennen J.K. A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part III. Quantitative near-infrared calibration for predicting of blend homogeneity and characterization of powder mixing kinetics. *J. Pharm. Sci.* 2006;95(2):422–434.
- [20] Rantanen J, Räsänen E, Antikainen O, Mannermaa J.P, Yliruusi J. In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near-infrared sensor: an evaluation of process-related variables and a development of non-linear calibration model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2001;56:51–58.
- [21] Gupta A, Peck G.E, Miller R.W, Morris K.R. Nondestructive Measurements of the Compact Strength and the Particle-Size Distribution after Milling of Roller Compacted Powders by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 2004;93:1047–1053
- [22] Nieuwmeyer F.J.S, Damen M, Gerich A, Rusmini F, Van der Voort K, Vromans H. Granule characterization during fluid bed drying by development of a near infrared method to determine water content and median granule size. *Pharm. Res.* 2007;24:1854–1861.
- [23] Tabasi S.H, Fahmy R, Bensley D, O'Brien C, Hoag S.W, 2008a. Quality by design, part I: application of NIR spectroscopy to monitor tablet manufacturing process. *J. Pharm. Sci.* 2008 ;97, 4040–4051.
- [24] Andersson M, Folestad S, Gottfries J, Johansson M.O, Josefson M, Wahlund K.G. Quantitative analysis of film coating in a fluidized bed process by in-line NIR spectrometry and multivariate batch calibration. *Anal. Chem.* 2000;72:2099–2108
- [25] Brülls M, Folestad S, Sparen A, Rasmuson A. In-situ near-infrared spectroscopy monitoring of the lyophilization process. *Pharm. Res.* 2003;20(3):494–499
- [26] Herkert T, Prinz H, Kovar K.A. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001;51:9–16

[29] Jamrogiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. J. Pharm. Biomed. Anal. 2012;66:1-10

[30] Bellon-Maurel V, Fernandez-Ahumada E, Palagos B, Roger J.M, McBratney A. Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. Trends Anal. Chem. 2010;29:1073–1081.

THESE :

[12] Gendre C. Process Analytical Technology, Suivi en temps réel d'une opération d'enrobage et de curing et nouvelles avancées dans la caractérisation du film polymère [thèse]. Chatenay-Malabry: faculté de pharmacie; 2012

OUVRAGES :

[1] Hadni A. L'infrarouge. Paris: Presses universitaires de France; 1975

[4] Bertrand D, Dufour E. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. 2^e éd. Paris: Lavoisier; 2006

SITES WEB :

[15] ICH (consulté le 29 octobre 2012)

<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>

[27] ICH (consulté le 29/10/2012)

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

DIVERS :

[5] Formation ABB. Analyseur FTIR – Introduction à la spectrométrie infrarouge. Réalisée le 14/02/2012

[6] Dalibert M, Servant L. Spectroscopie dans l'infrarouge. Les techniques de l'ingénieur P2 845. 2000

[8] Barthelmé B. Mémoire de la CNAM en sciences techniques industrielles option techniques pharmaceutiques. 2009

[10] Formation ABB. Analyse quantitative chimiométrique. Réalisée le 14/02/2012

[11] Food and Drug Administration. Guidance for industry, 2004. PAT - A Framework For Innovative Pharmaceutical, Development, Manufacturing and Quality Assurance

[28] Formation ABB. Etablissement d'un étalonnage Quantitatif / Qualitatif avec PLSplus/IQ. Réalisée le 15/02/2012



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme outil PAT pour la quantification de substances en solution

Thèse soutenue le 7 décembre par Laura FATELA

RESUME :

La démarche PAT a été initiée dans les années 2000 par la FDA auprès des industries et des laboratoires pharmaceutiques. Son objectif est de mettre en place des outils efficaces et performants pour contrôler et optimiser les procédés de production. La spectroscopie proche infrarouge est un outil analytique particulièrement approprié pour la mise en place du PAT. Elle permet de réaliser des analyses rapides, non destructives, sans préparation et sans contact.

Cette étude menée au sein de l'entreprise Merial a pour objectif de montrer que la SPIR peut être une méthode alternative à la CLHP pour quantifier des substances en solution. Ce mémoire expose les principes et la marche à suivre pour établir et analyser un modèle de quantification. Il explique la préparation des solutions puis les prétraitements à réaliser et se termine enfin par l'analyse des modèles obtenus et le choix du meilleur modèle.

Ce travail a permis de mettre au point un modèle de quantification pour trois des quatre substances présentes dans la solution étudiée. Pour la quatrième substance de par sa faible concentration dans le produit fini, aucun modèle de quantification n'a pu être mis au point malgré de nombreux essais réalisés.

La spectroscopie proche infrarouge permet de réaliser des analyses quantitatives ou qualitatives comme ce travail l'a démontré. Elle est capable de donner des informations sur les propriétés physiques et chimiques des produits. Son développement sera optimal lorsque les industries pharmaceutiques et les autorités de tutelle auront acquises suffisamment d'expérience dans ce domaine.

MOTS CLEFS :

Spectroscopie proche infrarouge (SPIR), Process Analytical Technology (PAT), analyses quantitatives, chimie, industrie pharmaceutique.

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury :

le Pr Denis WOUESSIDJEWE

Directeur de thèse :

le Dr Luc PISARIK

Membre du jury :

le Dr Catherine GROSSET