

## La spectrophotométrie dans le proche infrarouge : applications qualitatives et quantitatives dans l'industrie pharmaceutique

N. Barges<sup>1</sup>, H. Conan<sup>1</sup> and N. Poisson<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Smithkline Beecham, Zone Industrielle de la Peyrennière, BP. 2, 53101 Mayenne Cedex, France

<sup>2</sup> Bran+Luebbe, 87 rue des Poiriers, Parc Ste Apolline, BP. 72, 78374 Plaisir Cedex, France

**Near Infrared Spectroscopy has been examined as a rapid correlative analytical technique in the pharmaceutical industry. Quality control is one of the most severe in all industrial productions and all steps as analytical methods must be approvable by required administration. Near Infrared transmission, reflectance and transfectance spectroscopies have provided adequate quantitative and qualitative analysis to be included in Pharmacopae 97.**

La spectroscopie Proche Infra-Rouge est une technique d'analyse en constante évolution depuis ses débuts, il y a plusieurs décennies en chimie [1-3]. Aujourd'hui, elle a réussi à s'implanter dans le domaine de l'analyse multicomposante non destructive, grâce aux progrès réalisés sur les spectromètres et les fibres optiques ainsi que la chimio-métrie, dans des secteurs aussi variés que l'agriculture, la cosmétique, l'astronomie, l'agro-alimentaire, ... et la pharmacie, où elle est utilisée depuis une douzaine d'années.

Dans le domaine pharmaceutique, l'ensemble du processus d'élaboration d'un médicament est soumis à un contrôle rigoureux mis en place par les Autorités de la santé.

Ainsi la commercialisation d'un médicament n'est possible que si le laboratoire pharmaceutique a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché pour ce produit. Celle-ci découle entre autres de l'évaluation du dossier pharmaceutique décrivant la formule, la qualité et le contrôle des matières premières, le processus de fabrication, le contrôle du produit fini et sa stabilité. De même, les conditions de production en routine de ce médicament sont régies par un ensemble de règles définies dans le guide des Bonnes Pratiques de Fabrication. Ces contrôles effectués sur les matières premières pharmaceutiques et le médicament doivent être réalisés conformément aux règles, spécifications, et méthodes officiellement approuvées.

C'est dans ce cadre, que la spectroscopie Proche Infra-Rouge peut être utilisée compte-tenu de ses qualités pour effectuer des contrôles sur les excipients ou sur les principes actifs afin de les quantifier et/ou de les identifier [4-6].

Le but de cette étude est de présenter des exemples d'application de dosage et de contrôle par spectroscopie Proche Infra-Rouge validés dans l'industrie pharmaceutique. Nous avons également abordé de nouvelles possibilités de qualification des produits selon leur mise en oeuvre.

### Matériels

Les spectres Proche Infra-Rouge sont obtenus avec un spectromètre InfraProver II à transformée de Fourier (BRAN+LUEBBE) dans le domaine de 4500 à 10000  $\text{cm}^{-1}$  (1000 – 2200 nm). C'est un interféromètre à polarisation comprenant une source tungstène halogène, un système à deux cristaux biréfringents et un détecteur PbS réglé en température par effet Peltier. Les mesures sont effectuées avec une fibre optique multibrins sur laquelle un embout est adapté pour la mesure des liquides en transflexion. La matière de référence est une céramique. Les spectres sont le résultat de 5 balayages individuels.

Les données spectrales sont traitées par l'intermédiaire de logiciels « Cluster Analysis », « Library Model » et « PLS Model », respectivement dédiés à l'analyse qualitative, pour les deux premiers, et quantitative pour le dernier.

L'analyse HPLC est effectuée à l'aide d'appareils de type Kontron ou Hewlett Packard. Comme cette technique d'analyse fait partie de la Monographie enregistrée, elle nous a servi de méthode de référence.

### Échantillons

Les produits analysés proviennent tous de la société Smithkline Beecham et ne sont que partiellement décrits. Pour l'aspect quantitatif, nous avons étudié des suspensions vétérinaires se caractérisant par une base antibiotique allant de 11,75 à 18,47 %. Pour la partie qualitative, 12 types d'arômes ont été étudiés. Nous nous sommes particulièrement intéressés à 4 d'entre eux : pêche, citron, framboise et « Golden syrup », dont les réponses spectrales sont très proches. « Golden syrup » est un arôme naturel adsorbé sur amidon modifié (malto dextrine). Sur la figure 1, ont été représentés les spectres moyens de chacun de ces 4 arômes provenant d'une collecte de 10 lots représentatifs en moyenne. Les arômes n'ont subi aucune préparation.

### Principes de calcul

Compte tenu du mode de génération des bandes de vibrations en Proche Infra-Rouge, l'analyse directe des pics reste une technique moins développée que la chimiométrie. La chimiométrie est une méthode basée sur la condensation des données spectrales, permettant de séparer des produits selon des facteurs déterminants et discriminants, n'ayant pas forcément de rapport direct avec les propriétés recherchées de ces échantillons.

Le calcul matriciel génère deux types de résultats : les facteurs cités précédemment ou composantes principales, qui

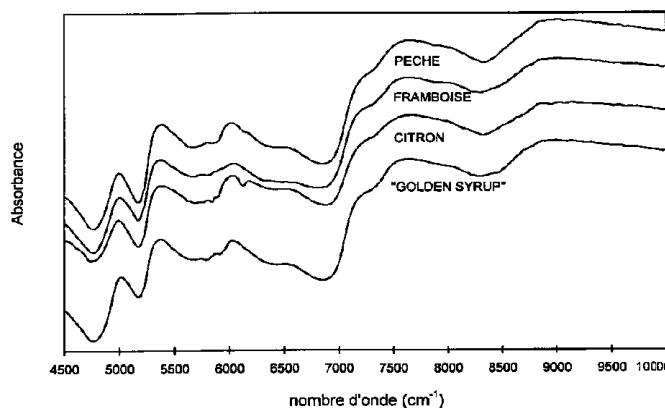


Figure 1. Spectres proche infrarouge des différents arômes : pêche, citron, framboise et « Golden syrup ».

créent les axes d'un espace multidimensionnel, et les « poids » ou « loadings » associés à ces facteurs, spécifiques à chaque spectre, qui servent de coordonnées dans cet espace.

Le traitement de données qui comprend plus d'informations sur le calcul est détaillé dans l'article « le détail du calcul » présenté par Chatenay Malabry.

Lors d'une analyse qualitative (« Cluster Analysis » ou « Library Model »), l'objectif est de caractériser les échantillons pour prévoir leur appartenance à un groupe connu, préalablement établi et inclus dans une bibliothèque. Ces groupes de références sont obtenus par mesure spectrale de nombreux échantillons semblables et forment des nuages de points dans l'espace multidimensionnel discriminant. Chaque groupe de référence est caractérisé par son centre et son rayon. Les distances séparant chaque centre sont appelées Distances de Mahalanobis. La robustesse d'un espace discriminant se détermine en tenant compte des rayons de groupe, des distances de Mahalanobis et de leur relation. Un composé inconnu, placé dans l'espace discriminant voulu, est attribué à un groupe à partir de ces paramètres.

Lors d'une analyse quantitative (« PLS Model »), la méthode diffère, car les valeurs dites théoriques de ou des propriétés peuvent être utilisées lors de la détermination des composantes principales. La courbe de calibration est obtenue alors soit, sans valeurs théoriques, par régression en composantes principales (PCR) soit, avec les valeurs théoriques, par régression par moindres carrés partiels (PLSR) [7].

Si l'on utilise un nombre réduit de longueurs d'onde pour la mesure, la détermination est effectuée par régression linéaire multiple (MLR) dont l'algorithme est totalement différent des deux premiers modèles. Alors qu'aucune hypothèse n'est nécessaire avec le modèle PLS, quatre hypothèses fondamentales dont la reproductibilité parfaite des mesures spectrales conditionnent l'utilisation du modèle par MLR. Toutefois, compte tenu qu'en proche Infra-Rouge, l'erreur sur la mesure est vraiment minimale, l'analyse par MLR est un outil mathématique approprié pour établir les étalonnages [8].

## Identification des matières premières à réception

Les échantillons d'arômes utilisés sont des compositions complexes chimiquement et physiquement très proches, ce qui implique que les spectres sont très similaires (Fig. 1). L'analyse est faite pour un nombre limité de ces produits, représentés par un minimum de 10 lots. Dans cette étude, tous les spectres sont utilisés. La bibliothèque spectrale a été constituée à partir des deux tiers des spectres environ. Le dernier tiers sert à tester le modèle. Si tous les individus de ce test sont correctement identifiés et placés dans un groupe unique par type de produit, le modèle est alors prêt à être utilisé pour la détermination de l'identité d'échantillons inconnus, après une période de validation en grandeur réelle (réception de nouveaux lots).

Deux pré-traitements ont été effectués sur les spectres des 4 arômes avant calcul : normalisation et dérivée première. Le premier pré-traitement homogénéise les niveaux d'absorbance (minimum à 0 et maximum à 1). Quand au second, il permet d'atténuer la dérive de ligne de base, due aux échantillons. Outre la transformée de Fourier, les spectres ont été décomposés en composantes principales avant de réaliser une analyse discriminante ou « Cluster Analysis ». Deux composantes principales suffisent pour différencier les 4 types d'arômes. La figure 2 illustre la capacité de la technique à regrouper les arômes en fonction de leur nature. Les 4 groupes sont distincts, séparés dans un espace à deux dimensions où nous avons représenté pour chaque spectre le cercle permis, correspondant à la variabilité admise sur la mesure et l'échantillon.

La validation de la bibliothèque est systématiquement réalisée en mettant en test des échantillons connus pour vérifier qu'ils sont identifiés conformément aux groupes de référence auxquels ils appartiennent.

Ce « Cluster » discrimine 4 types d'arômes sur les 12. Deux autres « Cluster » ont été créés pour séparer les huit arômes restants. Ils ont été validés individuellement, comme dans le premier cas, puis tous ensemble. C'est le principe de la validation croisée : Durant cette étape, chaque arôme appartenant à un espace discriminant donné (arôme résident) est replacé successivement dans les deux autres espaces discriminants et nous vérifions qu'il n'interfère pas avec un

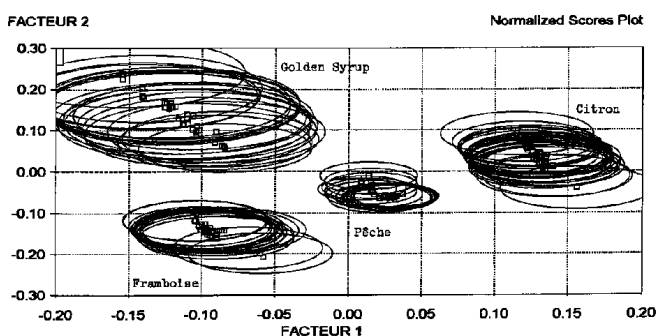


Figure 2. Représentation de l'espace discriminant des arômes – analyse « Cluster ».

arôme résident. Ces « Cluster » servent actuellement à identifier les lots à réception.

Le contrôle qualité à réception est également effectué, sur toutes les matières premières, préalablement introduites dans différentes bibliothèques spectrales. Lorsque la distance de Mahalanobis est supérieure à 0,1, cela signifie que la réponse spectrale de chaque produit étudié, par exemple des excipients autres que les arômes, est suffisamment caractéristique pour travailler sur les spectres moyens. Dans ce cas, les modèles sont de type « Library ».

De plus, lorsque de nouvelles matières sont à identifier, elles doivent être intégrées dans l'espace discriminant adéquat et pourront ensuite être contrôlées à réception, après validation, comme les matières premières initiales.

## Maîtrise des process

Smithkline Beecham a mis au point un modèle quantitatif pour caractériser des suspensions vétérinaires à base d'antibiotiques. La détermination quantitative a été envisagée en tenant compte de l'ensemble du spectre obtenu en Proche Infra-Rouge et des résultats HPLC. Une gamme d'étalonnage a été conduite à partir des suspensions chargées de 11,75 à 18,47 % de principes actifs. La régression linéaire est calculée par la méthode des moindres carrés partiels et le logiciel de calcul établit la corrélation entre les valeurs théoriques (HPLC) et celles prévues par le modèle (Fig. 3). Le coefficient de corrélation obtenu pour 6 composantes principales est égal à  $R = 0,996$  et l'écart-type sur la mesure est de  $\sigma = 0,173$ . Le modèle a été validé par une série de contrôle en validation de process et a permis d'intégrer une méthode plus rapide que l'HPLC pour optimiser les temps de mélange. L'HPLC est alors utilisée à bon escient pour prendre la décision de libérer les lots.

Le Proche Infra-Rouge permet une nouvelle approche d'amélioration de la maîtrise du process car cette technique est capable de prévoir son comportement à l'utilisation. Pour cette application, nous nous intéressons à un produit commercialisé par deux fournisseurs. Ce produit est bien sûr caractérisé par ses constituants mais aussi par le procédé de

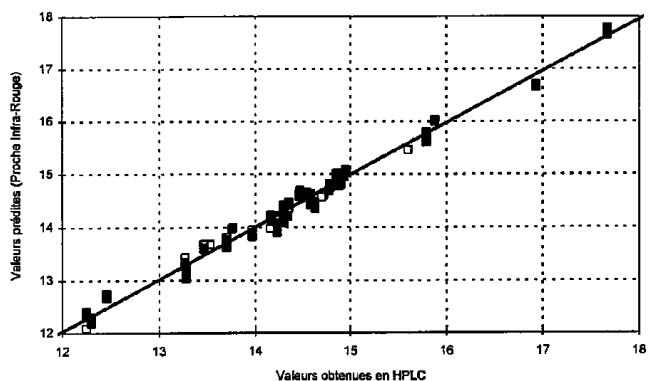


Figure 3. Valeurs prédites par la spectroscopie Proche Infra-Rouge en fonction des valeurs données par la HPLC ( $R = 0,996$ ) : (■) points utilisés pour établir le modèle ; (□) points

fabrication, car celui-ci est spécifique à chaque fournisseur. Ce procédé imprime au produit une information globale, que l'on nommera « machinabilité ». Ce terme contient les notions de fluidité, de capacité à être réparti sur son équipement industriel déterminé. Un modèle de type « Cluster » a été mis au point pour discriminer les spectres Proche Infra-Rouge représentant une « bonne machinabilité » et une « mauvaise machinabilité ».

Ainsi, lors de la réception, l'analyse Proche Infra-Rouge indique si le produit est correctement identifié mais renseigne également les opérateurs sur ses conditions de mise en œuvre. Il est alors possible de prévoir le temps-machine, d'anticiper les ressources supplémentaires, et donc de maîtriser les coûts.

---

### Conclusion

L'analyse Proche Infra-Rouge est une méthode corrélative, nécessitant une phase d'étalonnage importante, qui fournit plusieurs types d'informations : elle permet, dans ce cas, le dosage des constituants avec une précision équivalente à celle fournie par l'HPLC, en un temps très court et avec une très bonne répétabilité. De plus, elle est capable de séparer des produits différents, même de composition très proche comme les arômes. Les performances apportées par l'analyse Proche Infra-Rouge ont été reconnues dans le secteur très exigeant de l'industrie pharmaceutique, ce qui lui a per-

mis d'être intégrée comme technique homologuée, inscrite à la Pharmacopée 97 (Sect. 2.2.40).

Le développement de son utilisation se poursuit puisqu'elle permet également de discriminer un même produit selon son fournisseur et d'intégrer cette information pour estimer sa « machinabilité ». Le temps-machine peut donc être estimé, les ressources supplémentaires peuvent être anticipées, ce qui permet de maîtriser les coûts.

### Références

1. Dannenberg, H.; Harp, W. R. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 86-90.
2. Goddu, R. F.; Delker, D. A. *Anal. Chem.* **1958**, *30*(10), 2013-2016.
3. Whetzel, K.; Roberson, W. E.; Krell, M. W. *Anal. Chem.* **1958**, *30*(10), 1594-1597.
4. Berntsson, O.; Zackrisson, G.; Ostling, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*(7), 895-902.
5. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; De La Pezuela, C. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *333*(1-2), 147-156.
6. Blanco, M.; Coello, J.; Elaamrani, M.; Iturriaga, H.; Maspoch, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *15*(3), 329-338.
7. Bjørsvik, H.-R.; Martens, H. in: *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Burns, D. A.; Ciurczak, E. W. Eds., Dekker, New York, 1992; Vol. 13, pp 159-180.
8. Mark, H. in: *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Burns, D. A.; Ciurczak, E. W. Eds., Dekker, New York, 1992; Vol. 13, pp 107-158.