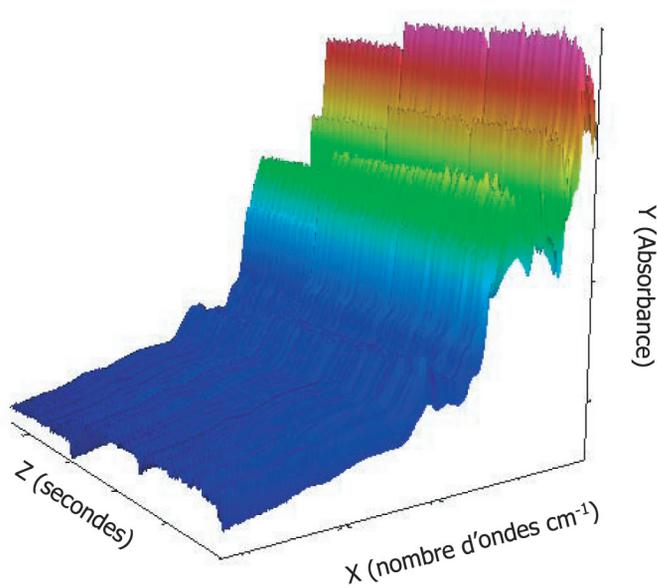


APPLICATION DE LA TECHNOLOGIE ANALYTIQUE DES PROCÉDES DANS L'ÉTUDE DE L'HOMOGENÉITÉ DE MELANGES DE POUDRES POUR COMPRESSION DIRECTE



Cédric BODSON
Pharmacien

Au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation et qui m'ont permis par leur soutien et leur avis judicieux de le mener à bien.

Je désire remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Luc Delattre qui m'a donné l'occasion d'entreprendre mon travail dans son laboratoire et a accepté de diriger et de suivre cette thèse avec bienveillance et intérêt. Ses encouragements et conseils éclairés ont grandement facilité l'avancement de ce travail. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma plus haute gratitude pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse, ainsi que pour m'avoir fait partager ses compétences lors de nos nombreuses discussions.

Je remercie également Madame Brigitte Evrard-Germy, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Chargée de Cours, pour ses conseils et critiques scientifiques. Je voudrais également remercier Madame Géraldine Piel-Salpetier, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, première assistante, pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de sa compétence.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Philippe Hubert qui m'a fait profiter de ses nombreuses connaissances scientifiques et pour l'aide et les conseils qu'il m'a apportés au cours de cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent à Madame et Messieurs les Membres du comité de thèse pour leur disponibilité et pour leurs précieux conseils prodigués tout au long de ce travail, ainsi qu'à Mesdames et Messieurs les Membres du jury qui me font l'honneur de juger ce mémoire.

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans la participation financière de la Communauté française de Belgique. Je veux aussi remercier les sociétés

BruKer Optics, GEA-Collette, FMC BioPolymer, UCB Pharma pour leurs collaborations et leurs soutiens logistique et financier.

Le présent travail est également le fruit d'une collaboration étroite avec de nombreuses personnes qu'il me tient à cœur de remercier, en particulier :

- *Monsieur le Professeur Nicolas Vandewalle et son équipe (Service de Physique Statistique) et plus particulièrement Monsieur Geoffroy Lumay pour son aide dans la réalisation des expériences sur l'écoulement des poudres.*
- *Monsieur Louis Vandeun de la société BrukerOptics pour son aide précieuse dans l'utilisation du Spectromètre Proche Infrarouge*
- *Madame Monique Berwaer, pharmacienne chez UCB-Pharma, et Monsieur Serge Cuypers d'UCB-Pharma pour m'avoir fait découvrir le domaine de la production industrielle ainsi que pour leurs nombreux conseils et discussions scientifiques.*
- *Monsieur Eric Rozet, chercheur dans le service de chimie analytique de l'Université de Liège, pour son aide apportée si généreusement dans les différents travaux de validation.*
- *Mesdames Françoise Léonard et Laurence Collard, techniciennes au Laboratoire de Technologie Pharmaceutique pour leur dévouement et leurs aides durant les expériences réalisées au cours de cette thèse.*
- *Monsieur Yves Gonnissen, Ingénieur dans le laboratoire de Technologie Pharmaceutique du Professeur Remon (Université de Gand) pour la réalisation des mesures de force de cisaillement des poudres.*
- *Tous les membres du Laboratoire de Technologie Pharmaceutique qui par leur bonne humeur et leur disponibilité m'ont non seulement permis de mener à bien ce travail mais également de profiter d'une agréable ambiance de travail.*

- *Toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la relecture de ce manuscrit, en particulier Monsieur Léonard.*

Enfin, je tiens à dédier ce mémoire à tous mes amis, à mes proches et tout particulièrement à mes parents pour leur patience et leurs encouragements durant toutes ces années d'études.

Cédric Bodson

Table des matières

Introduction

I. Le mélange de poudres.....	1
<i>1.1 Introduction</i>	1
<i>1.2 Définition</i>	3
<i>1.3 Les mécanismes de mélange</i>	3
<i>1.4 Les différents types de mélanges</i>	5
1.4.1 Le mélange parfait.....	6
1.4.2 Le mélange ordonné.....	7
1.4.3 Le mélange randomisé	7
<i>1.5 Les propriétés physico-chimiques des poudres influençant le processus de mélange</i>	8
1.5.1 La taille des particules	8
1.5.2 La forme des particules	9
1.5.3 La densité des particules.....	10
1.5.4 Les charges électrostatiques et les forces de Van der Waals.....	10
1.5.5 L'humidité.....	12
<i>1.6 Autres paramètres influençant l'homogénéité</i>	14
1.6.1 La concentration en matière active.....	14
1.6.2 La nature des excipients.....	15
<i>1.7 Le contrôle de l'homogénéité</i>	15
1.7.1 Historique.....	16
1.7.2 Echantillonnage	18
1.7.2.1 Techniques de prélèvements	18
1.7.2.1.1 Echantillonnage statique.....	18
1.7.2.2 Echantillonnage dynamique	20
1.7.2.3 Erreur d'échantillonnage	21

1.7.2.4 Taille de l'échantillon	22
1.7.3 Les méthodes de mesures en ligne de l'homogénéité de mélange	23
1.7.3.1 Les méthodes spectroscopiques	23
1.7.3.2 Les méthodes d'analyse d'images	23
1.8 La caractérisation de l'état de mélange par la technique d'échantillonnage.....	24
1.9 Les différents types de mélangeurs.....	26
1.9.1 Les mélangeurs à cuve tournante.....	26
1.9.2 Les mélangeurs à outils mobiles.....	27
1.9.3 Les mélangeurs à force de cisaillement élevée.....	28
1.10 Références bibliographiques	29
II. La technologie analytique des procédés.....	33
II.1 Introduction.....	33
II.2 La Spectroscopie Proche Infrarouge	35
II.2.1 Historique	35
II.2.2 Principes fondamentaux de la spectroscopie PIR.....	36
II.2.2.1 Introduction	36
II.2.2.2 Rappel sur le rayonnement électromagnétique.....	37
II.2.2.2.1 Vibration moléculaire.....	39
II.2.2.2.1.1 L'oscillateur harmonique	39
II.2.2.2.1.2 L'oscillateur anharmonique	41
II.2.2.2.3 Appareillages	44
II.2.2.2.3.1 Spectrophotométrie par transformée de Fourier	44
II.2.3 Nature chimique des bandes observées	46
II.2.3.1 Modes de vibration	46
II.2.3.2 Interprétation chimique des spectres PIR	47
II.2.4 Modes de mesures en spectroscopie PIR.....	48
II.2.4.1 Mesure en réflexion	48
II.2.4.2 Mesure en transmission	50
II.2.5 Avantages et inconvénients de la spectroscopie PIR.....	51

II.2.5.1 Avantages.....	51
II.2.5.2 Inconvénients	51
II.2.6 <i>Introduction à la chimiométrie</i>	52
II.2.6.1 Importance de la chimiométrie en spectroscopie PIR.....	52
II.2.6.2 Principales méthodes de prétraitements mathématiques des spectres PIR	53
II.2.6.2.1 Correction compensatrice (Offset Correction)	54
II.2.6.2.2 Dérivées première et seconde	55
II.2.6.2.3 Autres	57
II.2.6.3 Principales méthodes d'analyse des spectres	58
II.2.6.3.1 L'analyse en composantes principales	58
II.2.6.3.2 La régression « PLS ».....	60
II.2.7 <i>Applications de la spectroscopie PIR dans le domaine pharmaceutique</i>	61
II.2.7.1 Procédé de fabrication et contrôle de qualité.....	61
II.2.7.1.1 L'étape de cristallisation.....	61
II.2.7.2 Détermination de la teneur en eau	63
II.2.7.3 Détermination de la taille des particules	63
II.2.7.4 Suivi des étapes de fabrication d'un comprimé.....	64
II.2.7.4.1 L'opération de mélange	64
II.2.7.4.2 Suivi de la granulation par voie humide	67
II.2.7.4.2.1 La granulation par voie humide	67
II.2.7.4.2.2 Le processus de séchage.....	68
II.2.7.4.3 La compression : analyse des comprimés.....	69
II.2.7.4.4 Le suivi du processus d'enrobage	70
II.2.7.4.5 Le conditionnement.....	71
II.2.7.4.6 Identification de contrefaçons	72
II.3 Références bibliographiques	73

Objectifs

III. Objectifs du travail 81

Partie expérimentale

IV. Etude de l'homogénéité d'un mélange binaire 85

IV.1 Introduction 85

IV.2 Etude de l'homogénéité du mélange binaire par la spectroscopie UV-Visible..... 86

IV.2.1 Mise au point de la méthode de dosage 86

IV.2.1.1 Matériel et Méthodes..... 86

IV.2.1.1.1 Solutions de référence 87

IV.2.1.1.2 Préparation des échantillons 87

IV.2.1.2 Validation de la méthode de dosage de la riboflavine 87

IV.2.1.2.1 Concepts théoriques 87

IV.2.1.2.2 La linéarité 88

IV.2.1.2.2.1 Existence d'une pente significative 88

IV.2.1.2.2.2 Test d'existence de l'ordonnée à l'origine 89

IV.2.1.2.2.3 Test de validité de la droite d'ajustement 89

IV.2.1.2.3 Sélectivité..... 90

IV.2.1.2.4 Fidélité ou précision..... 91

IV.2.1.2.5 Exactitude 91

IV.2.2 Etude de l'influence du temps de mélange et de la vitesse de mélange : Etude préliminaire 92

IV.2.2.1 Introduction..... 92

IV.2.2.2 Matériel et méthodes..... 92

IV.2.2.3 Influence du temps de mélange 95

IV.2.2.4 Influence de la vitesse de mélange..... 95

IV.2.2.5 Résultats et discussion 95

IV.2.2.5.1 Influence du temps de mélange	95
IV.2.2.5.2 Influence de la vitesse de mélange	96
IV.2.2.6 Conclusions.....	97
<i>IV.2.3 Etude de l'influence de quelques paramètres de mélange par utilisation des plans d'expériences</i>	<i>98</i>
IV.2.3.1 Introduction	98
IV.2.3.2 Paramètres étudiés et réponse mesurée.....	98
IV.2.3.3 Réalisation du plan d'expériences	99
IV.2.3.4 Résultats	100
IV.2.3.4.1 Analyse statistique.....	100
IV.2.3.4.2 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions	101
<i>IV.2.4 Comparaison de l'uniformité de teneur en principe actif dans les prélèvements réalisés au sein de la cuve du mélangeur et dans des comprimés obtenus à partir des mêmes mélanges.....</i>	<i>104</i>
IV.2.4.1 Matériel et méthodes	104
IV.2.4.2 Résultats et discussion	105
IV.3 Etude de l'homogénéité du mélange binaire par spectroscopie PIR	106
<i>IV.3.1 Introduction.....</i>	<i>106</i>
<i>IV.3.2 Matériel et méthodes.....</i>	<i>107</i>
<i>IV.3.3 Résultats et discussion.....</i>	<i>109</i>
IV.3.3.1 Analyse des spectres PIR des différents constituants.....	109
IV.3.3.2 Suivi en ligne de la cinétique de mélange par PIR	112
IV.3.3.2.1 Etude préliminaire : Influence de la vitesse d'agitation	114
IV.3.3.2.1.1 Résultats et discussions.....	114
IV.3.3.2.1.2 Conclusions.....	118
IV.3.3.2.2 Influence de la nature des différents constituants sur la cinétique de mélange obtenue par PIR.....	118
IV.3.3.2.2.1 Matériel et méthodes.....	118

IV.3.3.2.2.2 Caractérisation des matières premières utilisées	119
IV.3.3.2.2.3 Résultats et discussions	120
IV.3.3.2.2.4 Conclusions	125
IV.3.3.2.3 Etude des propriétés d'écoulement des différents mélanges	125
IV.3.3.2.3.1 Matériel et méthodes	125
IV.3.3.2.4 Comparaison des différents tests d'aptitude à l'écoulement	129
IV.3.3.2.5 Relation entre les cinétiques de mélange analysées par PIR et les propriétés d'écoulement	132
IV.3.4 Conclusions	133
IV.4 Mise au point et validation de la méthode de dosage des comprimés de riboflavine par PIR	134
IV.4.1 Introduction	134
IV.4.2 Matériels	135
IV.4.3 Méthodes	135
IV.4.3.1 Méthodes analytiques	135
IV.4.3.2 La spectrophotométrie UV-Visible	136
IV.4.3.2.1 Préparation des échantillons	136
IV.4.3.3 La spectrophotométrie PIR	136
IV.4.3.3.1 Calibration du spectrophotomètre PIR	137
IV.4.3.3.1.1 Construction du modèle PLS	137
IV.4.3.3.2 Validation du modèle	140
IV.4.3.3.2.1 Concordance entre les deux techniques de mesures	141
IV.4.3.3.2.2 Exactitude et précision de la méthode PIR	143
IV.4.3.3.2.3 Evaluation du profil de risque	145
IV.4.3.4 Usage du modèle PIR dans le contrôle de l'homogénéité de mélange	145
IV.4.3.5 Conclusions	147

IV.5 Conclusions générales	148
IV.6 Références bibliographiques	150
V. Etude de l'homogénéité d'un mélange multicomposant	155
V.1 Introduction	155
V.2 Matériels	156
V.3 Méthodes	156
V.3.1 Méthode de référence du dosage du chlorhydrate de diltiazem	156
V.3.1.1 Solutions de référence	157
V.3.1.2 Préparation des échantillons à doser.....	157
V.3.1.3 Validation de la méthode de référence	157
V.4 Etude de la cinétique d'homogénéité du mélange pour compression directe à base de diltiazem HCl	158
V.4.1 Etude préliminaire par spectrophotométrie UV-Visible	158
V.4.2 Suivi de la cinétique de mélange par la spectrophotométrie PIR	
.....	162
V.4.2.1 Méthodes	162
V.4.2.2 Analyse des spectres des matières premières et du mélange	
.....	163
V.4.2.3 Etude de l'influence de la vitesse d'agitation et de la	
concentration en principe actif sur le point de fin de mélange	166
V.5 Résultats et discussion	167
V.6 Conclusions	173
V.7 Applications de la spectrophotométrie PIR au dosage des comprimés à base de diltiazem HCl	174
V.7.1 Introduction.....	174
V.7.2 Validation de la méthode de dosage du diltiazem HCl dans des	
comprimés	175
V.7.2.1 Matériel et méthodes.....	175
V.7.2.2 Résultats et discussions	176
V.7.3 Comparaison de la méthode PIR et de la méthode de référence	
UV.....	180

V.7.3.1 Matériels et méthodes	180
V.7.3.2 Résultats et discussions.....	181
V.7.4 <i>Validation du procédé de fabrication des comprimés de diltiazem HCl par PIR</i>	182
V.7.4.1 Introduction.....	182
V.7.4.2 Matériel et méthodes.....	183
V.7.4.3 Résultats et discussions.....	183
V.7.5 <i>Conclusions</i>	187
V.8 Références bibliographiques	188
VI. Etude de l'homogénéité d'un mélange à l'échelle industrielle	191
VI.1 Etude de la cinétique de mélange d'une poudre pour compaction	191
VI.1.1 <i>Introduction</i>	191
VI.1.2 <i>Matériels et Méthodes</i>	191
VI.1.2.1 Méthode de référence du dosage du principe actif.....	192
VI.1.2.2 Suivi de la cinétique de mélange par la spectrophotométrie PIR.....	192
VI.1.2.2.1 Méthodes	192
VI.1.2.2.2 Résultats et discussions	194
VI.1.3 <i>Conclusions</i>	196
VI.2 Etude de la cinétique d'addition du Stéarate de Magnésium	196
VI.2.1 <i>Introduction</i>	196
VI.2.2 <i>Matériel et Méthodes</i>	197
VI.2.3 <i>Résultats et Discussions</i>	197
VI.2.4 <i>Conclusions</i>	199
VI.3 Références bibliographiques	201

Conclusions

Discussion et conclusions générales.....203

Résumés

Résumé.....211
Summary.....217
Samenvatting.....221

Annexes

Annexes.....225

Publications

Publications.....235

INTRODUCTION

Chapitre I

Le mélange de poudres

I.1 Introduction

Le mélange de poudres est une opération essentielle dans la production des médicaments. La qualité du mélange va conditionner d'emblée la qualité du produit fini. En effet, le mélange final doit être homogène puisqu'il va être divisé en plusieurs unités qui doivent renfermer la même quantité d'excipients et de principe actif.

Le principe actif est rarement utilisé seul, mais plutôt en association avec des excipients qui permettent d'améliorer les caractéristiques biopharmaceutiques et technologiques du médicament. L'opération de mélange a comme objectif l'obtention d'une répartition homogène des différents constituants.

Cet objectif comprend deux aspects essentiels (Cartillier, 1987) :

- D'une part, un aspect technologique car il faut aboutir à un mélange homogène quelles que soient les caractéristiques des constituants.
- D'autre part, un aspect thérapeutique car il convient de s'assurer que chaque unité de prise obtenue par la suite contient effectivement la quantité de principe actif définie.

Bien que le mélange de poudres soit une opération très courante, son approche reste très empirique, la caractérisation d'un mélange et la validation du procédé restent encore difficiles.

La validation du procédé de mélange est nécessaire pour différentes raisons, comme :

1. La connaissance de l'efficacité du mélangeur
2. La détermination du temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène
3. L'évaluation de la robustesse de la méthode de fabrication de formes solides unitaires

Le mélange de poudres diffère du mélange de liquides par différents aspects (Massol-Chaudeur, 2000) :

- Il n'y a pas de mouvement relatif des particules solides, comme pour les liquides ou les gaz, sans apport d'énergie. La vitesse d'homogénéisation des poudres ne dépend que des propriétés d'écoulement des particules et des conditions opératoires imposées par le mélangeur.
- Bien que les molécules d'un système liquide monophasé puissent être différentes et diffuser à des vitesses différentes, elles atteindront toujours un état de mélange parfait dans un temps plus ou moins long. En revanche, l'homogénéisation de solides est toujours accompagnée d'un processus de démélange appelé ségrégation qui ne permet pas l'obtention d'un mélange parfait. L'état final d'un mélange est un équilibre réversible entre un processus d'homogénéisation et un démélange. Par opposition au mélange de liquides ou de gaz, un mélange de poudres n'est jamais dans un état irréversible et tout mouvement peut entraîner un déplacement de l'équilibre mélange/ségrégation.
- La taille d'une particule solide est toujours plus élevée que n'importe quelle molécule de liquide ou de gaz. En conséquence, un

prélèvement de poudres d'un mélange aléatoire aura une texture moins fine et une qualité de mélange moindre qu'un prélèvement équivalent pris dans un mélange de gaz ou de liquides.

I.2 Définition

Le processus de mélange solide-solide peut être défini de différentes manières :

- Tout processus qui tend à obtenir une répartition aléatoire de particules dissemblables au sein d'un système (Rippie, 1986).
- Opération consistant à disperser dans une masse généralement inerte et dans des proportions déterminées un ou plusieurs principe(s) actif(s) dans le but d'obtenir une homogénéité de répartition compatible avec l'activité thérapeutique. Cette homogénéité doit se conserver au cours des opérations physiques successives (Mony, 1986).

Le mélange de poudres est une opération qui se situe généralement en début du processus de fabrication. Il joue un rôle important dans la qualité galénique et thérapeutique du produit fini. La notion de stabilité du mélange est également primordiale, car, comme le dit Mony dans sa définition, l'homogénéité doit se conserver.

I.3 Les mécanismes de mélange

Lacey a défini trois grandes catégories de mécanismes de mélange (Lacey, 1954):

- Le mélange par DIFFUSION : il s'agit d'un déplacement individuel des particules dans des directions aléatoires les amenant à se positionner les unes par rapport aux autres. Il s'agit d'un mécanisme assez lent aboutissant à une redistribution individuelle des particules.
- Le mélange par CONVECTION : il s'agit du déplacement des particules par blocs. Ceci nécessite le plus souvent l'intervention d'une force extérieure (une pale d'agitation par exemple) pour amener une énergie suffisante au système.
- Le mélange par CISAILLEMENT : il s'agit d'un déplacement des particules en couches. Il apparaît des plans de déplacement de particules au sein du mélange. Ce mécanisme nécessite une énergie intermédiaire par rapport aux deux autres.

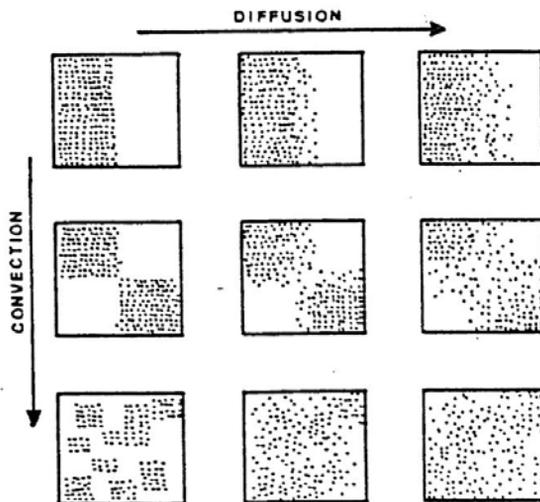


Figure I-1 : Les différents mécanismes de mélange (Schofield, 1970)

La prépondérance de l'un ou l'autre de ces mécanismes est imposée par le type de mélangeur utilisé, mais aussi par la nature des particules. Ainsi, dans le cas d'une poudre à distribution granulométrique étalée, les particules les plus fines ont tendance à se déplacer individuellement selon un mécanisme de diffusion. Les poudres cohésives, au sein desquels les forces d'interaction

particulaires sont élevées, ont plutôt tendance à se déplacer suivant un mécanisme de cisaillement.

Il faut également préciser que pour pouvoir réaliser le mélange, deux conditions préliminaires sont nécessaires : d'une part, une expansion préalable du lit de poudre et d'autre part, un cisaillement du lit de poudre.

Pour permettre l'expansion du lit de poudre, il faut ménager un volume suffisant à l'intérieur de la cuve du mélangeur. En pratique, on ne remplit jamais un mélangeur à plus des deux tiers de sa capacité.

I.4 Les différents types de mélanges

On distingue en théorie trois grands types de mélanges :

- Le mélange parfait
- Le mélange ordonné
- Le mélange « randomisé »

La figure I-2 représente les différents états dans lesquels un mélange peut exister.

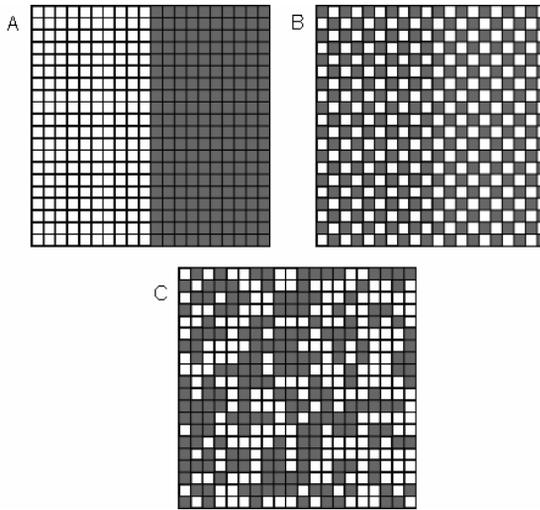


Figure I-2 : Différents états du mélange de poudre : Ségrégation complète (A), le mélange parfait (B), le mélange « randomisé » (C)

I.4.1 Le mélange parfait

Il s'agit d'un mélange pour lequel on obtiendrait des échantillons de composition identique si on prélevait 2 particules adjacentes au sein d'un mélange binaire composé de particules ne se différenciant que par un seul caractère. L'obtention d'un tel mélange est impossible en pratique.

L'équation de la cinétique d'un mélange de solides divisés est la suivante :

$$M = A(1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq. I-1}$$

Avec M : Indice du mélange (= 10 pour Mélange parfait)

$A = 10$

$K = 0.1$

$T = \text{temps (min)}$

La cinétique du mélange est représentée à la figure I-3.

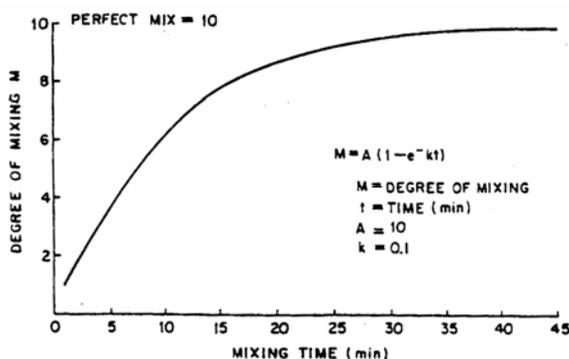


Figure I-3 : Cinétique de mélange de solides divisés (Lantz et Schwartz, 1990)

Vu le caractère asymptotique de la courbe, le mélange parfait ne peut toutefois pas être atteint.

I.4.2 Le mélange ordonné

Hersey est le premier à avoir décrit cet état de mélange. Il s'agirait d'un mélange dans lequel il existe des interactions entre les différents constituants donnant ainsi naissance à une véritable structure (Hersey, 1975). Dans cette théorie du mélange ordonné, on trouve l'exemple du principe actif de petite taille particulière mélangé avec un excipient de taille particulière plus importante (Yip et al., 1976). Etant donné les différences de propriétés (densité, taille,...) entre les deux types de constituants, le mélange ne serait pas possible sans l'existence d'interaction entre les petites et les grosses particules.

I.4.3 Le mélange randomisé

Le mélange randomisé se traduit par une distribution aléatoire des particules au sein du mélange (cfr. Figure I-2C). En d'autres mots, la probabilité de

trouver une particule d'un des constituants est la même en tout point du mélange (Staniforth, 1982).

En pratique, les mélanges obtenus résultent en réalité de la co-existence d'un état ordonné et d'un état randomisé.

I.5 Les propriétés physico-chimiques des poudres influençant le processus de mélange

I.5.1 La taille des particules

La distribution granulométrique est un paramètre critique. Plus la taille des particules est petite, plus les forces d'attraction interparticulaire sont importantes et plus les poudres seront cohésives. Malgré l'existence de ces forces de cohésion, des mélanges de bonne qualité peuvent être obtenus. En effet, les poudres cohésives ont une faible tendance à ségréger, mais, par contre, elles posent des problèmes d'écoulement.

Une autre caractéristique importante est l'étalement de la distribution granulométrique. Plus l'écart de taille entre les particules est grand, plus le phénomène de ségrégation risque de se manifester.

En effet, au cours du mélange, des espaces interparticulaires peuvent apparaître et favoriser l'écoulement des fines dans les interstices laissés par les particules de plus grande taille. On appelle ce phénomène *la ségrégation par percolation des fines*.

Dans certains cas, un autre mécanisme de ségrégation peut se produire en présence de fines. Il s'agit de l'*élutriation* qui est due à une différence de vitesse par rapport aux grosses particules. Il s'ensuit la formation d'un nuage de poussières de fines et ainsi une ségrégation (Davies, 2002).

Certains auteurs ont mis en relation la distribution granulométrique et l'uniformité de teneur d'un principe actif.

Ainsi, Yalkowsky et Bolton (Yalkowsky et al., 1990) ont montré que, pour satisfaire aux normes d'homogénéité, un principe actif présentant une distribution granulométrique étalée devait subir une réduction de celle-ci pour limiter les phénomènes de ségrégation.

Rohrs et al. (Rohrs et al., 2006) ont établi un modèle permettant d'optimiser la distribution granulométrique d'une matière active afin que les comprimés et/ou gélules réalisés avec cette dernière répondent aux normes d'uniformité de teneur.

Un des moyens pour résoudre certains problèmes de ségrégation est de diminuer le diamètre moyen des différents constituants d'un mélange en dessous de 100 microns ou de réduire les rapports de taille entre ces constituants en dessous de 1,3 (Purutyan et al., 2006).

I.5.2 La forme des particules

Plus les particules sont sphériques et régulières, plus le mélange sera facile à réaliser.

En effet, l'homogénéité est atteinte d'autant plus rapidement que les particules sont de forme régulière (Wong et al., 1990). La forme des particules va influencer les surfaces de contact entre les particules. Les particules sphériques possèdent des propriétés d'écoulement optimales en raison de leur surface de contact plus faible tandis que les particules aciculaires possèdent des propriétés d'écoulement inférieures (Lantz, 1990). L'utilisation d'excipients constitués de particules sphériques contribue à augmenter les propriétés d'écoulement et à minimiser la ségrégation et donc favorise le mélange (Staniforth, 1981).

I.5.3 La densité des particules

La densité est également un facteur qui va influencer le mélange de poudres. De fait, l'utilisation de matériaux présentant des densités différentes peut conduire à différents problèmes lorsque l'on doit obtenir un mélange homogène. La gravité aura tendance à attirer les particules les plus denses vers le bas tandis que les particules les moins denses se retrouveront au sommet.

I.5.4 Les charges électrostatiques et les forces de Van der Waals

Des charges électrostatiques peuvent se concentrer à la surface de particules suite à divers contacts avec les parois du mélangeur ou entre elles. Ainsi, certaines particules peuvent, pendant le mélange, adhérer préférentiellement à la paroi du mélangeur ou se lier aux autres particules, impliquant une ségrégation (Rowley, 2001). Muzzio et Alexander ont identifié les charges électrostatiques comme un des mécanismes responsables de la formation d'agrégats au cours du processus de mélange (Muzzio et al., 2005).

Les forces de Van der Waals sont des forces attractives entre des molécules séparées par une distance grande par rapport à leur taille. Ces forces décroissent avec la distance. Pour déterminer ces forces, deux formules ont été proposées par Lifshitz (Lifshitz, 1956) selon qu'il s'agit de l'interaction d'une particule avec la paroi d'un mélangeur ou de deux particules entre elles :

$$F_{vdw} = \frac{\overline{hw}}{8\pi Z_0^2} R \quad \text{Eq. I-2}$$

Avec : $R=$ Le rayon de la sphère

$Z_0 =$ La distance entre la sphère et la paroi

$\overline{hw} =$ Constante du système

Cette relation peut s'étendre à l'interaction entre deux sphères :

$$F_{vdw} = \frac{\overline{hw}}{8\pi Z_0^2} \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) \quad \text{Eq. I-3}$$

Avec R_1 et R_2 les rayons respectifs de chaque sphère.

Le champ d'action des forces de Van der Waals est bien inférieur à celui des forces électrostatiques. Tandis que les forces électrostatiques sont dépendantes de la nature du matériau, de ses propriétés de surface et des impuretés, les forces de Van der Waals sont, quant à elles, dépendantes de la compacité du lit de poudre affectant directement les distances interparticulaires. Ainsi pour les grosses particules, les liaisons de Van der Waals peuvent être considérées comme négligeables (figure I-4).

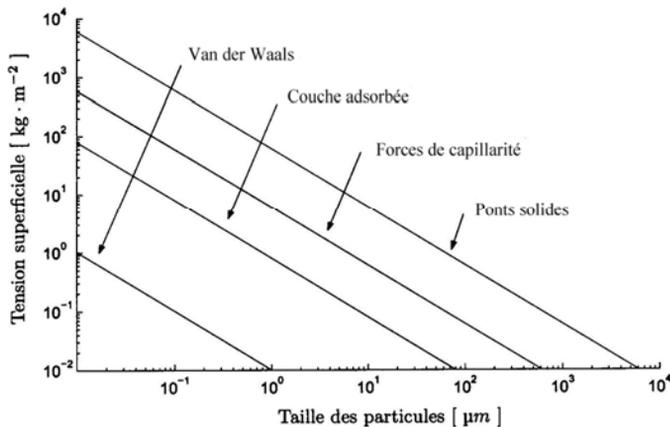


Figure I-4 : Relation entre la tension superficielle et la taille des particules (Rumpf, 1962)

I.5.5 L'humidité

Dans des conditions d'équilibre, la forme d'humidité retenue par une poudre est fonction de la nature des solides, de l'humidité ambiante, de la température et de la pression. Si l'humidité est inférieure à une valeur critique, H_c (humidité critique), elle est présente sous forme de vapeur adsorbée entre les particules. Dans le cas contraire, on est en présence de ponts liquides.

Dans le premier cas, la liaison interparticulaire est causée par le recouvrement des particules voisines par une couche d'humidité adsorbée. L'intensité de cette liaison est proportionnelle à la tension superficielle du film adsorbé et à la surface de contact. Elle est influencée par la densité de l'arrangement des particules ainsi que par leur forme et leur taille.

Dans le cas de deux sphères de diamètre différent (figure I-5), l'aire de contact est donnée par :

$$S = 4\pi\left(\delta - \frac{y}{2}\right)R_2\left(\frac{m}{m+1}\right) \quad \text{Eq. I-4}$$

Avec : δ = épaisseur de la couche adsorbée

y = distance entre les deux sphères

R_2 = rayon de la sphère la plus petite

$m = \frac{R_1}{R_2}$, rapport des rayons des 2 sphères

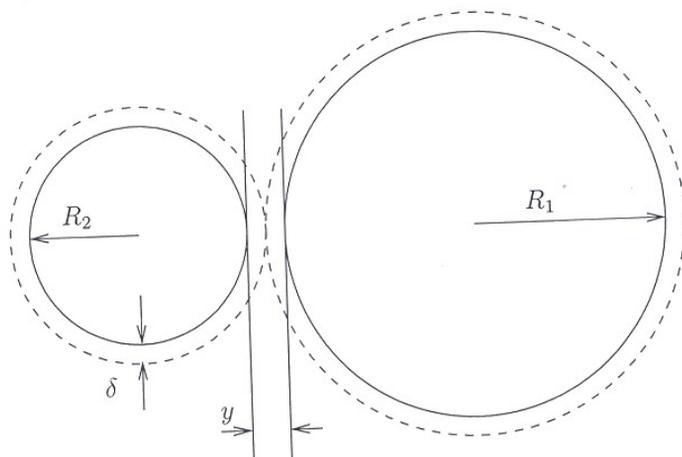


Figure I-5 : Couche d'humidité adsorbée entre deux particules (Harnby, 1985)

Dans le cas de l'eau comme liquide adsorbé et en considérant le poids de la plus petite particule comme unité de force, la force de liaison est donnée par :

$$f = \frac{3 \times 10^5 (\delta - y/2)}{\gamma R_2^2} \left(\frac{m}{m+1} \right) \quad \text{Eq. I-5}$$

Avec δ = épaisseur de la couche adsorbée

y = distance entre les deux sphères

R_2 = diamètre de la sphère la plus petite

$m = R_1 / R_2$

γ = masse spécifique du liquide adsorbé

Abouzeid (Abouzeid et al., 1972) a montré que lorsque le taux d'humidité était élevé, les particules ont tendance à se déplacer en agglomérats.

On notera que selon l'équation I-5, si une particule est très grande, la force de liaison s'accroît. Ainsi, la force entre une particule et une surface plane est deux fois plus importante qu'entre deux sphères de même taille. La

distribution de taille des particules favorisera donc une hétérogénéité des interactions conduisant à des phénomènes de ségrégation.

Rumpf (Rumpf, 1962) a représenté la relation entre la tension superficielle théorique des agglomérats en fonction de la taille des particules (Figure I-4).

En conclusion, il apparaît que l'humidité ambiante joue un rôle primordial dans le comportement des poudres.

I.6 Autres paramètres influençant l'homogénéité

I.6.1 La concentration en matière active

Il est généralement admis que pour les formulations faiblement dosées (<1%), l'uniformité de teneur est plus difficile à atteindre. Deux grands problèmes peuvent se produire avec les mélanges faiblement dosés : l'incapacité d'un mélangeur à briser les agglomérats et la ségrégation.

Kornchankul (Kornchankul et al., 2002) a étudié l'effet d'une diminution de la concentration en matière active sur l'uniformité de teneur. Dans cette étude, deux formulations se différenciant uniquement par leur teneur en matière active ont été comparées. Il apparaît évident que pour la formulation présentant la concentration la plus élevée, le mélange homogène est atteint plus rapidement. Il faut dans ce cas moins de temps pour permettre une bonne distribution des particules du principe actif dans l'ensemble du mélange.

Lorsque la teneur en principe actif est relativement faible, le nombre de particules doit augmenter dans une dose unitaire. Par conséquent, les particules de principe actif doivent être micronisées. Ceci permet de diminuer les valeurs de l'écart-type théorique donné par :

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}} \quad \text{Eq. I-6}$$

Avec N = taille de l'échantillon

P = proportion du constituant actif et $1-P$ équivaut à la proportion de l'excipient

I.6.2 La nature des excipients

La formulation du mélange est également primordiale car certains excipients vont contribuer à l'obtention d'un mélange homogène. C'est le cas notamment des agents régulateurs d'écoulement.

Les effets produits par les différents régulateurs d'écoulement dépendent d'une part, de leur nature chimique (ex : possibilité de ponts hydrogène avec les autres constituants) et d'autre part, de propriétés physiques de leurs particules comme la taille et la forme.

Le plus utilisé est la silice colloïdale anhydre (Jonat et al., 2004; Jonat et al., 2006). Il existe deux théories concernant le mode d'action de ces excipients.

La première décrit le recouvrement des particules de poudres par les fines particules de l'agent régulateur d'écoulement. La formation de cette couche augmente la distance entre les différentes particules de poudre réduisant ainsi les forces d'attraction entre elles ce qui augmente leurs propriétés d'écoulement.

La seconde décrit un recouvrement identique qui permet une possibilité pour les différentes particules de rouler les unes sur les autres et favorise ainsi l'écoulement (Sheth et al., 1980).

I.7 Le contrôle de l'homogénéité

Le contrôle de l'homogénéité de mélange est une étape primordiale dans la fabrication du médicament. L'hétérogénéité d'un mélange peut être due, soit

à un temps de mélange insuffisant, soit à un phénomène de démixtion durant le transport ou le stockage.

Habituellement, l'homogénéité du mélange est déterminée en prélevant des échantillons au sein du mélange. Idéalement, chaque échantillon doit avoir une masse équivalente à une à trois fois la masse d'une prise unitaire du produit fini (USP, 2003).

I.7.1 Historique

Les industries pharmaceutiques sont tenues de respecter les réglementations définies dans le document 21 CFR (21 Code of Federal Regulations). Il s'agit d'une loi générale décrivant les règles de bonnes pratiques de fabrication (cGMP). En particulier, les chapitres 210 et 211 décrivent respectivement la fabrication, le conditionnement et le stockage des matières premières (210) et des produits finis (211).

La réglementation 21 CFR est publiée par la Food and Drug Administration (FDA). Cette loi très générale ne donne pas vraiment les moyens qui doivent être mis en œuvre pour la respecter mais se limite à une description des normes demandées. Par exemple, jusqu'au début des années 90, moment à partir duquel la FDA a commencé à clarifier et à standardiser les méthodes de contrôle de l'homogénéité de mélange, rien n'était précisé concernant la manière d'aboutir à l'homogénéité et de contrôler le mélange.

Dans un premier temps, la réglementation ne définissait pas un schéma d'échantillonnage et le contrôle reposait sur la prise d'un échantillon qui pouvait se limiter à 10 doses unitaires. Murray (Murray et al., 1995) a montré que ce test était inadéquat pour prouver l'homogénéité d'un lot, en particulier lorsque le principe actif est faiblement dosé.

En 1993, suite à une décision de justice (Wolin, 1993), la FDA a été contrainte de conseiller la prise d'un échantillon dont la masse équivaut au maximum à trois fois la masse du produit fini. Aucune réglementation n'était

cependant éditée concernant les critères d'acceptation de l'homogénéité et le nombre d'échantillons à prélever.

Les derniers critères ont été définis en 1999 par le « Working Group for Blend Uniformity Testing »(Howard-Sparks et al., 2004) :

- La masse de l'échantillon ne doit pas excéder trois fois la masse de la forme unitaire.
- La valeur du RSD ne doit pas être supérieure à 5% et tous les dosages individuels doivent se trouver dans la fourchette 90-110 % de la valeur attendue.

Depuis 2003 (CDER, 2003), il est recommandé d'effectuer un échantillonnage « stratifié » qui consiste en la prise d'échantillons à des intervalles de temps réguliers aux différents endroits de la chaîne de production susceptibles d'être à l'origine d'une mauvaise uniformité de teneur du principe actif dans le produit fini (Boehm G et al.,2003). Au niveau du mélange final, il est recommandé de prendre au minimum trois échantillons aux différents niveaux de prélèvement (minimum 10 niveaux de prélèvement, soit un total de 30 prélèvements). Dans un premier temps, le principe actif sera dosé dans un seul échantillon prélevé à chaque niveau. Si les résultats obtenus sur ces échantillons ne rencontrent pas les critères d'acceptation (90-110 % et $CV \leq 5,0\%$), les autres échantillons devront être dosés.

En outre, il est recommandé de prélever des échantillons à différents moments de la chaîne de production ; par exemple, des comprimés seront prélevés au cours de la compression. La teneur en principe actif dans ces comprimés devra se situer à l'intérieur de l'intervalle 90-110% et le coefficient de variation de la teneur sera $\leq 6\%$.

I.7.2 Echantillonnage

La difficulté de l'échantillonnage réside dans le fait que les échantillons doivent être représentatifs du mélange dans lequel ils ont été prélevés. En théorie, pour que l'échantillon soit représentatif, il faut que chaque constituant ait une chance équivalente d'être prélevé. Il faut aussi éviter de perturber de manière excessive l'intégrité du mélange au sein duquel on effectue les prélèvements. Le nombre d'échantillons, leur masse ainsi que la méthode d'échantillonnage sont des paramètres très importants pour garantir la qualité de ce dernier. On sait depuis longtemps (Hersey, 1970) que plus le nombre d'échantillons est élevé plus l'erreur sur l'homogénéité diminue.

I.7.2.1 Techniques de prélèvements

I.7.2.1.1 Echantillonnage statique

Bien que les sondes de prélèvement soient loin d'être le matériel idéal pour l'échantillonnage, elles restent les outils les plus couramment utilisés. En effet, ces sondes de prélèvements sont fortement invasives pouvant ainsi être à l'origine de perturbation au sein du lit de poudre. De plus, dans certains cas, un écoulement préférentiel de certains constituants par rapport aux autres peut être constaté, responsable d'une interprétation erronée de l'état de mélange. Idéalement, une sonde doit être étroite, avec une extrémité pointue afin de limiter au maximum la perturbation du mélange et faciliter l'insertion de l'outil au sein du lit de poudre (Harwood et al., 1977).

Il existe différents types de sonde de prélèvements.

La figure I-6 présente des sondes de prélèvements permettant de récolter un ou plusieurs échantillons. Plusieurs publications ont fait la comparaison de différents types de sondes de prélèvements et ont montré l'importance du choix de la sonde sur la qualité de l'échantillonnage (Garcia et al.,1997) (Berman et al.,1996).

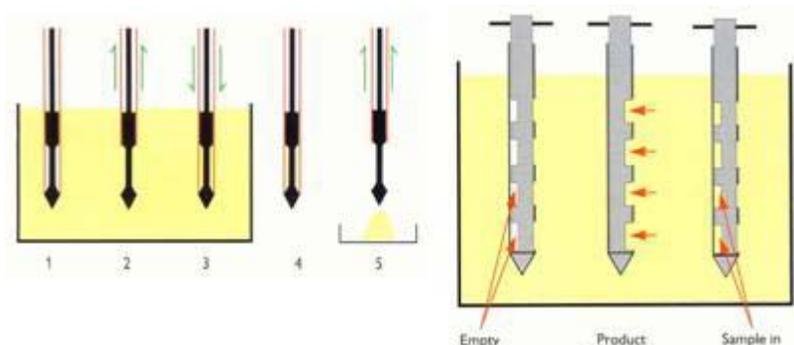


Figure I-6 : Exemples de différents modèles de sondes de prélèvements

Berman a également étudié la manière de plonger la sonde dans la cuve et comment l'angle d'insertion pouvait influencer l'erreur d'échantillonnage. D'après lui, la meilleure position est celle présentant la sonde à 45 degrés par rapport au lit de poudre avec les compartiments ouverts vers le haut afin que la poudre située au-dessus puisse s'écouler facilement dans les compartiments. La figure I-7 illustre les différents modes de positionnement comparés par Berman.

Il a également comparé différentes profondeurs d'échantillonnage. Ses travaux ont montré qu'une même sonde de prélèvements pouvait retirer des échantillons de composition différente en fonction des conditions d'utilisation (profondeur, inclinaison,...) et que deux sondes différentes utilisées dans les mêmes conditions pouvaient prélever des échantillons différents. Ceci démontre que l'usage des sondes de prélèvements est loin d'être idéal.

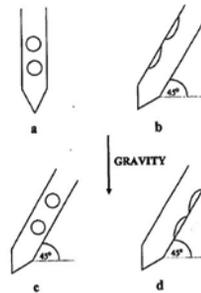


Figure I-7 : Comparaison des modes de prélèvements (Berman et al., 1996)

Par conséquent, certains privilégient le dosage unitaire sur le produit fini (Carstensen et al., 1996). Celui-ci permettrait, en effet, d'éviter l'étape d'échantillonnage, potentielle source d'erreur mais cette méthode est évidemment coûteuse.

I.7.2.2 Echantillonnage dynamique

Certains auteurs préconisent l'échantillonnage dynamique. Dès lors, deux « règles d'or » doivent être respectées (Allen, 1996) :

- Une poudre ne peut être échantillonnée qu'en mouvement
- Le flux d'écoulement doit faire l'objet de prélèvements uniformes sur toute sa largeur et pendant des intervalles de temps réguliers.

Les avantages de l'échantillonnage dynamique (stream sampling) découlent de la possibilité d'obtenir un nombre plus important d'échantillons et donc une image plus représentative de la qualité d'un mélange de poudre. De plus, cette méthode étant non invasive évite tout changement susceptible d'être provoqué par l'insertion d'une sonde au sein du lit de poudre. Enfin, cette technique d'échantillonnage permet de prévoir d'éventuels phénomènes de ségrégation lorsque la poudre est en mouvement, notamment lors du remplissage des matrices sur une presse pharmaceutique.

Cependant, il existe une limitation de l'échantillonnage dynamique, il n'est pas possible de prélever des échantillons dans des régions présentant un risque d'hétérogénéité du mélange, contrairement à l'utilisation de sondes de prélèvements.

En fait, l'objectif principal de l'échantillonnage dynamique est d'obtenir des échantillons représentatifs et non de cibler des régions spécifiques (Popo et al., 2002). Un schéma d'un échantillonneur rotatif est représenté à la figure I-8.

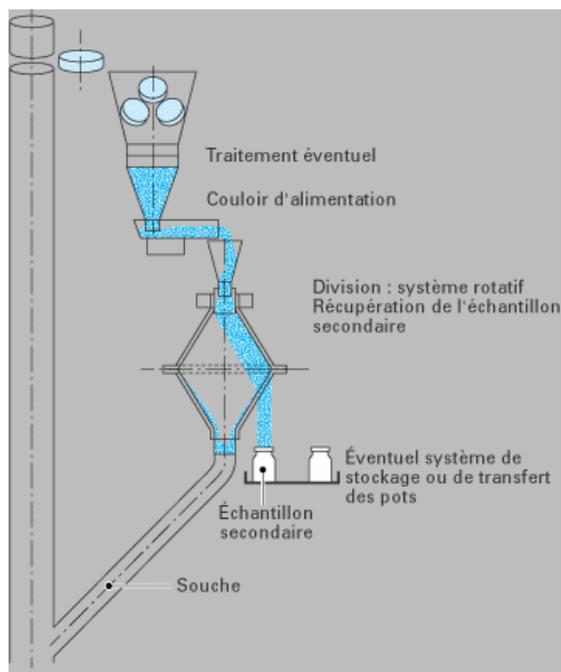


Figure I-8 : Représentation d'un système d'échantillonnage dynamique (Massol-Chaudeur, 2000)

I.7.2.3 Erreur d'échantillonnage

On l'aura compris, l'échantillonnage n'est pas une opération aisée. De nombreux articles ont présenté des résultats sur des échantillons de mélanges qui sont moins uniformes que les comprimés issus de ces mêmes mélanges (Garcia et al., 2001; Kornchankul et al., 2002; Kraemer et al.,

1999). Mis à part le mode de prélèvement, il est évident que la formulation du mélange va influencer fortement la qualité de l'échantillonnage. En effet, si les constituants du mélange présentent des propriétés d'écoulement différentes, il est possible que certains d'entre eux s'écoulent plus facilement dans le compartiment d'échantillonnage. Si tel est le cas du principe actif, les échantillons pourraient être sur-dosés. Dans le cas contraire, ils seront sous-dosés.

Des erreurs d'échantillonnage peuvent aussi être constatées lors de l'adhésion préférentielle de certains constituants à la sonde par des interactions électrostatiques qui peuvent être limitées par l'utilisation de matériaux conducteurs tel que l'inox. Mohan a montré que l'on pouvait préalablement tapisser la sonde avec une fine couche de poudre de la formulation pour diminuer les problèmes d'adhésion préférentielle (Mohan et al., 1997). La concentration en matière active est également un paramètre important. En effet, plus celle-ci est faible, plus les autres sources d'erreurs seront amplifiées.

I.7.2.4 Taille de l'échantillon

La variance entre les échantillons diminue lorsque la taille ou la masse de ceux-ci augmente. Toutes les sources d'erreur d'échantillonnage voient leur influence diminuer lorsque la taille de l'échantillon augmente (Bolton et al., 1997).

Cependant, il existe des règles concernant la taille des échantillons (FDA, 2003). Celle-ci doit être au maximum égale à trois fois la taille de la dose unitaire final. Dans certains cas, si le produit fini renferme de très faibles concentrations en principe actif, un échantillon dont la taille est dix fois supérieure à la forme finale peut être accepté.

De manière générale, il faut cependant veiller à ce que la masse de l'échantillon prélevé soit proche de la masse de l'unité de prise par le patient.

I.7.3 Les méthodes de mesures en ligne de l'homogénéité de mélange

Le développement actuel de méthodes de mesures non invasives devrait toutefois permettre à l'avenir une meilleure définition et un meilleur contrôle de l'homogénéité. Grâce à ces nouvelles techniques, il semble possible de surmonter les difficultés liées à l'échantillonnage. Etant adaptables en ligne, elles sont aptes à fournir un échantillonnage exhaustif, c'est-à-dire qu'elles prennent en considération tous les échantillons possibles.

I.7.3.1 Les méthodes spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques (ex : proche infrarouge, Raman...) sont des techniques d'analyse qui permettent de connaître la composition chimique beaucoup plus rapidement que les dosages classiques. Elles permettent des analyses simultanées de divers composants avec une grande rapidité, sur une faible quantité de produit, récupérable si nécessaire, et avec un coût d'analyse relativement faible.

De plus, le développement des fibres optiques permet l'utilisation de ces techniques en plusieurs endroits sur la chaîne de production. L'utilisation de ces méthodes sera développée dans le chapitre II de cette introduction.

I.7.3.2 Les méthodes d'analyse d'images

Realpe (Realpe et al., 2003) a développé un système d'analyse d'images permettant de caractériser l'homogénéité d'un mélange. Le travail consiste à numériser les images prises sur un mélange en cours. Les images sont numérisées par niveaux de gris d'un pixel d'image dont les valeurs s'étendent de 0 à 255. La valeur de niveaux de gris contient les informations sur la quantité de lumière réfléchiée par les composants du mélange. Ces

valeurs de niveaux de gris sont analysées et organisées dans un histogramme afin de déterminer la concentration de chaque composé du mélange dont les valeurs moyennes de niveaux de gris ont été mesurées initialement. Le mélange est considéré comme acceptable lorsque la moyenne des valeurs de niveaux de gris de l'histogramme ne change plus significativement.

I.8 La caractérisation de l'état de mélange par la technique d'échantillonnage

Le caractère aléatoire du processus d'échantillonnage apparaît comme évident. Il ne doit pas être assimilé à une simple opération technologique mais à un processus aléatoire à part entière susceptible d'introduire des erreurs. Ainsi, si la caractérisation de l'état de mélange est basée sur une étude de la variance mesurée expérimentalement σ_{mes}^2 , elle est en fait la somme de trois termes :

$$\sigma_{mes}^2 = \sigma_{mél}^2 + \sigma_{éch}^2 + \sigma_{ana}^2 \quad \text{Eq. I-7}$$

Où $\sigma_{mél}^2$ = la variance réellement due au processus de mélange

$\sigma_{éch}^2$ = la variance (ou erreur) due au protocole d'échantillonnage

σ_{ana}^2 = la variance (ou erreur) due à la méthode analytique de dosage de la substance active

Si la variance due à la méthode analytique est souvent faible, il est important de pouvoir estimer et de pouvoir minimiser la variance due au protocole d'échantillonnage.

D'autre part, on a l'habitude de quantifier l'homogénéité d'un mélange par un indice de mélange. La littérature décrit un certain nombre d'indices de mélange (Madsen, 2002). La diversité de ceux-ci indique la difficulté à décrire la nature complexe du mélange.

Le tableau I-1 présente différents indices permettant de caractériser un mélange de poudres :

avec σ_0^2 : la variance du contenu en principe actif d'un mélange complètement ségrégé
 σ_r^2 : la variance du contenu en principe actif d'un mélange aléatoire
 σ : la variance du contenu en principe actif du mélange étudié

Tableau I-1 : Exemples de quelques indices permettant de caractériser un mélange de poudres

Auteur	Indice
Lacey (Lacey,1954)	$\frac{\sigma_0^2 - \sigma^2}{\sigma_0^2 - \sigma_r^2}$
Kramer (Lacey,1954)	$\frac{\sigma_0 - \sigma}{\sigma_0 - \sigma_r}$
Ashton (Vaizoglu,1999)	$\frac{\log[\sigma_0^2 / \sigma^2]}{\log[\sigma_0^2 / \sigma_r^2]}$
Poole (Poole et al.,1964)	$\frac{\sigma}{\sigma_r}$
Rose (Rose et al.,1965)	$1 - \frac{\sigma}{\sigma_0}$

En pratique, la méthode la plus utilisée reste la détermination de l'écart-type ou du coefficient de variation du contenu en principe actif des différents échantillons.

I.9 Les différents types de mélangeurs

Les mélangeurs utilisés dans l'industrie sont principalement de trois types, selon que l'agitation est produite par un mobile interne (mélangeur convectif), par rotation de la cuve (mélangeur à tambour), ou bien encore par l'écoulement propre du matériau (mélangeur statique).

I.9.1 Les mélangeurs à cuve tournante

Les mélangeurs à cuve tournante sont généralement utilisés pour les poudres présentant de bonnes propriétés d'écoulement. Il en existe différents types comme le montre la figure I-9.

Il s'agit en général d'une cuve fermée soumise à une rotation autour d'un axe. Ce mouvement forçant les particules à rouler les unes par rapport aux autres à la surface du mélange. Selon l'inclinaison de la cuve, sa forme, sa position par rapport à l'axe de rotation et la vitesse de rotation employée, les particules subissent des mouvements d'avalanches plus ou moins marqués. Ces mélangeurs sont dépourvus de pièces internes facilitant ainsi leur nettoyage. Le mécanisme principal dans ce type de mélangeur repose sur la gravité et le mouvement du lit de poudre est influencé par les mécanismes de diffusion et de cisaillement. Leur usage est recommandé pour le mélange de poudres à écoulement libre possédant des caractéristiques les plus identiques possibles (Yip et al.,1977). En effet, si les poudres sont constituées de particules de taille, de forme ou de densité différentes, des phénomènes de ségrégation apparaîtront au sein du mélangeur. Les

appareils les plus fréquemment rencontrés sont les mélangeurs en V et les doubles cônes (Brone et al., 1998).

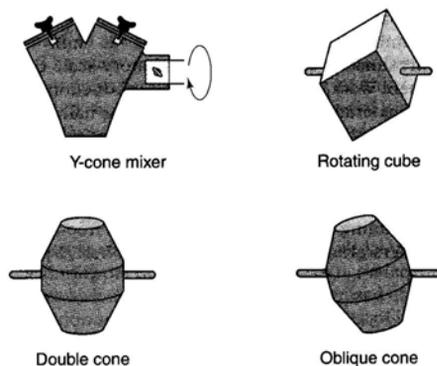


Figure I-9 : Illustration de différents types de mélangeurs à cuve tournante

I.9.2 Les mélangeurs à outils mobiles

Les mélangeurs à outils mobiles sont pourvus de bras qui permettent un mélange des poudres (Figure I-10). Parmi ces types de mélangeurs, on peut citer le mélangeur planétaire et le mélangeur à vis. Ce sont des mélangeurs produisant une agitation modérée par rapport aux mélangeurs à cisaillement. Leur utilisation est donc réservée à des mélanges randomisés de poudres qui ont tendance à ségréger (Williams, 1990).

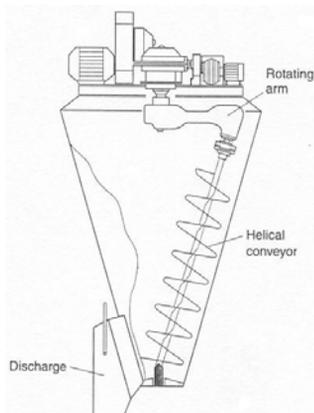


Figure I-10 : Exemple de mélangeur à outil mobile : le mélangeur Nauta®

I.9.3 Les mélangeurs à force de cisaillement élevée

Dans ces appareils, le processus de mélange est induit par des cisaillements importants appliqués au sein de la poudre. Ce type de mélangeur permet de briser certains agglomérats de poudres très cohésives et d'améliorer ainsi la qualité de mélange. Ils peuvent réduire la taille des particules et briser les agrégats en particules primaires même dans des systèmes très cohésifs. En outre, ces mélangeurs sont fréquemment utilisés pour la granulation par voie humide (Rossetto, 1998).

La figure I-11 représente schématiquement un mélangeur à haut cisaillement constitué d'une pale principale ainsi que d'un émotteur. Ce mélangeur a été utilisé au cours de notre étude.

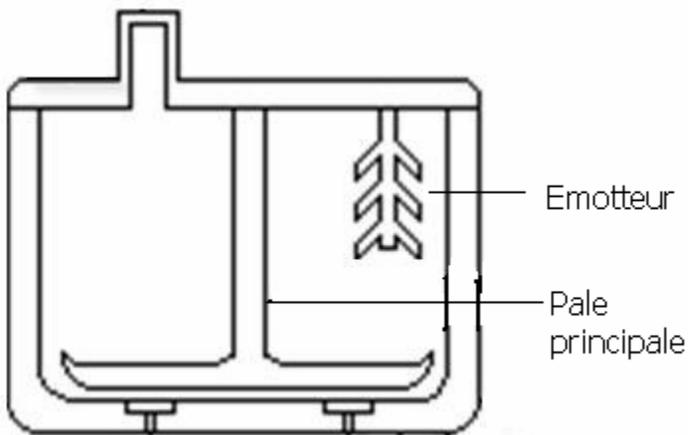


Figure I-11 : Exemple de mélangeur à force de cisaillement élevée (Gra[®]10, Collette, Belgique)

I.10 Références bibliographiques

Abouzeid, A.-Z., Fuerstenau, D.; Effect of humidity on mixing of particulate solids. *Ind.Eng.Chem.Process Des.Develop.* 1972, 11 (2), 296-306.

T. Allen, *Particle size measurement*, 1996, pp. 824.

Berman, J.; Schoeneman, A.; Shelton, J. T.; Unit dose sampling: A tale of two thieves. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1996, 22 (1), 1121-1132.

Boehm G; Clark J; Dietrick J; Foust L; Garcia T; Gavini M; Gelber L; Geoffroy JM; Jimenez P; Mergen G; Muzzio F; Planchard J; Prescott J; Timmermans J; Takiar N. The use of stratified sampling of blend and dosage units to demonstrate adequacy of mix for powder blends. *PDA Journal of pharmaceutical science and technology* 2003, 57, 59-74.

Bolton, S.; Sharma, M.; Cohen, E.; Nash, R.; Is it necessary to take small blend samples to assess drug uniformity? *Pharmaceutical Development and Technology* 7-2-1997, 2 (3), 297-299.

Brone, D.; Alexander, A.; Muzzio, F. J.; Quantitative characterization of mixing of dry powders in V-Blenders. *Particle Technology and Fluidization* 1998, 44 (2), 271-278.

Carstensen, J. T., Dali, V., Blending validation and content uniformity of low-content, noncohesive powder blends. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1996, 22 (4), 285-290.

Cartillier, L., Contribution à l'étude du mélange de poudres à principe actif cohésif et faiblement dosé. 1987.

CDER, Guidance for industry: Powder blends and finished dosage units-Stratified in-process dosage unit sampling and assessment. 2003

P. Davies, *Oral Solid Dosage Forms*, 2002, pp. 379.

Dietrick J., Food and Drug administration's recommendations of validation issues. *Regulatory Affairs* 2006, 5, 363-366.

FDA, Draft Guidance for Industry: Powder Blends and Finished Dosage Units-Stratified In-Process Dosage Unit Sampling and Assessment, 2003.

Garcia, T.; Wilkinson, S.J.; Scott, J.F.; The development of a blend-sampling technique to assess the uniformity of a powder mixture. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001, 27 (4), 297-307.

Garcia, T.; Taylor, M.; Pande, G.; Comparison of the Performance of Two Sample Thieves for the Determination of the Content Uniformity of a Powder Blend. *Pharmaceutical Development and Technology* 1997, 3 (1), 7-12.

Harwood, C. F.; Ripley, T.; Errors associated with the thief probe for bulk powder sampling. *Journal of powder and bulk solids technology*, 1977, 11, 20-29.

Hersey; Ordered mixing: a new concept in powder practice. *Powder Technology* 1975, 11, 41-44.

Hersey, J.; Sampling and assessment of powder mixtures for cosmetics and pharmaceuticals. *J.Soc.Cosmet.Chem.* 1970, 21, 259-269.

Howard-Sparks, M.; Gawlikowdki, A.; FDA Evaluation of blend uniformity and content based on 2003 stratified sampling guidance and 1999 blend uniformity analysis guidance : product A. *PDA Journal of pharmaceutical science and technology* 2004, 58 (4), 222-230.

Jonat, S.; Hasenzahl, S.; Drechsler, M.; Albers, P.; Wagner, K. G.; Schmidt, P. C., Investigation of compacted hydrophilic and hydrophobic colloidal silicon dioxides as glidants for pharmaceutical excipients. *Powder Technology* 18-3-2004, 141 (1-2), 31-43.

Jonat, S.; Albers, P.; Gray, A.; Schmidt, P. C.; Investigation of the glidant properties of compacted colloidal silicon dioxide by angle of repose and X-ray photoelectron spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006, 63 (3), 356-359.

Harnby, N.; *Mixing in the Process Industries*, 2nd Edition, Butterworths, London, UK, 1985, 23-38.

Kornchankul, W.; Hamed, E.; Parikh, N. H.; Sakr, A.; Effect of drug proportion and mixing time on the content uniformity of a low dose drug in a high shear mixer. *Pharmazie* 2002, 57, 49-53.

Kraemer, J.; Svensson, J. R.; Melgaard, H.; Sampling bias in blending validation and a different approach to homogeneity assessment. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1999, 25 (2), 217-222.

Lacey, P. M. C.; Developments in the theory of particle mixing. *J. of Appl. Chem.* 1954, 4, 257-268.

R. J. Lantz Jr and J. B. Schwartz; *Pharmaceutical dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, New York, 1990.

Lifshitz, E. M. Soviet; physics JETP 1956, 2, 73-84.

Madsen, C.; Statistical methods for assessment of blend homogeneity. 2002, 1-264.

Massol-Chaudeur, S. ; Caractérisation de l'état de mélange de poudres - cas des mélanges faiblement dosés. 2000.

Mohan, S.; Rankell, A.; Rehm, C.; Bhalani, V.; Kulkarni, A.; Unit-dose sampling and blend content uniformity testing. *Pharm Technol* 1997, 4, 116-125.

Mony; Conditions d'obtention d'un mélange homogène. 1986.

Murray, M.; Uraizee, S.; Sakr, A.; Preliminary investigations of the suitability of the USP uniformity of dosage units tests for evaluating the uniformity of powder blends and their corresponding tablets. *Pharm. Ind.* 1995, 57 (3), 256-262.

Muzzio, F., Alexander, A.; Scale-up of powder-blending operations. *Pharmaceutical Technology* 2005, March 2005, 34-42.

Poole, K. R.; Taylor, R. F.; Wall, G. P.; *Trans. Inst. Chem. Engrs.*, 1964, 42, 166-173.

Popo, M.; Romero-Torres, S.; Conde, C.; Romanach, R. J.; Blend Uniformity Analysing Using Stream Sampling and Near Infrared Spectroscopy. *AAPS PharmSciTech* 2002, 3 (3), 1-10.

Purutyan, H. Carson, J. W.; Predicting, diagnosing, and solving mixture segregation problems. *Powder and Bulk Engineering* 2006.

Realpe, A. Velazquez, C.; Image processing and analysis for determination of concentrations of powder mixtures. *Powder Technology* 2003, 134, 193-200.

G. Rippie. *The theory and practice of industrial pharmacy*, 1986, pp. 3-20.

Rohrs, B. R.; Amidon, G. E.; Meury, R. H.; Seceast, P. J.; King, H. M.; Skoug, C.J.; Particle size limits to meet USP content uniformity criteria for tablets and capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 95 (5), 1049-1059.

Rose, H. E.; Robinson, D.; *J. Am. Inst. Chem. Eng.* 1965, Ser.10, 13-24.

Y. Rossetto, in *Pharmacotechnie Industrielle* 1998, pp. 213-270.

Rowley, G., Quantifying electrostatic interactions in pharmaceutical solid systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 227 (1-2), 47-55.

H. Rumpf. *Agglomeration*, Wiley, New York, 1962, pp. 379.

Schofield, C.; Assessing mixture by autocorrelation, *Trans. Instn. Engrs.* 1970, 48, T28-T34.

B. B. Sheth, F. J. Bandelin, and R. F. Shangraw; *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, New York, 1980, pp. 141-143.

Staniforth, J. N.; *Advances in Powder Mixing and Segregation in Relation to Pharmaceutical Processing*. *International Journal of Pharmaceutical Technology and Product Manufacture* 1982, 3, 1-10.

Staniforth, J. N.; Rees, J. B.; Relation between mixing time and segregation of ordered mixes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1981, 33, 175-176.

USP, in *U.S. Pharmacopeia*, 2003, pp. 2227-2229.

Vaizoglu, O.; Assessment of the degree of mix of powder mixtures. *Tr. J of Physics* 1999, 23, 97-104.

J. C. Williams, in *Principles of Powder Technology* Chichester, 1990, pp. 71-90.

Wolin; *The United States of America vs Barr Laboratories*. 1993, 812 F supp 458.

Wong, L.; Pilpel, N.; Effect of particle shape on the mixing of powders. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1990, 42 (1), 1-6.

Yalkowsky, S.; H. Bolton, S.; Particle size and content uniformity. *Pharm. Res.* 1990, 7, 962-966.

Yip, C. W; Hersey, J. A.; Ordered mixing theory. *Nature* 1976, 262, 202-203.

Yip, W. Y; Hersey, J. A.; Ordered or random mixing: choice of system and mixer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1977, 3, 429-438.

Chapitre II

La technologie analytique des procédés

II.1 Introduction

Depuis quelques années, est apparu le concept de la Technologie Analytique des Procédés, mieux connue sous le vocable anglais Process Analytical Technology (PAT).

Ce nouveau concept, issu d'une réflexion menée conjointement par la FDA et l'industrie pharmaceutique, a été introduit dans un rapport par l'American Food and Drug Administration (FDA) publié dans sa dernière version en septembre 2004 (American Food and Drug Administration, 2004). Dans ce document, la FDA a ainsi défini le PAT comme étant : « Un système de modélisation, d'analyse et de contrôle en temps réel des procédés de fabrication par le biais de mesures effectuées aussi bien sur les matières premières que sur les procédés de fabrication, dans le but de s'assurer de la bonne qualité des produits finis ».

Parallèlement à l'initiative de la FDA, d'autres institutions se sont lancées dans le projet. L'Agence Européenne pour l'évaluation du médicament (European Medicine Evaluation Agency-EMEA) a également mis sur pied une équipe d'experts PAT afin de promouvoir l'introduction du PAT au sein de l'industrie pharmaceutique (www.emea.eu.int/Inspections/PAThome.html).

Le PAT est donc un système qui, par l'analyse en temps réel des paramètres critiques du procédé de fabrication, vise à obtenir une meilleure compréhension et une meilleure maîtrise du processus de fabrication afin d'améliorer la qualité des produits pharmaceutiques : l'objectif étant de

diminuer les risques d'erreurs de production (Jennings, 2005). La méthodologie PAT vise à assurer la qualité du produit par des contrôles intégrés au processus de fabrication.

L'enjeu principal du PAT est ainsi d'alléger les analyses en laboratoire au profit du contrôle en ligne, d'améliorer la robustesse des procédés de fabrication et de réduire la possibilité de commercialiser un produit défectueux. La libération de lots pourrait ainsi être effectuée immédiatement à la fin du processus de fabrication, sans contrôle ultérieur (« Real-time release »). En effet, le but serait de réaliser non seulement des contrôles des paramètres critiques du procédé de fabrication mais d'utiliser également les résultats de ces contrôles pour éliminer la nécessité de contrôler le produit final a posteriori et effectuer ainsi la libération paramétrique des lots de fabrication. Il est également important de noter que le terme analytique dans la notion de PAT est pris dans un sens très large et inclut des analyses chimiques, physiques, mathématiques, etc.

Afin de répondre aux objectifs définis par la FDA, de nombreuses techniques d'analyses ont été utilisées aux différentes étapes de la fabrication, depuis la réception des matières premières jusqu'au conditionnement des produits finis. Parmi ces techniques d'analyse, les spectrométries vibrationnelles occupent une place privilégiée dans le concept du PAT.

Dans cette introduction, nous nous concentrerons sur l'une d'entre elles : la Spectroscopie Proche Infrarouge (PIR). Le PIR, présent depuis plusieurs années dans l'industrie pharmaceutique par le biais du contrôle des matières premières, peut être également utilisé dans le contrôle de différentes étapes du procédé de fabrication. Depuis son utilisation par des industries telles que AstraZeneca ou Pfizer dans le contrôle du mélange, du séchage et de la compression, une véritable expansion du PIR a pu être constatée durant ces dernières années (Hinz, 2006).

Cependant, d'autres techniques spectroscopiques peuvent être envisagées. La spectroscopie Raman propose notamment des solutions

complémentaires. Celle-ci a fait l'objet de plusieurs travaux (Hausman et al., 2005; Vankeirsbilck et al., 2002; Vergote et al., 2004).

II.2 La Spectroscopie Proche Infrarouge

II.2.1 Historique

On doit le premier spectre Proche Infrarouge à l'astronome anglais William Herschel (Herschel, 1800), lorsqu'il étudia en 1800 le rayonnement solaire. Il postula l'existence d'une lumière invisible située juste sous la composante rouge du spectre visible.

Cependant, ce ne fut que dans la dernière partie du 19^{ème} siècle que Abney et Festing (Abney et al., 1881) poursuivirent les travaux en mesurant photographiquement les spectres PIR de plusieurs solvants organiques entre 700 et 1200 nm. Ces deux auteurs constatèrent l'importance des liaisons impliquant l'atome d'hydrogène en absorption Proche Infrarouge.

Au début du 20^{ème} siècle, de nombreux chercheurs tentèrent d'interpréter les spectres en attribuant les bandes d'absorption à des groupements chimiques. Coblentz, à l'origine du premier spectromètre (Coblentz, 1905), a notamment découvert qu'il n'existe pas deux composés possédant le même spectre, mais que certaines bandes d'absorption se retrouvent dans les spectres de composés de structure chimique identique.

Les premières études quantitatives mettant en œuvre la spectroscopie PIR concernent la détermination de l'humidité atmosphérique par Fowle (Fowle, 1912) et l'étude des interactions entre l'eau et la gélatine réalisée par Ellis et Bath (Ellis et al., 1938).

Néanmoins, la spectroscopie PIR ne prit son essor qu'après la seconde guerre mondiale.

Le Ministère de l'Agriculture américain fut le premier à utiliser cette technique dans le contrôle de la qualité des denrées alimentaires (Ben-Gera et al.,

1968). Par la suite, l'utilisation dans le domaine agro-alimentaire de cette technique allait largement se répandre à d'autres pays dans des méthodes de contrôle telles que l'analyse des œufs, des protéines ou de l'eau dans la viande, etc.

Le développement récent de la spectroscopie PIR doit son évolution aux progrès effectués en optique, en électronique et surtout à l'essor de l'informatique. En effet, les spectres mesurés par les appareils les plus récents renferment des quantités phénoménales d'informations dont l'essentiel ne peut être extrait que par des traitements mathématiques des données.

Dans le domaine pharmaceutique, la spectroscopie PIR est passée en une dizaine d'années, du statut de technique émergente à celui de technique d'analyse de plus en plus courante, notamment grâce aux récents progrès de l'instrumentation mais aussi de la chimométrie (Hindle, 2001).

La spectrophotométrie dans le Proche Infrarouge fait actuellement l'objet d'une description dans les Prescriptions Générales de la Pharmacopée Européenne 5.0 (Chapitre 2.2.40).

II.2.2 Principes fondamentaux de la spectroscopie PIR

II.2.2.1 Introduction

La spectroscopie peut être définie comme l'étude de l'interaction de la lumière avec la matière. La région du Proche Infrarouge couvre la plage des longueurs d'onde de la lumière comprise entre 800 et 2500 nanomètres (nm) comme le présente la figure II-1.

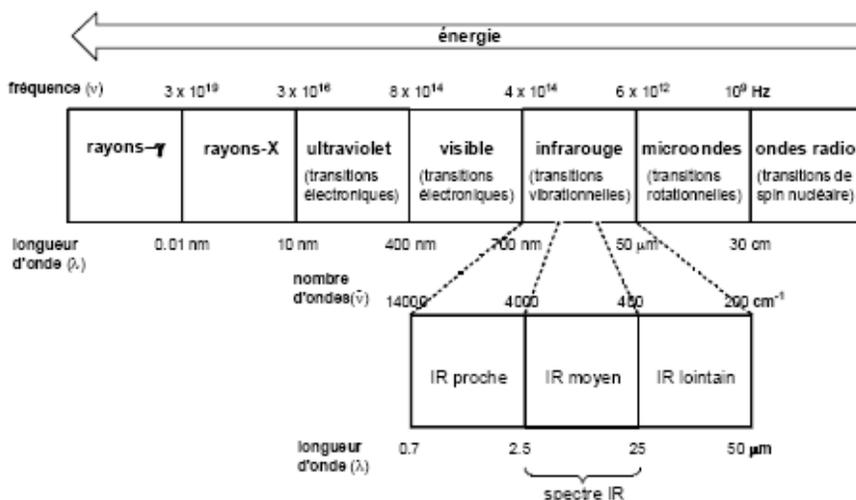


Figure II-1 : Représentation des différentes régions du spectre électromagnétique

Cette région est une partie du domaine de la spectroscopie vibrationnelle, qui inclut également la région de l'infrarouge moyen. Elle est le siège des harmoniques et des bandes de combinaison, dont les bandes fondamentales se situent dans le moyen infrarouge. Les bandes d'absorption dans le PIR sont moins intenses que les bandes fondamentales correspondantes.

II.2.2 Rappel sur le rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique (phénomène étudié), auquel appartient l'infrarouge, peut être considéré comme une onde harmonique simple (modèle utilisé). Celle-ci consiste en deux ondes couplées : l'onde électrique et l'onde magnétique, ce qui explique le caractère ondulatoire du rayonnement (Figure II-2).

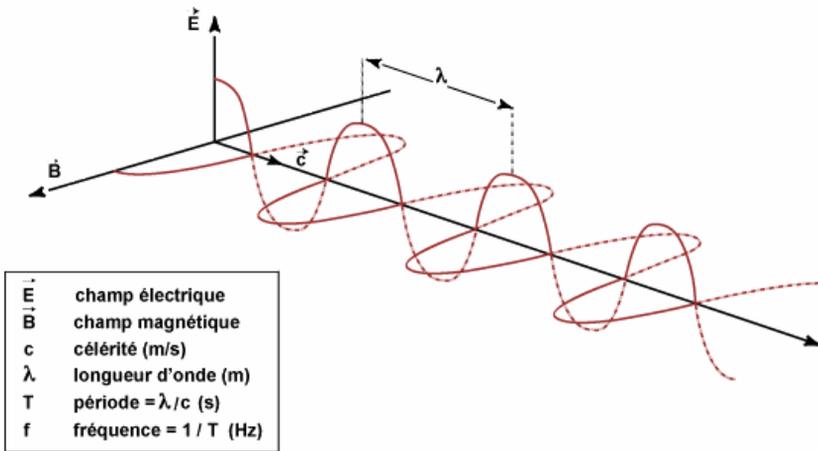


Figure II-2 : Propagation de l'onde électrique et de l'onde magnétique dans l'espace

Les champs électriques (\vec{E}) et magnétiques (\vec{B}) sont perpendiculaires entre eux et à la direction de propagation de l'onde électromagnétique. Ils interagissent avec la matière, donnant naissance à un spectre.

Le mouvement ondulatoire est défini par l'équation suivante :

$$y = A \sin 2\pi \nu t \quad \text{Eq. II-1}$$

où y est le déplacement avec un maximum A

ν la fréquence de l'onde

t le temps

Une propriété importante est la *longueur d'onde* (λ) c'est-à-dire la distance parcourue lors d'un cycle complet. On peut ainsi exprimer l'équation précédente en fonction de la distance.

En effet, $t = \frac{l}{c}$

où l est la distance parcourue par l'onde au temps t à la vitesse c (vitesse de la lumière dans le vide).

La longueur d'onde équivaut donc à :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (\text{nm}) \quad \text{Eq. II-2}$$

D'autre part, il est courant de caractériser le rayonnement électromagnétique en terme de *nombre d'onde* ($\bar{\nu}$), défini comme étant l'inverse de la longueur d'onde :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (\text{cm}^{-1}) \quad \text{Eq. II-3}$$

Le nombre d'onde représente ainsi le nombre de cycles accomplis par centimètre. Par convention, les spectroscopistes utilisent cette unité pour décrire la position d'une bande d'absorption PIR : un spectre est obtenu en enregistrant l'intensité de la lumière absorbée en fonction de la fréquence.

Bien que le modèle ondulatoire explique de nombreuses propriétés du rayonnement électromagnétique, il ne tient cependant pas compte des phénomènes d'absorption ou d'émission d'énergie. Il est donc nécessaire de considérer le rayonnement électromagnétique comme un flux de particules discrètes appelées photons, dont l'énergie est proportionnelle à la fréquence du rayonnement.

II.2.2.2.1 Vibration moléculaire

II.2.2.2.1.1 L'oscillateur harmonique

Quand deux atomes s'organisent pour former une liaison covalente, il s'établit un équilibre entre différentes forces de répulsion et d'attraction. La distance qui sépare les deux atomes sera telle que l'énergie est minimale. La figure II-3 présente ces différentes forces.

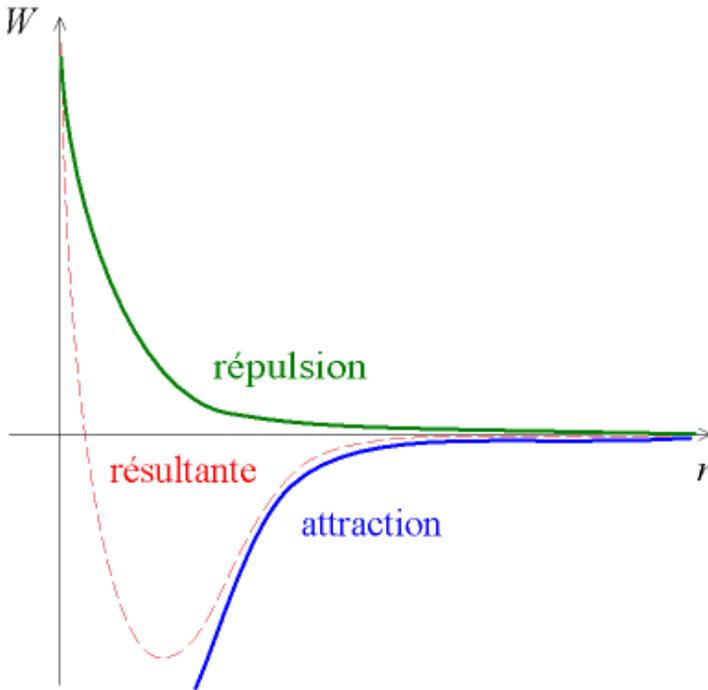


Figure II-3 : Représentation des forces de répulsion et d'attraction entre deux atomes en fonction de la distance qui les sépare

La liaison ainsi constituée va se comporter comme une corde élastique, c'est-à-dire que les atomes constitutifs vont se rapprocher ou s'éloigner en fonction du rétrécissement ou de l'allongement de la liaison : il y a donc *vibration*. La figure II-4 représente l'évolution de l'énergie de liaison en fonction de la distance inter-atomique.

Selon l'équation de la loi de Hooke (Hollas, 1996), la vibration d'une liaison chimique se comporte de façon analogue à celle d'un ressort:

$$\nu = \frac{1}{2} \pi \left(\frac{k}{\mu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. II-4}$$

où k représente la constante de force pour la liaison covalente et μ la masse réduite des deux atomes.

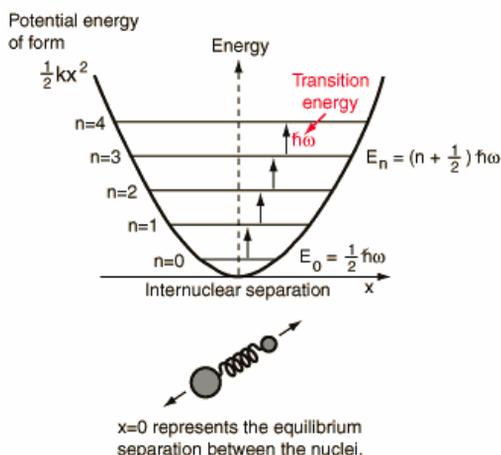


Figure II-4: Oscillateur harmonique : Evolution de l'énergie potentielle d'une molécule diatomique en fonction de la distance entre les deux atomes (Siesler, 2002)

En utilisant ce modèle mécanique simple, il est ainsi possible d'expliquer bon nombre d'observations spectrales dans le PIR. Cependant, il s'agit ici d'une vision simplifiée car dans ce modèle, une liaison ne possède qu'une seule fréquence propre. En réalité, les liaisons inter-atomiques ont plusieurs fréquences de vibration : la fondamentale, les harmoniques qui sont des multiples de la fondamentale et des bandes de combinaison. On peut tenir compte de cette constatation grâce au modèle anharmonique.

II.2.2.2.1.2 L'oscillateur anharmonique

Le modèle de l'oscillateur harmonique souffre cependant de quelques imperfections pour décrire les vibrations moléculaires (Gilbert, 2003).

En effet, lorsque les deux atomes se rapprochent, la répulsion coulombienne entre les deux noyaux correspondants produit une force qui agit dans la même direction que la force de rappel de la liaison chimique, ce qui provoque une augmentation plus rapide de l'énergie potentielle que celle prévue par le modèle de vibration harmonique (figure II-5).

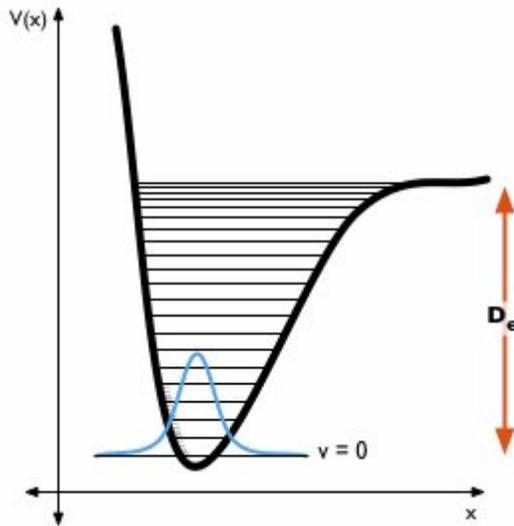


Figure II-5 : Modèle anharmonique : Evolution de l'énergie potentielle V en fonction de la distance inter-atomique x (Siesler, 2002)

Dans le modèle anharmonique et pour des valeurs de ν faibles (≤ 3), l'énergie vibrationnelle équivaut à :

$$E \approx h\nu [1 - X(\nu + 0,5)](\nu + 0,5) \quad \text{Eq. II-5}$$

où X est la constante d'anharmonicité ($X \approx 0.01$).

Au vu des équations ci-dessus, on constate qu'un oscillateur anharmonique se comporte comme un oscillateur harmonique, mais avec une fréquence d'oscillation qui diminue au fur et à mesure que ν augmente.

De ceci, on peut déduire que

$$E_0 = \left(\frac{h\nu}{2} \right) (1 - 0,5X) \quad \text{Eq. II-6}$$

et l'énergie associée à la transition de ν à $\nu + \Delta\nu$ vaut :

$$\Delta E = h\nu[1 - (2\nu + \Delta\nu + 1)X] \quad \text{Eq. II-7}$$

On peut voir dans cette équation que ΔE dépend de $\Delta\nu$. Des transitions vibrationnelles supérieures à celles rencontrées dans le cas de l'oscillateur harmonique sont donc envisageables. Cela signifie qu'une liaison donnée vibre généralement à plusieurs fréquences correspondant à la fondamentale et aux harmoniques.

Les transitions les plus fréquemment rencontrées en spectroscopie infrarouge sont :

$$\nu = 0 \rightarrow \nu = 1; \Delta\nu = +1 \text{ et } \Delta E = h\nu (1-2 \chi)$$

$$\nu = 0 \rightarrow \nu = 2; \Delta\nu = +2 \text{ et } \Delta E = h\nu (1-3 \chi)$$

$$\nu = 0 \rightarrow \nu = 3; \Delta\nu = +3 \text{ et } \Delta E = h\nu (1-4 \chi)$$

Selon une bonne approximation (puisque $\chi \approx 0.01$), ces transitions correspondent à des fréquences d'absorption voisines de ν , 2ν et 3ν .

La bande proche de ν est appelée bande fondamentale et celles proches de 2ν et 3ν , première et seconde harmoniques. On ne rencontre plus de bandes d'absorption fondamentales au-delà de 4000 cm^{-1} . Le domaine du Proche Infrarouge s'étend de 4000 à 12500 cm^{-1} , c'est-à-dire la région où il y a absorption du rayonnement aux fréquences de vibration harmonique.

En plus des bandes harmoniques, il est théoriquement possible de trouver des bandes de combinaison. Elles apparaissent si deux ou plusieurs vibrations distinctes d'une molécule interagissent pour donner des bandes d'absorption dont les fréquences correspondent à la somme (ou à la différence) de multiples des fréquences fondamentales :

$$V_{\text{comb}} = n_1V_1 \pm n_2V_2 \pm \dots$$

Eq. II-8

II.2.2.3 Appareillages

Les instruments rencontrés en spectroscopie PIR peuvent être divisés en 4 grands groupes en fonction du principe utilisé pour sélectionner les différentes longueurs d'onde de radiation. On distingue :

- Les instruments à diode électroluminescente. Ils émettent une radiation quasi monochromatique dans les régions les plus basses du PIR. Ils sont très récents, mais leur développement semble rapide.
- Les instruments dispersifs qui utilisent des prismes ou des réseaux pour produire des radiations de différentes longueurs d'onde.
- Les instruments à filtres qui sont utilisés lorsque seules quelques longueurs d'onde sont nécessaires.
- Les spectrophotomètres à transformée de Fourier. Ils sont les plus fréquemment rencontrés. Comme ce type d'équipement sera utilisé au cours de notre travail, nous le décrivons en détails ci-dessous.

II.2.2.3.1 Spectrophotométrie par transformée de Fourier

La plupart des spectrophotomètres modernes sont à transformée de Fourier. Dans ce type d'équipement, la radiation contenant les longueurs d'onde PIR est divisée en deux faisceaux grâce à un miroir semi-transparent (Beamsplitter en quartz). Un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable suivant la position du miroir mobile, avant d'être recombinaisonnés, de traverser l'échantillon et d'atteindre le détecteur. Quand la différence de chemin optique entre les faisceaux

correspond à un multiple entier de longueur d'onde, on parle d'interférence constructive.

Une interférence destructive apparaît quand cette différence est un multiple entier impair d'une demi-longueur d'onde. L'ensemble des interférences produit un interférogramme. La transformée de Fourier convertit cet interférogramme en un spectre (Kawata, 2004). La figure II-6 nous présente le schéma du spectrophotomètre à transformée de Fourier.

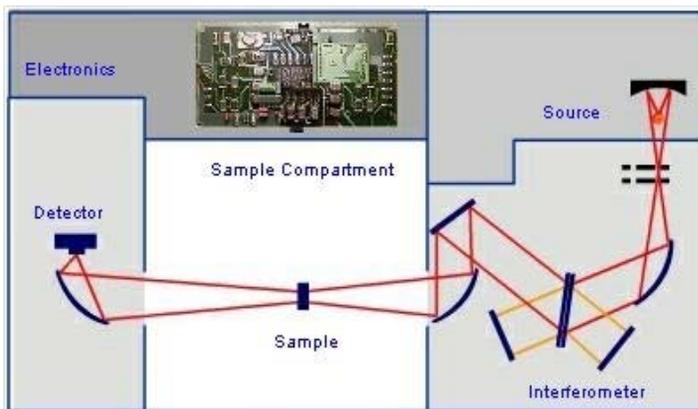


Figure II-6 : Schéma du spectrophotomètre à transformée de Fourier (Bruker[®], manuel d'utilisation MPA)

La spectrométrie à transformée de Fourier offre des avantages par rapport aux techniques dispersives (Griffiths, 1983) :

- Chacun des éléments de la radiation est observé pendant tout le temps d'enregistrement puisque toutes les fréquences atteignent le détecteur en continu (Avantage de Fellgett).
- La vitesse d'enregistrement des spectres est rapide et s'accompagne d'une grande sensibilité.
- Il est théoriquement possible de laisser entrer davantage de lumière dans un spectrophotomètre à transformée de Fourier que dans un

monochromateur classique. Il en résulte un rapport signal – bruit plus élevé (Avantage de Jaquinot).

II.2.3 Nature chimique des bandes observées

II.2.3.1 Modes de vibration

La figure II-7 donne des exemples de quelques modes de vibration typiques. A chaque mode correspondent une fréquence propre fondamentale et plusieurs autres fréquences associées aux harmoniques (Bertrand, 2002).

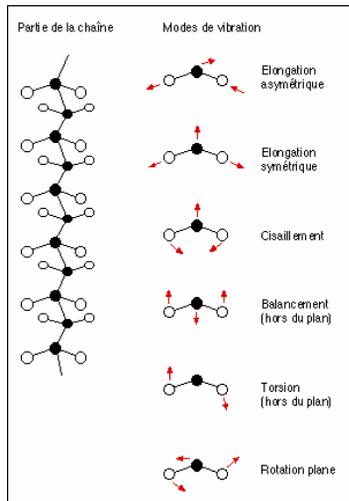


Figure II-7: Exemples de modes de vibration atomique (Bertrand, 2002)

De plus, on observe souvent des interactions entre les modes d'une liaison particulière et ceux d'autres liaisons. Ces interactions se traduisent par l'apparition de bandes de combinaison.

La région spectrale du PIR est le domaine des bandes harmoniques et des bandes de combinaison comme le montre la figure II-8.

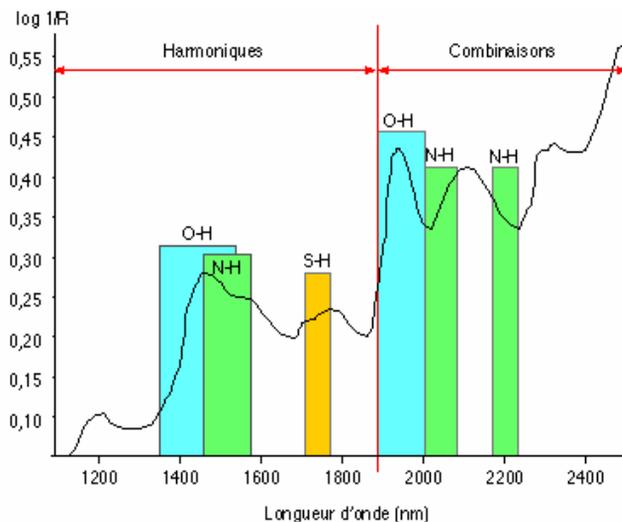


Figure II-8 : Bandes d'absorption dans le proche infrarouge (Bertrand, 2002)

II.2.3.2 Interprétation chimique des spectres PIR

Les groupements chimiques présentant une absorption dans la région du PIR sont principalement de la forme X-H, où X correspond aux atomes de carbone, d'oxygène ou d'azote.

D'une manière générale, il est plus difficile d'interpréter les spectres PIR que leurs équivalents dans l'IR moyen. Cependant, la région du Proche Infrarouge est bien adaptée au développement des applications analytiques pour deux raisons principales :

1. D'une part, les harmoniques et les bandes de combinaison sont moins intenses que les fondamentales correspondantes : la lumière est moins fortement absorbée dans le PIR que dans l'IR moyen. La lumière incidente pénètre de plusieurs millimètres à l'intérieur du produit étudié. Il n'est pas nécessaire de le diluer pour obtenir des spectres exploitables.
2. D'autre part, les bandes d'absorption PIR forment des pics plus larges : une petite dérive dans l'échelle des longueurs d'onde ne

changerait pas considérablement l'intensité de la lumière absorbée. C'est un avantage pour les applications analytiques qui sont basées sur la mesure de la lumière absorbée à des longueurs d'onde données.

II.2.4 Modes de mesures en spectroscopie PIR

Il existe deux grands modes de mesures en spectroscopie PIR : la réflexion et la transmission. En effet, lorsqu'un faisceau lumineux atteint la surface d'un échantillon, il peut être absorbé, transmis ou réfléchi. Selon le principe de la conservation d'énergie, l'intensité totale du rayonnement incident I_0 doit être égale à la somme de l'intensité des rayons absorbés I_A , transmis I_T et réfléchis I_R .

Les deux modes de mesures sont couramment utilisés. La nature de l'échantillon influencera le choix de l'une par rapport à l'autre. Il apparaît que, par exemple dans le cas de l'analyse de comprimés, la mesure en transmission donne des résultats plus précis concernant la teneur en principe actif. Ceci s'explique par le fait que l'analyse en réflexion ne concerne que la surface du comprimé tandis que la transmission permet une analyse sur toute l'épaisseur du comprimé (Thosar et al., 2001).

II.2.4.1 Mesure en réflexion

La mesure en réflexion consiste à mesurer la lumière réfléchie par l'échantillon. L'intensité de lumière réfléchie est mesurée par un détecteur de réflexion se trouvant du même côté de l'échantillon que la source lumineuse.

La réflectance R est définie comme étant le rapport d'intensité I_R / I_0

avec I_R l'intensité réfléchie par l'échantillon analysé et

I_0 l'intensité réfléchie par un matériau non absorbant pris comme référence.

L'absorbance est définie comme étant le logarithme décimal de l'inverse de la réflectance R , selon les équations :

$$A = \log 1/R \text{ ou } A = \log (I_0/I_R) \quad \text{Eq. II-9}$$

Lorsque la lumière est réfléchie par un échantillon de matière solide offrant une surface mate, on peut distinguer deux composantes de l'énergie lumineuse mesurée par les détecteurs de réflexion :

Une composante, dite de *réflexion spéculaire* qui correspond à la lumière réfléchie directement en surface de l'échantillon sans pénétrer à l'intérieur de celui-ci. Elle est porteuse d'informations physiques sur l'échantillon comme la taille ou la forme des particules de poudre (Berntsson, 2001).

Une composante de *réflexion diffuse* correspondant à la lumière qui pénètre à l'intérieur de l'échantillon, y subit l'absorption moléculaire ainsi que le processus de réfraction, diffraction et réflexion multiple entraînant sa dispersion dans toutes les directions et notamment son retour en arrière vers le détecteur de réflexion.

Seule la composante diffuse est porteuse d'information sur la composition chimique de l'échantillon.

On ne saurait terminer ce chapitre sans parler des fibres optiques. En effet, les fibres optiques sont de plus en plus utilisées pour transporter l'onde lumineuse depuis le spectromètre jusqu'à l'échantillon et/ou dans le sens inverse. Une fibre optique est formée de deux matériaux transparents, d'indice de réfraction différent. La partie centrale a pour rôle de guider la lumière. Cette partie est entourée d'une première gaine dont l'indice de

réfraction est plus faible que celui de la partie centrale. Ensuite, une couche extérieure est formée en général par une enveloppe protectrice (figure II-9).

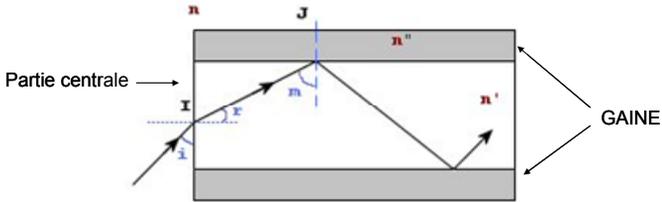


Figure II-9 : Représentation du trajet lumineux au sein d'une fibre optique

II.2.4.2 Mesure en transmission

La mesure en transmission consiste à mesurer la lumière transmise à travers l'échantillon à analyser. En raison de l'absorption de la lumière par l'échantillon, l'intensité du faisceau est atténuée depuis la valeur I_0 à l'entrée d'un côté de l'échantillon jusqu'à la valeur I_T , à la sortie de l'autre côté.

La transmittance T est définie comme étant la fraction d'énergie lumineuse traversant l'échantillon de part en part. Elle est égale au rapport d'intensité I_T / I_0 .

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

$$A = \log 1/ T \text{ ou } A = \log (I_0 / I_T) \quad \text{Eq. II-10}$$

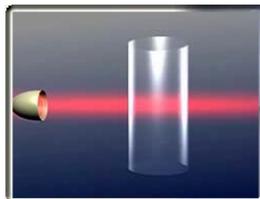


Figure II-10 : Illustration de la mesure par transmission (Bruker® ; manuel d'utilisation MPA)

II.2.5 Avantages et inconvénients de la spectroscopie PIR

Aucune technique analytique ne peut à elle seule résoudre tous les problèmes. Cependant, la spectroscopie PIR possède des avantages non négligeables par rapport à d'autres méthodes. Il est évident qu'elle présente également des inconvénients. Sa complémentarité avec d'autres techniques a été démontrée (Blanco M. et al., 2002 b). Une liste non exhaustive des principaux avantages et inconvénients est décrite ci-dessous :

II.2.5.1 Avantages

- Peu ou pas de préparation de l'échantillon
- Analyse rapide, possibilité d'analyse en temps réel
- Technique non destructive, non invasive
- Analyse en transmission sur des échantillons relativement épais
- Possibilité d'analyse à distance par l'utilisation de fibres optiques et d'analyse « at-line », « on-line » et « in-line »
- Un spectre renferme aussi bien des informations chimiques que physiques sur l'échantillon analysé

II.2.5.2 Inconvénients

- Difficulté d'interprétation des spectres : manque de corrélation structurale souvent observé et une sélectivité relativement pauvre par rapport à l'infrarouge moyen, les bandes d'absorption étant très larges et se superposant.
- Phase de calibration délicate : nécessité de traiter les spectres par la chimométrie.

- Influence parfois néfaste de paramètres physiques comme la taille des particules ainsi que l'orientation de l'échantillon.
- La spectroscopie PIR est une méthode relative ; on doit toujours avoir recours à une méthode de référence pour réaliser une calibration de l'équipement.
- Dans certains cas, on peut observer un manque de sensibilité de la technique.

II.2.6 Introduction à la chimiométrie

II.2.6.1 Importance de la chimiométrie en spectroscopie PIR

L'interprétation visuelle des spectres PIR est parfois illusoire vu leur réelle complexité (pics larges, chevauchement, décalage entre les spectres,...). Dans certains cas, des différences subtiles, imperceptibles à l'œil nu, permettront d'aboutir à des conclusions.

Un spectre PIR s'étend sur plusieurs longueurs d'onde (4000 à 12500 cm^{-1} ou 800 à 2500 nm) et à chaque longueur d'onde correspond une valeur d'intensité. Chaque spectre peut être défini, dans un espace à p dimensions (où p = nombre de variables), par les valeurs en intensité mesurées pour chaque longueur d'onde. Un ensemble de n spectres PIR peut être représenté par une matrice $n \times p$ où chaque ligne correspond à un spectre et chaque colonne à une variable. Cette matrice renferme une importante quantité d'informations, tant chimiques que physiques, dont seule une partie nous intéresse. Pour ces raisons, l'analyse des spectres PIR doit faire appel à la chimiométrie.

La chimiométrie est un outil utilisé afin d'extraire l'information pertinente et utile à partir de données physico-chimiques. Elle consiste en l'application de méthodes mathématiques en vue du traitement, de l'évaluation et de

l'interprétation d'une grande quantité de données (Martens et al., 1989; Naes, 1987).

Les méthodes chimiométriques les plus couramment utilisées pour l'analyse des spectres PIR sont :

- Les prétraitements mathématiques pour supprimer la plus grande partie de l'information qui n'est pas directement liée à la nature chimique de l'échantillon ;
- Les méthodes de régression pour relier le spectre à une concentration et donc créer le modèle mathématique ;
- Les méthodes de classification permettant de comparer les échantillons (Roggo et al., 2004).

Dans cette introduction, nous décrivons uniquement certains prétraitements mathématiques de spectres, la régression PLS et l'analyse en composantes principales.

II.2.6.2 Principales méthodes de prétraitements mathématiques des spectres PIR

Un des problèmes majeurs en spectroscopie PIR est l'influence d'un certain nombre de paramètres incontrôlables. En effet, on sait que les spectres renferment à la fois une information sur la nature chimique de l'échantillon, mais aussi sur les propriétés physiques de celui-ci. Par exemple, une même substance chimique mais de granulométrie non homogène présente des spectres décalés suite à des phénomènes de diffusion de la lumière par les particules. Cette différence entre les spectres peut être à l'origine d'interprétations tant quantitatives que qualitatives erronées. D'autres facteurs peuvent aussi influencer le spectre PIR comme des taux d'humidité différents (Candolfi et al., 1997) ou la densité apparente de la poudre qui peut entraîner le tassement de l'échantillon dans une cupule de mesure. Pour limiter ces influences néfastes, on peut avoir recours à différents

prétraitements mathématiques de spectres. Le choix d'un prétraitement adéquat est primordial. Nous exposons ci-dessous certains d'entre eux.

II.2.6.2.1 Correction compensatrice (Offset Correction)

Il s'agit d'une des premières méthodes utilisées afin de corriger les décalages entre les spectres PIR d'échantillons de très faible épaisseur comme par exemple les films polymériques. En effet, rappelons que selon la loi de Beer-Lambert, toute variation de la longueur du trajet optique modifie l'intensité de la réponse spectrale.

Le principe est relativement simple. On sélectionne une région commune à tous les spectres enregistrés pour laquelle il ne devrait en principe exister aucune différence. On retire ensuite la moyenne des points ainsi choisis à l'ensemble des spectres.

$$x_{ij,0} = x_{ij} - \bar{x}_{i,a-b} \quad \text{Eq : II-11}$$

où $x_{ij,0}$ est l'élément obtenu après transformation,

x_{ij} l'élément original

$\bar{x}_{i,a-b}$ la moyenne des points choisis.

Ce prétraitement ne s'applique que lorsque le décalage entre les spectres est régulier.

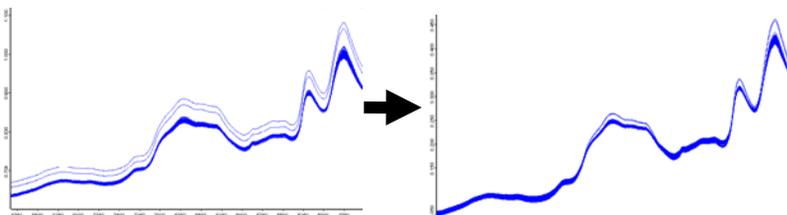


Figure II-11 : Spectres de comprimés de Diltiazem HCl avant (gauche) et après (droite) correction compensatrice

On peut constater sur la partie droite de la figure II-11, une diminution des différences existantes au niveau des spectres. Cependant, le résultat obtenu n'est pas satisfaisant puisqu'une différence persiste toujours. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la méthode corrige le décalage entre les spectres de la même manière tout au long de l'axe des longueurs d'onde, or ce décalage n'est pas une constante. La correction compensatrice fait partie des méthodes de normalisation. Dans cette catégorie, on peut aussi trouver la méthode appelée « Normalisation Vectorielle » (Vector Normalization).

II.2.6.2.2 Dérivées première et seconde

La dérivation des spectres propose une solution intéressante aux problèmes de chevauchement des pics et de ligne de base curvilinéaire.

La dérivée première $d \left(\frac{\log \frac{1}{R}}{d\lambda} \right)$ mesure le taux de variation de $\log \frac{1}{R}$ par

rapport à λ , c'est-à-dire la pente de la courbe en chaque point du spectre. Il suffit simplement de calculer la différence entre les valeurs de $\log (1/R)$ pour chaque longueur d'onde adjacente. La dérivée première $f'(x_i)$ peut donc s'écrire :

$$f'(x_i) = \frac{f(x_{i+2}) + f(x_{i+1}) - f(x_{i-1}) - f(x_{i-2})}{4} \quad \text{Eq. II-12}$$

où x_i est l'intensité spectrale mesurée à la $i^{\text{ème}}$ longueur d'onde.

Dès lors, la dérivée première d'un spectre PIR présente un pic ou un puits lorsque la pente des bandes d'absorption du spectre original est respectivement positive ou négative au niveau des pics originaux. Chaque pic et chaque puits de la dérivée correspondent aux points de courbures maximales dans les spectres originaux. L'analogie entre les spectres dérivés

et les originaux n'est pas évidente. En effet, un pic original possède une valeur nulle dans le spectre de la dérivée première. La partie droite de la figure II-12 représente l'effet de la dérivée première sur le spectre original.

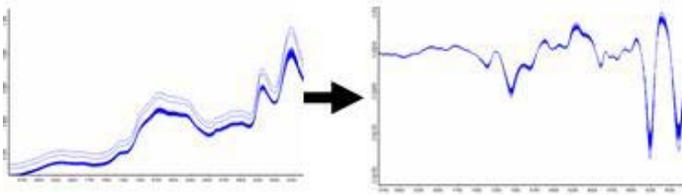


Figure II-12 : Spectres des comprimés de Diltiazem HCl avant (gauche) et après (droite) dérivée première.

La dérivée seconde $d^2 \left(\frac{\log \frac{1}{R}}{d\lambda^2} \right)$ est encore plus intéressante à utiliser.

Celle-ci est obtenue en dérivant une seconde fois les spectres en fonction de la longueur d'onde.

$$f''(x_i) = \frac{f(x_{i+1}) - 2f(x_i) + f(x_{i-1}))}{2} \quad \text{Eq : II-13}$$

Notons qu'un puits dans la dérivée seconde correspond à un pic dans le spectre initial (Gorry, 1990).

Sur la figure II-13 représentant l'effet de la dérivée seconde, on peut remarquer que le décalage entre les spectres devient de plus en plus négligeable.

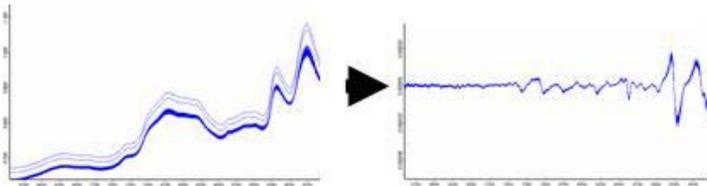


Figure II-13: Spectres des comprimés de Diltiazem HCl avant (gauche) et après (droite) dérivée seconde

II.2.6.2.3 Autres

D'autres méthodes de prétraitement existent comme la correction de la ligne de base, la soustraction spectrale ou la méthode appelée « multiplicative signal correction » (MSC ou « correction multiplicative de la réflexion diffuse ») (Geladi, 1985).

Les méthodes de correction de la ligne de base émettent l'hypothèse implicite que le spectre observé est la somme d'un signal correspondant à des variations incontrôlées (bruit de fond) et d'un signal utile contenant l'information spectrale. La correction consiste à modéliser le bruit de fond et à le soustraire du signal observé. La modélisation de bruit de fond se fait en général à partir de quelques points du spectre pour lesquels on n'observe pas de bande d'absorption (Fearn, 1999).

La MSC consiste à modéliser un spectre x_{ij} quelconque d'une collection spectrale X par la relation :

$$x_{ij} = a_i + b_i \overline{x_j} + e_{ij} \quad \text{Eq. II-14}$$

L'indice i porte sur les observations et l'indice j sur les longueurs d'onde. Les coefficients a_i et b_i sont propres à chaque spectre et doivent être estimés individuellement. L'erreur e_{ij} représente les effets qui ne peuvent pas être modélisés par une constante et un coefficient multiplicateur. Cette erreur reflète donc en fait les variations spectrales provenant de l'information chimique « utile ». La méthode MSC consiste à estimer tout d'abord les coefficients a_i et b_i par régression linéaire. Les données corrigées sont ensuite obtenues par :

$$xcor_{ij} = \frac{x_{ij} - \hat{a}_i}{\hat{b}_i} \quad \text{Eq. II-15}$$

où \hat{a}_i et \hat{b}_i sont les estimations des coefficients a_i et b_i .

II.2.6.3 Principales méthodes d'analyse des spectres

On peut classer les méthodes d'analyse des spectres en fonction de leur nature linéaire ou non linéaire.

Les méthodes linéaires font l'hypothèse que l'information utile peut être extraite à partir de combinaisons linéaires de variables prédictives. Les méthodes non linéaires s'affranchissent de l'hypothèse de linéarité. Elles font partie du domaine de l'intelligence artificielle.

Un deuxième élément de classement porte sur leur nature descriptive ou prédictive.

Dans l'approche descriptive, on ne dispose que des données spectrales, sans aucune autre information complémentaire sur la nature des données. C'est le cas de l'analyse en composantes principales.

Dans les méthodes prédictives, les données spectrales PIR sont exploitées dans le but de prédire une variable qualitative ou quantitative.

II.2.6.3.1 L'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique mathématique permettant de réduire un système complexe de corrélations en un plus petit nombre de dimensions. L'objectif est d'obtenir une représentation des n points de l'espace à p dimensions (n spectres mesurés à p longueurs d'onde) dans un espace plus familier comme la droite ou le plan, avec une perte minimale d'information. Cette analyse permet également de mettre en évidence des observations atypiques ou extrêmes, voire aberrantes, ou encore des sous-groupes d'observations bien individualisés (Albert A., 2004).

L'application dans le domaine de la technologie pharmaceutique comprend le développement de formulations (Gabrielson et al., 2000), mais aussi l'optimisation de la fabrication de formes solides (Bergman et al., 1998). Le suivi de nombreux procédés de fabrication par utilisation de l'analyse en

composantes principales a été décrit à plusieurs reprises (Andersson et al., 1999; Blanco M. et al., 1993; Herkert et al., 2001; Jouan-Rimbaud et al., 1995).

La figure II-14 permet de mieux comprendre le principe de l'analyse en composantes principales. Chaque observation i (ex : valeur d'absorbance) dans la matrice X est représentée par un point dans l'espace à K dimensions (ex : longueur d'onde). La première composante principale (PC_1) est la droite dans l'espace X qui représente le mieux les données. La deuxième composante principale (PC_2) augmente encore l'approximation des observations de X . Elle est représentée par un axe perpendiculaire à PC_1 . Ensemble les deux premières composantes principales forment un plan dans l'espace X dans lequel peuvent être projetées les observations i .

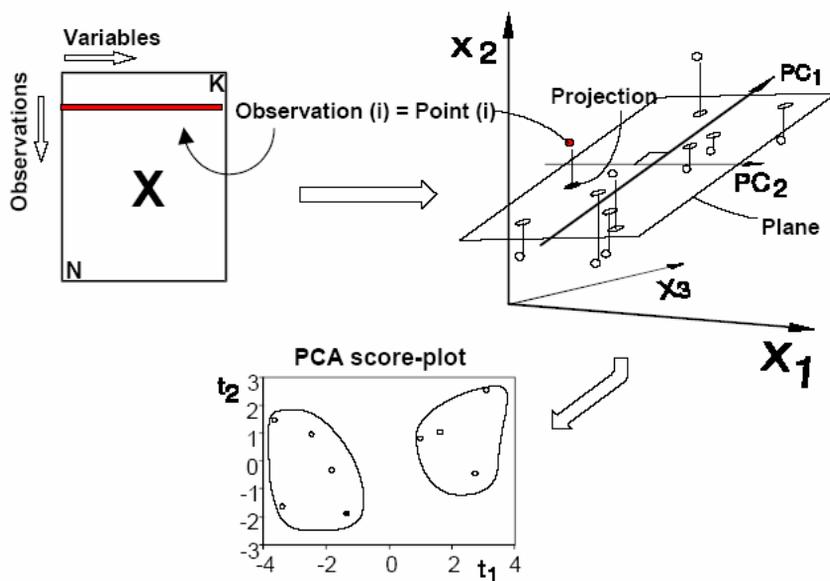


Figure II-14 : Principe de l'analyse en composantes principales

II.2.6.3.2 La régression « PLS »

La technique vise à étudier la relation entre plusieurs variables indépendantes ou prédictives et une variable dépendante. La régression PLS (Partial Least-squares Regression ou régression des moindres carrés partiels) est une extension de la MLR (Multilinear Regression ou régression linéaire multiple).

L'objectif est d'établir un modèle permettant de prédire une valeur analytique de référence à partir des données spectrales. La première étape est l'étalonnage ou la calibration de l'équipement qui est effectuée expérimentalement à partir d'échantillons dont on a, d'une part, enregistré le spectre et, d'autre part, mesuré une caractéristique par une méthode de référence. On dispose alors d'une matrice \mathbf{X} , avec n observations (spectres) et p variables (points de mesure) formant des données prédictives et un vecteur y de n éléments correspondant aux valeurs de référence.

Il s'agit d'exprimer la relation linéaire entre le vecteur \vec{y} et la matrice \mathbf{X} :

$$\vec{y} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{b} \quad \text{Eq. II-16}$$

Avec \vec{y} = ensemble des mesures de référence

\mathbf{X} = matrice des données spectrales

$$\begin{pmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ \dots \\ Y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} Spectre_1 \\ Spectre_2 \\ Spectre_3 \\ \dots \\ Spectre_n \end{pmatrix} \cdot \mathbf{b} \quad \text{Eq. II-17}$$

Cette équation peut se résumer comme suit :

$$Y_i = b_0 + b_1 X_{i1} + b_2 X_{i2} + \dots + b_p X_{ip} \quad \text{Eq. II-18}$$

Avec Y_i valeur de référence d'indice i
 X_{i1}, X_{i2}, \dots variables dites prédictives
 b_0, b_1, \dots coefficients de régression

Dans le cas de l'analyse spectrale, la matrice \mathbf{X} des données comporte en général beaucoup plus de variables (points de mesure) que d'observations (spectres) ce qui rend l'utilisation de la régression PLS intéressante. En effet, la régression PLS est la moins restrictive des extensions du modèle de régression linéaire multiple, ce qui lui permet d'analyser des données complexes comme les données spectrales pour lesquelles d'autres techniques de régression seraient limitées.

II.2.7 Applications de la spectroscopie PIR dans le domaine pharmaceutique

II.2.7.1 Procédé de fabrication et contrôle de qualité

Le point de départ de la production des médicaments consiste en la synthèse et la caractérisation des matières actives. Cette fabrication se fait généralement par synthèse chimique suivie d'une cristallisation, d'un séchage, puis d'un tamisage. Certaines de ces étapes ont fait l'objet de nombreuses recherches afin d'augmenter leur sécurité, leur productivité et leur reproductibilité. C'est le cas notamment pour l'étape de cristallisation.

II.2.7.1.1 L'étape de cristallisation

La spectroscopie PIR mesurant des modes de vibration permet de différencier deux formes polymorphes différentes.

La spectroscopie PIR étant rapide, fiable et pertinente semble une technique appropriée au suivi en ligne de la cristallisation. Cette technique a permis de caractériser la forme polymorphique sous laquelle se trouvait une matière active possédant deux formes cristallines et une forme amorphe (Fevotte et al., 2004). L'utilisation de sondes et de fibres optiques permet aussi de suivre la transformation polymorphique d'un principe actif (Norris et al., 1997). Comme le présente la figure II-15, il est possible d'équiper les réacteurs d'une sonde PIR afin de suivre en ligne une transformation polymorphique.

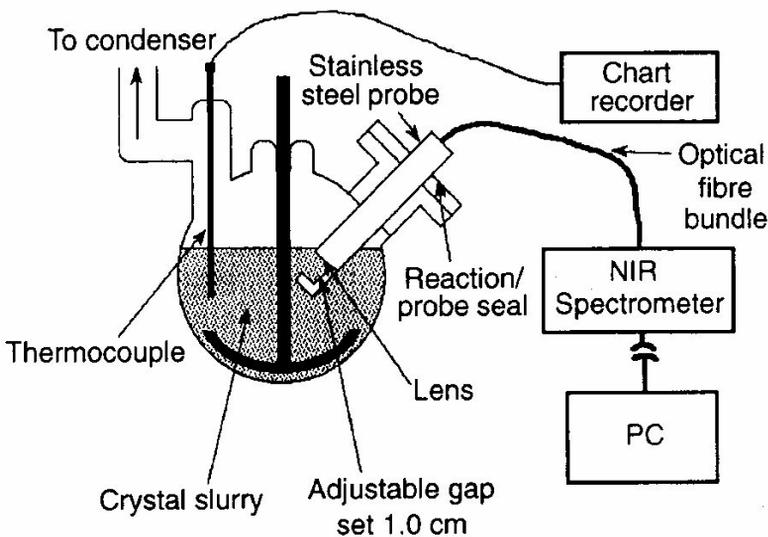


Figure II-15 : Suivi en ligne de l'étape de cristallisation par spectroscopie PIR (Norris,1997)

Des études de stabilité de formes polymorphiques par PIR ont également fait l'objet de publications. Dans ce cadre, la transformation de l'azithromycine dans différentes conditions de température et d'humidité a permis de montrer que les deux formes cristallines de ce principe actif sont stables (Blanco M. et al., 2005).

D'autres réactions chimiques ont aussi fait l'objet d'étude en PIR, c'est le cas notamment de la réaction d'hydrogénation. En effet, grâce à cette technique, il est possible de déterminer le point final de la réaction et ceci dans un laps

de temps très court par rapport aux techniques habituelles (Ward et al., 1998). Des réactions de polymérisation ont aussi fait l'objet d'applications en spectroscopie PIR et ont montré une forte corrélation entre les données spectrales obtenues et les techniques conventionnelles qui consistent par exemple à mesurer la longueur de la chaîne du polymère créé ou à doser la concentration résiduelle en monomère (Aldridge P.K et al., 1993).

Pan a publié une méthode d'analyse de résidus de solvant dans les produits de synthèse par utilisation de la spectroscopie PIR permettant ainsi de quantifier des dérivés toluéniques (Pan et al., 2006).

II.2.7.2 Détermination de la teneur en eau

L'eau est un des constituants les plus mesurés en proche infrarouge, car elle présente un coefficient d'extinction très élevé par rapport aux autres substances. Le dosage de l'eau et la détermination du taux d'humidité de produits pharmaceutiques ont fait l'objet de nombreuses publications. Cette analyse peut s'effectuer aussi bien sur des matières premières (Rantanen et al., 2005) que sur des produits finis comme les comprimés (Corti et al., 1990) ou les lyophilisats (Stokvold et al., 2002). Le PIR a aussi été utilisé au cours d'un procédé de granulation pour mesurer l'humidité présente dans le granulé (Rantanen et al., 2000 ; Rantanen et al., 2005). L'analyse de l'eau peut ainsi faire l'objet d'analyses qualitative et quantitative en calibrant le spectrophotomètre avec des résultats obtenus par une méthode de référence comme le microdosage de l'eau par titrage coulométrique (Karl Fischer).

II.2.7.3 Détermination de la taille des particules

La détermination de la distribution granulométrique des matières premières est une mesure primordiale avant de commencer un procédé de fabrication, car la taille des particules d'une poudre va influencer des propriétés physiques telles que l'écoulement de la poudre, l'aptitude à la compression et

la vitesse de dissolution. Les techniques classiques de mesure de particules sont l'analyse par tamis ou la diffraction laser, mais il apparaît que la spectroscopie PIR est un outil intéressant.

Il est connu que les spectres PIR d'échantillons de poudre sont affectés par leur distribution granulométrique (Ciurczak et al., 2002). Cela se traduit par une dérive de la ligne de base où l'on observe une augmentation de celle-ci aux valeurs les plus élevées de longueur d'onde. Il est possible de corrélérer les spectres d'une matière première obtenus par PIR avec le diamètre médian mesuré par une technique de référence de manière à calibrer l'appareillage PIR ; de cette façon, il est possible d'obtenir une nouvelle méthode de détermination de la taille particulaire (O'Neil A. et al., 1999; O'Neil A. et al., 2003).

II.2.7.4 Suivi des étapes de fabrication d'un comprimé

II.2.7.4.1 L'opération de mélange

Dans l'industrie pharmaceutique, le mélange est une opération très importante dans la production des médicaments. La qualité du mélange va conditionner la qualité du produit fini. En effet, il est important que ce mélange soit homogène puisqu'il va être divisé en plusieurs unités qui doivent renfermer la même quantité d'excipients et de principe actif. Habituellement, l'homogénéité est déterminée en prélevant des échantillons de poudre à différents endroits de la cuve du mélangeur à l'aide d'une sonde de prélèvement. Ces échantillons sont ensuite dosés par des techniques conventionnelles d'analyse telles que HPLC et spectrophotométrie UV-Visible. Le contenu ainsi que la déviation standard du contenu en principe actif de chaque échantillon doivent répondre à des normes bien précises pour que le mélange soit qualifié d'homogène (Berman, 2001). Cette procédure longue peut dans certains cas être source d'erreurs (voir chapitre I). Dès lors, la tendance consiste à utiliser des techniques rapides et non

invasives pour juger de l'homogénéité d'un mélange. La spectroscopie PIR fait partie de ces techniques. La spectroscopie PIR peut être utilisée dans ce cadre de différentes manières :

- soit une analyse off-line : un échantillon est analysé en dehors du mélangeur. Dans ce cas, on reste confronté aux difficultés liées au prélèvement (Sanchez et al., 1995; Sekulic et al., 1996; Wargo et al., 1996).
- soit une analyse in-line : une fibre optique est fixée au mélangeur et des spectres sont pris après arrêt du mélangeur (Hailey P.A. et al., 1995; Sekulic et al., 1998). Une fenêtre peut aussi être placée sur la paroi du mélangeur à travers laquelle les spectres peuvent être mesurés (De Maesschalck R. et al., 1998). Skibsted (Skibsted et al., 2006) a imaginé d'enregistrer des spectres à différents endroits du mélangeur. Les écarts-types et les moyennes obtenus sur les teneurs en principe actif prédites sont comparés à un lot de référence (golden batch) qui correspond à un mélange homogène.
- soit une analyse on-line : une fibre optique est fixée à la cuve du mélangeur et prend des spectres au cours du mélange.

Il existe différents moyens de déterminer le point de fin de mélange qui correspond à un état d'homogénéité :

- On peut comparer les spectres pris au cours du processus de mélange avec des spectres de référence correspondant à l'état d'homogénéité. Dès que les spectres sont comparables à la référence, l'état d'homogénéité est atteint.
Différents algorithmes mathématiques, comme l'analyse en composantes principales ou le suivi de la distance entre deux spectres successifs, sont utilisés pour comparer les spectres entre eux (Blanco M. et al., 2002a).

- Une autre méthode consiste à comparer entre eux les spectres pris au cours du mélange. Dès que ceux-ci sont identiques, l'homogénéité est atteinte. Ici encore, l'utilisation d'algorithmes mathématiques est nécessaire.

Les premières études sur l'application de la spectroscopie PIR sont essentiellement des approches qualitatives visant à suivre les variations de spectres au cours du temps ou à différents endroits de la cuve du mélangeur. Des analyses quantitatives ont également été envisagées (Berntsson O. et al., 2000; El Hagrasy et al., 2006). De manière générale, les approches quantitatives demandent plus de travail en ce qui concerne le développement et la validation de la méthode. De plus, l'approche quantitative est beaucoup plus sensible aux différentes modifications de l'instrumentation, de l'environnement ou encore aux caractéristiques physiques des matières premières (Li et al., 2007).

Les paramètres clés concernant la caractérisation de l'homogénéité de mélange sont l'erreur d'échantillonnage, la taille de l'échantillon et le nombre d'échantillons. Berntsson a déterminé la taille optimale de l'échantillon dans le suivi du processus de mélange par utilisation de la réflexion PIR en fonction du degré de pénétration de la lumière au sein du mélange (Berntsson O. et al., 1998). Li a étudié l'importance de la largeur du faisceau lumineux sur la détermination en ligne de l'homogénéité de mélange (Li et al., 2003).

El-Hagrasy s'est intéressé non pas au mélange du principe actif, mais à la distribution des excipients et en particulier, du stéarate de magnésium (El Hagrasy et al., 2006). La détermination du mélange optimal en présence de stéarate de magnésium est primordiale afin d'éviter des problèmes de sous- ou de sur-lubrification. Un modèle quantitatif a été développé dans ces travaux permettant de détecter les changements de concentration du stéarate de magnésium avec une sensibilité de l'ordre de 0.1% m/m. Duong a également suivi l'évolution de la distribution du stéarate de magnésium

dans un mélange ternaire (Duong et al., 2003). Plus récemment, une étude a évalué l'impact de la vitesse des pales d'un mélangeur sur l'homogénéité de mélange par analyse d'échantillons prélevés au sein de la cuve en utilisant la spectroscopie PIR (Arratia et al., 2006).

Actuellement, il existe très peu d'études réalisées au cours du mélange c'est-à-dire lorsque la poudre est en mouvement. La première d'entre elles consistait à suivre l'évolution de l'homogénéisation d'un mélange binaire dans un mélangeur Nauta® (Berntsson et al., 2002).

II.2.7.4.2 Suivi de la granulation par voie humide

II.2.7.4.2.1 La granulation par voie humide

La granulation par voie humide reste un processus très répandu dans l'industrie pharmaceutique. Il existe différentes méthodes pour déterminer le terme d'une granulation. La mesure du torque au niveau de la pale principale ou la consommation de puissance peuvent être utilisées pour la détermination du point de fin de granulation.

Un des problèmes inhérents aux techniques traditionnelles de détermination de la teneur en eau d'un granulé est qu'elles souffrent d'un décalage par rapport à la teneur réelle en eau du granulé. Ceci a contribué à l'apparition de méthodes permettant une détermination directe de la quantité d'eau présente au sein du granulé.

Le PIR est une méthode attrayante pour la mesure en ligne du taux d'humidité vu le faible pouvoir d'absorption de l'eau, raison notamment pour laquelle l'eau a fait l'objet des premières mesures en PIR (Sinsheimer et al., 1968). Rantanen a présenté une application du suivi du taux d'humidité durant la granulation en lit d'air fluidisé à l'aide du PIR (Rantanen et al., 1999; Rantanen et al., 2000). Jorgensen a comparé la mesure du torque et la spectroscopie PIR dans le suivi du processus de granulation par voie humide. Il ressort également de cette étude que la spectroscopie PIR peut

être utilisée dans le suivi du processus de granulation par voie humide même dans les cas où la mesure du torque de la pale principale est difficile à appliquer (Jorgensen et al., 2004).

La spectroscopie PIR permet également de suivre les modifications de taille particulaire au cours du processus de granulation vu que les spectres renferment à la fois des informations chimiques et physiques (Frake et al., 1997).

II.2.7.4.2.2 Le processus de séchage

Faisant suite à la granulation par voie humide, l'étape de séchage peut avoir des conséquences importantes sur la qualité du produit. En effet, un séchage trop important peut conduire à la disparition d'une forme hydratée désirée ou à une transformation polymorphique. Inversement, un séchage insuffisant peut également conduire à différents problèmes technologiques (agglomérats, collage aux poinçons...). Habituellement, le séchage est évalué par le prélèvement d'échantillons au sein de la masse humide et par la mesure de la teneur résiduelle en solvant de chaque échantillon. Cette technique est longue et de plus est destructrice. C'est la raison pour laquelle, on s'est tourné vers des méthodes de contrôle en ligne. La spectroscopie PIR semble une technique appropriée. Glaxo Smith Kline a mis au point un système d'analyse par PIR des vapeurs de solvant présenté à la figure II-16. On constate une diminution de la concentration en résidus de solvant tout au long du processus de séchage (Parris et al., 2005).

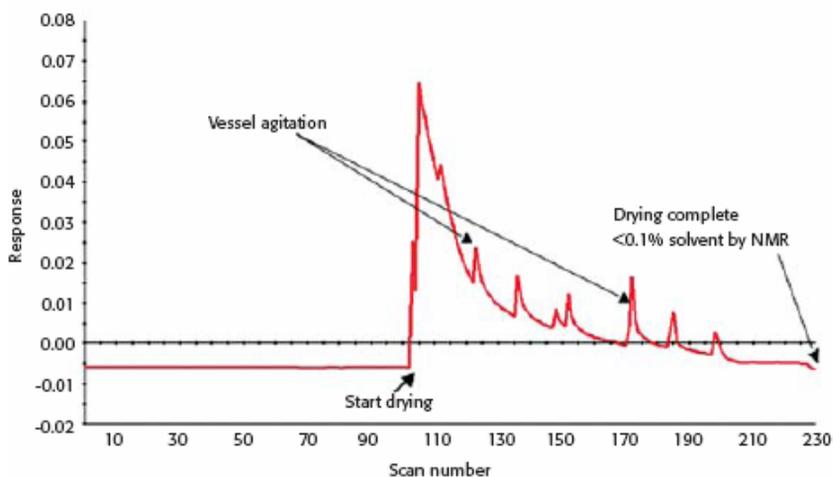


Figure II-16 : Suivi du procédé de séchage par PIR (Parris et al., 2005)

II.2.7.4.3 La compression : analyse des comprimés

La spectroscopie PIR est également utilisée pour l'analyse des comprimés. Les premiers travaux sur des comprimés ont été réalisés par Sherken en 1968 (Sherken, 1968). Dans cette étude, des comprimés de méprobamate ont fait l'objet d'un dosage PIR. A cette époque, les dosages se faisaient sur des solutions d'extraction. Depuis lors, l'utilisation du PIR a fortement évolué tant dans l'analyse qualitative que quantitative. C'est à la fin des années 80 que Lodder a présenté les premiers travaux sur des comprimés d'acide acétylsalicylique (Lodder et al., 1988). Ces travaux consistaient en une analyse qualitative permettant d'identifier des comprimés altérés d'acide acétylsalicylique. Ensuite, de nombreuses analyses quantitatives ont été publiées. Ces analyses peuvent se faire par transmission ou par réflexion. Blanco a mis au point une méthode simultanée de détermination de l'uniformité de teneur et du temps de dissolution par analyse des spectres PIR (Blanco M. et al., 2006). Au cours de ce travail, une calibration de l'équipement pour la détermination de la résistance à la rupture a été réalisée en mesurant des comprimés fabriqués à différentes pressions.

II.2.7.4.4 Le suivi du processus d'enrobage

Les comprimés pharmaceutiques sont souvent recouverts d'un enrobage dont le rôle est de protéger le principe actif d'une éventuelle dégradation par les agents extérieurs (humidité, oxygène...), de masquer un mauvais goût, de faciliter le conditionnement des comprimés sous blister ou encore de fabriquer des formes à libération modifiée.

Si l'enrobage est incorrect, différents effets indésirables peuvent se produire : un enrobage insuffisant ne protégera pas le comprimé tandis qu'un enrobage trop important pourra diminuer la vitesse de libération du principe actif (Rossetto, 1998). Pour ces raisons, il est très important de mesurer l'épaisseur de l'enrobage en cours d'opération. En général, c'est la quantité de solution d'enrobage dispensée qui est suivie ou la détermination de la prise de poids des comprimés au cours du temps. La spectroscopie PIR a été utilisée dans le suivi du processus d'enrobage (Kirsch et al., 1995a) (Kirsch et al., 1995b). Ces méthodes sont basées sur le suivi des transformations spectrales qui se produisent au cours de l'addition de l'agent filmogène. En effet, lors de cette addition, on constate une diminution de l'intensité au niveau des zones d'absorbance du principe actif dans le noyau du comprimé tandis qu'une augmentation des intensités se manifeste pour les zones correspondant au filmogène (Andersson et al., 1999).

La figure II-17 présente la variation des spectres pris sur les deux faces d'un comprimé au cours du processus d'enrobage. On constate une diminution de l'absorbance due au principe actif au cours du processus d'enrobage.

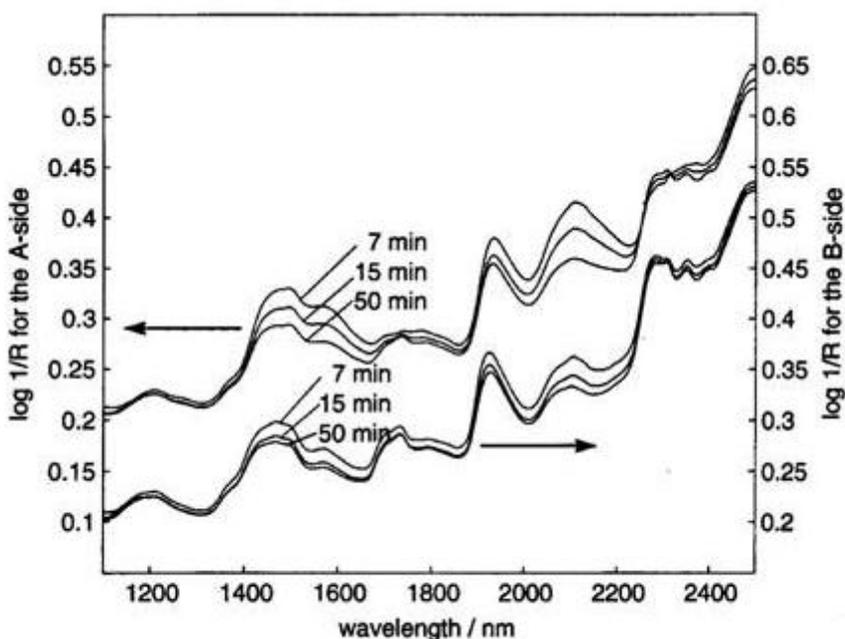


Figure II-17 : Suivi du processus d'enrobage (Andersson et Al., 1999)

Au cours de ces différentes études, il apparaît qu'il est possible de déterminer la quantité d'enrobage présente à la surface d'un comprimé par utilisation de la spectroscopie PIR.

II.2.7.4.5 Le conditionnement

Après leur production, les comprimés sont en général conditionnés sous blister afin d'être protégés vis-à-vis de l'environnement. Dans cette étape, la spectroscopie PIR a également fait l'objet d'applications notamment pour l'analyse qualitative du conditionnement primaire.

En effet, la spectroscopie PIR a permis de contrôler l'épaisseur du film de PVC constitutif du blister et ceci très rapidement (en moins de 2 min) alors que le test IR recommandé par la pharmacopée demande au moins 2 heures (Laasonen et al., 2004). La spectroscopie PIR s'est également avérée très utile dans les études cliniques en double aveugle pour l'identification des

placebos et des comprimés renfermant la substance active à différentes concentrations à travers le blister (Van den Kerkhof et al., 2006).

II.2.7.4.6 Identification de contrefaçons

De nos jours, l'apparition de contrefaçons ne cesse de se développer et la lutte efficace contre ces pratiques frauduleuses revêt une importance capitale. Certains auteurs ont montré que le PIR constituait un outil précieux pour l'identification des copies de médicaments originaux (Vredenbregt et al., 2006). Cette application permettra une caractérisation physico-chimique, à la fois qualitative et quantitative, et permettra de mettre en évidence l'empreinte de toute la matrice du médicament (Scafi et al., 2001) (Westenberger et al., 2005).

II.3 Références bibliographiques

Abney, W.; Festing, E. R.; *Philosophical Transactions of the Royal Society* 1881, 172, 887-893.

Albert A., *Analyse statistique multivariée*. Université de Liège, 2004, pp. 37-49.

Aldridge P.K; Burns, D. H.; Kelly, J. J.; Callis, J. B.; *Monitoring of methyl methacrylate polymerization using non-invasive SW-NIR spectroscopy*. *Process Control and Quality* 1993, 4, 155-160.

American Food and Drug Administration (FDA), *Guidance for industry: PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance*. FDA, 2004.

Andersson, M.; Josefson, M.; Langkilde, F. W.; Wahlund, K.-G.; *Monitoring of a film coating process for tablets using near infrared reflectance spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999, 20 (1-2), 27-37.

Arratia, P. E.; Duong, N. h.; Muzzio, F. J.; Godbole, P.; Lange, A.; Reynolds, S.; *Characterizing mixing and lubrication in the Bohle Bin blender*. *Powder Technology* 2006, 161 (3), 202-208.

Ben-Gera, I.; Norris, K. H.; *Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products*. *Journal of Food Science* 1968, 33, 64-72.

Bergman, R.; Johansson, M.; Lundstedt, T.; Seifert, E.; Aberg, J.; *Optimization of a granulation and tableting process by sequential design and multivariate analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1998, 44, 271-286.

Berman, J.; *The compliance and science of Blend Uniformity Analysis*. *PDA.J Pharm Sci Technol*. 2001, 55 (4), 209-222.

Berntsson O.; *Characterization and application of near-infrared reflection spectroscopy for quantitative process analysis of powder mixtures*. PhD Thesis 2001, 1-43.

Berntsson O.; Danielsson L-G.; *Estimation of effective sample size when analysing powders with diffuse reflectance near-infrared spectrometry*. *Analytica Chimica Acta* 1998, 364, 243-251.

Berntsson O.; Danielsson L-G.; Johansson M.O.; Folestad S.; Quantitative determination of content in binary powder mixtures using reflectance near infrared spectrometry and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta* 2000, 419, 45-54.

Berntsson, O.; Danielsson, L.-G.; Lagerholm, B.; Folestad, S.; Quantitative in-line monitoring of powder blending by near infrared reflection spectroscopy. *Powder Technology* 11-3-2002, 123 (2-3), 185-193.

Bertrand, D. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *INRA Productions Animales* 2002, 15 (3), 209-219.

Blanco M.; Alcalá, M.; Gonzalez, J. M.; Torras, E.; A process analytical technology approach based on near infrared spectroscopy: Tablet hardness, content uniformity and dissolution test measurements of intact tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 95 (10), 2137-2144.

Blanco M.; Bertran E.; Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy. *Talanta* 2002a, 56, 203-212.

Blanco M.; Coello, J.; Gonzalez F.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Spectrophotometric analysis of a pharmaceutical preparation by principal component regression. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1993, 82, 834-837.

Blanco M.; Valdes, D.; Llorente, I.; Bayod, M. S.; Application of NIR spectroscopy in polymorphic analysis: Study of pseudo-polymorphs stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 94 (6), 1336-1342.

Blanco M.; Villarroja, I.; NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in analytical chemistry* 2002b, 21, 240-250.

Candolfi, A.; Massart, D. L.; Heuerding, S.; Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta* 1997, 345 (1-3), 185-196.

Ciurczak E.W. and J. K. Drennen, in *Pharmaceutical and medical applications of near-infrared spectroscopy* (Dekker Marcel, ed.), New York, 2002, pp. 73-105.

Coblentz, W. W.; *Investigations of Infrared Spectra Part 1*. Carnegie Institute of Washington 1905, 35-43.

Corti, P.; Dreassi, E.; Corbini, G.; Bernuzzi, M.; Application of near infrared reflectance to the analytical control of pharmaceuticals: Assay of ranitidine chlorhydrate and water content in tablets. *Pharm.Acta Helv.* 1990, 65, 28-32.

De Maesschalck R.; Cuesta Sanchez F.; Massart D.L.; Doherty P.; Hailey P.; On-Line Monitoring of Powder Blending with Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 1998, 52 (5), 725-731.

Duong, N. H.; Arratia, P.; Muzzio, F.; Lange, A.; Timmermans, J.; Reynolds, S.; A homogeneity study using NIR spectroscopy: tracking magnesium stearate in Bohle bin-blender. *Drug Dev.Ind.Pharm* 2003, 29 (6), 679-687.

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

Ellis J.; Bath, J.; Modifications in the Near Infra-Red Absorption Spectra of Protein and of Light and Heavy Water Molecules When Water is Bound to Gelatin. *Journal of Chemical Physics* 1938, 6, 723-729.

Fearn T. A look at some standard pre-treatments for spectra. *NIR news* 1999, 10 (3), 10-11.

Fevotte, G.; Calas, J.; Puel, F.; Hoff, C.; Applications of NIR spectroscopy to monitoring and analyzing the solid state during industrial crystallization processes. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 273 (1-2), 159-169.

Fowle, F. E.; The spectroscopic determination of aqueous vapour. *Astrophys. J.* 1912, 35, 149-162.

Frake, P.; Greenhalgh, D.; Grierson, S. M.; Hempenstall, J. M.; Rudd, D. R.; Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infra-red spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 12-5-1997, 151 (1),75-80.

Gabrielson, J.; Nyström, A.; Lundstedt, T.; Multivariate methods in developing an evolutionary strategy for tablet formulation. *Drug Dev.Ind.Pharm* 2000, 26, 275-296.

B. Gilbert, *Chimie Analytique: Méthodes physiques d'analyse*, 2003, pp. 159-161.

Gorry, P. A.; General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method. *Analytical Chemistry* 1990, 62, 570-573.

Griffiths, P. R.; Fourier transform infrared spectrometry. *Science* 1983, 222, 297-302.

Hailey P.A.; Doherty P.; Tapsell P.; Oliver T.; Aldridge P.K.; Automated system for the on-line monitoring of powder blending using near-infrared spectroscopy. Part I. System development and control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1995, 14, 551-559.

Hausman, D. S.; Cambron, R. T.; Sakr, A.; Application of Raman spectroscopy for on-line monitoring of low dose blend uniformity. *International Journal of Pharmaceutics* 14-7-2005, 298 (1), 80-90.

Herkert, T.; Prinz, H.; Kovar, K. A. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2001, 51 (1), 9-16.

Herschel, W.; *Philosophical Transactions of the Royal Society* 1800, 90, 255-283.

Hindle, P.H.; in *Handbook of near-infrared analysis* (D. A. Burns and Ciurczak E.W., eds.), New-York, 2001, pp. 1-5.

Hinz, D. C.; Process analytical technologies in the pharmaceutical industry: the FDA's PAT initiative. *Anal.Bioanal.Chem.* 2006, 384, 1036-1042.

Hollas, J.M.; *Modern spectroscopy*, 1996, pp. 21-23.

Jennings, T. A.; Assessment of risk factors of the container-closure system for PAT guidelines. 2005.

Jorgensen, A.; Luukkonen, P.; Rantanen, J.; Schaefer, T.; Juppo, A.; Yliruusi, J.; Comparison of torque measurements and near-infrared spectroscopy in characterization of a wet granulation process. *Journal of pharmaceutical sciences* 2004, 93 (9), 2232-2243.

Jouan-Rimbaud, D.; Khots, M. S.; Massart, D. L.; Last, I. R.; Prebble, K. A.; Calibration line adjustment to facilitate the use of synthetic calibration samples in near-infrared spectrometric analysis of pharmaceutical production samples. *Analytica Chimica Acta* 1995, 315 (3), 257-266.

S. Kawata, in *Near-infrared Spectroscopy* (H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, and H. M. Heise, eds.), 2004, pp. 43-73.

Kirsch, J.; Drennen, J. K.; Near-Infrared Spectroscopic Monitoring of the Film Coating Process. *Pharm. Res.* 1995a, 13, 234-237.

Kirsch, J.; D.Drennen, J. K.; Determination of film-coated tablet parameters by near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1995b, 13 (10), 1273-1281.

Laasonen, M.; Harmia-Pulkkinen, T.; Simard, C.; Rasanen, M.; Vuorela, H.; Determination of the thickness of plastic sheets used in blister packaging by near infrared spectroscopy: development and validation of the method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 21 (4), 493-500.

Li, T.; Donner, A. D.; Choi, C.; A Statistical Support for Using Spectroscopic Methods to Validate the Content Uniformity of Solid Dosage Forms. *J Pharm Sci* 2003, 92 (7), 1526-1530.

Li, W.; Johnson, M. C.; Bruce, R.; Rasmussen, H.; Worosila, G. D.; The effect of beam size on real-time determination of powder blend homogeneity by an online near infrared sensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17-1-2007, 43 (2), 711-717.

Lodder, R. A.; Hieftje G.M.; Analysis of intact tablet by near-infrared reflectance spectrometry. *Applied Spectroscopy* 1988, 42, 556-558.

H. Martens and T. Naes; *Multivariate calibration*, Chichester, 1989.

Naes, T.; The design of calibration in near infrared reflectance analysis by clustering. *Journal of Chemometrics* 1987, 1, 121-134.

Norris, T.; Aldridge P.K.; Sekulic, S. S.; Determination of end-points for polymorph conversions of crystalline organic compounds using on-line near-infrared spectroscopy. *The Analyst* 1997, 122, 549-552.

O'Neil A.; Jee, R. D.; Moffat, A. C. Measurement of the cumulative particle size distribution of microcrystalline cellulose using near infrared reflectance spectroscopy. *The Analyst* 1999, 124, 33-36.

O'Neil A.; Jee, R. D.; Moffat, A. C.; Measurement of the percentage volume particle size distribution of powdered microcrystalline cellulose using reflectance near-infrared spectroscopy. *The Analyst* 2003, 1326-1330.

P.Geladi, D. M. a. H. M.; Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy* 1985, 39, 491.

Pan, L.; Lobrutto, R.; Zhou, G.; Characterization of moisture-sensitive raw materials with simple spectroscopic techniques. *Talanta* 2006, 70 (3), 661-667.

Parris, J.; Airiau, C.; Escott, R.; Rydzak, J.; Crocombe, R.; Monitoring API drying operations with NIR. *Spectroscopy* 2005, 20 (2), 34-41.

Rantanen, J.; Antikainen O.; Mannermaa, J.; Use of the nir-infrared reflectance method for measurement of moisture content during granulation. *Pharmaceutical Development and Technology* 1999, 5 (2), 209-217.

Rantanen, J.; Rasanen, E.; Tenhunen, J.; Kansakoski, M.; Mannermaa, J.; Yliruusi, J.; In-line moisture measurement during granulation with a four-wavelength near infrared sensor: an evaluation of particle size and binder effects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50 (2), 271-276.

Rantanen, J.; Wikström H.; Rhea, F. E.; Taylor, L.; Improved understanding of factors contributing to quantification of anhydrate/hydrate powder mixtures. *Applied Spectroscopy* 2005, 59, 942-951.

Roggo, Y.; Edmond, A.; Ulmschneider, M.; Chemometrics applied to near infrared spectroscopy: Methods for the quantitative analysis. *Chimiométrie* 2004, 33, 18-22.

Y. Rossetto, in *Pharmacotechnie industrielle* (IMT, ed.), Vendôme, 1998, pp. 311-317.

Sanchez, F. C.; Toft, J.; Van den Bogaert, B.; D.L.Massart; Dive, S. S.; Hailey, P.; Monitoring powder blending by NIR spectroscopy. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1995, 352, 771-778.

Scafi, S. H. F.; Pasquini, C.; Identification of counterfeit drugs using near-infrared spectroscopy. *Analyst* 2001, 126, 2218-2224.

Sekulic, S. S.; Wakeman, J.; Doherty, P.; Hailey, P. A.; Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II. Qualitative approaches to blend evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17 (8), 1285-1309.

Sekulic, S. S.; Ward, H. W.; Aldridge, P. K.; On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 1996, 68 (3), 509-513.

Sherken, S.; Rapid near-infrared spectrophotometric method for determination of meprobamate in meprobamate tablets. *Journal of the association of official analytical chemists* 1968, 51, 616-618.

Siesler, H.W.; *Basic Principles of vibrational spectroscopy, in Near-Infrared Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Sinsheimer, J. E.; Poswalk, N. M.; Pharmaceutical applications of the near infrared determination of water. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1968, 57 (11), 2007-2010.

Skibsted, E. T. S.; Boelens, H. F. M.; Westerhuis, J. A.; Witte, D. T.; Smilde, A. K.; Simple assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near-infrared reflectance probe and control charts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, 41 (1), 26-35.

Stokvold, A.; Dyrstad, K.; Libnau, F. O.; Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 28 (5), 867-873.

Thosar, S. S.; Forbess, R. A.; Ebube, N. K.; Chen, Y.; Rubinovitz, R. L.; Kemper, M. S.; Reier, G. E.; Wheatley, T. A.; Shukla, A. J.; A comparison of reflectance and transmittance near-infrared spectroscopic techniques in determining drug content in intact tablets. *Pharm Dev. Technol.* 2001, 6 (1), 19-29.

Van den Kerkhof, T.; De Maesschalck, R.; Vanhoutte, K.; Coene, M. C.; Augmentation of near infrared diffuse reflectance and transmittance spectral data for the development of robust PLSBC models for classifying double blind clinical trial tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, 42 (4), 517-522.

Vankeirsbilck, T.; Vercauteren, A.; Baeyens, W.; Van der Weken, G.; Verpoort, F.; Vergote, G.; Remon, J. P.; Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2002, 21 (12), 869-877.

Vergote, G. J.; De Beer, T. R. M.; Vervaet, C.; Remon, J. P.; Baeyens, W. R. G.; Diericx, N.; Verpoort, F.; In-line monitoring of a pharmaceutical blending process using FT-Raman spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 21 (4), 479-485.

Vredenburg, M. J.; Blok-Tip, L.; Hoogerbrugge, R.; Barends, D. M.; Kaste, D.; Screening suspected counterfeit Viagra(R) and imitations of Viagra(R) with near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, 40 (4), 840-849.

Ward, H. W.; Sekulic, S. S.; Wheeler, M. J.; Taber, G.; Urbanski, F. J.; Sistare, F. E.; Norris, T.; Aldridge P.K; On-line determination of reaction completion in a closed-loop hydrogenator using nir spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 1998, 52 (1), 17-21.

Wargo, D. J.; Drennen, J. K.; Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14 (11), 1415-1423.

Westenberger, B. J.; Ellison, C. D.; Fussner, A. S.; Jenney, S.; Kolinski, R. E.; Lipe, T. G.; Lyon, R. C.; Moore, T. W.; Revelle, L. K.; Smith, A. P.; Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques. *International Journal of Pharmaceutics* 8-12-2005, 306 (1-2), 56-70.

OBJECTIFS

Chapitre III

Objectifs du travail

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une convention d'Action de Recherche Concertée dont le thème est «Ségrégation et compaction de poudres et de matières granulaires ». Notre laboratoire s'est intéressé à la thématique du mélange de poudre pour compression directe.

Le mélange de poudre est une étape indispensable à la fabrication du médicament. La qualité du mélange va conditionner la qualité du produit fini. En effet, il est indispensable que le mélange soit homogène et qu'il le reste tout au long du processus de fabrication afin d'assurer une bonne répartition du principe actif dans la forme médicamenteuse finale.

A l'heure actuelle, les méthodes de contrôle de l'homogénéité de mélange mettent en œuvre l'utilisation de sondes de prélèvement. L'opération de mélange est une étape de la production d'un médicament difficile à valider car une validation appropriée demande la mise en œuvre d'un plan d'échantillonnage complexe (prélèvements destructifs à différents endroits et à différents temps pour différentes vitesses de mélange) avec de nombreux dosages effectués à chaque temps nécessitant l'immobilisation du mélangeur.

De plus, cette technique par son aspect invasif est susceptible de perturber l'état d'homogénéité du mélange. En conséquence, elle peut fausser l'interprétation des résultats.

Dès lors, la tendance consiste à recourir à des méthodes de contrôle en ligne rapides, non destructives et non invasives. C'est dans ce cadre que s'est développé, à l'initiative de la FDA, la Technologie Analytique des Procédés.

Dans cette optique, l'objectif principal de notre travail est d'étudier la cinétique de mélanges de poudres pour compression directe par l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge (PIR). Plus particulièrement, nous étudierons l'influence des caractéristiques des différents constituants du mélange, l'influence de la vitesse d'agitation et l'influence du temps de mélange sur l'obtention d'un mélange homogène.

Pour ce faire, nous avons équipé un mélangeur-granulateur à haute vitesse de cisaillement (GRAL[®] 10) à l'aide d'une sonde reliée par des fibres optiques à un spectrophotomètre PIR. Nous avons opté pour la spectroscopie PIR car la plupart des molécules organiques absorbent dans cette région du spectre électromagnétique.

Trois modèles seront étudiés : d'une part, un modèle simple, c'est-à-dire un mélange binaire et d'autre part, deux mélanges plus complexes, l'un à l'échelle du laboratoire et l'autre à l'échelle industrielle.

Dans le cas du mélange binaire, des variations seront envisagées principalement au niveau de la nature du constituant principal, l'excipient. Nous tenterons d'expliquer les différences éventuelles de cinétique de mélange observées en fonction de la nature des constituants du mélange.

Une méthode de dosage du traceur actif sera mise au point et validée afin de vérifier l'homogénéité de mélange par le dosage de la substance active dans le produit fini c'est-à-dire les comprimés. Ceci permettra de vérifier si l'état d'homogénéité a été maintenu tout au long du processus de fabrication.

Pour ce qui est du mélange « multicomposant », l'objectif sera plutôt d'étudier les paramètres du mélangeur qui influenceront l'obtention d'un mélange homogène. Le recours à un plan d'expériences permettra de comprendre l'influence de paramètres tels que la vitesse d'agitation du mélangeur ou encore la concentration en matière active sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène et ceci avec un nombre

réduit d'expériences. Une méthode de dosage PIR de la substance active dans les comprimés sera également mise au point avec comme objectif de valider le processus de fabrication.

Pour terminer notre étude dans le domaine de la cinétique de mélange, nous avons envisagé d'étudier l'application de la technique à l'échelle industrielle sur un mélangeur d'une capacité de 400 litres grâce à une étude menée en collaboration avec UCB-Pharma®.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV

Etude de l'homogénéité d'un mélange binaire

IV.1 Introduction

Afin de caractériser, d'optimiser et/ou de contrôler le processus de mélange, l'effet des variations de composition de celui-ci sur l'homogénéité doit être étudié. Dans l'industrie pharmaceutique, cette étape de mélange est primordiale. Les autorités réglementaires insistent d'ailleurs sur la nécessité d'exercer un véritable contrôle de ce processus dont la validation est essentielle.

Dans cette première partie expérimentale, nous avons choisi d'étudier le mélange binaire composé d'un principe actif modèle, la riboflavine à 1% (m/m), et d'un excipient, la cellulose microcristalline à 99% (m/m).

Nous avons opté pour ce mélange simple, car il nous permettait de le comprimer directement sans y ajouter d'autres excipients. En effet, un des objectifs de cette partie de notre recherche est également de contrôler l'uniformité de la teneur en riboflavine dans les comprimés.

De plus, la riboflavine étant colorée, un état d'hétérogénéité peut être perçu par un simple examen visuel. Pour commencer notre étude, nous avons tenté de mettre en évidence l'influence de quelques paramètres sur l'homogénéité du mélange. Une approche qualitative en ligne de l'état d'homogénéité du mélange a été envisagée afin de remplacer les techniques conventionnelles de prélèvements (Berman, 2001; Carstensen et al., 1996).

Dans la seconde partie du chapitre, nous avons confirmé les résultats de la méthode d'analyse en ligne des mélanges par une méthode de dosage

rapide et non destructive de la riboflavine dans les comprimés réalisés à partir de ces mêmes mélanges.

IV.2 Etude de l'homogénéité du mélange binaire par la spectroscopie UV-Visible

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons étudié différents paramètres influençant l'homogénéité du mélange binaire. Le contrôle de l'homogénéité de mélange a été réalisé par la technique traditionnelle de prélèvement à la canne apicale (Venables et al., 2002).

Cette méthode consiste à arrêter le mélangeur à différents temps pour y prélever des échantillons qui seront analysés par une technique conventionnelle de dosage. On détermine la teneur en principe actif de chaque échantillon pour caractériser l'état d'homogénéité. L'homogénéité de mélange est déterminée grâce au coefficient de variation des teneurs en principe actif dans les échantillons (Garcia et al., 2001).

IV.2.1 Mise au point de la méthode de dosage

IV.2.1.1 Matériel et Méthodes

Le principe actif modèle est la riboflavine. Cette substance se présente sous forme d'une poudre cristalline jaune, très peu soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'alcool.

La riboflavine est fournie par Certa[®] (Belgique), le certificat d'analyse est présenté dans l'annexe 1. Le dosage de cette substance sera effectué par spectrophotométrie Visible au moyen d'un spectrophotomètre HITACHI U-3010 (Tokyo, Japon). La longueur d'onde pour ce dosage est fixée à 440 nm.

L'excipient utilisé est la cellulose microcristalline (Avicel® PH 200, FMC, Belgique).

IV.2.1.1.1 Solutions de référence

Une solution mère est préparée en pesant précisément une quantité d'environ 10,0 mg de riboflavine et en la transférant quantitativement dans un ballon jaugé de 200,0 ml au moyen d'une solution d'acétate de sodium à 14 g/l.

Cette solution est ensuite diluée à l'aide du même solvant afin d'obtenir des solutions filles de 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 12,5 µg/ml de riboflavine.

IV.2.1.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons à doser sont dissous dans une solution d'acétate de sodium à 14 g/l. Ils sont ensuite dispersés pendant 15 minutes afin de permettre la solubilisation de la riboflavine puis centrifugés à 4000 tours par minute de manière à séparer la cellulose microcristalline, non dissoute, de la riboflavine dissoute. Le surnageant est ensuite dilué de manière à obtenir une concentration en riboflavine proche de 5 µg/ml.

IV.2.1.2 Validation de la méthode de dosage de la riboflavine

IV.2.1.2.1 Concepts théoriques

Avant de débiter toute expérimentation, nous avons d'abord validé la méthode de dosage de la riboflavine dans le mélange binaire.

La validation permet de vérifier la linéarité, le seuil de détection et de quantification, la fidélité, l'exactitude et la sélectivité de la méthode de dosage. Elle a été réalisée suivant le « guide de validation analytique »

publié dans la revue STP Pharma Pratique (Caporal-Gautier et al., 1992) présentant une stratégie pour la validation des méthodes analytiques.

IV.2.1.2.2 La linéarité

La linéarité permet de démontrer qu'il existe une relation linéaire entre les réponses et la concentration en riboflavine des solutions réalisées.

La droite de régression a été construite à partir de 5 concentrations (2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 12,5 µg/ml) avec 3 répétitions indépendantes pour chacune de ces valeurs.

La droite de régression ainsi obtenue est la suivante :

$$y = 29,7x + 0,098 \qquad \text{Eq. IV-1}$$

où y est la concentration en µg/ml

x est l'absorbance

Le coefficient de détermination vaut 0,9995, ce qui signifie que la concentration de l'échantillon est dépendante à 99,95% de l'absorbance mesurée. Il est donc raisonnable d'affirmer qu'il existe une très bonne corrélation entre la réponse spectrophotométrique et les concentrations en riboflavine comprises entre 2,5 et 12,5 µg/ml.

L'analyse de variance de la régression permet de vérifier l'existence d'une pente significative, l'existence d'une ordonnée à l'origine et la validité de l'ajustement de la droite.

IV.2.1.2.2.1 Existence d'une pente significative

La dépendance linéaire est testée par un F de SNEDECOR au seuil de confiance de 95%. Si le test n'est pas significatif, la pente est nulle. Par contre, si celui-ci est significatif, la pente est différente de 0. Si le $F_{\text{calculé}}$ est

supérieur au F de la table aux degrés de liberté (1, N-2), N étant le nombre total d'observations (ici 15), le test est significatif.

$$F_{\text{calculé}} = 29987,69$$

$$F(0,95 ; 1 ; 13) = 4,67$$

Comme 29987,69 est bien plus grand que 4,67, la pente est significative, c'est-à-dire différente de 0.

IV.2.1.2.2.2 Test d'existence de l'ordonnée à l'origine

Un t de Student est effectué pour déterminer si la droite de régression passe par l'origine. Si le critère calculé est supérieur au t de la table de Student à (N-2) degrés de liberté (13 dans notre cas), le test est significatif et la valeur de l'ordonnée à l'origine est considérée comme statistiquement différente de 0.

$$t_{\text{calculé}} = 0,30$$

$$t(13) = 2,1604$$

Comme 0,30 est inférieur à 2,16, l'ordonnée à l'origine est considérée comme nulle. Cette observation, permet de réaliser une droite d'étalonnage à un seul point pour tous les prochains dosages.

IV.2.1.2.2.3 Test de validité de la droite d'ajustement

Le test de validité de la droite d'ajustement est réalisé par un test de F de SNEDECOR.

Si le critère $F_{\text{calculé}}$ est inférieur au F de la table aux degrés de liberté (0,95 ; k-2 ; N-k), le test n'est pas significatif. La dispersion due à l'ajustement de la droite est considérée comme valide.

$$F_{\text{calculé}} = 0,76$$

$$F(0,95 ; 3, 10) = 3,71$$

Puisque 0,76 est inférieur à 3,71, le test est donc non significatif et l'ajustement est considéré comme valide.

IV.2.1.2.3 Sélectivité

La sélectivité d'une méthode définit son aptitude à faire la différence entre l'analyte étudié et les composants de l'échantillon pouvant interférer avec celui-ci.

La sélectivité de la méthode en présence de cellulose microcristalline a été étudiée. Il a fallu démontrer que l'absorbance de solutions à la même concentration en riboflavine n'était pas influencée par la présence de l'excipient.

A cette fin, des solutions à 7,5 µg/ml de riboflavine ont été réalisées avec et sans cellulose microcristalline.

La comparaison entre ces différents échantillons a été effectuée par un test de Student. Le seuil de confiance a été fixé à 95 %. Si le test est significatif, c'est-à-dire lorsque $t_{\text{calculé}}$ est inférieur à $Q_t(0,975 ; n_1+n_2-2)$ (ici, $k = 2$ et $N = 12$), ces échantillons sont considérés comme équivalents.

$$t_{\text{calculé}} = 0,010$$

$$Q_F(0,975 ; 10) = 2,2281$$

Le test nous a donné une p-valeur de 0,0187.

Ce test est significatif puisque $t_{\text{calculé}} < Q_F(0,975 ; 10)$. La présence de la cellulose microcristalline n'influence pas l'absorbance et la méthode peut donc être considérée comme sélective.

IV.2.1.2.4 Fidélité ou précision

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (CV, %) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses spectroscopiques.

La répétabilité (fidélité intra-jour) et la fidélité intermédiaire (fidélité inter-jour) ont été observées à trois concentrations (2,5 ; 5 et 7,5 µg/ml).

La méthode sera considérée comme fidèle si les CV de la répétabilité sont inférieurs à 2%.

Tableau IV-1 : Résumé des données de répétabilité

Concentrations (µg/ml)	n	C.V. (%)
2,5	6	1,52
5,0	6	0,37
7,5	6	0,40

Tableau IV-2 : Résumé des données de fidélité intermédiaire

Concentrations (µg/ml)	n	C.V. (%)
2,5	18	1,80
5,0	18	0,85
7,5	18	0,77

Au vu de ces résultats, la méthode est considérée comme fidèle.

IV.2.1.2.5 Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de la concentration réelle d'un échantillon reconstitué et la valeur de concentration mesurée par dosage.

L'étude est effectuée sur l'ensemble des mesures brutes. Cet ensemble est transformé en un ensemble de rendements : la concentration calculée est divisée par la concentration réelle, multipliée par cent.

Tableau IV-3: Résumé des données d'exactitude

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Intervalles de confiance (%)
2,5	100,97 \pm 1,06
5,0	101,34 \pm 1,63
7,5	99,92 \pm 0,20

Au vu des résultats, la méthode est considérée comme exacte.

IV.2.2 Etude de l'influence du temps de mélange et de la vitesse de mélange : Etude préliminaire

IV.2.2.1 Introduction

Une étude préliminaire a été menée afin de dégager les principaux facteurs influençant l'obtention de l'homogénéité de mélange.

Ayant fait l'acquisition d'un nouveau mélangeur, nous avons étudié l'influence sur la cinétique de mélange de deux paramètres élémentaires : le temps de mélange et la vitesse du mélangeur, comme c'est souvent le cas lors des essais préliminaires sur un nouvel équipement (Palmieri, 1998).

IV.2.2.2 Matériel et méthodes

Le mélange a été réalisé dans un mélangeur-granulateur à haute vitesse de cisaillement au sein d'une cuve à double paroi d'une capacité de 10 litres (Gra1[®] 10, GEA Collette[®], Belgique). Ce mélangeur est équipé d'un bras mélangeur principal à 3 pales d'agitation et d'un émotteur. Des mélanges de

2 kg ont été mis en oeuvre ce qui correspond à un volume de remplissage d'environ la moitié de la capacité de la cuve.

Pour le prélèvement des échantillons, nous avons utilisé une canne apicale permettant de prélever des échantillons d'un volume d'environ 0,25 ml ce qui correspond approximativement dans notre modèle à une prise d'échantillon de 100 mg (Keyser et Mackay, Paris, France). La figure IV-1 présente une photographie du mélangeur.

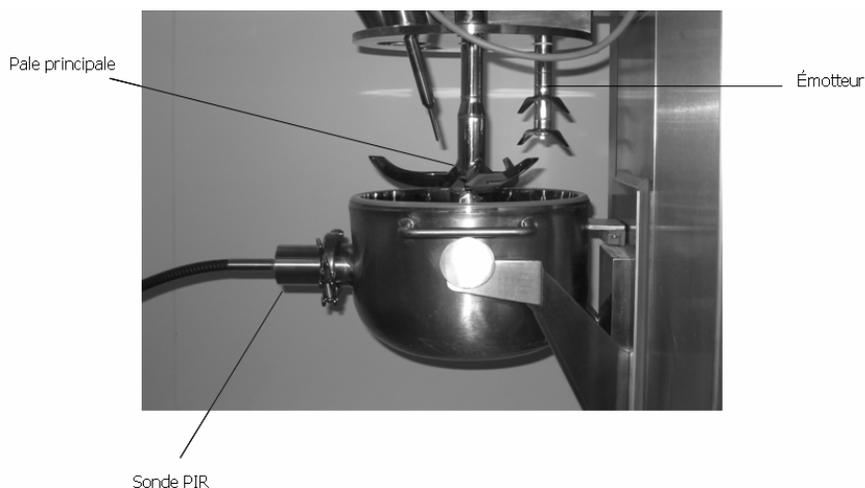


Figure IV-1: Photographie du mélangeur Grai® 10 utilisé au cours de notre travail

Après chaque temps de mélange, le mélangeur est arrêté et 10 échantillons sont prélevés au sein de la cuve selon le schéma présenté à la figure IV-2. Ces échantillons sont prélevés à 5 endroits différents et à deux niveaux différents (Carstensen et al., 1993; Muzzio et al., 1997; Muzzio et al., 2003).

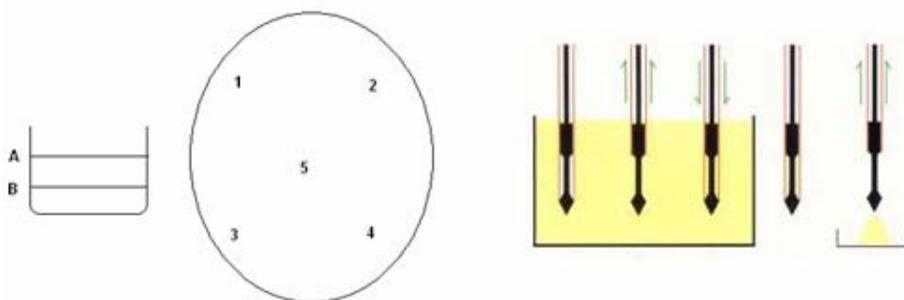


Figure IV-2: Schéma d'échantillonnage utilisé au cours de l'étude préliminaire: 5 échantillons sont prélevés à 2 niveaux différents (A et B) au sein de la cuve à l'aide d'une canne apicale

Ensuite, le contenu en riboflavine de ces 10 échantillons est déterminé quantitativement par la méthode spectrophotométrique décrite au chapitre IV.2.1.

Au cours de ces études préliminaires, les matières premières utilisées sont la riboflavine (Ph. Eur. 5^{ème} Ed. 01/2005 :0292, Certa, Belgique) et la cellulose microcristalline (Ph. Eur. 5^{ème} Ed, Avicel[®] PH 200, FMC, Belgique). Le tableau IV-4 décrit les caractéristiques de ces deux matières premières. La taille granulométrique est exprimée par le diamètre volumétrique médian c'est-à-dire la valeur de taille qui sépare la distribution en deux parties égales. La masse volumique des 2 constituants du mélange a également été déterminée à l'aide d'un pycnomètre à He.

Tableau IV-4 : Caractéristiques des différentes matières premières

	$D_{(v;0,5)} (\mu\text{m})^1$	Masse volumique (g/ml)²	N° Lot
riboflavine	74,4	1,41	UQ 40122007
Avicel [®] PH200	179,1	1,48	M601C

¹ Le $D_{(v;0,5)}$ correspond au diamètre volumétrique médian mesuré par diffractométrie laser en voie sèche (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments[®], Royaume Uni)

² Mesurée au pycnomètre à He (Pycnomatic[®], Thermo Electron[®]). Cette mesure consiste à déterminer le volume occupé par un échantillon de masse précise, en mesurant le volume d'hélium détendu dans la cellule.

IV.2.2.3 Influence du temps de mélange

Différents temps de mélange ont été étudiés : 2, 4, 8, 16 et 32 minutes. Dans un premier temps, nous avons travaillé à la vitesse la plus faible permise par le Gral-10[®] (70 tours par minute). Il faut préciser que l'émetteur n'a pas été utilisé au cours des opérations de mélange.

IV.2.2.4 Influence de la vitesse de mélange

L'étude de l'influence de la vitesse a été réalisée sur trois mélanges de composition identique à différentes vitesses d'agitation de la pale principale : 100, 300, 400 tours par minute.

IV.2.2.5 Résultats et discussion

IV.2.2.5.1 Influence du temps de mélange

Nous avons admis que le mélange est homogène lorsque le coefficient de variation de la teneur en riboflavine dans les différents échantillons est

inférieur à 5%. L'expérience a été réalisée à trois reprises (mélanges A, B, C).

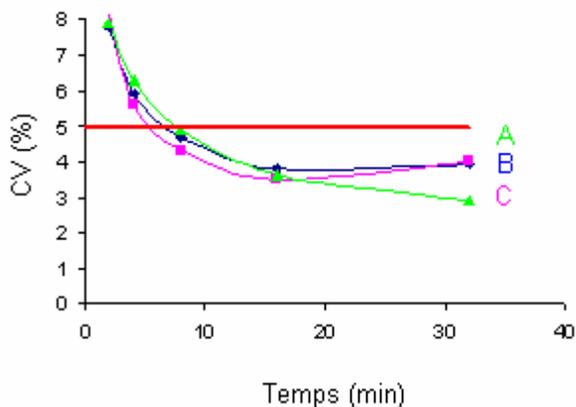


Figure IV-3 : Analyse de la cinétique de 3 mélanges (A, B, C) à base de riboflavine à 70 tpm pendant 32 minutes

On peut constater sur la figure IV-3 qu'après 8 minutes de mélange, le coefficient de variation de la teneur en riboflavine atteint une valeur inférieure à 5%. Cependant, pour la suite de notre étude préliminaire, nous avons prolongé la durée de mélange jusqu'à 16 minutes. Cette augmentation de la durée de mélange permet de garantir avec plus de certitude l'obtention d'un état d'homogénéité et ne présente pas de risque de démixage accru puisque après 32 minutes les valeurs du coefficient de variation restent stables (Fig IV-3). Kornchankul a en effet démontré qu'une certaine prudence devait être imposée puisque une durée de mélange excessive peut dans certains cas conduire à des phénomènes de démixage (Kornchankul et al., 2002).

IV.2.2.5.2 Influence de la vitesse de mélange

Après l'étude de l'influence du temps de mélange, nous avons voulu comparer l'influence de différentes vitesses d'agitation sur l'homogénéité de la poudre afin de s'assurer qu'aucun risque de démixage ne se manifeste

au cours des 16 minutes et ceci quelle que soit la vitesse du bras mélangeur (Fan et al., 1990).

Tableau IV-5 : Etude de l'influence de la vitesse d'agitation du bras mélangeur sur l'homogénéité de la poudre après 16 minutes de mélange (n=3)

	100 tpm	300 tpm	400 tpm
Moyenne (mg)	1,04	0,98	0,95
Ecart-type (mg)	0,04	0,04	0,05
CV (%)	3,84	4,55	4,89

Les résultats du tableau IV-5 montrent que, quelle que soit la vitesse d'agitation, on atteint une valeur de CV de la teneur en riboflavine inférieure à 5% après 16 minutes de mélange et que dès lors, les 3 mélanges peuvent être considérés comme homogènes.

IV.2.2.6 Conclusions

Cette étude nous permet de confirmer que le temps de mélange est un paramètre qu'il faudra étudier en détail, vu qu'il possède une influence prépondérante sur l'obtention d'un mélange homogène.

Par contre, contenu du cisaillement intense induit par le bras du mélangeur, la vitesse d'agitation semble avoir peu d'effet sur l'obtention d'un mélange homogène pour des valeurs comprises entre 100 et 400 tpm.

Afin de mieux comprendre, l'influence de ces deux paramètres sur l'obtention du point de fin de mélange, la planification expérimentale a été envisagée.

IV.2.3 Etude de l'influence de quelques paramètres de mélange par utilisation des plans d'expériences

IV.2.3.1 Introduction

La planification expérimentale peut nous aider à comprendre l'influence des différents paramètres tout en limitant le nombre d'expériences à réaliser. En effet, la méthodologie des plans d'expériences propose le recours à une série d'expériences construites à priori et garantissant dès le départ la meilleure qualité de l'information qui sera exploitée ultérieurement. Les plans d'expériences vont permettre de faire varier tous les facteurs simultanément à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée (Goupy J., 1996; Lanteri et al., 1996).

Les avantages de cette méthode sont notamment une diminution du nombre d'essais, un nombre plus important de facteurs étudiés, une détection des interactions entre facteurs, une détection des optimums ainsi qu'une optimisation et une modélisation des résultats (Servais AC., 2004).

Pour la réalisation de cette étude, nous avons utilisé le logiciel MODDE® version 6.0 (Umetrics, Suède).

IV.2.3.2 Paramètres étudiés et réponse mesurée

Le tableau IV-6 résume les paramètres étudiés dans ce plan d'expériences, leurs limites de variation ainsi que la réponse mesurée. La réponse est exprimée en pourcent et correspond au coefficient de variation de la teneur en riboflavine mesuré sur les 10 échantillons prélevés au terme du mélange c'est-à-dire 16 minutes.

Tableau IV-6 : Paramètres étudiés et réponse mesurée

Temps (min.)		Vitesse d'agitation (tours/min.)		Réponse mesurée
Limite inf.	Limite sup.	Limite inf.	Limite sup.	CV (%) de la teneur en riboflavine (n=10)
2	16	100	400	

IV.2.3.3 Réalisation du plan d'expériences

En fonction des paramètres introduits, le logiciel MODDE® 6.0 a déterminé les expériences à réaliser ainsi que l'ordre dans lequel elles seront réalisées. Le tableau IV-7 présente les expériences réalisées ainsi que les résultats obtenus pour chacune d'entre elles.

Tableau IV-7: Plan d'expériences permettant d'étudier l'influence des différents paramètres sur l'homogénéité de mélange

N° expérience	N°ordre expérience	Vitesse (tours/min.)	Temps (min.)	CV de la teneur en riboflavine (%) (n=10)
1	6	100	2	14,07
2	14	300	2	9,86
3	9	400	2	12,02
4	12	200	4	9,75
5	3	400	4	7,45
6	13	100	8	4,82
7	1	300	8	3,75
8	4	100	16	4,23
9	2	200	16	3,56
10	5	400	16	3,25
11	11	400	16	4,43
12	10	400	16	2,89
13	7	400	16	3,75
14	8	400	16	4,16

IV.2.3.4 Résultats

Le plan créé par le logiciel est un plan de type D-optimal et respecte le critère d'efficacité G. Ce critère d'optimalité est utilisé par défaut par le logiciel et correspond à la valeur optimale de la variance de prédiction dans le domaine. Il est exprimé en pourcentage par rapport au meilleur plan possible suivant ce critère (Govaerts et al., 1998).

IV.2.3.4.1 Analyse statistique

La qualité du modèle fourni par l'analyse des données peut être estimée par deux grandeurs : R^2 et Q^2 .

- R^2 exprime le pourcentage de variabilité de la réponse expliquée par le modèle. Il est calculé par la formule suivante :

$$R^2 = \frac{SS_{\text{rég}}}{SS} \quad \text{Eq. IV-2}$$

où $SS_{\text{rég}}$ est la somme des carrés des écarts des prédictions à la moyenne (variance due au modèle)

SS est la somme des carrés des écarts à la moyenne (variance totale).

- Q^2 exprime le pourcentage de variabilité de la réponse qui peut être prédit par le modèle. Il est calculé par la formule suivante :

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SS} \quad \text{Eq. IV-3}$$

où SS est la somme des carrés des écarts à la moyenne (variance totale)

PRESS est la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle

Pour chaque observation, la réponse a été prédite sur la base d'un modèle ajusté en tenant compte des autres observations. Une fois que toutes les prédictions ont été calculées, la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle est calculée (*PRESS*).

Les valeurs de R^2 et Q^2 sont habituellement comprises entre 0 et 1 et, plus elles sont proches de 1, plus le modèle est considéré comme prédictif.

Les valeurs de R^2 et Q^2 sont présentées à la figure IV-4.

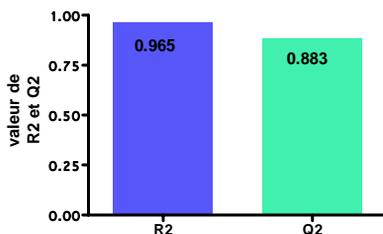


Figure IV-4: Valeurs de R^2 et Q^2 du modèle sélectionné

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que le modèle choisi explique en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque la valeur du Q^2 est positive.

IV.2.3.4.2 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions

La figure IV-5 représente les coefficients du modèle établi à partir de l'analyse des données du plan d'expériences à un niveau de confiance de 95%. Ces coefficients sont considérés comme non significatifs quand ils sont englobés par l'intervalle de confiance.

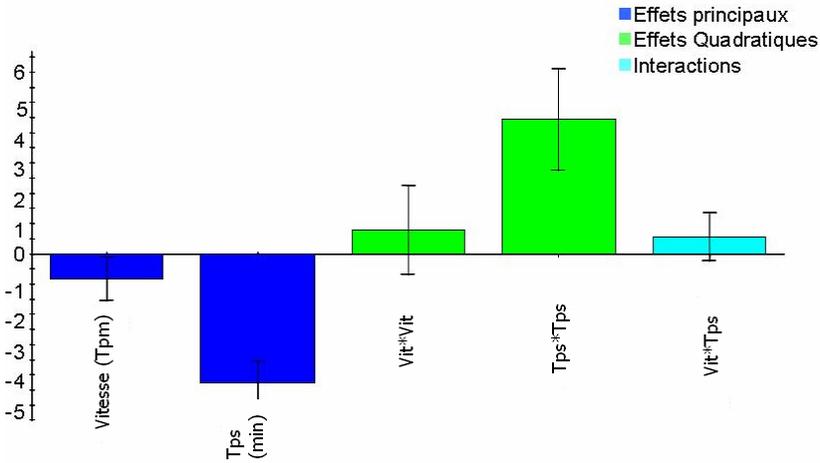


Figure IV-5 : coefficients du modèle sélectionné

L'étude des effets principaux fait apparaître que :

1. La vitesse d'agitation influence significativement la réponse, mais ceci de manière assez faible. Lorsque la vitesse augmente le coefficient de variation diminue.
2. Le temps d'agitation influence le coefficient de variation de manière encore plus significative. La valeur du CV diminue avec le temps d'agitation.
3. La figure IV-5 montre aussi qu'il existe un effet quadratique du temps, ceci signifie que le CV n'évolue pas de manière linéaire en fonction du temps.
4. Enfin, il n'existe pas d'interaction significative entre le temps et la vitesse.

La figure IV-6 décrit l'évolution du coefficient de variation de la teneur en riboflavine en fonction de la vitesse et ceci pour les valeurs extrêmes du temps de mélange (limites inférieure et supérieure). On peut constater que, quelle que soit la vitesse, si le temps de mélange est suffisant, il est possible d'obtenir un mélange homogène. En effet, la figure IV-6 montre qu'un temps

de mélange de 2 minutes ne permet pas d'obtenir des valeurs de CV inférieures à 5% quelle que soit la vitesse d'agitation. Par contre, quand la durée d'agitation est de 16 minutes, le coefficient de variation est inférieur à 5% pour toutes les vitesses testées.

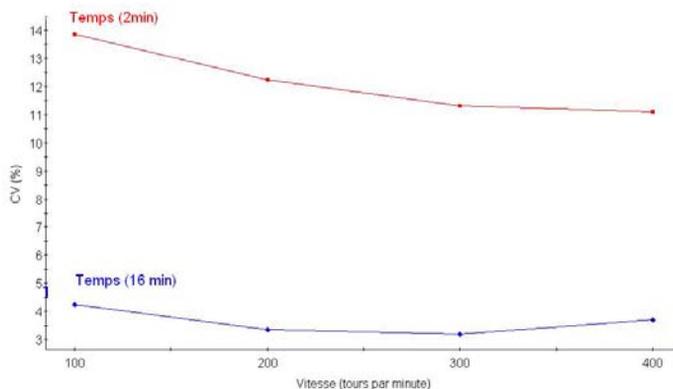


Figure IV-6: Evolution de CV de la teneur en riboflavine en fonction du temps et de la vitesse de mélange

Ces résultats confirment les données obtenues lors de l'étude préliminaire. Nous avons donc opté pour un temps de mélange de 16 minutes pour la suite de notre travail.

La surface de réponse illustrée à la figure IV-7 permet de comprendre les effets de la vitesse et du temps de mélange sur les valeurs du CV de la teneur en riboflavine.

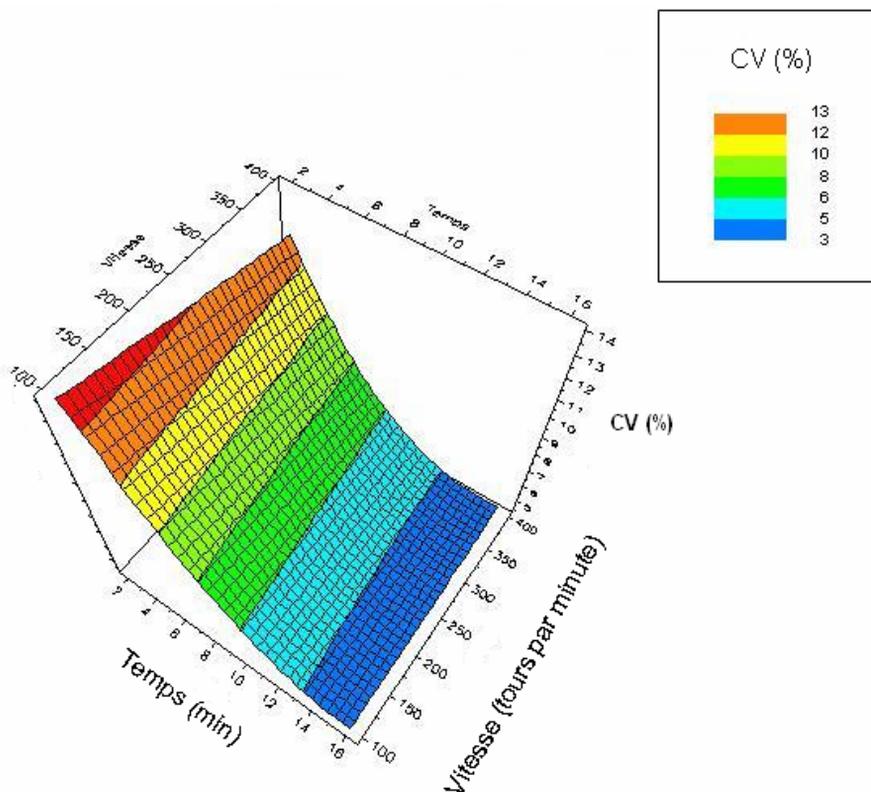


Figure IV-7 : Surface de réponse illustrant les résultats du plan d'expériences

IV.2.4 Comparaison de l'uniformité de teneur en principe actif dans les prélèvements réalisés au sein de la cuve du mélangeur et dans des comprimés obtenus à partir des mêmes mélanges

IV.2.4.1 Matériel et méthodes

Les matières premières sont identiques à celles décrites au paragraphe IV.2.2.2. Les mélanges obtenus ont été comprimés à l'aide d'une presse rotative RO-2 (GEA-Courtoy®, Halle, Belgique) équipée de poinçons plats de

7 mm de diamètre. Les comprimés obtenus avaient un poids nominal théorique de 100 mg ($98,8 \text{ mg} \pm 2,8 \text{ mg}$).

Dix comprimés sont prélevés par mélange et dosés par spectrophotométrie UV-Visible.

IV.2.4.2 Résultats et discussion

La figure IV-8 présente les coefficients de variation des teneurs en riboflavine obtenus sur les prélèvements réalisés à la canne apicale au sein des mélanges et sur les comprimés issus de ces mêmes mélanges. Nous pouvons constater que les CV de la teneur en riboflavine, obtenus à partir des prélèvements dans le mélange, présentent généralement des valeurs supérieures à ceux obtenus dans les comprimés. Ceci a été confirmé par une analyse statistique. En effet, le test de Student permettant de comparer les 2 types d'échantillons présente une p-value $< 0,05$ ce qui signifie que la différence entre les CV de la teneur en riboflavine obtenus à partir des mélanges et les CV des teneurs en PA obtenus à partir des comprimés est significative. Il apparaît également que la différence entre les deux CV est d'autant plus grande que le mélange n'est pas homogène (ex : expériences N°1 et 3).

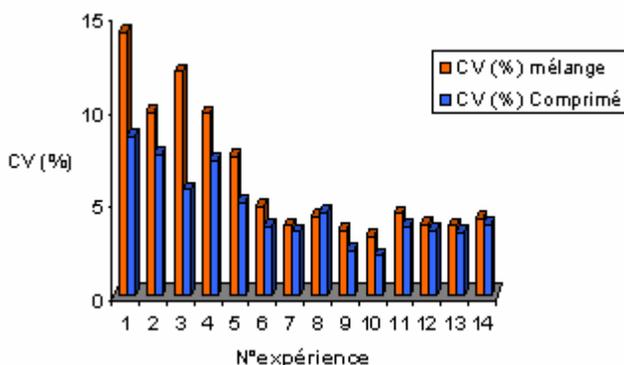


Figure IV-8: Comparaison des CV de la teneur en riboflavine obtenus sur les mélanges et sur les comprimés

Ces résultats confirment les observations de Berman (Berman, 2001) concernant les erreurs d'échantillonnage et le biais observés quand on utilise des sondes de prélèvements. Dans le cas qui nous occupe, cette mauvaise corrélation pourrait s'expliquer par l'existence de charges électrostatiques au niveau des particules de cellulose microcristalline qui pourraient induire une interaction avec le matériau de la sonde de prélèvement (Garcia et al., 1997). Suite à l'analyse des résultats, une méthode non invasive de la détermination du point de fin de mélange pourrait se révéler utile.

IV.3 Etude de l'homogénéité du mélange binaire par spectroscopie PIR

IV.3.1 Introduction

Notre choix concernant une technique de suivi en ligne s'est porté sur la spectroscopie Proche Infrarouge (PIR). En effet, la plupart des matières premières actives ou des excipients absorbent la lumière PIR. Toutes les molécules possédant des liaisons hydrogènes telles que OH, CH, SH et OH absorbent dans le PIR (Ciurczak E.W. et al., 2002).

De plus, la mise à disposition des fibres optiques a permis de réaliser des mesures rapides et surtout non invasives au sein même de la cuve du mélangeur (Blanco M. et al., 2002). En ce qui concerne l'étude de la cinétique de mélange, une approche qualitative a été envisagée, car elle requiert un travail de développement et de validation moindre que l'approche quantitative qui sera envisagée pour la détermination de l'uniformité de teneur des comprimés. De plus, l'approche qualitative est moins sensible aux conditions changeantes de l'environnement comme l'humidité relative ou la température (Li et al., 2007). A la fin de chaque mélange, l'homogénéité sera

contrôlée par la technique conventionnelle de prélèvement afin de confirmer les résultats obtenus par PIR.

Un avantage non négligeable par rapport à l'utilisation des sondes de prélèvement est le gain de temps que le contrôle en ligne de l'homogénéité de mélange va apporter (Lai et al., 2001).

IV.3.2 Matériel et méthodes

Le spectrophotomètre utilisé au cours de ce travail est un spectrophotomètre « Multi Purpose Analyzer » (MPA, Bruker Optics, Belgique). Cet équipement comprend trois compartiments principaux :

- Un module pour fibre optique
- Un analyseur d'échantillon contenu en vial
- Un module de transmission

Le module pour fibre optique permettra la réalisation d'analyses « à distance », car il forme grâce à la fibre optique un lien entre le spectrophotomètre et le lieu où se fait la mesure.

Les deux autres modules permettent l'analyse d'échantillons individuellement, soit par réflexion soit par transmission. Les schémas respectifs de ces deux modules sont présentés aux annexes 2 et 3. Le MPA comporte les parties suivantes :

- La source constituée d'une lampe à filament de tungstène.
- Un interféromètre de Michelson divisant la radiation PIR en deux faisceaux.
- Un Laser He-Ne permettant de suivre la position du miroir mobile et qui sert de standard interne assurant ainsi la répétabilité de la mesure.
- Un détecteur InGaAs dont la plage d'utilisation s'étend de 12500 à 4000 cm^{-1} .

La fibre optique de type « Series 400 Diffuse Reflectance » fournie par Precision Sensing Devices (Massachusetts, USA) mesure environ 1,50 m. Elle est constituée de 16 fibres qui envoient la lumière vers l'échantillon et de 16 fibres réceptrices de la lumière réfléchie par l'échantillon. Un schéma de la fibre est présenté à l'annexe 4.

La fibre optique est raccordée à la cuve du mélangeur en s'intégrant dans la paroi de celui-ci. Comme le montre la figure IV-9, sa position au sein de la cuve n'affecte en rien l'intégrité du mélange puisque celle-ci ne pénètre pas dans la masse de poudre.

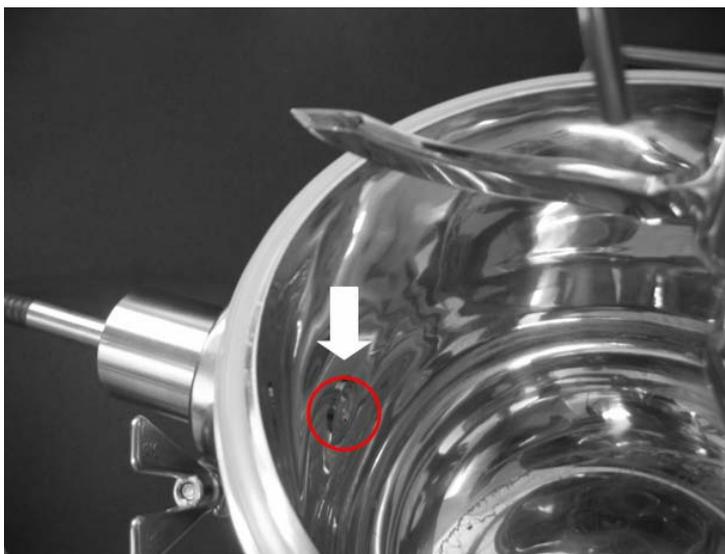


Figure IV-9: Photographie de la sonde PIR placée dans la double paroi du mélangeur Gral® 10

Le MPA est contrôlé par ordinateur via le logiciel d'acquisition et d'analyse des données Opus® version 5.0 développé par Bruker®.

Pour l'étude de la cinétique de mélange, tous les spectres ont été enregistrés entre 12500 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 8 cm^{-1} . Chaque spectre correspond à une moyenne de 16 mesures. Dans ces conditions, 15 spectres sont enregistrés en 1 minute de mélange.

Les matières premières utilisées sont identiques à celles décrites dans le tableau IV-4.

IV.3.3 Résultats et discussion

IV.3.3.1 Analyse des spectres PIR des différents constituants

Dans un premier temps, nous avons analysé les spectres originaux de chaque matière première afin d'identifier d'éventuelles bandes caractéristiques. Ces spectres sont constitués des harmoniques des bandes fondamentales. Des bandes de combinaison peuvent également être observées aux longueurs d'onde les plus élevées.

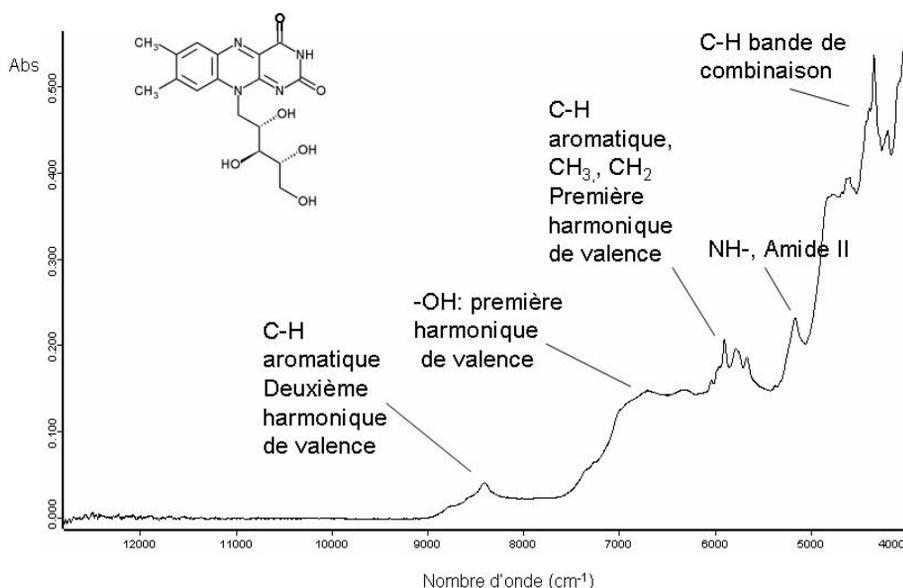


Figure IV-10 : Spectre PIR en réflexion de la riboflavine

Comme décrit dans l'introduction, il est très difficile d'interpréter les spectres PIR. Pour la riboflavine, nous avons tenté de mettre en relation certaines

bandes d'absorption avec les groupements chimiques constitutifs de la molécule. On peut notamment constater sur la figure IV-10 l'existence de bandes d'absorption étroites pour les CH du noyau aromatique en dessous des 6000 cm^{-1} qui correspondent aux bandes de première harmonique. Les bandes situées à 5000 cm^{-1} pourraient correspondre aux groupements NH ou amide.

Le spectre de la cellulose microcristalline est présenté à la figure IV-11. On peut y observer les bandes de première harmonique correspondant aux groupements OH. Il faut également faire remarquer la présence d'une bande d'absorption due à la présence d'eau.

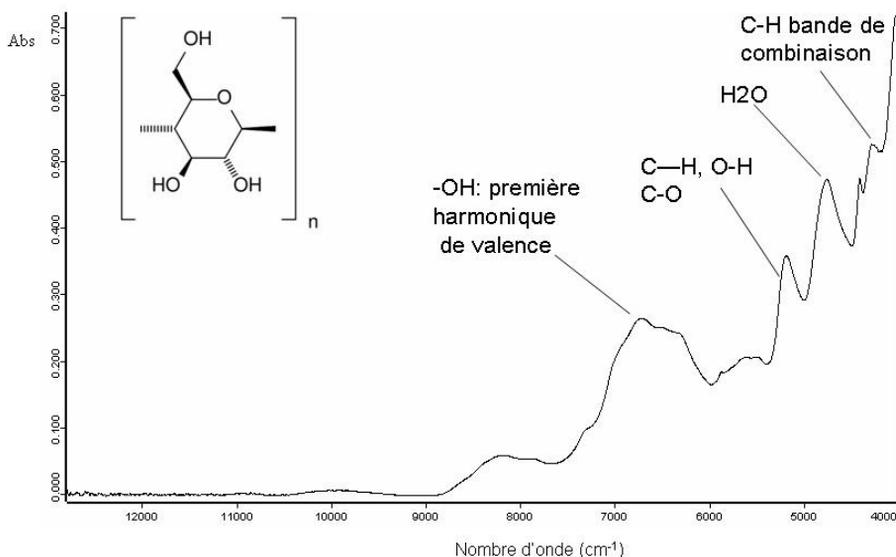


Figure IV-11 : Spectre PIR en réflexion de la cellulose microcristalline

Nous avons ensuite analysé le spectre du mélange. La figure IV-12 présente le spectre du mélange à 1% m/m en riboflavine. A l'examen des différents spectres, il est possible de déduire qu' :

- Au-dessus de 12000 cm^{-1} , les spectres ne présentent aucune bande d'absorption. En effet, on peut constater une diminution des bandes d'absorption au fur et à mesure qu'on évolue dans les harmoniques.

- Au-dessous de 4500 cm^{-1} , lorsque plusieurs spectres sont enregistrés les uns à la suite des autres, le bruit de fond augmente de manière significative.

Ces observations montrent qu'il est permis de limiter l'enregistrement des spectres entre 4500 et 12000 cm^{-1} . De plus, cette limitation de la zone de travail permet également de décharger la matrice spectrale de données superflues.

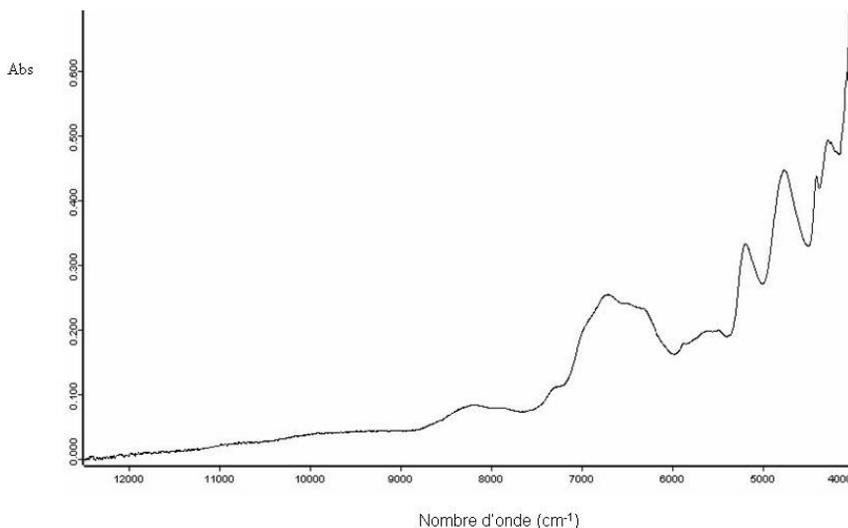


Figure IV-12 : Spectre PIR du mélange à 1% de riboflavine et de cellulose microcristalline

La figure IV-13 présente les spectres enregistrés au cours d'un mélange complet. Les spectres pris au début du mélange sont représentés en bleu tandis que les spectres rouges représentent les spectres de fin de mélange. Les spectres verts sont les spectres intermédiaires pris au cours du mélange.

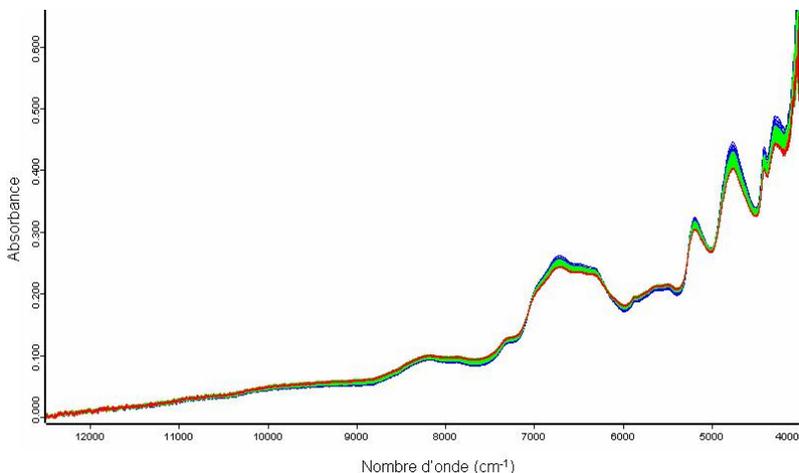


Figure IV-13: Exemple du suivi en ligne d'un mélange de riboflavine et de cellulose microcristalline

Pour ce qui concerne la sélection de la zone de travail, nous avons choisi de travailler entre 9000 et 5200 cm^{-1} car d'une part, au delà de 9000 cm^{-1} nous avons estimé qu'il n'y a plus d'information intéressante et d'autre part, nous avons voulu éviter l'interférence de l'humidité au niveau des spectres (vers 4600 cm^{-1} et 5050 cm^{-1}). La sélection de longueurs d'onde permet ainsi d'éliminer l'influence néfaste de bruits de fond éventuels au cours de l'analyse des spectres (Skibsted et al., 2004), augmentant le rapport signal/bruit.

IV.3.3.2 Suivi en ligne de la cinétique de mélange par PIR

Nous avons opté pour une analyse qualitative du mélange. La méthode que nous avons choisie consiste à comparer des spectres pris au cours du mélange avec des spectres de référence correspondant à un état homogène. Ces spectres de référence ($n=10$) ont été préalablement enregistrés sur un mélange de composition identique au modèle étudié dont l'homogénéité a été contrôlée par la technique conventionnelle.

Pour la comparaison des spectres de référence avec les spectres enregistrés sur un nouveau mélange, nous avons utilisé l'indice de conformité (CI) (Plugge et al., 1993; Ritchie et al., 2003). Le principe de cette méthode établit que l'état d'homogénéité est atteint lorsque les spectres pris au cours du mélange ne sont plus significativement différents de la référence. Cette référence est constituée de différents spectres mesurés sur la cible à atteindre.

$$CI = \frac{A_{ref,i} - A_{éch,i}}{\sigma_{ref,i}} \quad \text{Eq. IV-4}$$

- Avec $A_{ref,i}$ Absorbance moyenne des spectres de référence à la longueur d'onde i
 $A_{éch,i}$ Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde i
 $\sigma_{ref,i}$ Ecart-type des absorbances des spectres de référence à la longueur d'onde i

Les limites pour l'indice de conformité ont été fixées à 3. Cela signifie que chaque spectre dont la valeur de l'indice de conformité est égale ou inférieure à 3 n'est pas significativement différent de la référence. Cette valeur de 3 est choisie par référence à la règle dite des « 3 sigma ». Comme le montre la figure IV-14, cet intervalle de ± 3 nous garantit une certitude sur la mesure suffisante (99.73%).

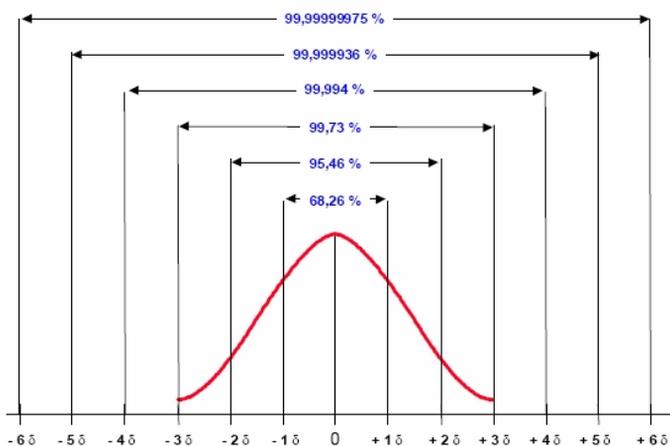


Figure IV-14: Illustration de la règle statistique des « 3 sigma »

IV.3.3.2.1 Etude préliminaire : Influence de la vitesse d'agitation

IV.3.3.2.1.1 Résultats et discussions

Dans un premier temps, nous avons comparé différentes vitesses d'agitation afin de voir si le PIR pouvait mettre en évidence d'éventuelles différences au niveau de la cinétique de mélange. Les figures IV-15, 16 et 17 présentent les cinétiques de mélange déterminées par PIR aux vitesses de 100, 300 et 400 tours par minute.

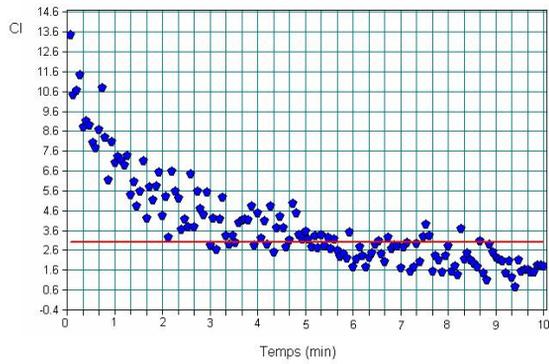


Figure IV-15: Cinétique de mélange à 100 tours par minute

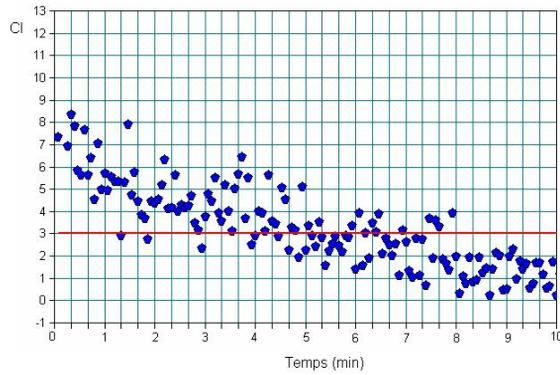


Figure IV-16: Cinétique de mélange à 300 tours par minute

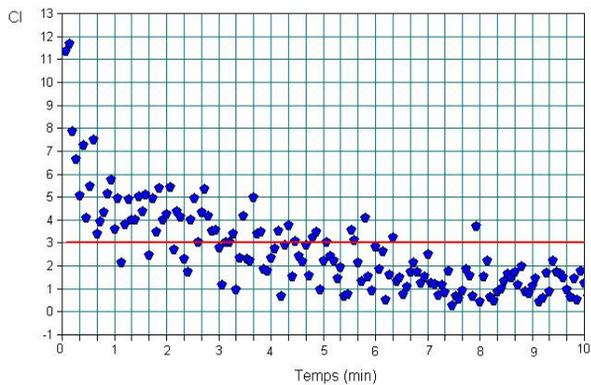


Figure IV-17 : Cinétique du mélange à 400 tours par minute

Sur ces graphiques, la ligne rouge représente la limite pour laquelle l'indice de conformité est de 3. Les points bleus représentent les spectres pris au cours du mélange.

Le temps nécessaire pour atteindre l'état d'homogénéité est d'autant plus faible que la vitesse augmente. Nous pouvons également remarquer qu'un temps de mélange de 10 minutes est suffisant pour atteindre l'homogénéité quelle que soit la vitesse d'agitation. Cette constatation coïncide avec les conclusions tirées de l'étude réalisée à l'aide de la canne apicale. Les résultats des prélèvements réalisés sur ces 3 mélanges sont présentés au tableau IV-8 et confirment un état d'homogénéité après 10 minutes de mélange.

Tableau IV-8: Résultats de la teneur en riboflavine dans les prélèvements réalisés sur les trois mélanges étudiés au cours de l'étude préliminaire du suivi de la cinétique de mélange par PIR

	100 tpm	300 tpm	400 tpm
CV (%) de la teneur en riboflavine (n=10)	4,39	4,07	3,31

De plus, l'examen des figures IV-15, 16 et 17 permet de constater une certaine variabilité parmi les spectres, celle-ci étant d'autant plus marquée que la vitesse est importante. Cette variabilité peut s'expliquer par l'agitation plus ou moins importante provoquée par la pale du mélangeur à l'intérieur de la cuve.

Enfin, on peut également observer qu'après avoir franchi la limite correspondant à l'homogénéité certains spectres peuvent présenter une valeur de CI supérieure à 3. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au cours du mélange, il existe un équilibre entre des états d'homogénéité et des états d'hétérogénéité.

Pour faciliter l'analyse de ces profils de mélange, un lissage des courbes est réalisé. Dans ce but, la moyenne de 3 spectres successifs a été calculées à l'aide du logiciel Excel[®] et ces différentes moyennes sont reliées entre elles.

Pour illustrer cette transformation, la figure IV-18 représente le profil après lissage des mélanges étudiés.

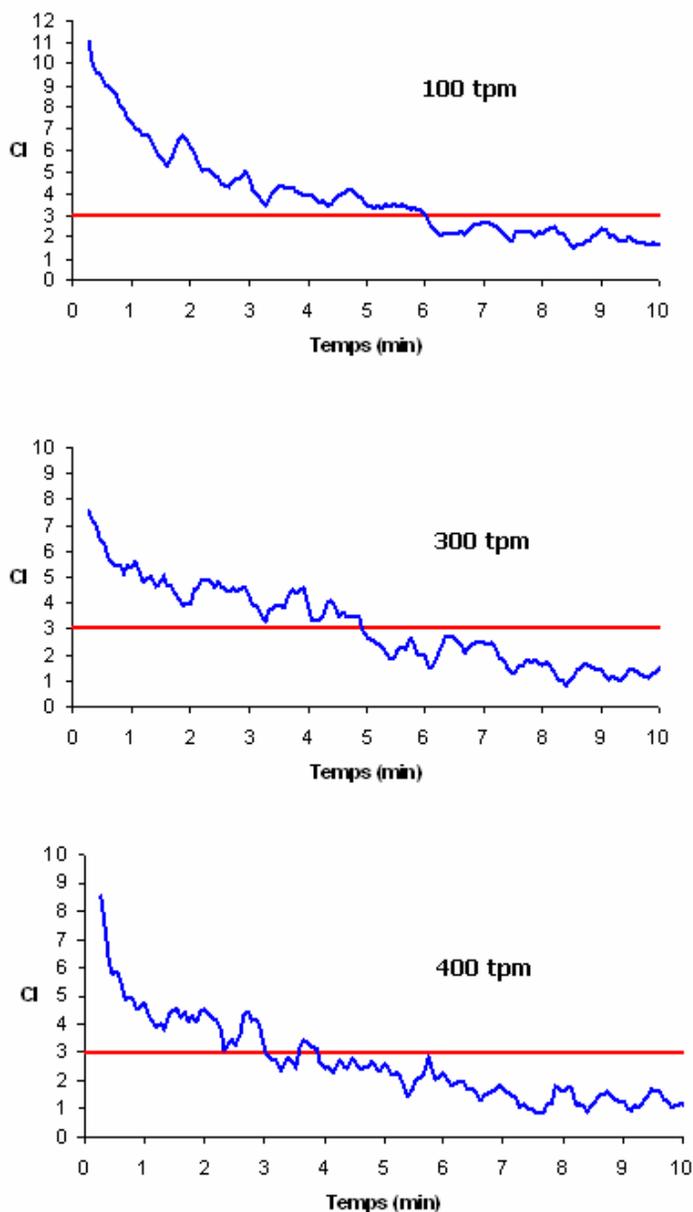


Figure IV-18: Représentation des profils de mélange obtenus après lissage

Grâce à cette transformation, il devient plus facile de déterminer le temps à partir duquel le mélange peut être considéré comme homogène ($CI < 3$).

IV.3.3.2.1.2 Conclusions

A l'issue de cette étude préliminaire par PIR, nous pouvons conclure que l'homogénéité est atteinte après 6, 5 et 4 minutes pour les mélanges réalisés respectivement à 100, 300 et 400 tours par minute. Ces résultats confirment l'étude préliminaire réalisée sur les prélèvements à la canne apicale. Cependant, par utilisation du PIR, les temps de mélange nécessaires à l'obtention d'un état d'homogénéité semblent plus courts. Ceci pourrait s'expliquer par une meilleure représentation de l'état du mélange au sein de la cuve du mélangeur que lors de l'utilisation de la technique de prélèvements à la canne apicale susceptible de perturber le mélange.

La vitesse de mélange semble avoir un impact moins important que le temps de mélange pour l'obtention d'un état d'homogénéité. L'opération de lissage des profils de mélange facilite l'interprétation des résultats et la détermination du point de fin de mélange.

IV.3.3.2.2 Influence de la nature des différents constituants sur la cinétique de mélange obtenue par PIR

Par la suite, nous avons voulu étudier l'influence de la nature des excipients ainsi que l'influence de l'origine du principe actif sur l'homogénéité de mélange.

IV.3.3.2.2.1 Matériel et méthodes

Lors de cette étude, nous avons comparé différents types de cellulose microcristalline, Avicel[®] PH 101, PH 102 et le PH 200, comme excipient

principal dans la composition du mélange. Ces trois types de cellulose se différencient par leur granulométrie comme le montre le tableau IV-8. Nous avons aussi étudié l'influence de la nature du principe actif en utilisant deux riboflavines d'origine différente. Enfin, l'influence de l'ajout d'un agent régulateur d'écoulement a également été étudiée. Nous avons utilisé la silice colloïdale anhydre (Aerosil 200®) à différentes concentrations : 0 ; 0,25 et 0,50 % (m/m).

Pour tenter d'obtenir un effet discriminant des propriétés d'écoulement des différentes poudres, compte tenu de la haute vitesse de cisaillement induite par l'agitation de la pale principale du Grai® 10, nous avons volontairement utilisé la vitesse d'agitation la plus faible (70 tpm). A la fin de chaque mélange, 10 prélèvements ont été réalisés à la canne apicale afin de vérifier l'état d'homogénéité par la technique conventionnelle. Les résultats obtenus sur ces échantillons sont présentés à l'annexe 5.

IV.3.3.2.2 Caractérisation des matières premières utilisées.

La granulométrie de chaque matière première a été mesurée par voie sèche à l'aide d'un diffractomètre laser (Mastersizer 2000®, Malvern Instruments, Royaume-Uni). Chaque mesure a été réalisée à trois reprises. Le tableau IV-8 présente les moyennes et les écart-types de ces différentes mesures.

Tableau IV-9: Distribution granulométrique des matières premières

	D_(v; 0,1) (µm)	D_(v; 0,5) (µm)	D_(v; 0,9) (µm)
Avicel PH 101	20,0 ± 1,2	54,1 ± 1,9	129,1 ± 1,5
Avicel PH 102	31,1 ± 3,1	125,3 ± 2,7	262,0 ± 2,2
Avicel PH 200	41,9 ± 1,9	179,1 ± 0,2	340,4 ± 2,6
riboflavine BASF	31,4 ± 2,0	91,8 ± 1,5	171,2 ± 1,8
riboflavine CERTA	11,1 ± 1,3	74,4 ± 1,2	149,8 ± 0,8

A la lecture des données de tableau IV-9, on constate que la taille particulière de la cellulose microcristalline augmente quand on passe de l'Avicel® PH101

à l'Avicel[®] PH200, l'Avicel[®] PH102 ayant une granulométrie intermédiaire. La riboflavine fournie par BASF[®] possède une granulométrie légèrement supérieure à celle de chez CERTA[®], son certificat d'analyse est présenté à l'annexe 6.

IV.3.3.2.2.3 Résultats et discussions

Un plan d'expériences a été mis en œuvre afin d'étudier l'influence des différents paramètres sur l'homogénéité de mélange. La réponse étudiée à l'aide de ce plan est le temps d'agitation nécessaire pour obtenir un mélange homogène c'est-à-dire le temps nécessaire à l'obtention de valeurs de CI <3. Le logiciel Modde[®] a déterminé 19 expériences à réaliser ainsi que l'ordre dans lequel elles doivent être effectuées. Ces expériences ainsi que la réponse qui y correspond sont mentionnées dans le tableau IV-10.

Tableau IV-10: Plan d'expériences utilisé pour étudier l'influence des différents excipients et l'influence de l'origine de la substance active sur l'homogénéité de mélange

N°expérience	N° ordre expérience	Type d'Avicel	Origine riboflavine	Conc. Aerosil (%)	Temps (sec.)
N1	4	PH 101	Certa	0,00	520
N2	18	PH 102	Certa	0,00	320
N3	14	PH 200	Certa	0,00	280
N4	2	PH 101	BASF	0,00	584
N5	6	PH 102	BASF	0,00	260
N6	15	PH 200	BASF	0,00	220
N7	5	PH 101	Certa	0,25	480
N8	11	PH 101	BASF	0,25	480
N9	1	PH 102	BASF	0,25	280
N10	7	PH 200	BASF	0,25	200
N11	12	PH 101	Certa	0,50	440
N12	10	PH 102	Certa	0,50	240
N13	3	PH 200	Certa	0,50	200
N14	17	PH 101	BASF	0,50	320
N15	16	PH 102	BASF	0,50	280
N16	8	PH 200	BASF	0,50	160
N17	9	PH 200	BASF	0,50	200
N18	19	PH 200	BASF	0,50	200
N19	13	PH 200	BASF	0,50	160

Le plan créé par le logiciel est un plan D-optimal respectant le critère d'efficacité G. Les valeurs de R^2 et Q^2 sont présentées dans la figure IV-19. Au vu de ces valeurs, nous constatons que le modèle choisi explique en grande partie les variations observées.

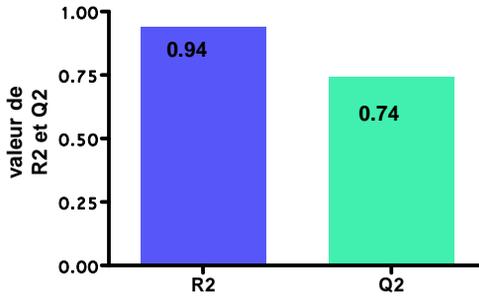


Figure IV-19: valeurs de R² et Q² du modèle défini par le plan d'expériences utilisé pour l'étude de l'influence des différents excipients et de l'origine de la riboflavine sur l'homogénéité de mélange.

La figure IV-20 représente les coefficients du modèle établi à partir des données du plan d'expériences, à un niveau de confiance de 95%. Ces coefficients sont considérés comme non significatifs quand ils sont englobés par l'intervalle de confiance.

L'étude des effets principaux montre qu'il existe un effet significatif de la silice colloïdale anhydre (Aérosil®) et de la nature de l'Avicel®. Par contre, il n'y a pas d'effet du type de riboflavine utilisé.

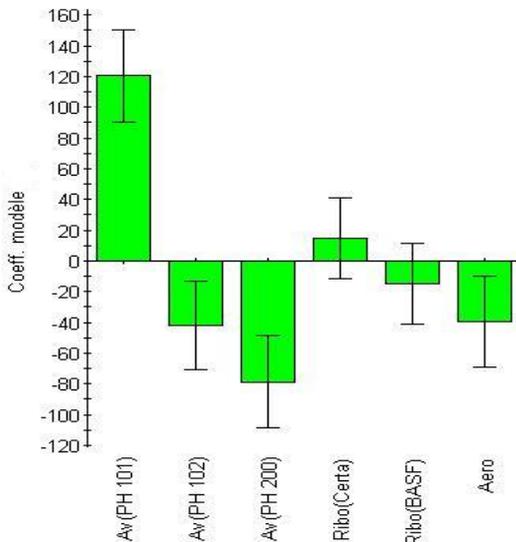


Figure IV-20: Analyse des coefficients du modèle concernant les effets principaux

La figure IV-21 montre que l'effet de la silice colloïdale anhydre est significatif lorsqu'on l'ajoute à une concentration de 0,5% (m/m). On constate que la présence de la silice colloïdale permet de diminuer le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. Ceci pourrait s'expliquer par l'action régulatrice d'écoulement de la silice colloïdale facilitant ainsi le glissement des particules les unes sur les autres et favorisant les mécanismes de mélange.

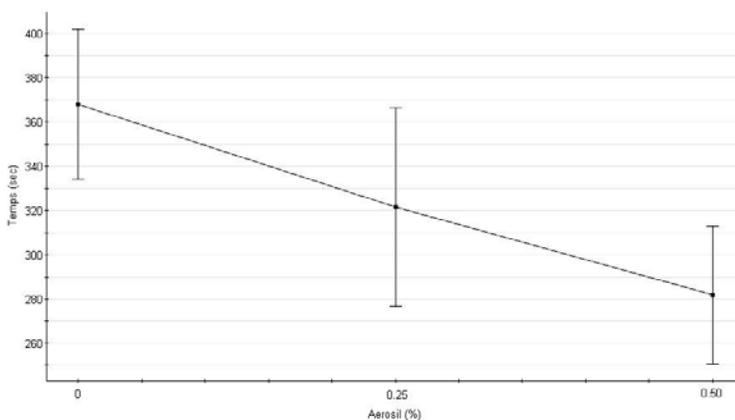


Figure IV-21: Effet de la silice colloïdale sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène

La figure IV-22 présente l'effet de la variété de cellulose microcristalline sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. Il existe une différence significative entre l'Avicel® PH 101 et les deux autres types d'Avicel®. A nouveau, l'hypothèse d'un moins bon écoulement avec l'Avicel® PH 101 pourrait expliquer ces résultats car cette variété de cellulose qui possède la taille particulière la plus petite parmi celle étudiée ne s'écoule pas librement.

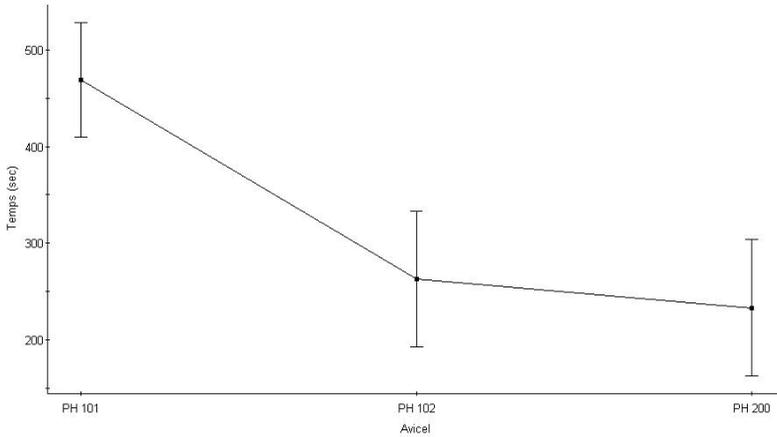


Figure IV-22: Effet du type de cellulose microcristalline sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène

La figure IV-23 permet de constater qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux types de riboflavine. Ces résultats ne sont pas surprenants vu les faibles différences qui existent entre les caractéristiques physico-chimiques (granulométrique notamment) des deux types de riboflavine.

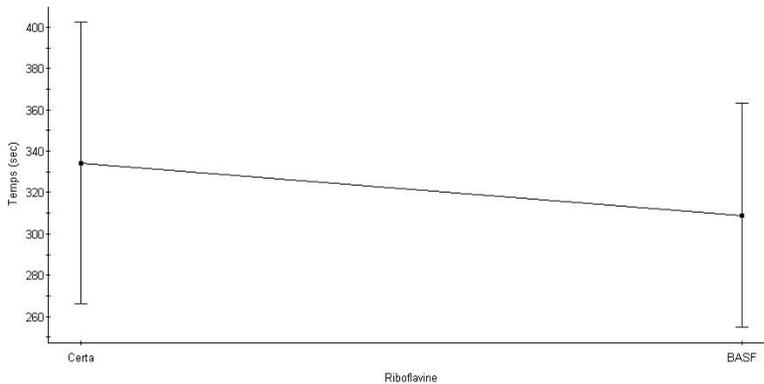


Figure IV-23: Effet du type de riboflavine sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène

IV.3.3.2.4 Conclusions

Il apparaît donc que la composition du mélange semble influencer le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène.

Tous ces résultats pourraient être mis en relation avec les propriétés d'écoulement des différents mélanges. Mieux le mélange s'écoule, moins il faudrait de temps pour obtenir un mélange homogène. Au cours de ces expériences, nous avons utilisé la vitesse d'agitation la plus faible (70 tpm) afin de limiter l'effet du bras mélangeur sur la cinétique de mélange.

IV.3.3.2.3 Etude des propriétés d'écoulement des différents mélanges

Afin de justifier notre hypothèse, différents tests d'écoulement ont été réalisés.

IV.3.3.2.3.1 Matériel et méthodes

Les mélanges réalisés dans notre plan d'expériences ont été soumis à différents tests utilisés pour caractériser leurs propriétés d'écoulement :

- la mesure de l'angle de repos présentée à la figure IV-24,

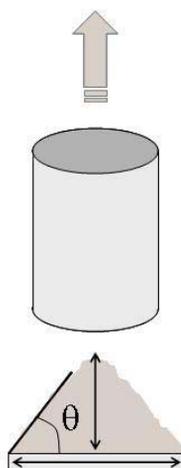


Figure IV-24: Mesure de l'angle de repos

Ce test consiste à mesurer l'angle formé entre le cône de poudre et le support sur lequel il repose. Plus cet angle est important, moins bon est l'écoulement de la poudre.

- la mesure du taux de tassement (la méthode présentée par la Ph.Eur 5^{ème} Ed. Chapitre 2.9.15 ainsi qu'une nouvelle technique développée par le laboratoire de physique statistique, GRASP de l'Université de Liège). La méthode développée par le laboratoire de Physique Statistique permet la détermination d'un paramètre appelé TAU. La valeur de celui-ci est d'autant plus élevée que l'aptitude à l'écoulement diminue (Lumay, 2006). Ce paramètre est déterminé à partir des courbes représentant l'évolution de la densité de l'empilement en fonction du nombre de secousses. A la différence de l'appareillage de la pharmacopée, le processus de tassement est mesuré de manière dynamique. En effet, l'appareil mesure la densité de la poudre entre chaque secousse. L'évolution de la densité de l'empilement en fonction du nombre de secousses est ajustée par une courbe théorique dont le temps caractéristique est le paramètre TAU.
- la détermination du diamètre minimum de l'orifice à travers lequel la poudre peut s'écouler librement (Flodex[®], Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA).

Ce diamètre minimum est mesuré à l'aide de l'équipement présenté à la figure IV-25. Cet instrument consiste en un cylindre dont le fond est constitué d'un disque amovible de diamètre variable. L'orifice est fermé par un obturateur mobile.



Figure IV-25: Représentation du Flodex[®] utilisé pour la détermination du diamètre minimum de l'orifice d'écoulement

Plus le diamètre de l'orifice est faible, meilleur est l'écoulement de la poudre.

- la détermination du nombre d'avalanches (Aeroflow[®], Amherst Process Instruments, Hadley, MA) utilisant l'équipement présenté à la figure IV-26,

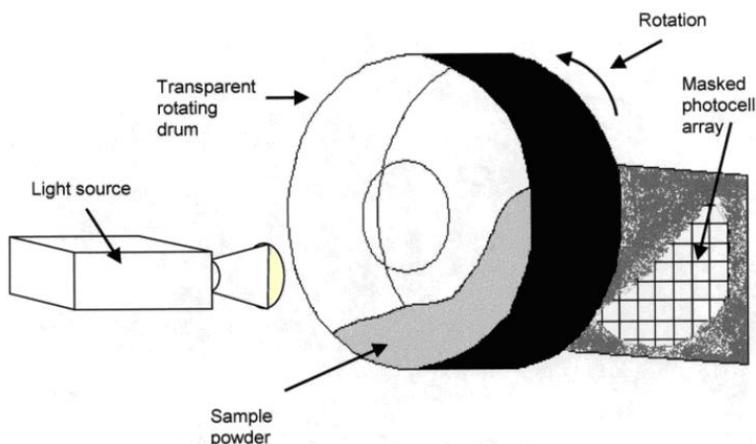


Figure IV-26: Détermination du nombre d'avalanches

50 ml de poudre sont placés dans le tambour qui effectue une rotation en 137 secondes. La durée du test est de 20 minutes. Une source lumineuse envoie de la lumière vers le tambour. Une cellule photoélectrique permet de

comptabiliser le nombre d'avalanches subies par le lit de poudre ainsi que le temps moyen entre deux avalanches.

Le nombre d'avalanches augmente avec l'aptitude à l'écoulement de la poudre.

- la mesure de la force de cisaillement nécessaire pour mettre la poudre en mouvement.

La figure IV-27 représente l'équipement utilisé, il s'agit d'un appareil de cisaillement annulaire (RST-XS, Dr. Schulze) mis à notre disposition dans le laboratoire de Technologie Pharmaceutique du Professeur Remon (UGent). Une charge verticale est appliquée sur le lit de poudre et on mesure la force nécessaire pour provoquer le cisaillement de la poudre. Un indice d'aptitude à l'écoulement (FFC) est déterminé.



Figure IV-27: Equipement utilisé pour la mesure de la force de cisaillement nécessaire pour mettre la poudre en mouvement

Plus les valeurs de FFC sont faibles, meilleures sont les propriétés d'écoulement.

Dans un premier temps, nous avons voulu comparer les résultats obtenus avec ces différents tests. Dans ce but, vu que chaque test fournissait des résultats avec des unités différentes, nous avons réalisé une analyse en composantes principales de manière à représenter les différentes réponses dans un même plan. Le logiciel Statistica® version 6 (StatSoft®, Maisons-Alfort, France) a été utilisé pour les analyses statistiques.

IV.3.3.2.4 Comparaison des différents tests d'aptitude à l'écoulement

Les différents tests ont été réalisés sur chacun des mélanges décrits précédemment dans le plan d'expériences à l'exception des mélanges 17, 18 et 19 qui sont identiques au mélange 16. Le tableau IV-11 présente les résultats obtenus avec les différentes méthodes.

Tableau IV-11: Résultats des tests d'aptitude à l'écoulement obtenus sur les différents mélanges réalisés au cours du plan d'expériences

N° expérience	FFC	Taux de tassement (%)	Angle de repos (°)	Diamètre (mm)	Nombre d'avalanches	TAU
1	5,7	26,9	56,9	22	182	32,8
2	7,3	19,7	53,0	16	250	23,7
3	13	15,5	48,2	12	297	20,7
4	4,6	21,4	56,7	22	153	21,0
5	6,7	24,7	53,5	12	246	18,1
6	13,0	12,2	43,3	4	357	17,6
7	13,0	18,8	52,0	20	230	16,6
8	11,0	18,6	51,8	22	242	20,8
10	79,0	12,4	55,7	4	425	13,2
11	12,0	17,2	53,2	18	242	22,0
12	37,0	16,6	49,9	4	315	18,1
13	20,0	11,0	39,4	4	439	12,2
14	21,0	19,6	55,2	8	336	28,5
15	22,0	17,5	50,4	4	320	19,8
16-17-18-19	40,0	10,3	38,2	16	274	17,7

Nous avons réalisé une analyse en composantes principales basée sur la matrice de corrélation puisque les unités de chaque mesure sont différentes. En effet, cette méthode statistique consiste à représenter dans un même plan des variables aléatoires permettant ainsi d'établir des corrélations entre elles (Albert A., 2004).

Dans le tableau IV-12, on voit que les deux premières composantes principales (FFC et % tassement) expliquent 80% de la distribution globale.

Tableau IV-12: valeurs propres et pourcentage cumulatif des différentes composantes principales

	Valeurs propres	Total (%)	Valeurs propres cumul.	Cumul. (%)
FFC	4,03	67,10	4,03	67,1
Taux de tassement (%)	0,77	12,91	4,80	80,0
Angle de repos (°)	0,67	11,15	5,47	91,2
Diamètre (mm)	0,29	4,87	5,76	96,0
Nombre d'avalanches	0,12	2,04	5,88	98,1
TAU	0,12	1,93	6,00	100,0

Le tableau IV-13 présente les coordonnées des variables actives permettant de réaliser la projection des différentes variables dans le plan présenté à la figure IV-28.

Tableau IV-13: Coordonnées des différentes variables

	Fact. 1	Fact. 2
FFC	-0,70	-0,56
Taux de tassement (%)	0,93	-0,18
Angle de repos (°)	0,76	-0,59
Diamètre (mm)	0,75	0,18
Nombre d'avalanches	-0,92	-0,18
TAU	0,83	-0,10

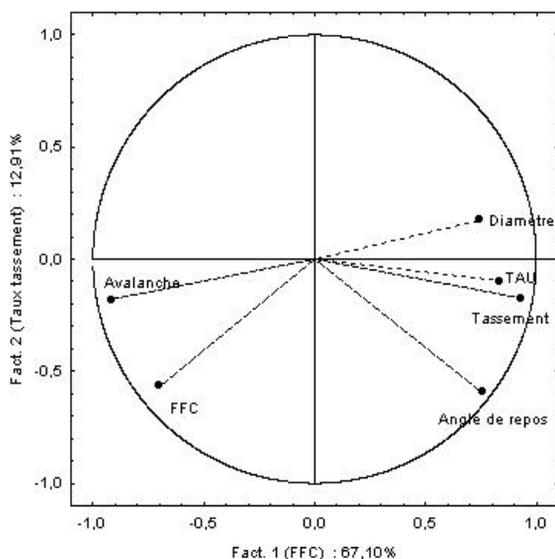


Figure IV-28: Corrélation entre les différentes méthodes de mesures

Dans ce type de projection, deux réponses sont corrélées lorsque les vecteurs qui les représentent constituent un même axe. Par contre, il n'y a pas de corrélation entre deux réponses représentées par deux vecteurs orthogonaux.

Par exemple, l'écoulement à travers un orifice et le nombre d'avalanches sont corrélés de façon négative, ce qui s'explique par le fait que les réponses obtenues par ces deux méthodes sont respectivement d'autant plus petites et plus grandes que l'écoulement est bon.

On constate aussi que la mesure de l'angle de repos n'est pas corrélée avec la détermination du nombre d'avalanches, ni avec le cisaillement, ni avec le diamètre de l'orifice critique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la mesure de l'angle de repos est une mesure calculée lorsque la poudre est statique tandis que pour les autres méthodes la poudre est en mouvement.

IV.3.3.2.5 Relation entre les cinétiques de mélange analysées par PIR et les propriétés d'écoulement

S'il l'on étudie la relation entre la détermination du point de fin de mélange par PIR et les propriétés d'écoulement, on se rend compte que meilleur est l'écoulement de la poudre, plus l'homogénéité sera atteinte rapidement, et ceci, pour une faible vitesse d'agitation. Cette hypothèse se confirme pour les mesures d'écoulement s'effectuant lorsque la poudre est en mouvement : ce qui est le cas pour la détermination du nombre d'avalanches et la détermination du diamètre minimum à travers lequel la poudre peut s'écouler. Le tableau IV-14 mentionne les résultats des analyses de variance des modèles linéaires étudiés pour chaque paramètre. Au vu des p-valeurs, il apparaît que seuls les résultats obtenus par les techniques de mesure au cours desquelles la poudre est en mouvement sont en relation avec le temps nécessaire pour obtenir un mélange homogène (p-valeur <0,05).

Tableau IV-14: Résultats des analyses de variance des différents modèles de régression

	t Value	p Value
FFC	-0,9	0,3954
Taux de tassement (%)	2,0	0,063
Angle de repos °	1,6	0,1337
Diamètre (mm)	2,67	0,0193
Nbre d'avalanches	-3,05	0,0092
TAU	0,86	0,4035

Cette observation se vérifie pour des vitesses d'agitation faibles (environ 70 tpm).

En revanche, quand on utilise la vitesse la plus élevée du bras mélangeur (400 tpm), le temps à partir duquel l'homogénéité est atteinte ($CI \leq 3$) est identique malgré les différences d'aptitude à l'écoulement des 3 variétés de

cellulose microcristalline (Avicel PH200 > Avicel PH102 > Avicel PH101). En effet, comme le montrent les profils décrits dans la figure IV-29, les spectres atteignent des valeurs de $CI \leq 3$ à partir de 220 secondes. Ceci s'explique par les forces de cisaillement intenses induites par la rotation du bras mélangeur qui assure une homogénéité rapide quelle que soit l'aptitude à l'écoulement de la cellulose microcristalline.

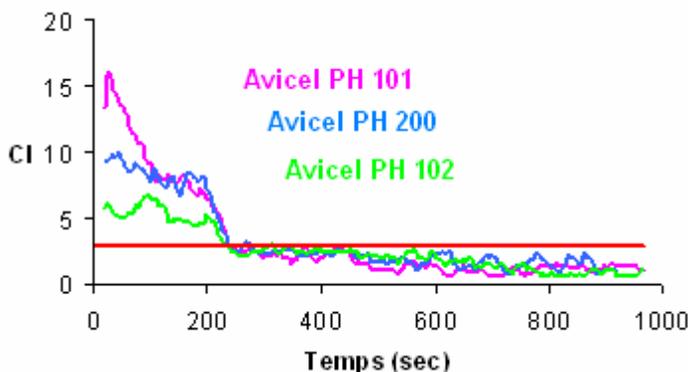


Figure IV-29: Cinétique de mélanges réalisés à 400 tours par minute se différenciant par le type de cellulose microcristalline

IV.3.4 Conclusions

Notre objectif était d'évaluer la capacité de la spectroscopie PIR à suivre en ligne la cinétique d'homogénéisation d'un mélange binaire simple refermant 1% de riboflavine.

Nous nous sommes intéressés à l'influence des propriétés d'écoulement des excipients dans le mélange et nous avons constaté que ces différentes propriétés d'écoulement modifiaient les cinétiques de mélange suivies par la spectroscopie PIR lorsque l'on minimise l'effet du mélangeur en travaillant à la plus basse vitesse permise par l'appareillage.

L'homogénéité de mélange mesurée par la spectroscopie PIR a été confirmée par les techniques conventionnelles de prélèvement à la canne apicale.

Au vu des résultats présentés, la spectroscopie PIR semble un outil rapide et performant pour l'étude qualitative en ligne de la cinétique de mélange.

IV.4 Mise au point et validation de la méthode de dosage des comprimés de riboflavine par PIR

IV.4.1 Introduction

La première partie de ce chapitre a été consacrée au suivi en ligne de la cinétique de mélange. Pour confirmer l'homogénéité obtenue sur les différents mélanges étudiés, nous avons mis au point une méthode par spectroscopie PIR rapide et non destructive de dosage du traceur actif des comprimés fabriqués à partir de ces mêmes mélanges.

L'utilisation de la spectroscopie PIR pour l'analyse de comprimés intacts fait partie, comme l'a décrit Skibsted (Skibsted, 2007) du nouveau concept de libération en temps réel.

En effet, grâce à la spectroscopie PIR, il est possible d'analyser très rapidement et de manière non destructive un très grand nombre de comprimés (Abrahamsson et al., 2005; Laasonen et al., 2003; Tatavarti et al., 2005).

Chen a montré qu'il était possible de quantifier l'uniformité de teneur et la résistance à la rupture de comprimés par PIR (Chen et al., 2001). Dans une étude réalisée par Donoso et ses collaborateurs (Donoso et al., 2003), il a été montré que la porosité des comprimés pouvait aussi être quantifiée. Les comprimés peuvent être analysés en réflexion (Han et al., 1996) ou en transmission (Eustaquio et al., 1998).

Nous avons utilisé le mode transmission. En effet, ce mode de mesure permet une meilleure détermination du contenu en substance active dans le

comprimé puisque la lumière traverse l'entièreté du comprimé (Gottfries et al., 1996) tandis qu'en mode réflexion, une surface restreinte est analysée.

L'objectif principal est de confirmer l'homogénéité de mélange par dosage des comprimés obtenus à partir de ces mêmes mélanges. Ce type de contrôle permettrait d'éviter l'étape délicate d'échantillonnage par l'utilisation des sondes de prélèvements (Kraemer et al., 1999; Murray et al., 1995).

IV.4.2 Matériels

Nous avons utilisé le mélange binaire pour compression directe constitué de 1% (m/m) de riboflavine (Certa[®], Allemagne) et de 99% (m/m) de cellulose microcristalline (Avicel[®] PH 200, FMC, Belgique) pour la fabrication des comprimés. La cellulose microcristalline a été utilisée pour ses rôles de liant et de diluant et la riboflavine comme principe actif modèle.

La compression a été réalisée sur une presse rotative RO/2 (GEA-Courtoy, Belgique) équipée de 10 poinçons plats de 7 mm de diamètre.

IV.4.3 Méthodes

IV.4.3.1 Méthodes analytiques

Il faut garder à l'esprit que la spectrophotométrie PIR est une méthode dite secondaire qui nécessite le recours à une méthode de référence pour sa calibration. En effet, une phase d'étalonnage préliminaire est indispensable pour chaque mise au point d'une méthode quantitative mettant en œuvre la spectroscopie PIR.

IV.4.3.2 La spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible a été utilisée comme méthode de référence afin de calibrer le spectrophotomètre PIR et de réaliser la validation de la nouvelle méthode de dosage. A cette fin, nous avons utilisé la méthode UV-Visible et l'équipement présenté au chapitre IV.2.1 afin de doser la riboflavine dans les comprimés.

IV.4.3.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés de manière identique à ceux présentés au paragraphe IV.2.1.1.2. Les comprimés, après avoir été analysés au spectrophotomètre PIR, sont exactement pesés puis, ceux-ci sont dispersés dans 50 ml de solution d'acétate de sodium à 14g/l. Après centrifugation à 4000 tours par minute pendant 15 minutes, le surnageant est dilué de manière à obtenir des concentrations en riboflavine de l'ordre de 5 µg/ml.

IV.4.3.3 La spectrophotométrie PIR

Le dosage dans des comprimés par PIR s'effectue à l'aide du spectrophotomètre MPA[®] (Bruker Optics, Belgique) par transmission, la source et le détecteur étant situés de part et d'autre du comprimé analysé. Le MPA[®] est contrôlé par le logiciel OPUS 5.0[®] (Bruker Optics, Belgium) qui permet l'acquisition et le traitement des spectres. Pour l'analyse quantitative des comprimés, la méthode QUANT de ce logiciel a été utilisée. Cette dernière met en œuvre la régression PLS ou « Partial Least Square » ou des « Moindres carrés partiels ».

IV.4.3.3.1 Calibration du spectrophotomètre PIR

Cette étape consiste à établir la corrélation entre les données spectrales PIR et une donnée fournie par la méthode de référence comme la concentration en matière active. Cette corrélation est établie par la régression des moindres carrés partiels (PLS) à l'aide d'échantillons de calibration. Cette calibration a pour but de prédire la concentration d'échantillons inconnus mais, de même nature. Les échantillons utilisés pour la calibration sont présentés à l'annexe 7.

IV.4.3.3.1.1 Construction du modèle PLS

Pour la calibration du spectrophotomètre PIR et la construction du modèle PLS, des comprimés renfermant 5 niveaux de concentrations en riboflavine ont été fabriqués. A partir d'un mélange à 1% en riboflavine et en faisant varier le poids des comprimés produits, des comprimés de 80, 100, 120, 140 et 160 mg ont été réalisés renfermant tous la même composition centésimale en principe actif.

Afin d'obtenir des comprimés d'épaisseur identique, la pression a été modifiée au cours de la production des différents types de comprimés. Les résultats des tests de résistance à la rupture varient entre 30 Newtons pour les comprimés de 80 mg à 90 Newtons pour les comprimés de 160 mg ce qui permet d'obtenir des comprimés de 3 mm d'épaisseur.

Chaque comprimé est analysé par transmission à l'aide du spectrophotomètre PIR. Dix comprimés sont prélevés au hasard pour chaque concentration et sont ensuite analysés pendant 3 jours par PIR. Chaque spectre est la moyenne de 32 mesures et la résolution est de 8 cm^{-1} . On obtient ainsi un total de 150 spectres (5 concentrations, 10 comprimés, 3 jours).

La figure IV-30 présente les spectres obtenus avec les différents comprimés après normalisation vectorielle (NV). Ce prétraitement homogénéise les

niveaux d'absorbance, permet de réduire les différences inter-spectrales (Barges et al., 1998) et s'avère intéressant pour des échantillons de même nature présentant des épaisseurs différentes ou pour réduire l'effet de la granulométrie ou encore des différences de densité entre les échantillons. Dans notre cas, ce prétraitement a surtout été utilisé pour réduire l'effet causé par la différence de résistance à la rupture entre les différents lots de comprimés.

De plus, cette correction améliore la linéarité de la relation entre l'absorbance et la concentration (Roggo et al., 2004). Au cours de ce prétraitement, le spectre moyen (dont l'absorbance à la longueur d'onde λ est la moyenne des absorbances de tous les spectres à la longueur d'onde λ) est tout d'abord calculé. Il est soustrait du spectre prétraité pour le centrer. Alors, le spectre centré est divisé par l'écart-type des spectres :

$$X_{corj} = \frac{X_j - \bar{X}}{\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^p (X_k - \bar{X})^2}{p-1}}} \quad \text{Eq IV-5}$$

Avec X_{corj} : absorbance à la longueur d'onde j corrigée

X_j : absorbance à la longueur d'onde j

\bar{X} : moyenne des absorbances à la longueur d'onde j

p : nombre de spectres du lot d'étalonnage

On constate sur ces spectres obtenus par transmission que le bruit est important en dessous de 7000 cm^{-1} et déjà à partir de 8000 cm^{-1} pour les comprimés à 160 mg. Ceci s'explique par le fait qu'une quantité de lumière trop faible atteint le détecteur. Dès lors pour la calibration, nous nous sommes concentrés essentiellement sur deux régions spectrales comprises entre 11250 et 8500 cm^{-1} et entre 7900 et 7350 cm^{-1} .

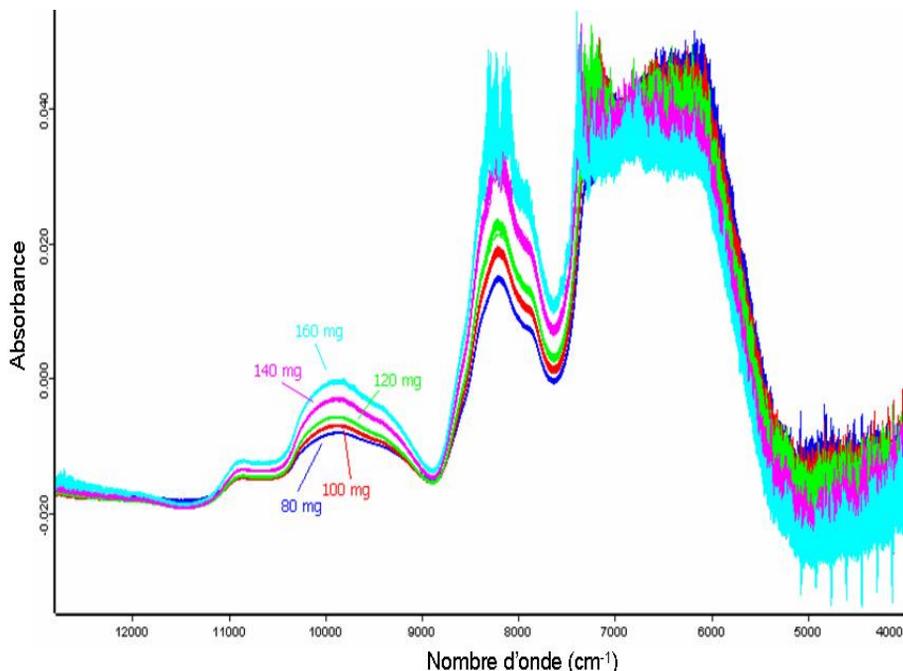


Figure IV-30 : Spectres PIR des comprimés de riboflavine base après NV

En plus de la normalisation vectorielle, une dérivation première a été effectuée sur les différents spectres. La dérivation est efficace pour réduire les problèmes de chevauchement des pics.

Le modèle obtenu par régression PLS est présenté dans la figure IV-31. Le coefficient de corrélation de ce dernier est de 99,23%. L'équation de ce dernier est la suivante :

$$X (\text{Vis}) = Y (\text{PIR}) - 0,0063 \quad \text{Eq. IV-6}$$

Afin d'évaluer la capacité de prédiction du modèle, on détermine la racine carrée de l'écart-type résiduel de la prédiction ou RSEP (Relative Standard Error of Prediction) de la manière suivante (Otto et al., 1985) :

$$RSEP(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{Vis} - C_{PIR})^2}{\sum_{i=1}^n C_{Vis}^2}} \times 100 \quad \text{Eq. IV-7}$$

Avec C_{Vis} la teneur en PA donnée par la spectrophotométrie Visible

C_{PIR} la teneur en PA donnée par la spectrophotométrie PIR

La valeur de cette RSEP est de 2,7% ce qui est tout à fait satisfaisant pour envisager une utilisation de ce modèle en routine concernant le dosage des comprimés de riboflavine.

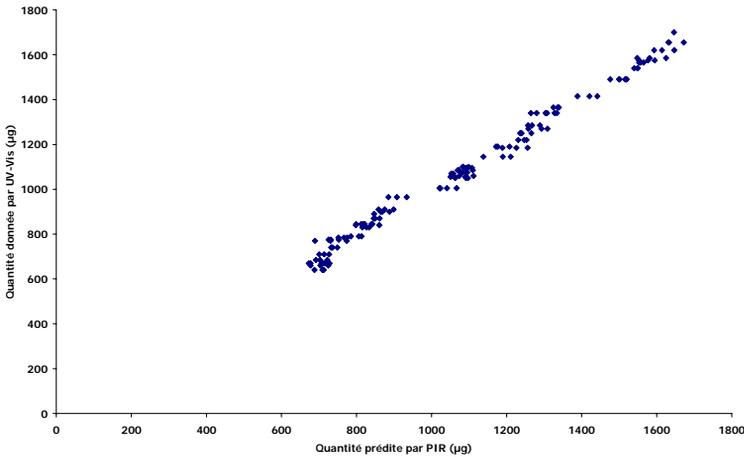


Figure IV-31: Régression des échantillons de calibration PIR vs UV-VIS

IV.4.3.3.2 Validation du modèle

Une fois le modèle établi, il est nécessaire de procéder à une validation de celui-ci afin de justifier son application en routine. Pour ce faire, 10 nouveaux échantillons pour chaque niveau de concentration ont été prélevés au hasard et analysés durant 3 jours par spectrophotométrie PIR (Boulangier et al., 2003 ; Hubert et al., 2004) . Ensuite, ces échantillons ont été analysés par la technique UV-VIS de référence.

IV.4.3.3.2.1 Concordance entre les deux techniques de mesures

Dans un premier temps, nous avons évalué l'accord entre les deux techniques de mesures. A cette fin, nous avons utilisé l'analyse statistique de Bland et Altman (Bland et al., 1986). Cette méthode couramment utilisée en biologie clinique permet de comparer deux méthodes analytiques afin d'évaluer leur concordance. La méthode de Bland et Altman consiste à réaliser un graphique représentant en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues par les deux techniques, soit $(UV - PIR)$ et en abscisse la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(\frac{UV + PIR}{2})$. La figure IV-32 nous présente cette distribution. La moyenne des différences est représentée par la ligne continue ; elle correspond au biais $\hat{\delta}$ entre les deux techniques d'analyse. Les lignes discontinues représentent les limites de concordance supérieure et inférieure. Elles sont déterminées grâce à l'écart-type des différences (ET) par l'équation suivante :

$$Limit = \hat{\delta} \pm 1,96ET$$

Eq. IV-8

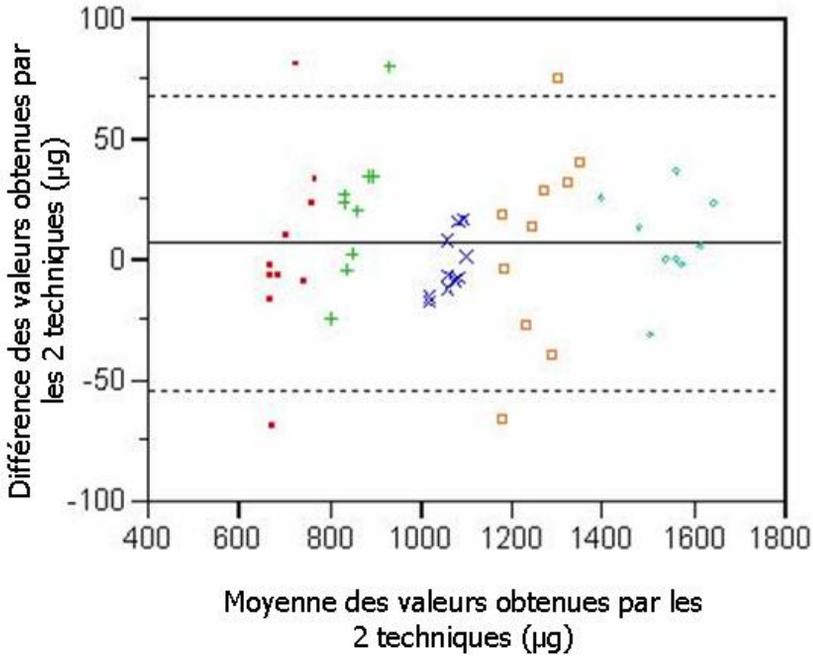


Figure IV-32 : Distribution des différences entre les 2 techniques d'analyse

Ces limites ont été arbitrairement choisies. Cependant, comme les différences suivent une loi normale, elles englobent l'intervalle dans lequel sont comprises 95% des différences (1,96 ET).

On peut constater sur ce graphique que 5 points se situent en dehors des limites. Ceci s'explique par une plus grande variabilité de la spectrophotométrie UV-Visible par rapport aux mesures réalisées à l'aide de la spectrophotométrie PIR. Pour s'en rendre compte, nous avons calculé les coefficients de variation (CV) pour chaque niveau de concentration. Dans le tableau IV-15, on observe que les valeurs de CV obtenues par spectrophotométrie UV-Vis sont toujours supérieures à celles obtenues par PIR.

Tableau IV-15 : CV (%) des teneurs en riboflavine à chaque niveau de concentration

Niveaux de concentration	1	2	3	4	5
PIR	4,15	2,35	4,20	4,56	4,76
UV-VIS	5,92	3,13	5,99	7,50	4,76

Le fait que 5 points se situent en dehors des limites ne pose toutefois pas de problème puisque il s'agit des différences sur les mesures obtenues avec les deux méthodes de dosage.

IV.4.3.3.2 Exactitude et précision de la méthode PIR

Après 3 jours de mesure par PIR, nous avons évalué l'exactitude de notre nouvelle méthode de dosage pour chaque niveau de concentration. Le tableau IV-16 présente les résultats obtenus. Le biais correspond à la moyenne des écarts entre la méthode de référence et la spectrophotométrie PIR, il s'agit de l'erreur systématique entre les deux méthodes.

Tableau IV-16 : Exactitude de la méthode de dosage PIR

Niveaux de concentration	Biais absolu (µg)	Biais relatif (%)	Rendement (%)
1	8×10^{-2}	1×10^{-2}	100,00
2	-48×10^{-2}	-5×10^{-2}	99,94
3	86×10^{-2}	8×10^{-2}	100,10
4	$-0,27 \times 10^{-2}$	-2×10^{-2}	99,98
5	-500×10^{-2}	-32×10^{-2}	99,68

Comme le montre le tableau IV-17, la répétabilité et la fidélité intermédiaire ont également été évaluées.

Tableau IV-17 : Répétabilité et précision intermédiaire

Niveaux de concentration	Répétabilité (CV %)	Fidélité intermédiaire (CV %)
1	3,7	3,9
2	4,3	4,3
3	2,3	2,4
4	4,3	2,3
5	4,4	4,4

Ensuite, nous avons tracé le profil de précision. Les limites d'acceptation ont été fixées à 15% comme décrit dans la Pharmacopée Européenne pour des comprimés renfermant moins de 2 mg de matière active. Sur la figure IV-33, la ligne continue représente le biais relatif, la ligne en pointillés (...) représente les limites d'acceptation ($\pm 15\%$) tandis que la ligne discontinue (_ _ _) représente les limites de tolérance.

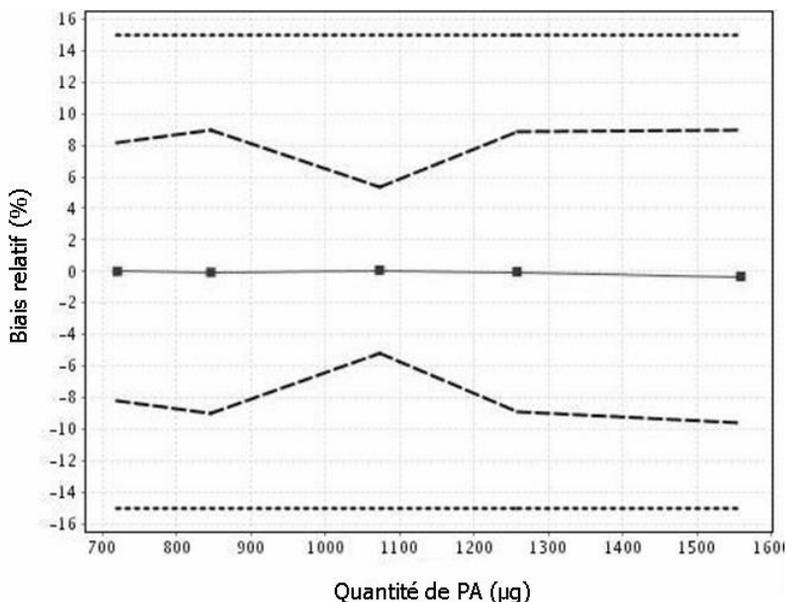


Figure IV-33 : Profil de précision de la méthode de dosage PIR

IV.4.3.3.3 Evaluation du profil de risque

Pour terminer, nous avons évalué le risque si on utilisait cette méthode PIR en routine. Comme le montre la figure IV-34, ce risque est nettement inférieur à 1% (ligne discontinue). La ligne pointillée (...) représente le risque maximum accepté (5%).

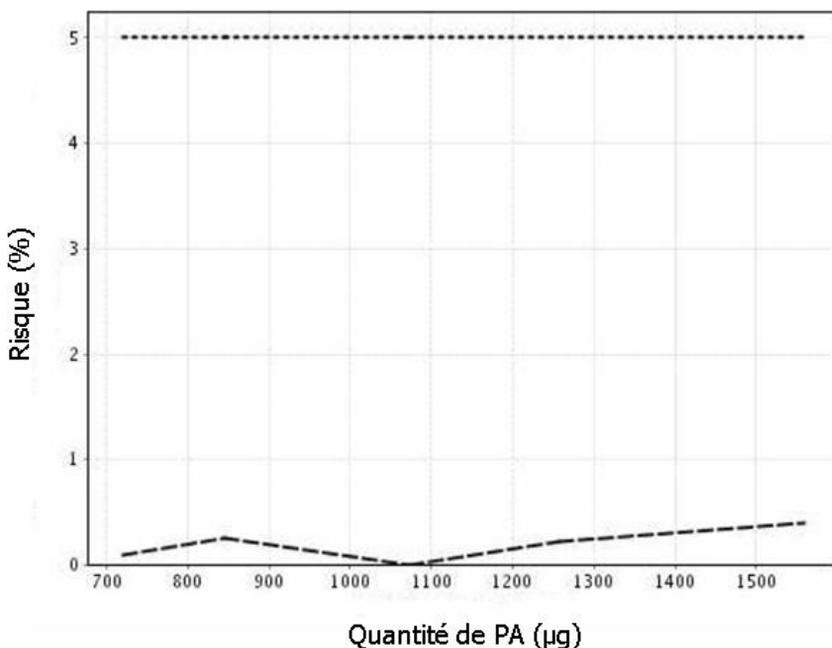


Figure IV-34 : Profil de risque couru par l'utilisation en routine la méthode de dosage PIR

IV.4.3.4 Usage du modèle PIR dans le contrôle de l'homogénéité de mélange

Nous avons réalisé des comprimés à partir des mélanges à base d'Avicel® PH 200 et de riboflavine (mélanges N3, N6, N10, N13, N16 à N19) utilisés dans le plan d'expériences présenté dans le tableau IV-9.

10 comprimés ont été prélevés à partir de chaque mélange et dosés grâce au modèle validé ci-dessus afin de confirmer l'homogénéité du mélange. Le

tableau IV-18 présente les résultats des dosages unitaires obtenus sur les comprimés prélevés.

Tableau IV-18: Teneurs en riboflavine des comprimés mesurées par spectrophotométrie PIR

Comprimés	N3	N6	N10	N13	N16	N17	N18	N19
1	0,95	0,86	0,94	0,91	0,94	0,94	0,93	0,95
2	0,89	0,93	0,99	0,97	0,91	0,99	1,01	0,92
3	0,92	0,93	1,01	0,91	0,94	0,91	0,95	0,92
4	0,95	0,92	0,97	0,93	0,91	0,97	0,98	0,91
5	0,94	0,95	1,00	0,95	0,90	1,00	0,96	0,93
6	0,96	0,90	0,97	0,96	0,90	0,97	0,94	0,91
7	0,88	0,95	0,98	1,00	0,98	0,98	0,91	0,93
8	0,94	0,90	0,99	0,99	0,95	0,99	0,94	0,89
9	0,91	0,95	0,90	0,97	0,94	0,90	0,94	0,93
10	0,96	0,92	0,95	0,94	0,96	0,95	0,91	0,91
Moyenne (mg)	0,93	0,92	0,97	0,95	0,93	0,96	0,95	0,92
Ecart-type (mg)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02
CV (%)	3,19	3,19	3,36	3,14	2,73	3,57	3,23	1,77

Au vu de ces résultats, tous les comprimés répondent aux exigences du test d'uniformité de teneur selon la Pharmacopée Européenne puisque la teneur individuelle de chaque unité est comprise entre 85 pour cent et 115 pour cent de la teneur moyenne (Pharmacopée Européenne,2005).

Ces résultats confirment que les mélanges utilisés pour la production de ces comprimés sont homogènes.

IV.4.3.5 Conclusions

Cette étude a permis de démontrer que la spectrophotométrie Proche Infrarouge pouvait être utilisée pour le dosage des comprimés produits à partir d'un mélange binaire faiblement dosé. Cette technique validée peut être utilisée en routine avec un risque d'erreur négligeable. Elle possède en outre l'avantage, par rapport aux techniques conventionnelles, d'être très reproductible, rapide et non destructive.

IV.5 Conclusions générales

Le processus de mélange est une étape primordiale dans la fabrication des formes solides unitaires. Les autorités réglementaires insistent d'ailleurs sur la nécessité d'exercer un véritable contrôle de ce processus dont la validation est essentielle.

Pour débiter l'étude sur la cinétique d'homogénéisation du mélange, nous avons choisi d'étudier un mélange binaire composé d'un traceur actif, la riboflavine à 1% (m/m) et d'un excipient, la cellulose microcristalline.

Un premier plan d'expériences, basé sur un contrôle conventionnel de l'homogénéité de mélange à la canne apicale, a été réalisé pour connaître l'influence de paramètres tels que le temps ou la vitesse d'agitation. Il est apparu que le temps d'agitation semblait avoir une influence plus importante que la vitesse d'agitation du bras mélangeur.

Des comprimés ont été fabriqués par compression directe à partir des mélanges réalisés au cours de ce plan d'expériences. Les valeurs de coefficient de variation de la teneur en riboflavine dans les comprimés sont inférieures aux valeurs de coefficient de variation de la teneur en riboflavine des prélèvements effectués à l'aide de la canne apicale au sein du mélangeur. Cette observation peut être expliquée par le caractère invasif de la méthode d'échantillonnage susceptible de perturber l'homogénéité de mélange.

Dès lors, nous avons mis au point une méthode qualitative de suivi en ligne de la cinétique de mélange par utilisation de la spectroscopie PIR. Cette méthode repose sur la détermination d'un indice de conformité (CI) qui est déterminé en comparant les spectres enregistrés au cours d'un mélange avec des spectres de référence enregistrés préalablement sur un mélange homogène.

Pour étudier l'influence des différents constituants du mélange, nous avons comparé différents types de cellulose microcristalline ainsi que deux variétés

de riboflavine d'origine différente. L'influence de l'ajout d'un agent régulateur d'écoulement à différentes concentrations a également été étudiée.

Il apparaît que la composition du mélange semble influencer le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. Dans les conditions opératoires choisies, tous ces résultats pourraient être mis en relation avec l'aptitude à l'écoulement des différents mélanges. Meilleures sont les propriétés d'écoulement, moins il faudrait de temps pour obtenir un mélange homogène.

Afin de justifier cette hypothèse différents tests permettant d'évaluer l'aptitude à l'écoulement d'une poudre ont été réalisés. Il apparaît qu'une relation existe entre le temps nécessaire pour l'obtention d'un mélange homogène, lorsque l'on travaille à la vitesse d'agitation la plus faible, et les tests mettant en œuvre des mesures dynamiques d'aptitude à l'écoulement. En revanche, quand on utilise la vitesse la plus élevée (400 tpm) du bras mélangeur, le temps à partir duquel l'homogénéité est atteinte est identique malgré les différences d'aptitude à l'écoulement.

Pour vérifier l'homogénéité de mélange, nous avons également choisi d'étudier l'uniformité de teneur des comprimés produits à partir du mélange à 1% (m/m) de riboflavine et à 99% (m/m) d'Avicel® PH200. Dans ce but, nous avons mis au point et validé une technique de dosage non destructive des comprimés par utilisation de la spectrophotométrie PIR en mode transmission. Cette technique a été validée et comparée à une méthode de dosage conventionnelle de spectrophotométrie UV-Visible. Selon la méthode statistique de Bland et Altman, il apparaît que les résultats obtenus par les deux techniques sont identiques et que cette nouvelle technique peut remplacer avec un risque limité la technique de dosage conventionnelle.

Pour terminer, cette technique PIR reproductible, rapide et non destructive, a été utilisée en routine pour vérifier que les comprimés produits répondaient aux normes de la Pharmacopée Européenne.

IV.6 Références bibliographiques

Abrahamsson, C.; Johansson, J.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, S.; Folestad, S.; Time-resolved NIR spectroscopy for quantitative analysis of intact pharmaceutical tablets. *Analytical Chemistry* 2005, 77 (4), 1055-1059.

Albert A., in *Analyse statistique multivariée* Université de Liège, 2004, pp. 37-49.

Barges, N.; Conan, H.; Poisson, N. La spectrophotométrie dans le proche infrarouge: applications qualitatives et quantitatives dans l'industrie pharmaceutique. *Analisis magazine* 1998, 26 (4), 43-46.

Berman, J.; The compliance and science of Blend Uniformity Analysis. *PDA.J Pharm Sci Technol.* 2001, 55 (4), 209-222.

Blanco M.; Villarroya, I.; NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in analytical chemistry* 2002, 21, 240-250.

Bland, J. M.; Altman, D. G.; Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986, 307-310.

Boulanger B.; Dewé W.; Chiap P., Crommen J., Hubert Ph. ; An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods : progresses and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32 (4-5), 753-765.

J. Caporal-Gautier and J. M. Nivet; Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP Méthodologie, 1992, pp. 205-226.

Carstensen, J. T.; Dali, V.; Blending validation and content uniformity of low-content, noncohesive powder blends. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1996, 22 (4), 285-290.

Carstensen, J. T.; Rhodes, C. T.; Sampling in blending validation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1993, 19 (20), 2699-2708.

Chen, Y.; Thosar, S. S.; Forbess, R. A.; Kemper, M. A.; Rubinovitz, R.; Shukla, A. J.; Prediction of drug content and hardness of intact tablets using artificial neural network and near-infrared spectroscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001, 27 (7), 623-631.

Ciurczak E.W. and Drennen J.K.; *Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, 2002.

Donoso, M.; Kildsig, D. O.; Ghaly, E. S.; Prediction of Tablet Hardness and Porosity Using Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy as a Nondestructive Method. *Pharmaceutical Development and Technology* 2003, 8, 357-366.

Eustaquio, A.; Graham, P.; Jee, R. D.; Moffatt, A. C.; Trafford, A. D.; Quantification of paracetamol in intact tablets using near-infrared transmittance spectroscopy. *Analyst* 1998, 123 (11), 2303-2306.

Fan, L. T.; Chen, Y. M.; Recent Developments in solids mixing. *Powder Technology* 1990, 61, 255-287.

Garcia, T.; Wilkinson, S.J.; Scott, J.F.; The development of a blend-sampling technique to assess the uniformity of a powder mixture. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001, 27 (4), 297-307.

Garcia, T.; Taylor, M.; Pande, G.; Comparison of the Performance of Two Sample Thieves for the Determination of the Content Uniformity of a Powder Blend. *Pharmaceutical Development and Technology* 1997, 3 (1), 7-12.

Gottfries, J.; Depui, H.; Fransson, M.; Jongeneelen, M.; Josefson, M.; Langkilde, F. W.; Witte, D. T.; Vibrational spectrometry for the assessment of active substance in metoprolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry. *J Pharm Biomed. Anal.* 1996, 14 (11), 1495-1503.

Goupy J., La méthodologie des plans d'expérience. Paris, 1996, pp. 1-8.

B. Govaerts and E. Leboulengé ; Planification expérimentale - Méthodologie et techniques, 1998.

Han, S. M. Faulkner, P. G.; Determination of SB 216469-S during tablet production using near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1996, 14 (12), 1681-1689.

Kornchankul , W.; Hamed, E.; Parikh, N. H.; Sakr, A.; Effect of drug proportion and mixing time on the content uniformity of a low dose drug in a high shear mixer. *Pharmazie* 2002, 57, 49-53.

Hubert Ph., et al.; Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 36 (3), 579-586.

Kraemer, J.; Svensson, J. R.; Melgaard, H.; Sampling bias in blending validation and a different approach to homogeneity assessment. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1999, 25 (2), 217-222.

Laasonen, M.; Harmia-Pulkkinen, T.; Simard, C.; Rasanen, M.; Vuorela, H.; Development and validation of a near-infrared method for the quantification of caffeine in intact single tablets. *Anal. Chem.* 2003, 75 (4), 754-760.

Lai, C. K.; Holt, D.; Leung, J. C.; Cooney, C. L.; Raju, G. K.; Hansen, P.; Real time and noninvasive monitoring of dry powder blend homogeneity. *AIChE Journal* 2001, 47 (11), 2618-2622.

Lanteri P. ; Longera R. ; Chimiométrie: le mariage réussi entre les sciences analytiques et l'informatique. *Analusis Magazine* 1996, 24, M17-M27.

Li, W.; Johnson, M. C.; Bruce, R.; Rasmussen, H.; Worosila, G. D.; The effect of beam size on real-time determination of powder blend homogeneity by an online near infrared sensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17-1-2007, 43 (2), 711-717.

Lumay, G.; Bodson, C.; Gerasimov, O.; Delattre, L.; Vandewalle, N.; Linking compaction dynamics to the flow properties of powders. *Applied Physics Letters* 2006, 89, 1-3.

Murray, M.; Uraizee, S.; Sakr, A.; Preliminary investigations of the suitability of the USP uniformity of dosage units tests for evaluating the uniformity of powder blends and their corresponding tablets. *Pharm. Ind.* 1995, 57 (3), 256-262.

Muzzio, F. J.; Goodridge, C. L.; Alexander, A.; Arratia, P.; Yang, H.; Sudah, O.; Mergen, G.; Sampling and characterization of pharmaceutical powders and granular blends. *International Journal of Pharmaceutics* 2-1-2003, 250 (1), 51-64.

Muzzio, F. J.; Robinson, P.; Wightman, C.; Dean, B.; Sampling practices in powder blending. *International Journal of Pharmaceutics* 26-9-1997, 155 (2), 153-178.

Otto, M.; Wegscheider, W.; Spectrophotometric multicomponent analysis applied to trace metal determination. *Analytical Letters* 1985, 33 (13), 2701-2718.

Palmieri GF; Evaluation of the mixing effectiveness of a new powder mixer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1998, 24 (1), 81-88.

Pharmacopée Européenne, in *Pharmacopée Européenne 5.0* 2005, pp. 248.

Plugge, W.; Van der Vlies, C.; Near-infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11 (6), 435-442.

Ritchie, G. E.; Mark, H.; Ciurczak E.W.; Evaluation of the conformity index and the mahalanobis distance as a tool for process analysis: A technical note. AAPS PharmSciTech 2003, 4 (2).

Roggo, Y.; Edmond, A.; Ulmschneider, M.; Chemometrics applied to near infrared spectroscopy: Methods for the quantitative analysis. Chimiométrie 2004, 33, 18-22.

Servais AC. ; Séparation et dosage de substances médicamenteuses par électrophorèse capillaire en milieu non aqueux: Influence de l'utilisation simultanée d'une cyclodextrine et d'un agent d'appariement d'ions.2004.

Skibsted, E. T. S.; Boelens, H. F. M.; Westerhuis, J. A.; Witte, D. T.; Smilde, A. K.; New indicator for optimal preprocessing and wavelength selection of near-infrared spectra. Applied Spectroscopy 2004, 58 (3), 264-271.

Skibsted, E.T.S.; Westerhuis, J.; Smilde, A.K.; Witte, D.T.; Examples of NIR based real time release in tablet manufacturing, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007, 43 (4), 1297-1305.

Tatavarti, A. S.; Fahmy, R.; Wu, H.; Hussain, A. S.; Marnane, W.; Bensley, D.; Hollenbeck, G.; Hoag, S. W.; Assessment of nir spectroscopy for nondestructive analysis of physical and chemical attributes of sulfamethazine bolus dosage forms. AAPS PharmSciTech 2005, 6, E 91-E 99.

Venables, H. J.; Wells, J. I.; Powder Sampling. Drug Development and Industrial Pharmacy 2002, 28 (2), 107-117.

Chapitre V

Etude de l'homogénéité d'un mélange multicomposant

V.1 Introduction

Dans le chapitre IV, nous avons observé que la spectroscopie PIR pouvait être utilisée pour l'étude de l'homogénéité d'un mélange binaire.

Nous avons ensuite voulu étudier son application dans l'étude de l'homogénéité d'un mélange plus complexe à base de chlorhydrate de diltiazem. Ce mélange composé de 4 excipients et d'un principe actif est plus réaliste puisqu'un mélange destiné à la compression directe est rarement constitué d'une matière active et d'un seul excipient.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer les conditions optimales d'obtention d'un mélange homogène contenant plus de deux constituants. Dans ce chapitre, l'influence de la vitesse d'agitation du mélangeur et de la concentration en matière active sur l'homogénéité de mélange a été évaluée. L'influence du prétraitement mathématique des spectres a également été prise en compte. Ce prétraitement des spectres peut être utilisé afin d'améliorer la qualité du signal avant d'appliquer sur les spectres une analyse statistique (Bertrand, 2002).

Parallèlement au suivi en ligne du processus de mélange, nous avons mis au point une méthode de dosage du diltiazem HCl dans des comprimés. Cette méthode de dosage par transmission PIR a été validée et de plus, cette méthode a été utilisée pour valider le procédé de fabrication des comprimés.

V.2 Matériels

Le diltiazem HCl répond aux normes de la monographie 01/2005 :1004 de la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition. Il est fourni par Roig Farma (Barcelone, Espagne). Le lactose monohydrate (DCL 15[®]) utilisé comme diluant en compression directe est fourni par DMV International (Veghel, Pays-Bas). Le liant employé dans la formulation est la cellulose microcristalline (Avicel[®] PH 102) fournie par FMC[®] (Bruxelles, Belgique). Un agent régulateur d'écoulement, la silice colloïdale anhydre (Aérosil[®] 200) et un lubrifiant, le stéarate de magnésium, ont été obtenus chez Alpha Pharma[®] (Braine-l'Alleud, Belgique).

Le mélange est réalisé dans un mélangeur-granulateur (Gra1[®]10, GEA-Collette[®], Belgique) dont la cuve est équipée de la sonde PIR (Series 400 Diffuse Reflectance Probe, Precision Sensing Devices, Massachusetts, USA). La sonde est reliée par des fibres optiques au spectrophotomètre MPA[®] (Bruker Optics, Belgique). Le MPA[®] est contrôlé par le logiciel OPUS version 5.0 permettant l'acquisition et le traitement des spectres. Pour l'analyse statistique, les logiciels Excel 2000[®] (Microsoft) et Statgraphics Plus[®] version 5.1 ont été utilisés.

V.3 Méthodes

V.3.1 Méthode de référence du dosage du chlorhydrate de diltiazem

Une méthode de référence par spectrophotométrie UV-Visible a également été mise au point et validée. Pour ce faire, nous avons adopté la validation décrite au chapitre IV.2.1 à l'aide du spectrophotomètre HITACHI U-3010 (Tokyo, Japon) à la longueur d'onde de 240 nm.

V.3.1.1 Solutions de référence

Une solution mère est préparée en pesant de façon précise une quantité d'environ 100,0 mg de diltiazem HCl et en transférant quantitativement cette pesée dans un ballon jaugé de 100 ml au moyen d'une solution tampon phosphate de pH 6,5 (qui renferme 6,8 g de KH_2PO_4 et 0,224 g de NaOH dans 1000 ml d'eau). Cette solution est diluée de manière à obtenir des solutions de concentration de 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/ml}$ en diltiazem HCl.

V.3.1.2 Préparation des échantillons à doser

Les échantillons à doser sont introduits dans le tampon phosphate à pH 6,5. Ils sont ensuite agités afin de rendre la dissolution du diltiazem optimale puis centrifugés à 4000 tours par minute pendant 10 minutes de manière à séparer du principe actif les excipients non dissous. Le surnageant est alors dilué de manière à obtenir les concentrations désirées.

V.3.1.3 Validation de la méthode de référence

Les concepts théoriques de la validation ont été présentés dans le chapitre IV.2.1.2. Nous nous contenterons de présenter un tableau récapitulatif reprenant les résultats de cette validation.

Au vu des résultats présentés dans le tableau V-1, cette méthode spectrophotométrique peut être utilisée en routine pour doser des solutions dont les concentrations peuvent varier de 5,3 $\mu\text{g/ml}$ à 24,8 $\mu\text{g/ml}$. La teneur en chlorhydrate de diltiazem des échantillons prélevés au sein de la cuve à l'aide de la canne apicale sera déterminée par cette méthode UV.

Tableau V-1 : Résultats de la validation de la méthode de dosage du diltiazem HCl par spectrophotométrie UV-Visible

Quantité (µg/ml)	Exactitude	Précision		Linéarité			Limite de quantification(µg/ml)
		Reproductibilité (CV%)	Précision intermédiaire (CV%)	Intercept	Pente	R ²	
5	101,6	2,4	1,8	0,0336	0,9950	0,9999	5,3-24,8
15	99,3	1,3	2,2				
25	98,7	1,7	1,4				

V.4 Etude de la cinétique d'homogénéité du mélange pour compression directe à base de diltiazem HCl

V.4.1 Etude préliminaire par spectrophotométrie UV-Visible

Nous avons, comme pour le mélange binaire, débuté notre étude par un essai préliminaire pour obtenir une première évaluation de la cinétique de mélange du diltiazem HCl. Au cours de cette étude, les cinétiques de mélange sont étudiées avant l'ajout du stéarate de magnésium. En effet, en ajoutant le stéarate de magnésium au mélange dès le début du suivi de la cinétique d'homogénéisation, il existe un risque de provoquer une augmentation de la couverture des particules des autres constituants par les particules du lubrifiant susceptible de poser problème lors de l'étape de compression, notamment par une diminution de la résistance à la rupture des comprimés (Bolhuis, 1996).

Nous avons étudié la cinétique de mélange pour une concentration de 10 % en diltiazem HCl et pour deux vitesses extrêmes : 100 et 400 tours par minute. La composition du mélange est présentée dans le tableau V-2. Nous avons mis en œuvre 2,5 kg de ces mélanges, ce qui permet d'obtenir un volume adéquat (environ 4,5 litres) pour la cuve de notre mélangeur dont la capacité est de 10 litres.

Tableau V-2 : Composition du mélange à 10% en diltiazem HCl

Constituants	Pesée (g)
diltiazem HCl	250,00
Cellulose Microcristalline	500,00
Lactose Monohydrate	1718,57
Silice colloïdale anhydre	6,25
Stéarate de Magnésium	25,00

La figure V-1 décrit les deux cinétiques obtenues. Chaque mélange est arrêté après 1, 2, 4 et 8 minutes d'agitation. Dix prélèvements d'environ 140 mg de poudre sont effectués à chaque temps à l'aide de la canne apicale, correspondant à cinq endroits distincts au sein de la cuve et à deux profondeurs différentes. Ces échantillons sont placés dans des tubes d'une capacité de 50 ml afin de réaliser l'extraction et la dilution nécessaires à la préparation des solutions à doser. L'homogénéité est déterminée en analysant les coefficients de variation (CV %) obtenus à partir des teneurs en principe actif des différents échantillons. On considère que le mélange est homogène lorsque les valeurs de CV sont inférieures à 5%.

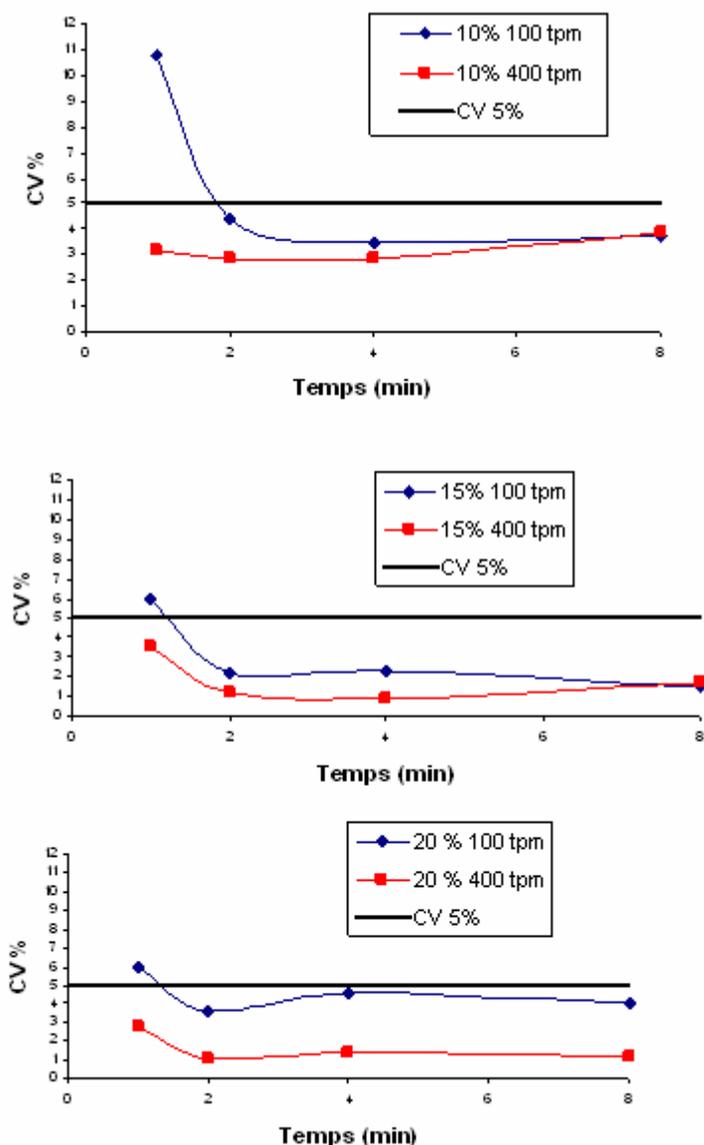


Figure V-1 : Cinétique d'un mélange à 10, 15 et 20% de diltiazem HCl à 100 et 400 Tours/min

Le temps nécessaire à l'obtention du point de fin de mélange est beaucoup plus court que dans le cas du mélange binaire, ce qui peut s'expliquer par les différences de concentrations en matière active (Kornchankul et al., 2002). En

effet, lorsque la concentration en principe actif est plus importante, le temps nécessaire pour obtenir un mélange homogène est généralement plus court. Nous avons fait de même avec les mélanges à 15 et 20 % en concentration en matière active comme le montrent la figure V-1.

Quand on compare les profils obtenus à 100 et 400 tpm, on observe que les valeurs de CV de la teneur en diltiazem HCl sont plus faibles avec les poudres mélangées à 400 tpm par rapport aux poudres mélangées à 100 tpm. On peut également constater que les valeurs de CV semblent diminuer quand la concentration en matière active augmente pour les poudres mélangées à 400 tpm.

Cette différence pourrait s'expliquer par la formation d'agglomérats dans le mélange à 20%. Cependant l'homogénéité est atteinte ($CV < 5\%$) à partir de 2 minutes d'agitation même à 100 tpm.

Cette étude préliminaire sur les poudres renfermant 10 et 20% de diltiazem HCl a permis de constater que les mélanges étaient homogènes après un temps assez court quand on applique une vitesse d'agitation de 100 ou de 400 tpm et que l'état d'homogénéité semble stable dans la plage des durées d'agitation comprises entre 2 et 8 minutes.

A la lumière de ces résultats, une durée de mélange ne dépassant pas 5 minutes sera utilisée lors de l'étude du suivi en ligne de l'homogénéité des poudres à base de diltiazem HCl.

V.4.2 Suivi de la cinétique de mélange par la spectrophotométrie PIR

V.4.2.1 Méthodes

Un mélange de 2,5 kg, dont la composition finale est décrite dans le tableau V-3, est réalisé au sein de la cuve du mélangeur Grai[®] 10. La sonde fixée à la cuve du mélangeur enregistre un spectre toutes les 4 secondes, soit 15 spectres par minute. Chaque spectre est la moyenne de 16 mesures. La résolution est de 8 cm⁻¹ et les spectres sont enregistrés sur l'ensemble des nombres d'onde allant de 12000 à 4500 cm⁻¹.

Tableau V-3: Composition des mélanges étudiés

Constituants	Quantité (g)		
	diltiazem HCl	250,00	375,00
Lactose monohydrate (Lactose DCL 15)	1718,75	1593,75	1468,75
Cellulose microcristalline (Avicel PH-102)	500,00	500,00	500,00
Oxyde de Silice Colloïdale anhydre	6,25	6,25	6,25
Stéarate de Magnésium	25,00	25,00	25,00

La durée du mélange est de 5 minutes. Au total, on enregistre donc 75 spectres au cours d'un mélange. L'homogénéité de mélange est déterminée grâce à l'indice de conformité, comme présenté au chapitre IV, qui compare les spectres à des spectres de référence enregistrés sur un mélange homogène.

Après l'enregistrement des 75 spectres, 10 prélèvements sont réalisés à l'aide de la sonde apicale afin de confirmer l'homogénéité du mélange par spectrophotométrie UV-Visible.

A chaque lot, la cinétique de mélange est étudiée avant l'ajout du stéarate de magnésium.

V.4.2.2 Analyse des spectres des matières premières et du mélange

Nous avons relié les structures chimiques des différents constituants du mélange à leur spectre Proche Infrarouge. Le spectre de la silice colloïdale anhydre n'est pas présenté car d'une part, elle est présente en faible quantité dans le mélange et d'autre part, comme il s'agit d'une substance d'origine minérale, elle influence très peu le spectre du mélange final. Le stéarate de magnésium n'étant pas présent dans la poudre pendant l'étude de la cinétique de mélange par spectroscopie PIR son spectre n'est pas décrit. Les figures V-2, V-3 et V-4 représentent les spectres respectifs du diltiazem HCl, du lactose et de la cellulose microcristalline. Ces spectres sont constitués essentiellement des harmoniques de bandes fondamentales des groupements constitutifs des différentes molécules ainsi que des bandes de combinaison.

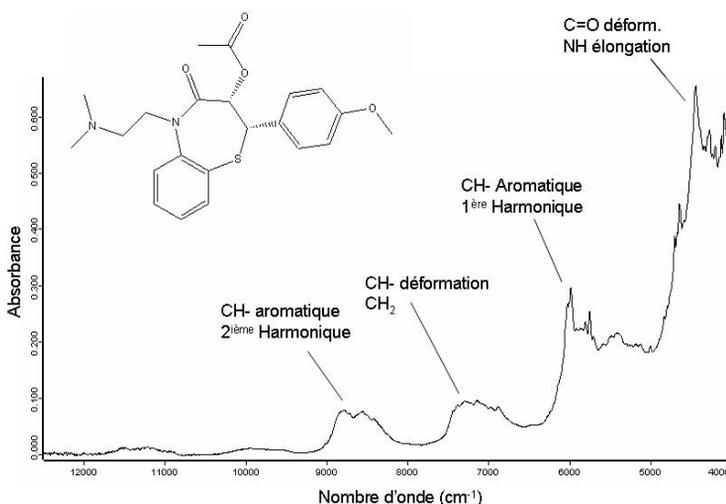


Figure V-2 : Spectre PIR du diltiazem HCl et ses principales bandes d'absorption

Pour ce qui du diltiazem HCl, ce sont principalement les liaisons CH- qui influencent le spectre PIR, en particulier celles dans le noyau aromatique.

En ce qui concerne le spectre du lactose, les groupements OH- sont bien représentés.

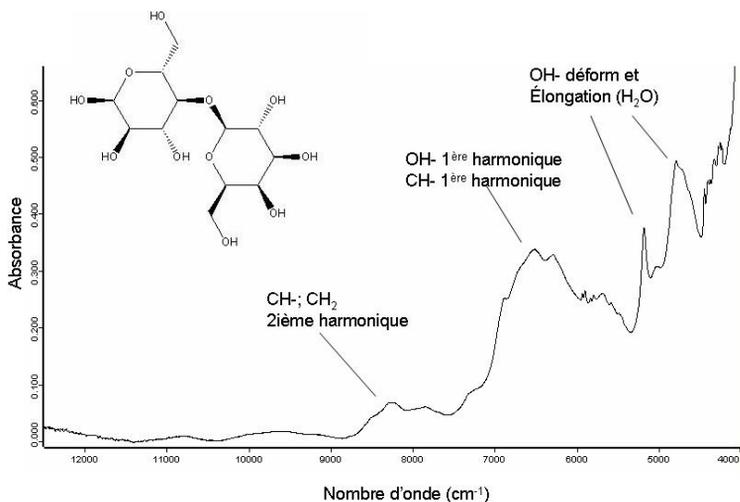


Figure V-3 : Spectre PIR du lactose monohydrate et ses principales bandes d'absorption

Pour la cellulose microcristalline, tout comme pour le lactose on retrouve un pic important dû aux groupements O-H aux alentours de 6500 cm^{-1} .

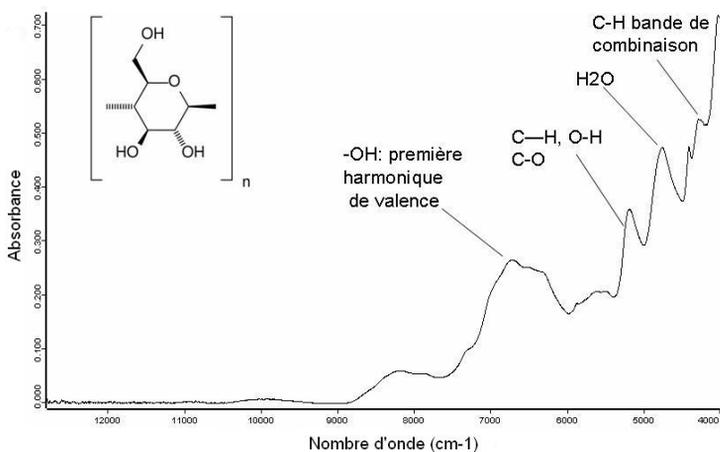


Figure V-4 : Spectre PIR de la cellulose microcristalline

Pour illustrer cette méthode d'analyse, nous avons présenté les 75 spectres pris au cours du mélange correspondant à l'expérience numéro 1 dans le tableau V-5. Dans l'ensemble de spectres, montré à la figure V-7, nous avons mis en évidence les spectres du début et de fin de mélange afin de faciliter la compréhension de cette méthode d'analyse.

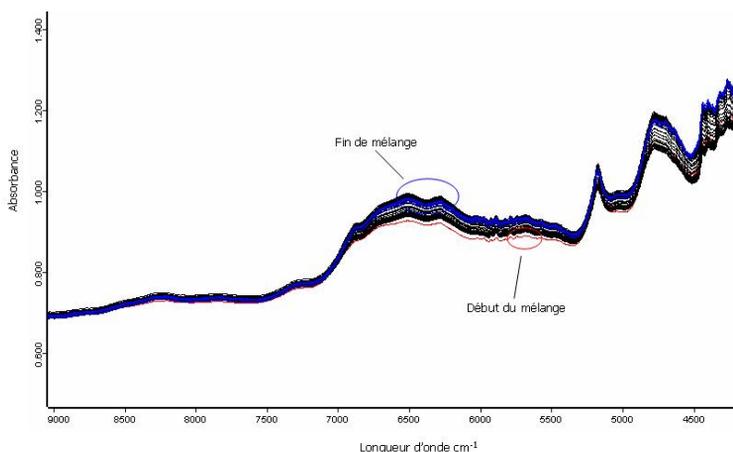


Figure V-5 : Spectres pris au cours du mélange renfermant 10% en diltiazem HCl à 100 tours par minute

L'analyse de cette cinétique de mélange a été effectuée en utilisant l'indice de conformité, comme présenté sur la figure V-6. On voit que la poudre devient homogène après moins de 3 minutes de mélange. En effet, il a été mis en évidence que les valeurs de CI deviennent inférieures à 3 à partir du 42^{ème} spectre. Ce temps de 168 secondes sera considéré comme le point de fin de mélange.

Au cours de notre étude, nous avons choisi ce temps de fin de mélange comme réponse afin d'évaluer l'effet de différents paramètres sur la cinétique de mélange. Contrairement à ce qui avait été réalisé dans le cas du mélange binaire, aucun lissage de courbe n'est opéré lors de ces analyses. En effet, le nombre de spectres enregistrés au cours du mélange à base de diltiazem étant inférieur à celui du mélange binaire, il est plus aisé d'identifier le point de fin de mélange.

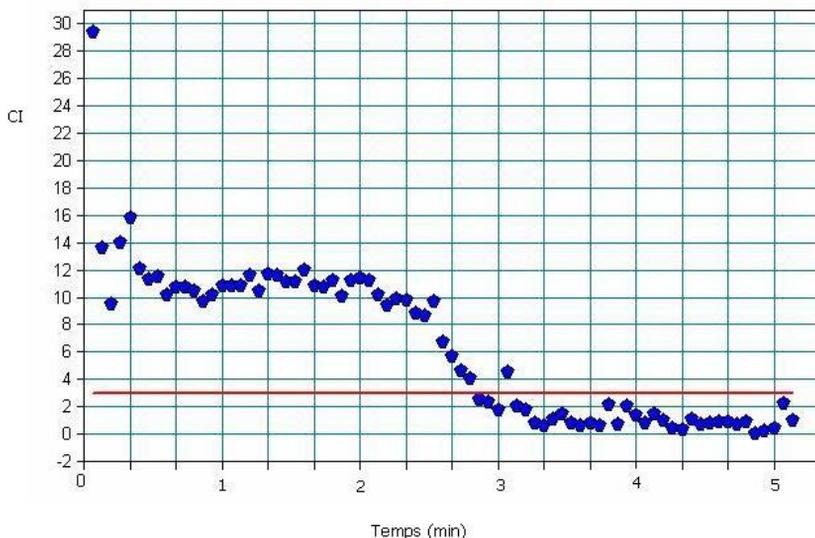


Figure V-6 : Cinétique du mélange renfermant 10% de diltiazem HCl à 100 tours par minute.
 Les points bleus représentent les différents spectres enregistrés au cours du mélange.

V.4.2.3 Etude de l'influence de la vitesse d'agitation et de la concentration en principe actif sur le point de fin de mélange

Deux grandes variables quantitatives ont été étudiées : la vitesse d'agitation et la concentration en principe actif. Le tableau V-4 mentionne les différentes valeurs de ces variables.

Tableau V-4: Variables quantitatives étudiées

Variables	Unités	Limites
Concentration en PA	% (m/m)	10 à 20
Vitesse d'agitation	Tours par minute	100 à 400

Nous avons également étudié l'importance des prétraitements mathématiques appliqués aux spectres avant leur analyse. En effet, la nature du prétraitement

peut influencer les résultats obtenus. C'est pourquoi nous avons voulu comparer différentes conditions d'analyse des spectres.

Pour cela, nous avons choisi 4 conditions différentes :

- L'analyse des spectres sans prétraitement
- L'analyse des spectres après normalisation vectorielle
- L'analyse des spectres après première dérivation
- L'analyse des spectres après normalisation vectorielle et première dérivation.

L'objectif a été de comprendre l'influence que ces prétraitements mathématiques peuvent avoir sur la réponse. Les prétraitements mathématiques appliqués aux spectres sont souvent utilisés pour éviter l'existence de bruits aléatoires ou des déformations de la ligne de base, permettant ainsi d'améliorer la qualité du signal (Bertrand, 2002).

V.5 Résultats et discussion

Le tableau V-5 présente les différentes expériences réalisées ainsi que les temps de mélange exprimés en secondes correspondant à l'état d'homogénéité. Ces temps exprimés en secondes correspondent au moment où, durant le mélange, les valeurs de CI deviennent égales ou inférieures à 3. Les poudres ont été mélangées pendant 5 minutes. A la fin du mélange, des prélèvements sont effectués à l'aide de la canne apicale pour confirmer l'homogénéité par la méthode de référence.

Tableau V-5: Résultats du plan d'expériences relatif à l'étude de l'homogénéité du diltiazem HCl. Les temps sont exprimés en secondes et sont donnés pour chaque prétraitement mathématique.

Expérience (N°)	diltiazem HCl (%)	Vitesse (tpm)	Sans Prétraitement	Normalisation Vectorielle (VN)	1 ^{ère} dérivée	VN + 1 ^{ère} dérivée
1	10	100	168	240	240	200
2	15	100	120	180	200	200
3	10	400	160	220	180	160
4	20	300	60	100	100	100
5	20	200	160	160	160	160
6	15	300	60	80	80	80
7	10	200	120	180	180	160
8	15	400	120	60	60	60
9	20	400	220	60	52	60
10	15	200	180	100	60	120
11	20	100	140	220	220	220
12	10	300	160	140	180	120

Pour l'analyse de ces données, le modèle de la régression linéaire multiple a été utilisé. Celui-ci consiste à relier la variable dépendante Y (*temps de mélange*) à plusieurs variables X dites explicatives.

L'équation du modèle obtenu avec ces résultats est la suivante :

$$\text{Temps de mélange} = 178,5 - 0,13 V - 15,24 C - 4,31 T + 0,004 V^2 - 0,01 VC - 0,006 ST + 0,52 C^2 + 0,44 CT - 0,46 T^2$$

Eq V-1

Dans cette équation,

V représente la vitesse d'agitation

C la concentration en principe actif

T le traitement mathématique appliqué aux spectres

Lorsqu'on examine les résultats obtenus sans appliquer un prétraitement mathématique des spectres (4^{ème} colonne du tableau V-4), on constate qu'il existe une faible corrélation entre la réponse, c'est-à-dire le temps de mélange nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène, et la vitesse d'agitation ainsi que la concentration en diltiazem HCl. En effet, la valeur du coefficient de corrélation du modèle n'est que de 72%.

Par contre, après avoir appliqué un prétraitement mathématique aux spectres, on constate que le coefficient de corrélation du modèle augmente de manière significative pour atteindre la valeur de 92,40%. L'erreur résiduelle de ce modèle est de 4,88 %.

Nous avons également réalisé un test d'analyse de variance afin d'évaluer la significativité des différents paramètres. Le tableau V-6 montre qu'il n'y a pas d'influence significative du prétraitement effectué (p -valeur > 0,05) contrairement à la vitesse d'agitation et à la concentration en principe actif. De plus, les résultats montrent qu'il n'existe pas d'interactions significatives dès que le paramètre traitement entre en jeu.

Tableau V-6 : Etude de l'influence des différents facteurs étudiés sur le temps nécessaire à l'obtention du point de fin de mélange. Les paramètres significatifs sont présentés en rouge ($p < 0,05$).

Paramètres	P-valeur
Vitesse (tpm)	<0,0001
Concentration en diltiazem HCl (%)	<0,0001
Prétraitement	0,3054
Vitesse*Vitesse	<0,0001
Vitesse*Concentration	<0,0001
Vitesse*Prétraitement	0,5184
Concentration*Concentration	<0,0001
Concentration*Prétraitement	0,0846
Prétraitement*Prétraitement	0,7926

En résumé, le prétraitement mathématique des spectres est indispensable mais la nature de celui-ci n'influence pas significativement la réponse obtenue.

Dès lors, pour la suite nous avons considéré les résultats obtenus après prétraitement mathématique des spectres.

La figure V-7 représente la projection du modèle dans l'espace. La surface en rouge représente les conditions pour lesquelles le temps nécessaire pour atteindre un mélange homogène est le plus court.

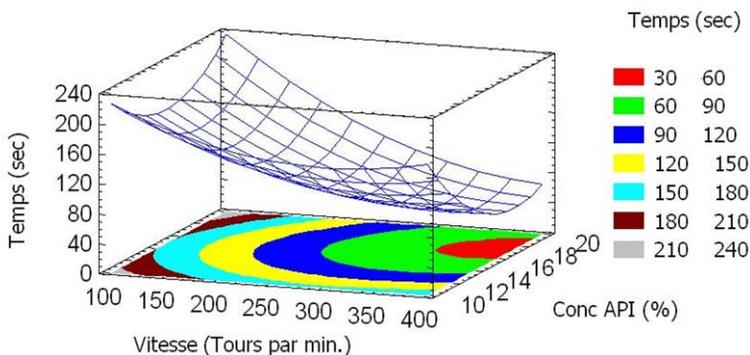


Figure V-7 : Surface de réponse du modèle représentant l'étude de l'homogénéité de mélange à base de diltiazem HCl

La figure V-8 représente les effets principaux obtenus avec le modèle sélectionné :

1. On peut constater que le temps de mélange diminue avec la vitesse jusqu'à l'obtention d'une valeur plafond (environ 380 tours/minute) pour laquelle l'influence de la vitesse sur le temps de mélange devient constante. Ceci confirme les résultats de l'étude préliminaire obtenus à l'aide de la méthode de référence, qui montraient que les mélanges réalisés à 400 tours par minute étaient plus rapidement homogènes que ceux réalisés à 100 tours par minute.
2. En ce qui concerne la concentration en principe actif, on constate d'abord une diminution du temps de mélange nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène, et ensuite, une augmentation de ce temps

au-delà d'une certaine valeur (environ 17%). Nous avons pu expliquer ce phénomène par l'apparition d'agglomérats dans la cuve du mélangeur quand la concentration en principe actif augmente. Ceci pourrait aussi expliquer l'allure du graphique de la figure V-1 : le mélange à 20% en diltiazem réalisé à 100 tours par minute semble moins homogène que celui réalisé à 400 tours par minute vitesse à laquelle le mélangeur permet de dissocier les agglomérats.

3. En ce qui concerne les prétraitements mathématiques appliqués aux spectres, on peut constater que la nature du prétraitement n'exerce pas d'influence significative sur les résultats.

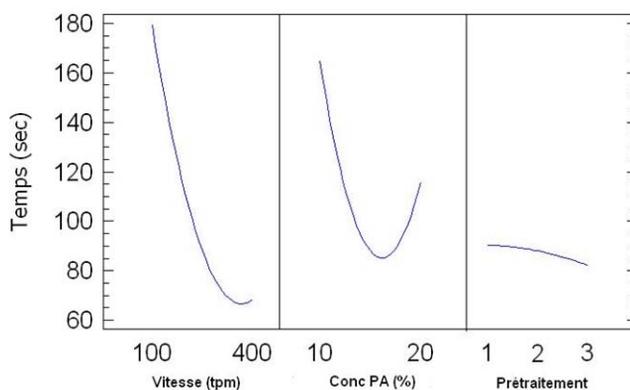


Figure V-8 : Représentation des effets des principaux paramètres sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène

Nous avons optimisé les conditions opératoires grâce au modèle obtenu. Le tableau V-7 présente les conditions optimales définies par le modèle. L'objectif poursuivi est d'obtenir un mélange homogène en un laps de temps le plus court possible.

Tableau V-7 : Représentation des conditions optimales définies par le modèle

Paramètres	Valeurs optimales
Vitesse (Tours par min.)	400
Concentration en principe actif (%)	17,2
Prétraitement	1 à 3

Dans ces conditions, l'homogénéité devrait être atteinte après 50 secondes. La figure V-9 représente la cinétique de mélanges réalisés dans les conditions optimales. Nous pouvons constater que l'homogénéité est très rapidement atteinte.

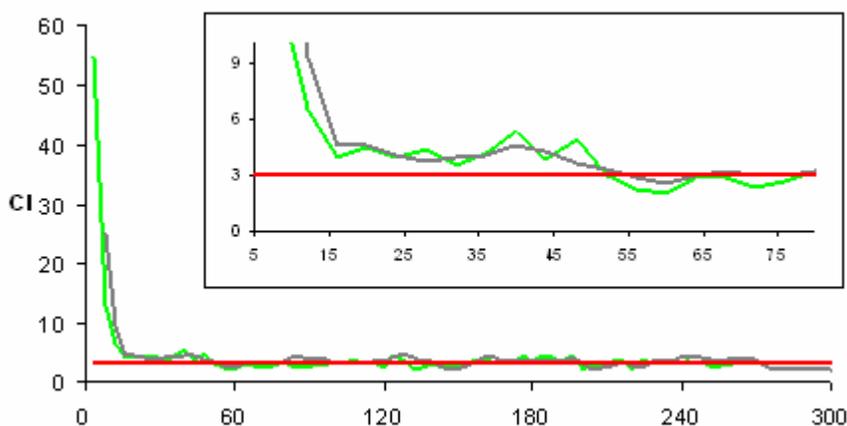


Figure V-9 : Représentation de la cinétique de mélange obtenue en appliquant les conditions optimales (n=2)

Afin de confirmer ces résultats, un troisième mélange a été analysé par la technique traditionnelle de prélèvements. Nous avons prélevé 10 échantillons à la canne apicale après 50 secondes de mélange afin de confirmer l'état d'homogénéité attendu. Le tableau V-8 nous présente les résultats des dosages obtenus sur ces différents échantillons. Comme, le coefficient de variation des teneurs en principe actif est inférieur à 5%, on peut conclure que l'homogénéité est atteinte.

Tableau V-8 : Dosage des échantillons prélevés sur les mélanges réalisés dans les conditions optimales

Echantillons	Masse échantillon (mg)	API (mg)	PA (%)
1	110,5	19,02	17,21
2	118,4	20,23	17,09
3	111,2	18,75	16,86
4	117,4	20,60	17,55
5	119,1	21,25	17,84
6	115,9	20,54	17,72
7	125,2	21,46	17,14
8	128,8	21,87	16,98
9	110,5	19,18	17,36
10	97,1	16,91	17,41
Moyenne		19,98	17,31
Ecart-type		1,51	0,32
CV (%)			1,84

V.6 Conclusions

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons démontré que la spectroscopie PIR pouvait également être utilisée dans le cas de mélanges renfermant plus de deux composants. Nous avons étudié la cinétique d'un mélange pour compression directe à base de diltiazem HCl. En particulier, nous nous sommes intéressés à différents paramètres susceptibles d'influencer la cinétique de ce mélange.

Pour ce modèle, la vitesse est apparue comme un paramètre important sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. Il apparaît cependant que l'effet de celle-ci se stabilise au delà d'un certain niveau (380 tours par minute).

Nous avons également montré que la concentration en diltiazem HCl jouait un rôle significatif nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. A nouveau, nous avons constaté une certaine diminution du temps nécessaire à l'obtention de valeurs de $Cl \leq 3$ lorsque la concentration en principe actif

augmente avec un seuil limite à partir duquel la relation s'inverse. Nous avons expliqué ce phénomène par la formation d'agglomérats perceptibles au sein de la poudre de la cuve du mélangeur.

De plus, nous avons évalué l'effet du prétraitement mathématique des spectres sur la réponse obtenue. Nous avons constaté qu'il est indispensable d'effectuer un prétraitement mathématique et que la nature de celui-ci, parmi ceux que nous avons sélectionnés, n'influence pas la réponse.

Enfin, des conditions optimales ont été définies. Nous avons vérifié ces conditions optimales par la technique PIR et par la méthode conventionnelle des prélèvements à la canne apicale.

V.7 Applications de la spectrophotométrie PIR au dosage des comprimés à base de diltiazem HCl

V.7.1 Introduction

Une méthode de dosage du diltiazem HCL dans des comprimés a également été développée en utilisant la spectrophotométrie PIR par transmission.

La technique PIR a été validée puis comparée à la technique conventionnelle UV-Visible de manière à démontrer que la nouvelle méthode de dosage est apte à remplacer la technique de dosage conventionnelle. Parallèlement à la validation de la méthode de dosage, nous avons tenté de valider le procédé de production des comprimés à base de diltiazem HCl. L'idée est d'utiliser l'analyse PIR comme une technique supplémentaire de contrôle du procédé de fabrication. L'objectif étant de se servir de cet outil comme d'un système permettant la libération en temps réel d'un lot. Ce concept a été envisagé par Skibsted qui a publié une approche théorique à ce sujet (Skibsted et al., 2006; Skibsted et al., 2007). En effet, si un problème se produit entre le mélange et

la fabrication des comprimés, l'analyse PIR permettra de le détecter et ceci en un temps très court. La validation du procédé de fabrication consiste à démontrer que ce procédé est robuste, sous contrôle et qu'il permet d'obtenir des lots de qualité reproductible.

V.7.2 Validation de la méthode de dosage du diltiazem HCl dans des comprimés

V.7.2.1 Matériel et méthodes

Trois types de comprimés se différenciant uniquement par la quantité de substance active ont été réalisés à l'aide d'une presse rotative RO2 (Courtoy[®], Halle, Belgique). Des comprimés renfermant respectivement 7, 14 et 21 mg en diltiazem HCl ont été sélectionnés au hasard parmi les différents lots produits. La masse des comprimés a été fixée approximativement à 140 mg pour chaque concentration. La force de compression a été maintenue constante au cours des différentes productions de manière à obtenir des comprimés dont la résistance à la rupture est de ± 90 N.

Ces comprimés ont été analysés à l'aide du spectrophotomètre PIR MPA[®] (BrukerOptics, Belgique) en mode transmission. Trente-deux mesures ont été effectuées sur chaque comprimé avec une résolution de 8 cm^{-1} , chaque spectre correspondant à la moyenne de ces 32 mesures. La validation a été réalisée sur trois jours. Neuf échantillons ont été dosés pour chaque niveau de concentration (B.Boulanger et al., 2003; Ph.Hubert et al., 2004).

Parallèlement, une validation de la méthode de référence UV a également été réalisée selon le même protocole. Les échantillons analysés par la méthode de référence ont été préparés comme décrit au chapitre V.3.1.2.

V.7.2.2 Résultats et discussions

La première étape a consisté à calibrer le spectrophotomètre PIR. Dans ce but, 120 échantillons ont été prélevés au hasard dans les différents niveaux de concentration (40 échantillons pour chaque niveau de concentration).

Un modèle linéaire a été construit en utilisant les spectres enregistrés sur les différents comprimés sélectionnés. La figure V-10 montre les spectres mesurés au cours de cette calibration après normalisation vectorielle (NV) pour les nombres d'onde allant de 10200 à 7000 cm^{-1} . En dessous de 7000 cm^{-1} , il devient très difficile de trouver une information exploitable au sein de ces spectres en raison du faible rapport signal/bruit au niveau du détecteur (Gottfries et al., 1996; Ramirez et al., 2001).

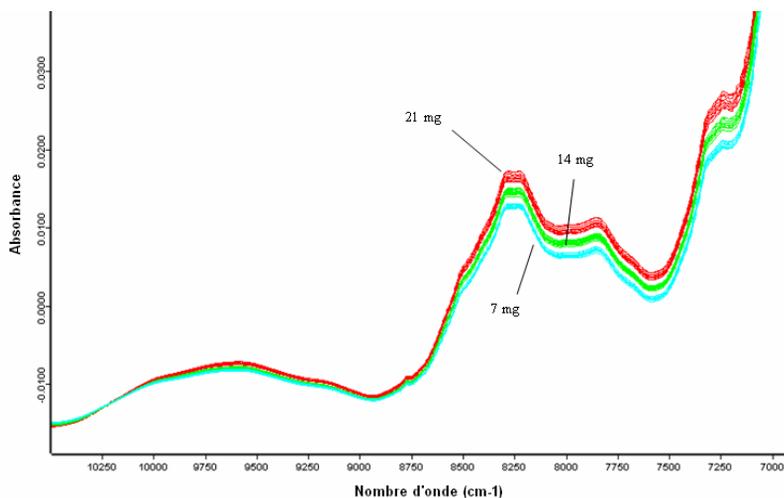


Figure V-10 : Spectres des comprimés de diltiazem HCl mesurés en transmission après NV

Pour la construction du modèle, la régression des moindres carrés (PLS regression) a été utilisée. Un nombre de 3 termes a été utilisé pour l'élaboration du modèle PLS qui donne un R^2 de 99,8%. Pour la construction de ce modèle, nous avons utilisé la validation croisée. Chaque échantillon est écarté à tour de rôle et un modèle est élaboré avec les individus restants. Le

modèle présente une valeur de RSEP de 0,22%. La figure V-11 illustre la relation linéaire entre les quantités en PA mesurées par spectrophotométrie UV et par PIR.

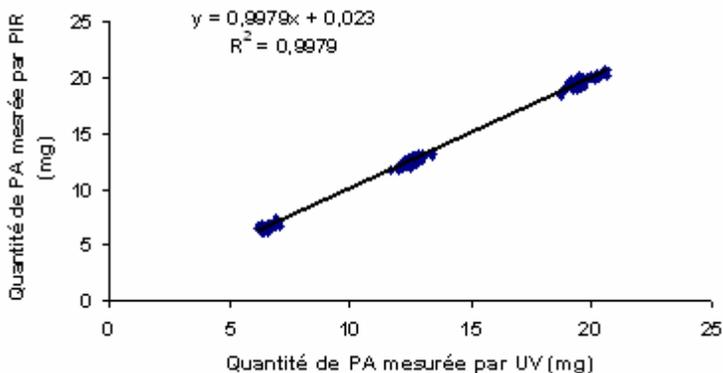


Figure V-11 : Régression PLS permettant la calibration du spectromètre PIR

Les résultats des deux validations sont présentés dans le tableau V-9. Les critères de validation étudiés sont ceux couramment utilisés tels que l'exactitude (justesse et fidélité intermédiaire), la répétabilité, la linéarité et les limites de quantification (Ph.Hubert et al., 2004).

L'exactitude correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus par une méthode de dosage et les valeurs théoriques (ICH, 2005).

Tableau V-9 : Résultats de la validation de la méthode de dosage du diltiazem HCl par spectrophotométrie PIR et par la méthode de référence UV

Paramètres	Niveau de concentration Quantité PA (mg)	UV méthode de référence	Spectroscopie PIR
Justesse (rendement%)	7	97,8	101,3
	14	99,5	99,4
	21	98,9	99,3
Répétabilité (CV%)	7	2,3	2,7
	14	0,6	1,4
	21	1,9	1,3
Fidélité Intermédiaire (CV %)	7	2,3	2,7
	14	0,95	1,4
	21	1,97	1,3
Linéarité	Intercept	-0,076	0,19
	Pente	0,9945	0,9831
	R²	0,998	0,998
Limites de quantification (mg)	Inférieures	6,98	6,97
	Supérieures	21,62	21,62

La figure V-12 montre les profils d'exactitude des deux méthodes de dosage. Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 10\%$, car nous avons estimé que chaque dosage répondait aux conditions de la détermination de teneur des préparations unidoses dont les limites sont fixées à $\pm 15\%$ par rapport à la teneur moyenne (Pharmacopée Européenne, 2005). En effet, ce sont les teneurs individuelles de substance active dans chaque comprimé qui sont mesurées par les deux techniques. Sur ces graphiques, la ligne continue représente le biais relatif, la ligne en pointillés (noir) représente les limites d'acceptation tandis que la ligne discontinue (bleu) correspond aux limites de tolérance avec un risque α de 5%. Ces limites de tolérance définissent donc l'intervalle dans lequel la probabilité de trouver un échantillon est de 95%. On constate que les limites de tolérance pour les 2 méthodes sont incluses dans les limites d'acceptation, on peut donc conclure que les 2 méthodes

fourniront des résultats répondant au critère d'exactitude lors de leur utilisation en routine.

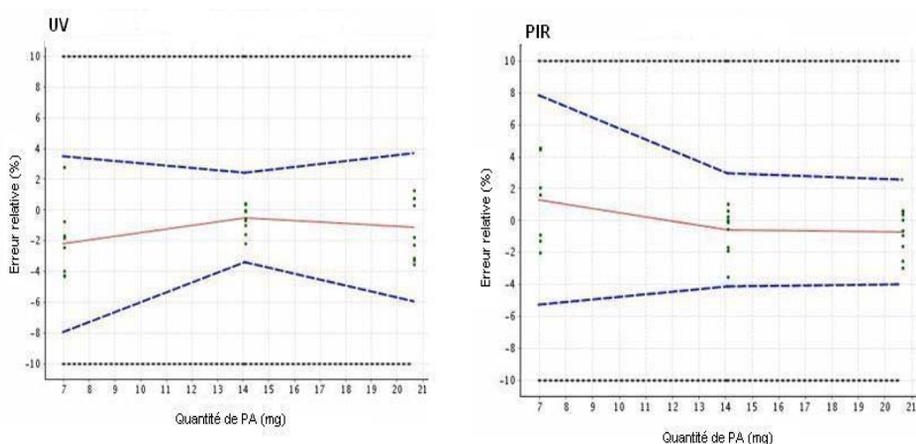


Figure V-12 : Profils d'exactitude des deux méthodes de dosage des comprimés par la méthode UV de référence et la spectroscopie PIR

A partir de ces profils d'exactitude, on a estimé le risque d'obtenir ultérieurement une valeur se trouvant en dehors des limites d'acceptation pour les deux méthodes.

La figure V-13 représente le profil de risque pour les deux techniques de dosage.

Ce profil de risque exprime, par niveau de concentration étudié, la probabilité que le résultat d'une mesure effectuée en analyse de routine puisse tomber en dehors des limites d'acceptation de $\pm 10\%$, en considérant le biais estimé ainsi que les paramètres de précision obtenus en phase de validation. Ce risque est inférieur au niveau choisi de 5%, et ceci quel que soit le niveau de concentration. Cette technique PIR peut donc être utilisée en routine de manière relativement sûre. Ce risque est plus faible pour les comprimés renfermant les 2 niveaux de concentration les plus élevés que pour les comprimés renfermant 7 mg de diltiazem HCl.

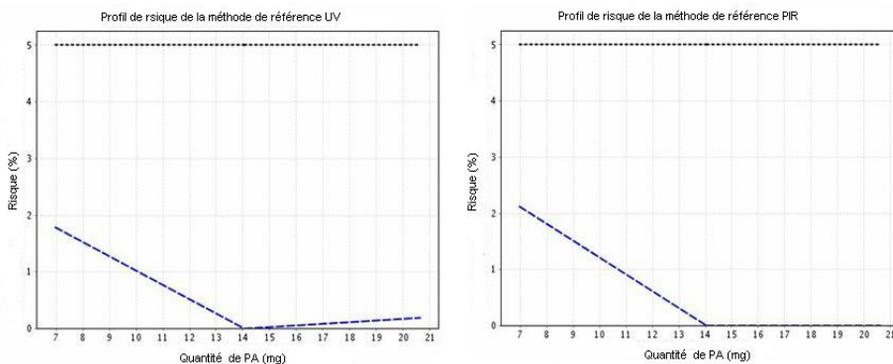


Figure V-13 : Profils de risques des deux méthodes de dosage

Sur la base de tous ces résultats, il apparaît que la méthode PIR et la méthode de référence sont validées pour des comprimés renfermant entre 7 mg à 21 mg de diltiazem HCl.

V.7.3 Comparaison de la méthode PIR et de la méthode de référence UV

Une fois les deux techniques validées, l'accord entre celles-ci a été évalué afin de savoir si la spectrophotométrie PIR pouvait remplacer en routine la méthode de référence UV.

V.7.3.1 Matériels et méthodes

Pour la comparaison des deux méthodes, l'analyse statistique de Bland et Altman a été utilisée (Bland et al., 1986). L'objectif de cette analyse est de montrer que la nouvelle méthode PIR est susceptible de remplacer la méthode de référence UV.

La méthode de Bland et Altman détermine le biais et les limites de concordance qui représentent les écarts des valeurs d'une technique par rapport à l'autre. La différence des résultats obtenus par les deux techniques

$(PIR - UV)$ est toujours exprimée en fonction de la moyenne des résultats obtenus avec chacune des deux méthodes de dosage, soit $(\frac{PIR + UV}{2})$.

V.7.3.2 Résultats et discussions

La figure V-14 représente le graphique exprimant en ordonnées la différence des teneurs en diltiazem obtenues par les deux techniques PIR et UV, soit $(PIR - UV)$, et en abscisses la moyenne des valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(\frac{PIR + UV}{2})$. L'intervalle de tolérance (TI) à 95% est déterminé pour chaque niveau à partir de la moyenne des différences de la manière suivante :

$$\bar{d} \pm 1.96ET \qquad \text{Eq. V-2}$$

avec \bar{d} la moyenne des différences pour chaque niveau de concentration
 ET l'écart-type des différences pour chaque niveau de concentration

Ces limites représentent l'aire renfermant 95% des différences.

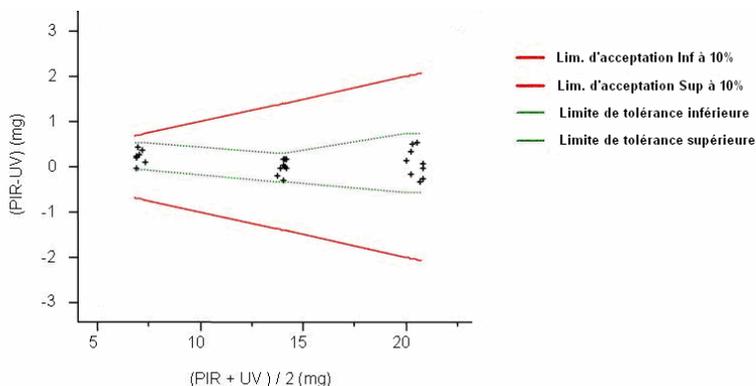


Figure V-14 : Comparaison des 2 techniques de dosage selon la méthode de Bland et Altman

On peut constater que les limites définies par l'intervalle de tolérance se situent dans les limites d'acceptation fixée à $\pm 10\%$ pour chaque niveau de concentration. Il y a donc accord entre les deux techniques. On remarque aussi une légère variation du biais en fonction de la quantité de principe actif dans les comprimés mais ceci ne diminue en rien la concordance entre les deux techniques.

Une fois la validation de la technique PIR réalisée et la concordance avec la méthode de référence démontrée, il nous est loisible d'utiliser la spectrophotométrie PIR en routine à la place de la méthode UV de référence (Grenier et al., 2000).

V.7.4 Validation du procédé de fabrication des comprimés de diltiazem HCl par PIR

V.7.4.1 Introduction

L'objectif de la dernière partie de ce chapitre était d'utiliser la spectrophotométrie PIR comme outil permettant de contrôler l'ensemble du processus de fabrication par analyse du produit fini.

Habituellement, l'uniformité de teneur est considérée comme un simple contrôle analytique et est validée en tant que tel. Nous avons voulu utiliser cet essai pour valider l'ensemble du procédé de fabrication.

Pour valider tout le procédé de fabrication, il est utile d'évaluer l'influence de celui-ci sur les résultats des dosages des comprimés et pas seulement l'influence de la technique analytique.

V.7.4.2 Matériel et méthodes

Trois lots de comprimés se différenciant par leur concentration ont été produits. Cette opération est répétée sur trois jours pour obtenir un total de neuf lots.

Les trois lots de comprimés produits chaque jour renferment respectivement 7, 14, et 21 mg de diltiazem HCl. Les comprimés ont un diamètre de 7 mm et une épaisseur de 3 mm. Ils sont réalisés à pression constante, les mesures de résistance à la rupture des 3 lots de comprimés étant respectivement de $83,2 \pm 9,1$ N ; $89,4 \pm 7,5$ N et de $92,4 \pm 5,4$ N (n=10).

Dix comprimés par lot sont ensuite sélectionnés et analysés à l'aide de la technique PIR précédemment validée. Cette opération est réalisée durant trois jours. Les résultats de ces dosages sont présentés à l'annexe 8.

V.7.4.3 Résultats et discussions

Pour les comprimés renfermant 7 mg de principe actif, les limites de tolérance totale sont équivalentes aux limites de tolérance fixées par la méthode analytique. Cela signifie qu'à ce niveau de concentration, il n'y a pas d'effet du procédé de fabrication sur les résultats obtenus.

A l'inverse, pour les niveaux supérieurs (14 et 21 mg de principe actif par comprimé), force est de constater qu'il existe une différence entre l'intervalle de tolérance donné par la méthode analytique et l'intervalle de tolérance totale, ce dernier étant plus large que l'intervalle de tolérance se rapportant à la méthode analytique. Ceci s'explique par un effet du procédé de fabrication sur les différentes mesures. Cependant, les résultats restent dans les limites d'acceptation. Le Tableau V-10 décrit en détail les limites de tolérance pour chaque niveau de concentration.

Tableau V-10: Résultats de la validation du procédé de fabrication : Analyse des différents lots produits.

Niveau de concentration (mg)	Rendement (%)	Limite de tolérance totale (%)		Limite de tolérance analytique (%)		Risque total (%)
		Supérieure	Inférieure	Supérieure	Inférieure	
7,1	103,3	108,0	98,6	108,0	98,6	0,3
14,2	101,8	107,7	95,9	105,7	97,9	0,4
21,6	97,4	102,5	92,3	100,8	94,0	0,2

Malgré le biais observé entre les trois niveaux de concentration, le procédé de production des comprimés est validé pour les comprimés renfermant de 7 à 21 mg en diltiazem HCl.

L'effet du procédé de fabrication peut être observé sur la figure V-15 pour les comprimés contenant 14 et 21 mg. Un biais important peut être observé pour les lots numéro 3 pour ces deux types de comprimés. Nous avons voulu trouver l'origine de ce biais, mais nous n'y sommes pas parvenus. Nous avons dans un premier temps pensé aux agrégats rencontrés au cours de la cinétique de mélange mais ceux-ci n'apparaissent que pour des concentrations de l'ordre de 20% et nous avons volontairement travaillé avec des comprimés renfermant des concentrations inférieures.

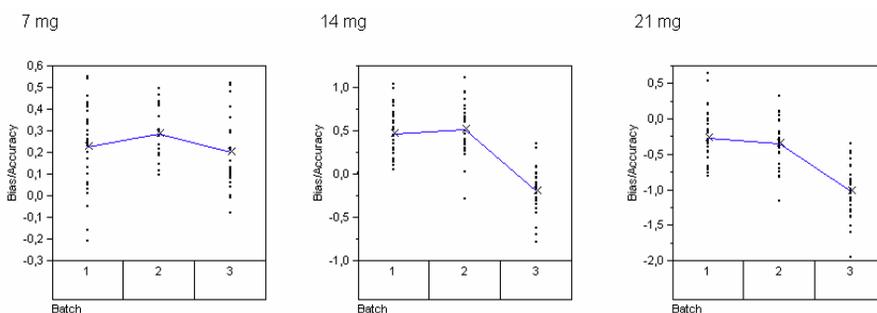


Figure V-15 : Analyse de l'effet lot sur la production des différents lots de comprimés.

Le tableau V-9 mentionne également le risque total d'obtenir un échantillon en dehors des limites de spécification. Ce risque total, considérant à la fois le

risque de la méthode analytique mais aussi le risque du procédé de fabrication, est inférieur à 5‰ pour les trois types de comprimés. Ceci garantit dans le futur une probabilité d'avoir 5 comprimés sur 1000 renfermant une quantité de principe actif située en dehors des limites d'acceptation de $\pm 10\%$. La figure V-16 représente le profil d'exactitude obtenu par l'analyse des différents lots. L'intervalle de tolérance pour un risque α de 5% se situe dans les limites d'acceptation fixées à $\pm 10\%$ démontrant ainsi la capacité du processus de fabrication à produire un produit final de qualité adéquate. Les variations «effet lot» et «effet jour» ont également été évaluées afin d'étudier les différentes sources de variabilité de production. Comme pour la validation analytique, aucun effet jour n'a été constaté.

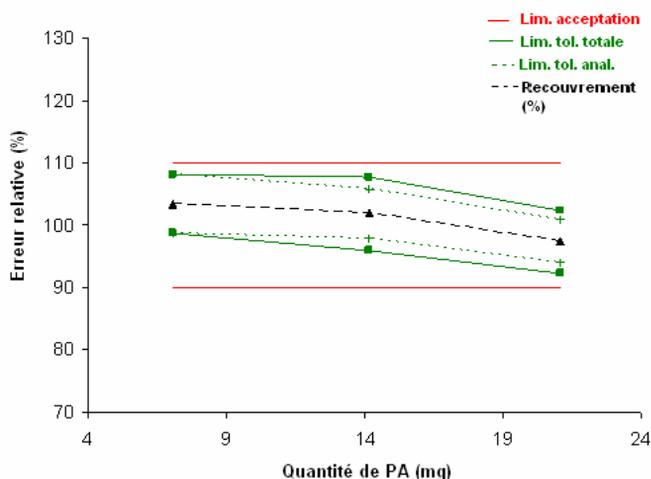


Figure V-16 : Profil d'exactitude obtenu par l'analyse des différents lots

Ensuite, afin d'augmenter la qualité des résultats, nous avons considéré chaque mesure comme étant la moyenne de 2 ou de 5 mesures afin d'étudier l'impact d'une telle opération sur les profils d'exactitude. La figure V-17 représente les profils d'exactitude obtenus. L'effet du lot est toujours présent ; en effet, la seule variabilité qui est augmentée est la répétabilité de la méthode analytique dont la variance est réduite respectivement par un facteur $\sqrt{2}$

ou $\sqrt{5}$. Dans la première situation envisagée, le risque d'avoir une mesure en dehors des limites de spécification est réduit à 1‰ tandis que dans la seconde, ce risque descend jusqu'à 0.4‰.

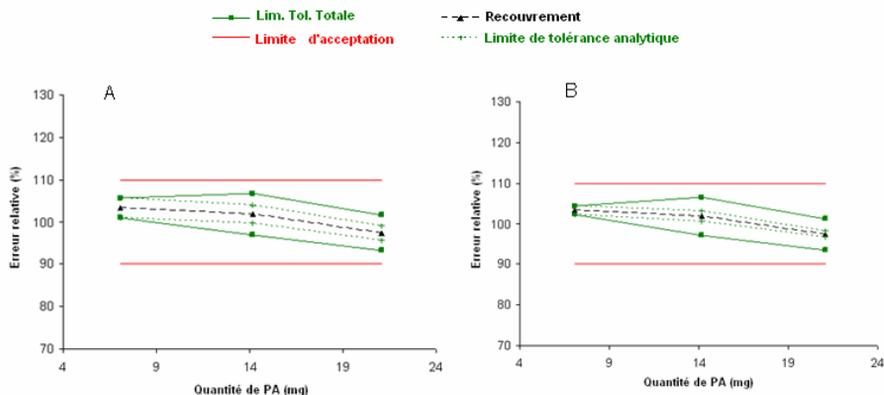


Figure V-17 : Profils d'exactitude obtenus en considérant une mesure comme étant la moyenne de deux (A) ou de cinq mesures (B)

Nous avons constaté, en effet, une diminution des limites de tolérance mais il n'est pas possible de réduire les limites d'acceptation en raison du biais toujours présent. Une possibilité serait d'augmenter le nombre d'échantillons par niveau de concentration afin d'améliorer éventuellement ces limites d'acceptation. Il n'existe cependant actuellement aucune norme décrivant le nombre d'échantillons nécessaires à la validation d'un procédé de fabrication. Au cours de cette étude, 90 échantillons (dix échantillons par lot) ont été utilisés, ce qui représente un chiffre que nous estimons suffisamment représentatif pour notre étude sachant que la taille des lots n'est que d'environ 2,5kg.

V.7.5 Conclusions

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons mis au point et validé une méthode de dosage des comprimés de diltiazem HCl rapide, non destructive et ne demandant pas de préparation d'échantillon par spectrophotométrie PIR en mode transmission. Un modèle a été établi par la régression des moindres carrés. Ce modèle a été validé et les résultats obtenus avec celui-ci ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode UV de référence. L'accord entre les deux méthodes a été démontré ce qui nous permet d'utiliser la spectrophotométrie PIR en routine à la place de la méthode de référence.

Par la suite, nous avons utilisé cette méthode pour valider le procédé de production des comprimés à base de diltiazem HCl. Dans ce but, trois lots se différenciant par leur niveau de concentration en matière active ont été fabriqués. Chaque lot a été fabriqué à trois reprises sur 3 jours distincts. Nous avons pu constater que le procédé de fabrication influençait le résultat des dosages et ceci pour les niveaux de concentration supérieurs (comprimés à 14 et 21 mg). Cependant, malgré cette influence, il nous a été possible de valider notre procédé de fabrication des comprimés. A notre connaissance, ce travail est novateur et s'inscrit parfaitement dans le concept de la technologie analytique des procédés.

V.8 Références bibliographiques

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

Bland, J. M.; Altman, D. G.; Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986, 1, 307-310.

Bolhuis, G.K.; Holzer, A.W.; Lubricant sensitivity, in Pharmaceutical powder compaction technology, Dekker Ed., New York, 1996, 517-560.

B. Boulanger; W. Dewé; P. Chiap; J. Crommen; Ph. Hubert; An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. J. Pharm. Biomed. Anal. 2003, 32 (4-5), 753-765.

Gottfries, J.; Depui, H.; Fransson, M.; Jongeneelen, M.; Josefson, M.; Langkilde, F. W.; Witte, D. T.; Vibrational spectrometry for the assessment of active substance in metoprolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 1996, 14 (11), 1495-1503.

Grenier, B.; Dubreuil, M.; Journois, D. ; Comparaison de deux méthodes de mesure d'une même grandeur: méthode de Bland et Altman. Ann. Fr. Anesth. Reanim 2000, 19, 128-135.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva 2005.

Kornchankul , W.; Hamed, E.; Parikh, N. H.; Sakr, A.; Effect of drug proportion and mixing time on the content uniformity of a low dose drug in a high shear mixer. Pharmazie 2002, 57, 49-53.

Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, *et al.* ; Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I. J Pharm Biomed. Anal. 2004, 36 (3), 579-586.

Pharmacopée Européenne 5.0 tome 1, 2.9.6 Uniformité de teneur des préparations unidoses, 2005, pp. 248-249.

Ramirez, J. L.; Bellamy, M. K.; Romanach, R. J.; A novel method for analyzing thick tablets by near infrared spectroscopy. *AAPS PharmSciTech* 2001, 2 (11), 1-10.

Skibsted, E. T. S.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; Witte, D. T.; A theoretical framework for real time release with NIR and chemometrics. *NIR news* 2006, 17 (2), 4-6.

Skibsted, E. T. S.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; Witte, D. T.; Examples of NIR based Real Time Release in Tablet Manufacturing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 43 (4), 1297-1305.

Chapitre VI

Etude de l'homogénéité d'un mélange à l'échelle industrielle

VI.1 Etude de la cinétique de mélange d'une poudre pour compaction

VI.1.1 Introduction

Après avoir étudié deux mélanges à l'échelle du développement, notre intérêt s'est porté sur l'application de la spectrophotométrie PIR dans le suivi de la cinétique de mélange à l'échelle industrielle.

Pour ce faire, des essais ont été réalisés grâce à une collaboration avec UCB Pharma afin d'évaluer le potentiel de la technique sur un mélangeur de production. L'intérêt de cette collaboration était de démontrer la faisabilité de la technique pour la détermination du point de fin de mélange avant compaction.

Au cours de cette étude, la cinétique d'addition du stéarate de magnésium par la spectroscopie PIR a également été déterminée.

VI.1.2 Matériels et Méthodes

Le mélange étudié est un mélange pour granulation par voie sèche (compaction) renfermant une molécule active en développement à une concentration de 18,5% (m/m) du mélange final et des excipients classiques pour compression.

Le mélange est réalisé dans un mélangeur Ruberg® d'une capacité de 400 litres. La sonde PIR (Series 400 Diffuse Reflectance Probe, Precision Sensing Devices, Massachusetts, USA) a été placée dans la paroi du mélangeur. La sonde est reliée par des fibres optiques au spectrophotomètre MPA® (Bruker Optics, Bruxelles, ® Belgique). Le MPA® est contrôlé par le logiciel OPUS version 5.0 (Bruker Optics, Bruxelles, Belgique) permettant l'acquisition et le traitement des spectres. Pour l'analyse statistique, le logiciel Excel 2000® (Microsoft) a été utilisé.

VI.1.2.1 Méthode de référence du dosage du principe actif

Une méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC) a également été mise au point et validée chez UCB Pharma de manière à comparer les résultats obtenus avec la spectroscopie PIR aux résultats obtenus par la méthode traditionnelle de dosage (HPLC). Cette méthode HPLC a permis de doser les échantillons prélevés au sein du mélangeur. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'une canne apicale calibrée de manière à collecter des échantillons dont la masse peut être équivalente à une à trois fois la masse du produit fini.

VI.1.2.2 Suivi de la cinétique de mélange par la spectrophotométrie PIR

VI.1.2.2.1 Méthodes

Environ 150 kg de poudre ont été placés dans la cuve du mélangeur Ruberg® (figure VI-1). Le mélange a été réalisé durant 20 minutes avant l'ajout du stéarate de magnésium, ce qui a permis l'enregistrement d'un total de 300 spectres (15 spectres par minute, chaque spectre étant la moyenne de 16 mesures).

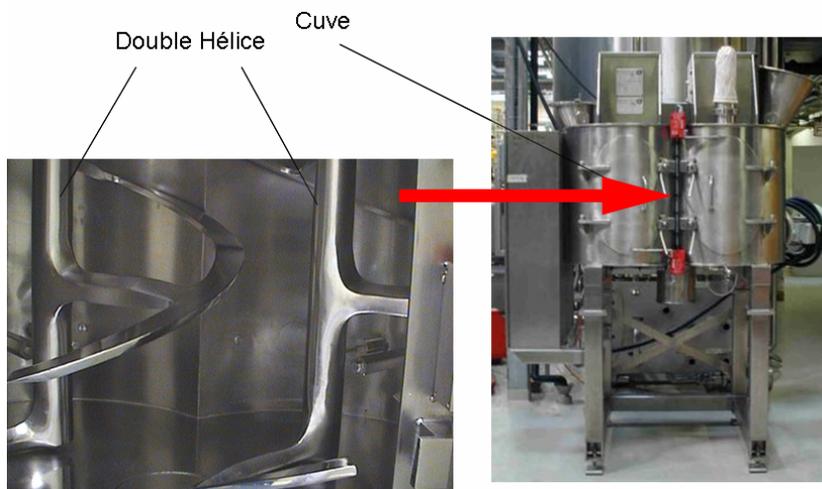


Figure VI-1 : Photographie du mélangeur Ruberg®

Vu leur nombre important et afin de simplifier l'étude de ces spectres, nous avons travaillé sur les moyennes de ceux-ci. Dans un premier temps, nous avons déterminé les moyennes de 10 spectres à différents temps de mélange (environ tous les 50 spectres) afin d'avoir une première approximation du temps, en secondes, correspondant au point de fin de mélange. Le tableau VI-1 présente les différentes moyennes préalablement étudiées de manière à simplifier l'ensemble des données.

Tableau VI-1: Détermination des différentes moyennes préalablement étudiées pour obtenir une première approximation du point de fin de mélange

Moyennes	Spectres	Temps (sec)
Moyenne 1	1 à 10	4 à 40
Moyenne 2	51 à 60	204 à 240
Moyenne 3	101 à 110	404 à 440
Moyenne 4	121 à 130	484 à 520
Moyenne 5	151 à 160	604 à 640
Moyenne 6	171 à 180	684 à 720
Moyenne 7	201 à 210	804 à 840
Moyenne 8	251 à 260	1004 à 1040
Moyenne 9	291 à 300	1164 à 1200

VI.1.2.2.2 Résultats et discussions

Le tableau VI-2 mentionne les valeurs d'indice de conformité des différentes moyennes. L'indice de conformité a été la mesure utilisée pour comparer les spectres inconnus à des spectres de référence correspondant au mélange homogène.

Les résultats présentés dans le tableau VI-2 nous permettent de constater que l'homogénéité semble atteinte à partir du spectre 170 ce qui correspond à un temps de mélange de l'ordre de 12 minutes. En effet, les valeurs de CI deviennent inférieures à 3, limite à partir de laquelle on peut considérer que la différence entre les spectres enregistrés au cours du mélange et les spectres de référence pris sur un mélange homogène est non significative.

Tableau VI-2 : Valeurs des indices de conformité des différentes moyennes préalablement étudiées pour obtenir une première approximation du point de fin de mélange

Moyennes	Indices de conformité
Moyenne 1	9,32
Moyenne 2	5,93
Moyenne 3	5,27
Moyenne 4	3,82
Moyenne 5	3,38
Moyenne 6	2,54
Moyenne 7	2,44
Moyenne 8	1,22
Moyenne 9	0,40

Dans l'étape suivante, nous avons augmenté le nombre de spectres dans notre modèle afin de mieux cerner le moment où l'état d'homogénéité est atteint. Nous avons déterminé une moyenne tous les 5 spectres. Cela revient à réduire les 300 spectres de départ en 60 données spectrales. La cinétique de mélange obtenue avec ces différentes moyennes est présentée à la figure VI-2. On peut également constater que le point de fin de mélange est atteint entre 12 et 13 minutes de mélange.

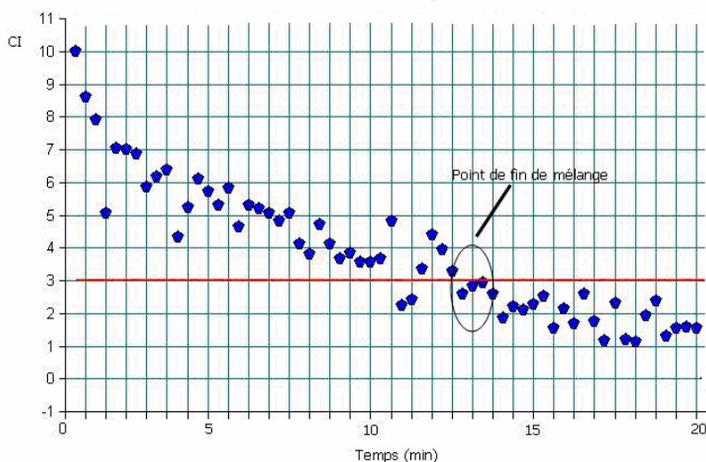


Figure VI-2 : cinétique du mélange après simplification des données spectrales

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse HPLC de prélèvements réalisés après 15 minutes de mélange au sein de la cuve du mélangeur comme le montre les résultats mentionnés dans le tableau VI-3.

Tableau VI-3 : Résultats des dosages HPLC des prélèvements réalisés à la canne apicale au sein du mélangeur Ruberg® après 15 minutes de mélange

Prélèvements	Poids (mg)	UCB 34714 (%)
1	422.33	98,21
2	349.50	90,09
3	488.70	96,76
4	404.80	98,24
5	342.60	98,61
6	198,10	94,04
7	237,50	100,13
8	335,70	99,83
9	165,50	102,58
10	397,0	99,81
Moyenne (mg)	334,17	97,82
Max. (mg)	488,7	102,58
Min. (mg)	165,5	90,09
CV (%)	31,1	3,6

VI.1.3 Conclusions

L'objectif de cette brève étude consiste à évaluer la faisabilité de l'utilisation de la spectroscopie PIR dans l'étude de l'homogénéité de mélange à l'échelle industrielle. Dans le cas du mélange étudié, il peut être conclu que la technique semble applicable vu la concordance entre les résultats obtenus avec cette dernière et ceux obtenus par la méthode de référence HPLC.

Cependant, afin de réaliser une validation approfondie, plusieurs lots de mélanges devraient être analysés. Vu le coût et les difficultés d'organisation d'une telle validation, un seul essai a été réalisé et il faut donc se garder de tirer des conclusions trop hâtives à partir des résultats obtenus.

Il serait également intéressant de multiplier le nombre de points de mesure lorsque l'on travaille avec des cuves de grande capacité. On pourrait ainsi effectuer une comparaison entre les spectres enregistrés par un minimum de deux sondes distinctes situées à différents endroits de la cuve. Ceci permettrait d'obtenir une image de la qualité du mélange dans l'ensemble de la cuve et également, de contrôler l'homogénéité du mélange au niveau de zones mortes, en général difficiles d'accès.

VI.2 Etude de la cinétique d'addition du Stéarate de Magnésium

VI.2.1 Introduction

Le stéarate de magnésium est le lubrifiant le plus largement utilisé dans la fabrication des comprimés. Le temps d'agitation du stéarate de magnésium est d'une grande importance (Ragnarsson et al., 1979) car il est hydrophobe et peut donc retarder la dissolution d'un principe actif lorsque le temps de mélange entre les deux est trop long (Hussain et al., 1992) ou encore être

responsable d'une diminution de la résistance mécanique du comprimé (Sheikh-Salem et al., 1981). Néanmoins, il est nécessaire d'ajouter au mélange pour compression directe une quantité minimale pendant un temps suffisant permettant une bonne répartition de ce lubrifiant afin qu'il puisse exercer son rôle (Duong et al., 2003).

Afin d'éviter tout problème de sous- ou de sur-lubrification, le suivi de la cinétique de répartition du stéarate de magnésium a été effectué par spectroscopie PIR.

VI.2.2 Matériel et Méthodes

Nous avons étudié le temps nécessaire à une répartition uniforme de stéarate de magnésium dans le mélange pour compaction. Six temps de mélange ont été comparés : 1, 2, 4, 6, 8 et 10 minutes de mélange. Les spectres ont été enregistrés au cours du temps avec une résolution de 8 cm^{-1} , chaque spectre étant la moyenne de 16 mesures. Un total de 15 spectres a été pris sur une minute de mélange.

Pour la détermination du point de fin de mélange, nous avons également utilisé l'indice de conformité.

Le stéarate de magnésium a été ajouté après le mélange des différents constituants.

La concentration en stéarate de magnésium est de 1% dans chaque mélange et la vitesse d'agitation a été fixée à 150 tours par minute.

VI.2.3 Résultats et Discussions

La figure VI-3 représente les spectres pris pendant le mélange au cours duquel le lubrifiant est ajouté durant 6 minutes. Pour simplifier la figure, nous avons représenté les spectres pris au début de mélange (spectres bleus) et les spectres pris à la fin du mélange (spectres rouges). Nous avons

sélectionné pour notre étude la région du spectre la plus intéressante allant de 7400 cm^{-1} à 4200 cm^{-1} . La normalisation vectorielle a également été appliquée sur ces spectres. On peut observer une augmentation de l'absorbance en fonction du temps résultant de la distribution du lubrifiant au sein de la poudre.

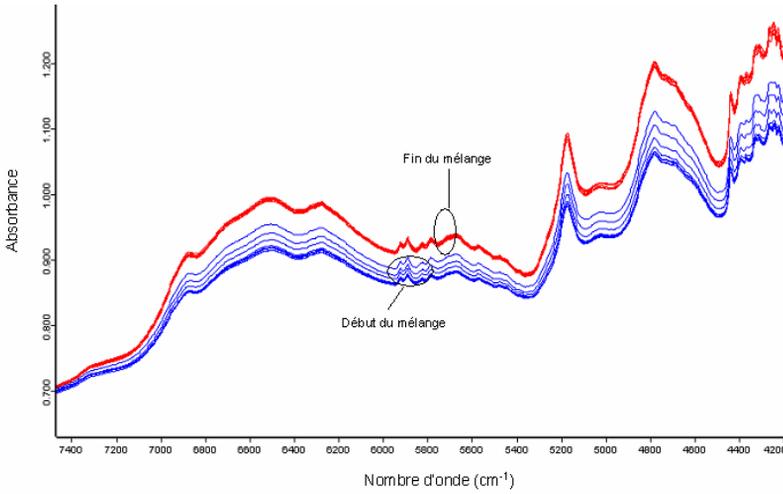


Figure VI-3 : Suivi de l'ajout du Stéarate de Magnésium durant 6 minutes

Les spectres ont été enregistrés sur les différents mélanges.

Ensuite les différentes cinétiques de mélange ont été comparées. Les Indices de Conformité (CI) atteignent des valeurs inférieures à 3 à partir de 5 minutes de mélange (figure VI-4).

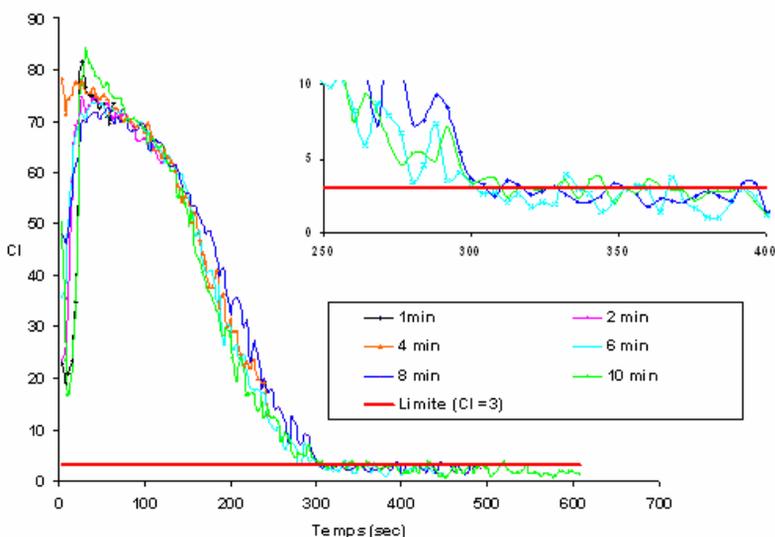


Figure VI-4: Comparaison des différentes cinétiques de mélange au cours de l'addition du Stéarate de Magnésium

On peut néanmoins constater l'existence de valeurs de CI supérieures à 3 ; il faut garder à l'esprit que l'état d'homogénéité n'est jamais qu'un équilibre entre homogénéité et hétérogénéité. Un autre phénomène susceptible d'expliquer ces valeurs de CI supérieures à 3 est l'existence de perturbations à l'intérieur de la cuve provoquées par les mouvements de la pale du mélangeur.

VI.2.4 Conclusions

Nous avons montré qu'il était possible de suivre en ligne l'ajout de l'agent lubrifiant au sein d'un mélange. Ceci avait été déjà réalisé à l'aide du PIR mais sur des échantillons prélevés au sein du mélange et analysés « off-line » (Duong et al.,2003). Nous avons comparé différents temps de mélange du stéarate de magnésium. Il apparaît qu'un temps de mélange de 5 minutes est suffisant pour atteindre une bonne répartition du lubrifiant.

Il est évident que ce travail demanderait une analyse approfondie ainsi que une validation plus poussée. L'objectif ici était de prouver l'utilité et la faisabilité de la technique à l'échelle industrielle.

Pour ce qui est des perspectives envisagées dans le cadre de ce travail, on pourrait mettre au point un système permettant l'arrêt du mélangeur une fois l'état d'homogénéité atteint. Cela pourrait se faire sur la base des valeurs de l'indice de conformité. Une fois que les valeurs de cet indice atteignent les critères d'acceptation (≤ 3) et ceci pendant un temps suffisant, afin d'être certain de l'état d'homogénéité, l'opérateur pourrait stopper le mélangeur.

VI.3 Références bibliographiques

Duong, N. H.; Arratia, P.; Muzzio, F.; Lange, A.; Timmermans, J.; Reynolds, S.; A homogeneity study using NIR spectroscopy: tracking magnesium stearate in Bohle bin-blender. *Drug Dev.Ind.Pharm* 2003, 29 (6), 679-687.

Hussain, M.; York, P.; Timmins, P.; Effect of commercial and high purity magnesium stearates on in-vitro dissolution of paracetamol DC tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 1992, 78, 203-207.

Ragnarsson G.; Holzer, A.; Sjogren, J.; The influence of mixing time and colloidal silica on the lubricating properties of magnesium stearate. *International Journal of Pharmaceutics* 1979, 3, 127-131.

Sheikh-Salem, M. Fell, JT.; The influence of magnesium stearate on time dependent strength changes in tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1981, 7, 669-674.

CONCLUSIONS

Discussion et conclusions générales

La technologie analytique des procédés est un outil performant pour étudier les nombreux facteurs influençant l'obtention d'un mélange homogène de poudres destiné à la fabrication d'une forme solide divisée. Les autorités réglementaires exigent que l'étape de mélange d'un médicament produit à l'échelle industrielle soit parfaitement validée. Une validation rigoureuse nécessite une expérimentation longue donc coûteuse pour explorer de manière la plus exhaustive possible les facteurs influençant l'obtention d'une poudre ayant un degré d'homogénéité acceptable. Les moyens actuels pour effectuer cette validation utilisent des sondes de prélèvement au sein de la poudre dans la cuve du mélangeur. Des prélèvements en nombre suffisant et à différents endroits dans la couche de poudre sont effectués à différents temps puis analysés par une méthode appropriée de détermination quantitative de la substance active. Ces sondes de prélèvement perturbent la couche de poudre lors de l'échantillonnage et les méthodes de dosage de la substance active dans ces prélèvements sont destructives.

Si on considère qu'une validation d'un procédé de mélange doit être effectuée sur au moins trois lots de taille industrielle, avec un nombre suffisant de prélèvements effectués après plusieurs temps d'agitation, à différentes vitesses d'agitation et avec différents volumes de remplissage de la cuve du mélangeur, on peut aisément comprendre la difficulté de la tâche du galéniste et de l'analyste en charge de la validation du procédé.

En outre, quand le mélange des poudres est destiné à la compression directe, des opérations supplémentaires de validation sont exigées afin de démontrer que la poudre homogène ne se démélange pas en cours de fabrication des comprimés. Dans ce but, il est recommandé de fabriquer trois lots successifs de comprimés et d'effectuer des prélèvements de comprimés en début, au milieu et à la fin de la fabrication puis de doser la substance

active dans ces échantillons de comprimés. Les résultats de ces prélèvements doivent démontrer l'absence d'une dérive significative de la teneur moyenne en substance active du début à la fin de la fabrication. A nouveau, ces essais de validation supplémentaires sont longs car ils font appel à des méthodes analytiques qui ne fournissent pas immédiatement le résultat de la teneur de la substance active dans les comprimés.

La technologie analytique des procédés est un moyen rapide et fiable pour effectuer une validation approfondie d'un procédé de mélange mais aussi du procédé de fabrication du comprimé. Elle permet de suivre en temps réel et de manière non destructive la cinétique de mélange de la poudre et donc d'étudier en un temps beaucoup plus court de nombreux facteurs influençant l'obtention d'un mélange homogène. Une validation de la méthode de fabrication des comprimés est également possible en un temps plus court grâce à un dosage rapide et non destructif de la substance active dans les comprimés.

La technologie analytique des procédés faisant appel à des méthodes spectrales doit évidemment relier les données spectrales à une teneur en substance active dans la forme solide divisée. Pour que ce nouveau concept puisse être accepté par les autorités réglementaires, il faut valider les méthodes spectrales utilisées dans le PAT par rapport à des méthodes analytiques conventionnelles et démontrer qu'un lot de comprimés possède une uniformité de teneur en substance active sur la base de données spectrales validées.

C'est dans cette optique que le PAT pourra devenir une méthode acceptée par les Pharmacopées et les autorités réglementaires pour la libération paramétrique de formes solides divisées.

Dans la première partie de notre travail, nous avons démontré l'intérêt d'une méthode non invasive de suivi en ligne de la cinétique du mélange de poudres. Nous avons opté pour un modèle simple : un mélange binaire contenant 1% (m/m) de substance active (riboflavine).

Un premier plan d'expériences, basé sur une méthode de contrôle conventionnelle de l'homogénéité de mélange (prélèvements à la canne apicale et analyse des CV des teneurs en principe actif), a montré qu'un temps d'agitation de 16 minutes nous permettait d'obtenir un mélange homogène sans risque de démixage.

Les comprimés obtenus par compression directe à partir des mélanges utilisés dans ce plan d'expériences présentent des variations de teneurs moindres que ce qui était prévu par l'analyse des différents mélanges suite à un échantillonnage réalisé à la canne apicale. Cette différence s'explique par le fait que la méthode d'échantillonnage réalisée au sein de la cuve du mélangeur est invasive et peut conduire à des perturbations au sein d'une poudre homogène.

Au vu de ces résultats, nous avons montré l'intérêt de la spectroscopie PIR comme outil analytique permettant le suivi en ligne de la cinétique de mélange. Après avoir démontré la faisabilité de la technique par une étude préliminaire, nous avons présenté une méthode d'analyse qualitative de la cinétique de mélange basée sur la détermination de l'Indice de Conformité (CI).

L'approche PAT impose un haut niveau de compréhension scientifique de l'impact des paramètres de fabrication sur la qualité du produit fini. C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'influence des conditions opératoires (temps et vitesse de mélange) et des différents constituants du mélange sur l'obtention du point de fin de mélange. C'est ainsi que nous avons montré l'importance de la durée du mélange et des propriétés d'écoulement dans la cinétique de mélange.

La planification expérimentale a démontré qu'il existait une influence significative du type de cellulose microcristalline ainsi que de la présence d'un agent régulateur d'écoulement, la silice colloïdale anhydre (Aérosil 200®) sur le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène.

Au cours de cette étude, il nous a été permis de conclure que les mélanges sont réalisés d'autant plus rapidement qu'ils présentent de bonnes propriétés

d'écoulement. Ceux-ci ont été réalisés à faible vitesse afin d'éviter toute influence du mélangeur sur la cinétique de mélange. En effet, à grande vitesse, nous avons montré que, quelles que soient les propriétés d'écoulement, l'effet du mélangeur était prédominant dans la cinétique du mélange.

Différentes méthodes d'évaluation des propriétés d'écoulement sont décrites dans la littérature. Il s'agit de mesures statiques et dynamiques. Une comparaison de ces différentes méthodes d'évaluation des propriétés d'écoulement a été réalisée par utilisation d'une analyse statistique multivariée. Il apparaît qu'il existe une bonne corrélation entre les méthodes de mesures dynamiques (nombre d'avalanches et diamètre critique) et le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène.

Notre conclusion est qu'il faut dans le cas de la détermination du point de fin de mélange privilégier les méthodes dynamiques de mesure d'écoulement, plus proches des conditions de mesures en ligne de l'homogénéité de mélange.

Enfin, pour terminer la première partie de notre travail, nous avons mis au point et validé une méthode de dosage PIR par transmission des comprimés de riboflavine. Cette technique rapide, non destructive et ne demandant pas de préparation de l'échantillon, s'avère très prometteuse pour le contrôle de l'homogénéité de mélange. Une calibration de l'équipement a été réalisée à l'aide de la régression des moindres carrés partiels (PLS régression). Le modèle sélectionné a été validé selon les critères recommandés par l'International Conference on Harmonization (ICH).

Puis, cette nouvelle technique a été comparée à la technique de référence UV-Visible en utilisant la méthode statistique de Bland et Altman. L'analyse de risque effectuée sur les résultats obtenus nous a permis de conclure que la spectrophotométrie PIR pouvait être utilisée en routine pour remplacer la technique conventionnelle.

Nous avons dès lors utilisé ce dosage PIR pour vérifier l'homogénéité des mélanges étudiés dans le plan d'expériences. Les résultats d'uniformité de

teneur, conformes aux normes définies par la Pharmacopée Européenne, confirment l'homogénéité des différents mélanges.

La seconde partie du travail a permis de démontrer l'intérêt de la spectroscopie PIR dans l'étude de la cinétique d'un mélange plus complexe à base de diltiazem HCl. Comparativement au mélange binaire, ce mélange de plusieurs constituants est plus représentatif de ce qui est habituellement utilisé dans l'industrie. Grâce à une méthode de régression multiple, nous avons élaboré un modèle permettant d'optimiser les différents facteurs nécessaires à l'obtention du point de fin de mélange. La réponse suivie au cours de cette optimisation est le temps nécessaire pour aboutir à un mélange homogène. La concentration en principe actif et la vitesse d'agitation influencent cette réponse de manière significative. En effet, à partir d'une certaine concentration en diltiazem HCl, des agrégats (visibles pour le mélange renfermant 20% de matière active) apparaissent au sein du mélangeur provoquant une augmentation du temps nécessaire à l'obtention du point de fin de mélange. Dans ce modèle, la vitesse d'agitation semble influencer significativement le temps nécessaire à l'obtention d'un mélange homogène. Un troisième paramètre d'ordre qualitatif a également été étudié au cours de ces expériences : il s'agit du prétraitement mathématique appliqué aux spectres avant leur analyse. Ce prétraitement est indispensable afin d'isoler l'information pertinente au sein des spectres PIR. Pour le modèle sélectionné, il apparaît qu'il n'existe pas d'influence de la nature du prétraitement utilisé, mais que celui-ci est toujours nécessaire.

Par la suite, des conditions optimales, c'est-à-dire les conditions permettant d'obtenir un mélange homogène en un temps le plus court, ont été définies, puis confirmées à l'aide d'essais supplémentaires.

Après avoir contrôlé l'homogénéité des poudres, notre intérêt s'est à nouveau porté sur l'analyse des comprimés. L'objectif était de valider à l'aide du dosage PIR le procédé de production des comprimés à base de diltiazem HCl. Dans ce but, nous avons validé la méthode de référence UV, puis la

nouvelle technique de dosage par PIR. Après avoir effectué la validation de ces deux techniques de dosage, elles ont été comparées par la méthode statistique de Bland et Altman. Pour ces deux techniques, les résultats obtenus étant identiques dans les limites d'acceptation sélectionnées, nous avons conclu que la technique PIR pourrait remplacer en routine la méthode UV de référence.

La spectrophotométrie PIR a ensuite été utilisée pour valider le procédé de production des comprimés. Dans ce but, durant trois jours, nous avons produit trois lots de comprimés se différenciant par leur concentration en principe actif, soit un total de 9 lots. Dix comprimés par lots ont été sélectionnés au hasard et analysés par PIR. L'analyse du profil d'exactitude obtenu a permis de constater qu'il existait un effet du procédé de production sur les concentrations supérieures (14 et 21 mg) en matière active. En effet, il a été constaté que l'Intervalle de tolérance total obtenu est supérieur pour ces deux niveaux à l'intervalle de tolérance de la technique analytique.

Un « effet lot » a été mis en évidence pour les niveaux de teneurs en principe actif les plus élevés. Cependant, malgré cette influence, il a été possible de valider le procédé de production dans son ensemble pour des comprimés renfermant de 7 à 21 mg en diltiazem HCl. Une analyse plus poussée de l'impact des paramètres de la formulation et du procédé de fabrication devrait sans doute être envisagée afin de prévenir ou d'atténuer cet effet lot et ainsi de diminuer le risque d'aboutir à un produit de mauvaise qualité.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons réalisé une étude préliminaire démontrant la faisabilité de la technique à l'échelle industrielle en étudiant la cinétique de mélange sur un mélangeur Ruberg® d'une capacité de 400 litres. Une étude de faisabilité a également été réalisée pour le suivi de l'ajout du stéarate de magnésium par la spectroscopie PIR. Il apparaît qu'un temps de 5 minutes est suffisant pour obtenir une répartition homogène du lubrifiant.

Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur la base de ces deux expériences. En effet, une étude approfondie suivie d'un travail de validation s'avère nécessaire pour vérifier ces résultats. Néanmoins, d'un point de vue faisabilité, ces expériences s'avèrent prometteuses.

En conclusion, cette recherche a permis de montrer l'intérêt de la spectroscopie PIR dans l'étude en ligne de la cinétique de mélange mais également dans le dosage de comprimés. De plus, nous avons démontré que cette technique était adaptée non seulement au contrôle du produit fini mais également au contrôle du procédé de fabrication.

Au terme de ce travail, nous espérons avoir contribué à élargir le domaine d'application du PAT, concept passionnant se situant à l'interface de l'analytique et de la galénique et capable de révolutionner les méthodes de libération des lots industriels de médicaments.

Cette technique pourrait également être utilisée à différentes étapes de la production d'un médicament. Concernant le contrôle de la cinétique de mélange, on pourrait envisager un système qui arrête le mélangeur une fois l'état d'homogénéité atteint. Il suffirait, par exemple, de suivre l'évolution de l'Indice de Conformité (CI) au cours du mélange. Une fois que celui-ci atteint des valeurs inférieures ou égales à 3 pendant un temps suffisant, un système de contrôle arrêterait le mélangeur.

D'éventuels phénomènes de démixage à l'origine de nombreux soucis en cours de production pourraient être suivis à l'aide de cette technique. Par exemple, on pourrait envisager de contrôler la teneur en substance active dans une trémie alimentant une presse pharmaceutique.

RESUMES

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une convention « action de recherche concertée » dont le thème est « La ségrégation et la compaction de poudres et de matières granulaires ». L'étude de la cinétique d'obtention de mélanges homogènes destinés à la compression directe s'inscrit parfaitement dans le cadre de ce programme de recherche.

Le mélange de poudre est une étape critique lors de la fabrication d'une forme solide unitaire. La qualité du mélange va conditionner d'emblée la qualité du produit fini. Il est également indispensable que ce mélange reste homogène tout au long du processus de fabrication car l'uniformité de teneur en substance active doit être assurée au sein du lot de produit fini.

Habituellement, pour s'assurer de l'homogénéité du mélange, des prélèvements à l'aide d'une sonde d'échantillonnage sont réalisés. Les échantillons prélevés sont ensuite dosés afin de s'assurer de la bonne répartition du principe actif dans chacun d'entre eux. Cependant, ces méthodes conventionnelles de détermination de l'homogénéité posent parfois des problèmes d'ordre technique et statistique.

Le développement actuel de méthodes de mesure en ligne, non invasives, devrait permettre une meilleure définition et un meilleur contrôle de l'homogénéité en vue de la validation du procédé de mélange.

Parmi ces méthodes de mesure en ligne, plusieurs techniques de spectroscopie vibrationnelle occupent une place de choix. C'est le cas notamment de la spectroscopie Proche Infrarouge (PIR) qui a connu un essor important dans le milieu pharmaceutique ces dernières années. L'usage de fibres optiques n'y est pas étranger puisque grâce à ces

matériaux, il est possible d'aller chercher l'information sur la chaîne de production permettant de nombreuses analyses en ligne.

De plus, les progrès de l'informatique et l'apparition de la chimiométrie ont fourni de nouveaux outils pour extraire l'information utile présente dans les données spectrales, rendant la spectroscopie PIR plus efficace.

Une des nombreuses applications de la spectroscopie PIR est l'étude de l'homogénéité de mélange de solides divisés. Dès lors, avec la collaboration des sociétés GEA-Collette et Bruker Optics, un mélangeur-granulateur a été équipé d'une sonde reliée par des fibres optiques à un spectromètre PIR. Cet équipement permet de réaliser des mesures au sein même de la cuve du mélangeur.

Parallèlement à cette étude en ligne de la cinétique de mélange, le dosage de la substance active dans des comprimés peut être utilisé pour s'assurer de la conservation de l'homogénéité du mélange au cours du processus de production. La spectroscopie PIR est également un outil performant pour cette application.

L'objectif de ce travail est d'étudier la cinétique de mélanges de poudres pour compression directe et de contrôler l'uniformité de teneur en substance active du produit fini par l'utilisation de la spectroscopie PIR.

Pour débiter notre étude, un modèle simple a été choisi, à savoir le mélange binaire faiblement dosé renfermant 1% de riboflavine comme traceur actif et 99% de cellulose microcristalline comme excipient liant-diluant. Une étude préliminaire a été réalisée à l'aide des méthodes conventionnelles de prélèvements afin de mettre en évidence les paramètres les plus influents sur l'homogénéité de mélange. Au cours de cette étude, la planification expérimentale a permis de démontrer que la vitesse et le temps d'agitation avaient une influence sur la cinétique du mélange. Le coefficient de variation

de la teneur en principe actif de chaque prélèvement diminue lorsque la vitesse et le temps d'agitation augmentent.

Des comprimés ont été produits à partir des mélanges utilisés dans ce plan d'expériences et leur uniformité de teneur de riboflavine dans ces comprimés a été mesurée. Les coefficients de variation de la teneur en riboflavine calculés sur les comprimés sont souvent inférieurs à ceux obtenus à partir des teneurs des prélèvements réalisés au sein du même mélange à l'aide de la canne apicale. La technique de prélèvement peut donc, dans certains cas, donner une évaluation plutôt pessimiste de la qualité de mélange.

Suite à l'analyse de ces résultats, nous avons mis en oeuvre une technique non invasive pour la détermination du point de fin de mélange. La spectroscopie PIR a été utilisée pour l'analyse de mélanges réalisés à différentes vitesses d'agitation comme cela avait été réalisé au cours de l'étude préliminaire. Les résultats confirment ce qui avait été décrit au cours de l'étude préliminaire : la vitesse d'agitation influence significativement le temps nécessaire à l'obtention du point de fin de mélange.

Ensuite, la spectroscopie PIR a été utilisée comme outil d'analyse en ligne afin d'évaluer l'influence de la nature des différents constituants du mélange binaire sur le temps nécessaire à l'obtention du point de fin de mélange. La planification expérimentale a également été utilisée lors de ce travail. Il apparaît que le point de fin de mélange peut être corrélé aux propriétés d'écoulement du mélange, quand la vitesse d'agitation est fixée à son niveau le plus bas.

Une fois le contrôle en ligne réalisé, nous avons mis au point une technique non destructive de détermination de l'uniformité de teneur de la riboflavine dans les comprimés. La spectrophotométrie PIR a été utilisée en mode transmission pour l'analyse des comprimés issus de la compression directe

de certains mélanges réalisés au cours du plan d'expériences précédent. Le spectrophotomètre PIR a été calibré à l'aide d'une méthode spectrophotométrique UV-Visible de référence. Le modèle obtenu par la régression des moindres carrés partiels a été validé. Les résultats prédits à l'aide de ce modèle ont été comparés par l'analyse statistique de Bland et Altman à ceux obtenus à l'aide de la technique de référence.

La deuxième partie de notre travail consiste à étudier l'homogénéité d'un mélange plus complexe pour compression directe à base de diltiazem HCl en utilisant à nouveau la spectroscopie PIR. Une série d'expériences a été réalisée afin d'étudier l'influence de paramètres tels que la concentration en principe actif, la vitesse d'agitation et la nature du prétraitement mathématique des spectres sur l'obtention du point de fin de mélange. Une optimisation des différents paramètres a été réalisée. Il apparaît que le point de fin de mélange est atteint d'autant plus rapidement que la vitesse et que la concentration en principe actif augmentent. Le prétraitement mathématique des spectres est indispensable avant l'analyse de ceux-ci, mais il n'existe pas de différence significative entre les différents types de prétraitements mathématiques. Les conditions optimales définies par le modèle ont été répétées afin de contrôler la robustesse du modèle choisi.

Nous avons également procédé au dosage de comprimés issus du mélange à base de diltiazem par la spectrophotométrie PIR. L'objectif de ce travail a été de valider la méthode de dosage PIR, mais également de valider l'ensemble du procédé de production de ces comprimés. Dans ce but, trois lots par concentration en diltiazem ont été fabriqués et dosés à l'aide du modèle PIR validé et comparé à une méthode de référence. L'analyse des différents lots a permis de valider l'ensemble du processus de fabrication. La spectrophotométrie PIR semble un outil approprié pour la validation de l'ensemble du processus de fabrication.

Enfin, dans la dernière partie de notre travail, nous avons voulu évaluer l'application de la technique de contrôle en ligne de l'homogénéité de mélange à l'échelle industrielle. Une collaboration avec UCB Pharma a permis d'équiper un mélangeur Ruberg® de 400 litres à l'aide d'une sonde PIR. Les résultats obtenus semblent prometteurs, mais il conviendrait toutefois d'approfondir ces essais afin de valider l'utilisation de la technique PIR à l'échelle industrielle.

Summary

This study is one part of an intensive research entitled “Segregation and compaction of powders and granular materials”. The study of the kinetic of direct compression mixing is one of the subjects considered in this research group.

Powder mixing is a crucial and essential step during tablet manufacturing. The quality of the finished product depends greatly on the mixing quality. At the end of the process, each unit dosage form should contain the same quantity of each of the mixing components. Homogeneity should be preserved during the whole manufacturing process.

Usually, in order to control mixing homogeneity, samples are taken with a sample thief inside the powder blend. Then, samples are assayed to ensure that each of them contains the same quantity of active ingredient. Sometimes, there are some technical and statistical problems with this conventional technique.

The non invasive, on-line techniques currently being developed could take the place of conventional techniques. Among these on-line approaches, vibrational spectroscopy techniques are the methods of choice for use in the control of mixing homogeneity. Several years ago, NIR spectroscopy is became one of the most famous techniques for on-line analysis in the pharmaceutical field. One of the reasons for this is the emergence of optic fibres with these tools it is possible to record on-line information. Moreover, improvements in computer science and in chemometry for extracting useful information from spectra make NIR spectroscopy more effective.

Among numerous NIR applications, the study of mixing homogeneity is one of the most interesting. As a result, with the collaboration between GEA-

Collette[®] and Bruker Optics[®], a mixer-granulator has been equipped by a probe connected to an NIR spectrometer by optic fibres. With this equipment, it is possible to perform measurements inside the mixer bowl.

Concurrent with this on-line analysis, it is possible to use tablet assay to control the preservation of blending homogeneity during the manufacturing process. The characteristics of NIR spectroscopy make this an interesting tool for this application.

The purpose of this study is to demonstrate that NIR spectroscopy is a technique that can take the place of a conventional technique in the fields of mixing homogeneity determination and finished product assay.

To start our study, a simple model was chosen: the binary mixture. We opted for a low-dosage blend of Riboflavin as the model drug and microcrystalline cellulose as the excipient (1-99 % w/w). In a first step, an experimental screening process was performed by using conventional methods to study the influence of some parameters on mixing homogeneity. During this study, the experimental design showed that the speed of the main impeller and the mixing time had an influence on the mixing profile. The relative standard deviation (RSD %) which was the observed result in this experimental design decreases with these two parameters.

Tablets were manufactured with the powder blends produced during the experimental design and their content uniformity was measured. The relative standard deviation (RSD %) values obtained with these tablets are often smaller than those obtained in samples taken with the sample thief inside the same blend. The sample thief technique sometimes gives a pessimistic idea of blend homogeneity.

On considering these results, we had the idea of using a non-invasive technique to determine the mixing end-point. NIR spectroscopy was used to

follow mixing performed at different mixing speeds as occurred during the screening design. It can be concluded that mixing speed has a significant effect on the time needed to obtain the mixing end-point like as was the case with the screening design: mixing speed has a significant influence on the time needed to obtain mixing homogeneity.

Following this, the NIR spectroscopy was used as a tool to evaluate the influence of the constituents of the binary mixture on the mixing end-point. A second experimental design has demonstrated that the time needed to obtain the mixing end-point is related to the flow properties when the mixing speed is fixed at the lowest value.

Once the on-line mixing control had finished, we developed a non-destructive technique to measure intact tablet uniformity content. Transmission mode NIR spectrophotometry was used to analyse tablets obtained by pressing into tablets some blends of the experimental design described above. The spectrometer calibration was carried out using a UV-VIS reference method. The selected model obtained with a PLS regression was then validated. Results obtained by the two methods were compared using the Bland and Altman statistical method.

The purpose of the second part of this study was to research the application of NIR spectroscopy using a more complicated blend, so the model of a direct compression blend with Diltiazem HCl was used. Some experiments were performed in order to check the influence of different parameters such as active ingredient concentration, mixing speed and the type of mathematical pre-treatment in relation to the time needed to reach the mixing end-point. An optimisation of the different parameters was performed. It seems that the mixing end-point is obtained at the same rate as the increase in speed and the active ingredient concentration. Mathematical pre-treatment is necessary before analysing spectra but there are no significant differences

between these pre-treatments. Optimal conditions defined by the model were repeated to check the model's robustness.

We also used NIR spectrophotometry to study the assay of tablets manufactured from blends containing Diltiazem HCl. The aim of this research was to validate not only the tablet assay but also the tablet manufacturing process.

For this process validation, 3 batches per concentration were manufactured and assayed with the NIR model and then the results obtained were compared with the reference method. It can be concluded that NIR spectroscopy is an interesting tool to use to control the whole manufacturing process.

The last part of this study consists of the evaluation of the application of NIR spectroscopy at the industrial scale for the monitoring of on-line mixing. Collaboration with UCB-Pharma[®] has allowed us to equip a 400 litre Ruberg[®] mixer with the NIR probe. The results obtained are promising even if more extensive research and further validation seem to be essential.

Samenvatting

Deze studie is een deel van intensief onderzoek over „de segregatie en compactie van poeders en granulaten“. De studie van de kinematica van direct compressie menging is een van de onderwerpen die behandeld worden door deze onderzoeksgroep.

Poedermenging is een cruciale en essentiële stap bij de productie van een tabletten. De kwaliteit van het eindproduct hangt in grote mate af van de mengkwaliteit tijdens het proces. Elke eenheid (tablet) moet een bepaalde hoeveelheid van elk bestanddeel bevatten. Het is dus absoluut noodzakelijk dat de homogeniteit van het mengsel gegarandeerd is tijdens het productieproces.

Om de homogeniteit van een mengsel te controleren, worden gewoonlijk met behulp van een ‘thief probe’ stalen uit de menger genomen. Vervolgens wordt in deze stalen nagegaan via off-line analyse of ze allen dezelfde hoeveelheid actief bestanddeel bevatten. Toch zijn er met deze conventionele meetmethode diverse technische en statistische problemen.

De recent ontwikkelde on-line en niet-invasieve technieken kunnen deze conventionele methoden vervangen en zouden een betere controle van de homogeniteit moeten toelaten. Onder deze mogelijke online analysemethoden bestaan diverse vibrationele spectroscopische technieken. Vooral NIR spectroscopie heeft enorm aan belang gewonnen in de farmaceutische industrie. Dankzij de ontwikkeling van optische fibers is het mogelijk om op verschillende plaatsen in het productieproces in-line analyses uit te voeren. Bovendien heeft de vooruitgang van de informatica het mogelijk gemaakt om met behulp van diverse chemometrische technieken nuttige informatie uit de in-line gecollecteerde spectra te extraheren.

Een van de talrijke mogelijke toepassingen van NIR spectroscopie, is het monitoren van de homogeniteit tijdens mengprocessen. Met de medewerking van GEA-collette[®] en Bruker Optics[®], werd door de wand van een menger een probe gemonteerd die via optische vezels aan een NIR spectrometer was gekoppeld. Dit maakte het mogelijk NIR metingen uit te voeren binnenin de menger.

Parallel met deze online monitoring van het mengproces, kan het analyseren van de tabletten op het einde van het productieproces gebruikt worden om zich van het behoud van de homogeniteit tijdens het verdere productieproces (tableteren) na het mengen te verzekeren. Ook hiervoor lijkt NIR spectroscopie een geschikte techniek.

Het doel van deze studie is aan te tonen dat NIR spectroscopy de conventionele technieken kan vervangen bij het bepalen van de homogeniteit van een mengproces en bij het doseren van het eindproduct.

In een eerste fase van deze studie, werd een eenvoudig modelmengsel gekozen op basis van twee componenten: riboflavine (1% m/m) en microkristallijne cellulose (99% m/m). Tijdens preliminaire experimenten, werd met behulp van de conventionele methode (thief probe) de invloed van sommige parameters op het mengproces nagegaan. Deze studie op basis van experimental design toonde aan dat de mengsnelheid en de mengtijd het mengprofiel van het bestudeerde mengsel significant beïnvloeden. De relatieve standaardafwijking (RSD%), die de respons variabele was tijdens deze experimental design experimenten, daalt wanneer de mengsnelheid en tijd stijgen.

Uitgaande van het gehomogeniseerde poedermengsels verkregen tijdens de experimental design experimenten, werden tabletten geproduceerd, waarvan

dan het gehalte bepaald werd. De relatieve standaardafwijking (RSD%) waarden verkregen voor deze tabletten, was vaak kleiner dan RSD% resultaten van de met de thief probe gecollecteerde stalen. De thief probe methode geeft dus soms een te pessimistisch beeld over de homogeniteit.

Op basis van deze resultaten, kozen we ervoor de niet-invasieve NIR methode te gebruiken voor het eindpuntsbepaling van de mengprocessen. Dezelfde experimental design experimenten uitgevoerd tijdens de preliminaire experimenten, werden gemonitored met NIR spectroscopie. De resultaten bevestigen wat tijdens na vooronderzoek besloten werd: de mengsnelheid beïnvloedt significant de tijd nodig om het eindpunt van het mengproces te bereiken.

Vervolgens werd NIR spectroscopie als online middel gebruikt om de invloed van de bestanddelen van het binaire mengsel op het eindpunt van het mengproces te evalueren. Een tweede experimental design toonde aan dat de tijd nodig om het eindpunt van het mengproces te bereiken gerelateerd is aan de vloeieigenschappen wanneer de mengsnelheid laag is.

Na deze on-line controle studie, werd een niet-destructieve methode ontwikkeld om het gehalte in de tabletten op het einde van het productieproces te bepalen. Transmissie NIR spectroscopie werd gebruikt om de tabletten van de experimental design experimenten, verkregen door compressie van de gehomogeniseerde mengsels, te analyseren. Het geselecteerde PLS regressiemodel werd gevalideerd en de NIR methode werd vergeleken met een UV-VIS referentiemethode. De resultaten verkregen via de twee methodes werden vergeleken volgens the Bland and Altman statistische methode.

Het doel van het tweede deel van deze studie was te onderzoeken of NIR spectroscopie kon gebruikt worden voor het monitoren van complexere

mengprocessen. Daartoe werd het model van directe samenpersing met Diltiazem HCl werd gebruikt. Experimenten werden uitgevoerd om de invloed van parameters, zoals de concentratie aan actief bestanddeel, de mengsnelheid en de spectrale voorbehandeling, ten opzichte van het bereiken van het eindpunt van het mengproces, te bestuderen. Een optimalisering van de verschillende parameters werd verwezenlijkt. Het bleek dat het eindpunt van het mengproces sneller bereikt werd naarmate de snelheid en de concentratie van het actief bestanddeel stijgen. Spectrale voorbehandeling is absoluut noodzakelijk alvorens analyse van de spectra, maar het type voorbehandeling beïnvloedt de eindpuntsconclusie niet. De berekende optimale procesvoorwaarden, werden herhaald ten einde de robuustheid van het model na te gaan.

NIR spectroscopie werd ook gebruikt om tabletten geproduceerd uit de mengsels op basis van Diltiazem te analyseren. Het doel van dit werk was niet enkel om de analysemethode te valideren, maar eveneens het volledige productieproces van de tabletten. Hiertoe werden drie batchen geproduceerd – elk met een verschillende diltiazem concentratie - en met behulp van een NIR methode geanalyseerd. De resultaten werden vergeleken met de referentiemethode. Er kan besloten worden dat NIR spectroscopie een geschikt middel is om het hele productieproces te controleren.

Het laatste deel van deze studie bestond er in NIR te evalueren om op industriële schaal mengprocessen te monitoren. Een samenwerking met UCB Pharma heeft het mogelijk gemaakt om een NIR probe in te bouwen in een Ruberg® mixer van 400 liter. De verkregen resultaten lijken veelbelovend, maar een meer diepgaande studie en validatie zijn noodzakelijk.

ANNEXES

Annexe 1 : Certificat d'analyse de la Riboflavine fournie par CERTA

RIBOFLAVIN UNIVERSAL



Vitamin

CERTIFICATE OF ANALYSIS

04 1934

Productcode : 0470406
 Lot No. : UQ40122007
 Analysis No. : 01433698

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance	Powder		
Colour	Orange yellow		
Identity	Corresponds		
Specific Rotation (589nm, dried) (c=0.5 in NaOH (c=0.05 mol/l), 20°C)	-132.3	-135.0 to -115.0	degree
(c=0.5 in HCl (conc.), 25°C)	59.2	+56.5 to +59.5	degree
Absorbance			
Maximum 1	223	221 to 225	nm
Maximum 2	267	265 to 269	nm
Maximum 3	374	371 to 375	nm
Maximum 4	445	442 to 446	nm
Relative absorbance			
A373/A267	0.326	0.310 to 0.330	
A444/A267	0.382	0.360 to 0.390	
Loss on drying	0.5	max. 1.5	%
Sulphated ash	0.01	max. 0.10	%
Heavy Metals	<= 10 ppm		
Lead	<= 1 ppm		
Arsenic	<= 3 ppm		
Mercury	<= 1 ppm		
Cadmium	<= 1 ppm		
Lumiflavin	Passes test		
Primary aromatic amines	<= 100 ppm		
Organic volatile impurities	Corresponds USP		
Assay (dried)	99.0	98.0 to 101.0	%
Fineness < 180 µm	99.4	min. 90.0	%

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

The product meets all requirements of the following valid compendia when tested accordingly:

Ph.Eur. + USP + FCC

Roche Vitamine GmbH
 The Quality Assurance Manager

Rainer Polley

Roche Vitamine GmbH
 Postfach 1145
 D-79 629 Grenzach-Wyhlen
 Telefon + 49 (0) 7824 5090

1 / 1

Date of issue : 15-Jan-2004

Annexe 2 : Schéma du module de transmission du MPA®

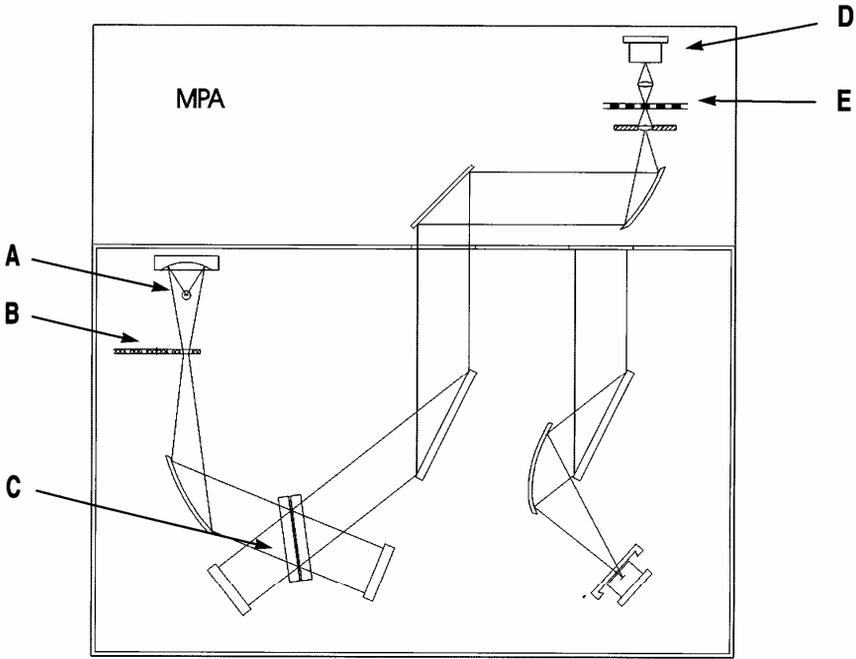


Figure 6: Optical Path for MPA with Transmission Unit

	Component		Component
A	IR-Source	B	Filter Wheel (IVU)
C	Interferometer	D	Detector
E	Sample Position		

Annexe 3 : Schéma du module de réflexion du MPA®

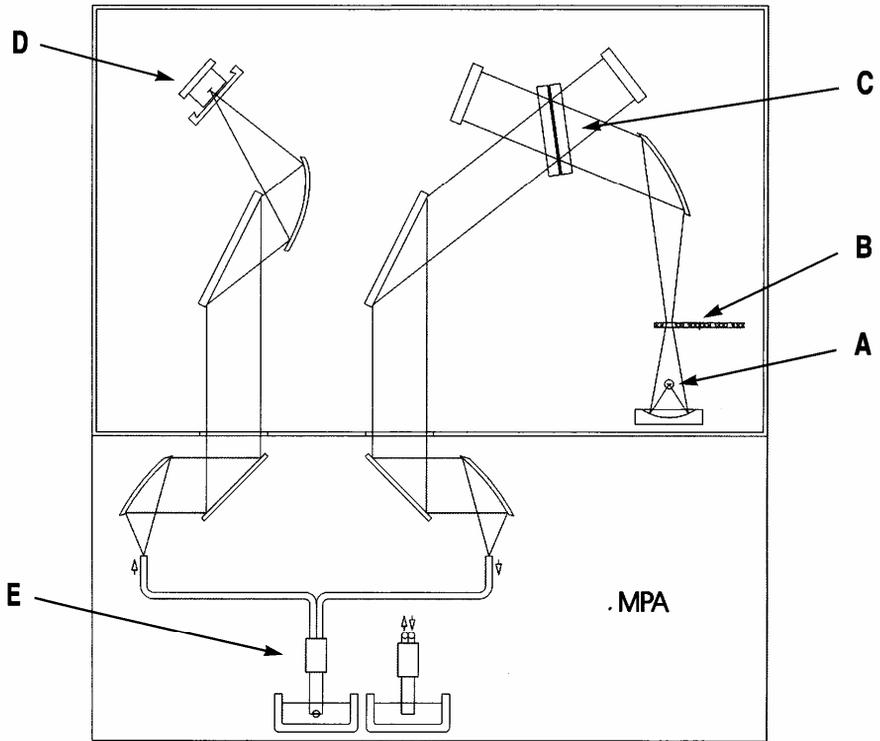
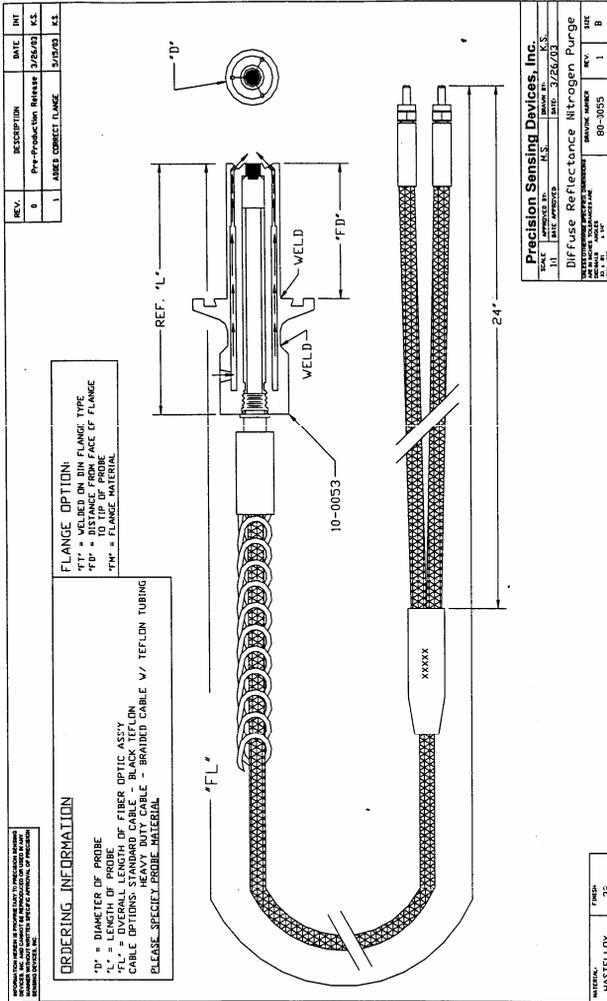


Figure 4: Optical Path for MPA with Fiber Optic Module

	Component		Component
A	IR-Source	B	Filter Wheel (IVU)
C	Interferometer	D	Detector
E	Fiber Probe		

Annexe 4 : Schéma de la fibre optique



FOR INFORMATION ONLY - PRECISION SENSING DEVICES, INC. IS NOT RESPONSIBLE FOR THE PROVISION OF PRECISION SENSING DEVICES, INC.

ORDERING INFORMATION

"D" = DIAMETER OF PROBE
 "L" = LENGTH OF PROBE
 "FL" = OVERALL LENGTH OF FIBER OPTIC ASSEMBLY
 CABLE OPTIONS: HEAVY DUTY CABLE - BRAIDED CABLE W/ TEFELON TUBING
 PLEASE SPECIFY PROBE MATERIAL.

FLANGE OPTION:

"FL" = WELDED ON DIN FLANGE TYPE
 "FD" = DISTANCE FROM FACE OF FLANGE TO END OF FIBER
 "WD" = FLANGE MATERIAL

REV.	DESCRIPTION	DATE	INT.
1	Pre-Production Release	3/26/00	U.S.
1	ASSEMBLY CORRECT FLANGE	5/17/03	U.S.

Precision Sensing Devices, Inc.			
101	DATE APPROVED	R.S.	REV.
		REV. 3/28/03	
Diffuse Reflectance Nitrogen Purge			
PRECISION SENSING DEVICES, INC.		80-0055	1
10100 W. 101ST AVE.			B
EAGLE CREEK, CO. 80015			

MATERIAL	FINISH
304 STAINLESS STEEL	32

Annexe 5 : Résultats des prélèvements réalisés sur les mélanges utilisés dans la plan d'expérience permettant de déterminé les paramètres influençant l'obtention du point de fin de mélange.

N° expérience	CV (%)
N1	3,6
N2	4,5
N3	4
N4	3,7
N5	2
N6	4,34
N7	2,22
N8	3,77
N9	1,16
N10	4,79
N11	3,2
N12	2,97
N13	4,47
N14	4,44
N15	3,68
N16	3,81
N17	2,89
N18	3,97
N19	3,52

Annexe 6 : Certificat d'analyse de la Riboflavine BASF



Certificate of Analysis
BASF Aktiengesellschaft

BASF CHEMTRADE GMBH
INDUSTRIESTRASSE 20
91593 EUGENBERNHAIM
Deutschland

FAX-NR 09843982826
2004-07-05
FCPO
Mr. Koh, Ha-Young
+82-63-469-2470
ZERTIFIKATS-NR 2277
SEITE 7 VON 9

QUALITAETSPRUEF-ZERTIFIKAT DIN 55350-18-4.2.2

Riboflavin High Flow 100	MATERIAL	54680669
25kg Karton mit PE-Sack	AUFTRAG	3001732640 000010
IHRE BESTELLUNG	LIEFERUNG	3082346153 000010
610685	CHARGE	RIB0016HP
54680669	-MENGE	775.000 KG
	TOTAL	1000.000 KG
	TRANSPORT	MA-KH 172 / PK

Test parameter	Requirements	UoM	Results
Identification (Ph.Eur., Meth.A)	Must comply		Complies
Identification (Ph.Eur., Meth.C)	Must comply		Complies
Identification (USP)	Must comply		Complies
Specific optical rotation (Ph.Eur.)	-115 to -135	degree	-126
Specific optical rotation (USP)	+56.5 to +59.5	degree	+58.1
Absorbance (Ph.Eur.)			
A 373/267 nm	0.31 to 0.33		0.33
A 444/267 nm	0.36 to 0.39		0.38
Lumiflavin (Ph.Eur.)	Must comply		Complies
Lumiflavin (USP)	Must comply		Complies



Certificate of Analysis
BASF Aktiengesellschaft

BASF CHEMTRADE GMBH
INDUSTRIESTRASSE 20
91593 EUGENBERNHAIM
Deutschland

FAX-NR 09843982826
2004-07-05
FCPO
Mr. Koh, Ha-Young
+82-63-469-2470
ZERTIFIKATS-NR 2277
SEITE 8 VON 9

QUALITAETSPRUEF-ZERTIFIKAT DIN 55350-18-4.2.2

Riboflavin High Flow 100	MATERIAL	54680669
25kg Karton mit PE-Sack	AUFTRAG	3001732640 000010
IHRE BESTELLUNG	LIEFERUNG	3082346153 000010
610685	CHARGE	RIB0016HP
54680669	-MENGE	775.000 KG
	TOTAL	1000.000 KG
	TRANSPORT	MA-KH 172 / PK

Test parameter	Requirements	UoM	Results
Sulfated ash (Ph.Eur.)	Max. 0.1	%	0.04
Residue on ignition (USP)	Max. 0.3	%	0.01
Loss on drying (Ph.Eur.)	Max. 1.5	%	0.7
Assay (Ph.Eur.)	98.0 to 101.0	%	99.6
Assay (USP)	98.0 to 102.0	%	99.7
Acidity or alkalinity (Ph.Eur.)	Must comply		Complies
Organic volatile impurities (USP)	Must comply		Complies

Annexe 7 : Résultats du dosage des comprimés renfermant la Riboflavine ayant permis la construction du modèle PLS

	Série	Niveau	True (UV-VIS µg)	Prediction (PIR µg)
1	1	4	1270	1258
2	1	4	1220	1253
3	1	4	1250	1266
4	1	4	1185	1226
5	1	4	1340	1334
6	1	4	1145	1190
7	1	4	1340	1328
8	1	4	1190	1208
9	1	4	1285	1289
10	1	4	1365	1339
11	2	4	1270	1293
12	2	4	1220	1231
13	2	4	1250	1240
14	2	4	1185	1256
15	2	4	1340	1280
16	2	4	1145	1138
17	2	4	1340	1304
18	2	4	1190	1176
19	2	4	1285	1268
20	2	4	1365	1336
21	3	4	1270	1309
22	3	4	1220	1247
23	3	4	1250	1236
24	3	4	1185	1189
25	3	4	1340	1308
26	3	4	1145	1211
27	3	4	1340	1265
28	3	4	1190	1172
29	3	4	1285	1257
30	3	4	1365	1325
31	1	3	1070	1053
32	1	3	1075	1095
33	1	3	1060	1074
34	1	3	1055	1051
35	1	3	1095	1091
36	1	3	1085	1073
37	1	3	1005	1067
38	1	3	1005	1041
39	1	3	1100	1083
40	1	3	1050	1097
41	2	3	1070	1058
42	2	3	1075	1092
43	2	3	1060	1112
44	2	3	1055	1090
45	2	3	1095	1108
46	2	3	1085	1110
48	2	3	1005	1023
49	2	3	1100	1099
50	2	3	1050	1092
51	3	3	1070	1079
52	3	3	1075	1083
53	3	3	1060	1053

54	3	3	1055	1062
55	3	3	1095	1095
56	3	3	1085	1070
57	3	3	1005	1021
58	3	3	1005	1023
59	3	3	1100	1084
60	3	3	1050	1063
61	1	2	965	933.8
62	1	2	870	861.8
63	1	2	845	799
64	1	2	845	812.5
65	1	2	790	806.3
66	1	2	890	846.6
67	1	2	840	798.1
68	1	2	900	887.9
69	1	2	910	858.6
70	1	2	830	826.9
71	2	2	965	907.7
72	2	2	870	846.1
73	2	2	845	821.9
74	2	2	845	839.9
75	2	2	790	785.1
77	2	2	840	860.8
78	2	2	900	868.7
79	2	2	910	899
80	2	2	830	815.4
81	3	2	965	885
82	3	2	870	849.5
83	3	2	845	818.2
84	3	2	845	842.4
85	3	2	790	813.6
87	3	2	840	816.2
88	3	2	900	864.5
89	3	2	910	875.1
90	3	2	830	834
91	1	1	770	773.8
92	1	1	670	712.4
93	1	1	640	712.6
94	1	1	710	727.1
95	1	1	740	732.5
96	1	1	775	725.6
97	1	1	785	775.2
98	1	1	685	703
99	1	1	670	706.8
100	1	1	660	703.6
101	2	1	770	730.9
102	2	1	670	715.7
103	2	1	640	688
104	2	1	710	713.7
105	2	1	740	736.2
106	2	1	775	731.3
107	2	1	785	766.8
108	2	1	685	722.3
109	2	1	670	728.5
110	2	1	660	724.7
111	3	1	770	689.3
112	3	1	670	672.7
113	3	1	640	709.1

Annexes

114	3	1	710	700.5
115	3	1	740	749.1
116	3	1	775	752.7
117	3	1	785	751.7
118	3	1	685	691.7
119	3	1	670	677.4
120	3	1	660	677.5
121	1	5	1415	1421
122	1	5	1565	1553
124	1	5	1575	1553
125	1	5	1655	1633
126	1	5	1620	1593
127	1	5	1585	1581
128	1	5	1490	1501
129	1	5	1490	1519
130	1	5	1540	1549
131	2	5	1415	1442
132	2	5	1565	1557
133	2	5	1700	1646
134	2	5	1575	1595
135	2	5	1655	1672
136	2	5	1620	1647
137	2	5	1585	1625
138	2	5	1490	1516
139	2	5	1490	1500
140	2	5	1540	1549
141	3	5	1415	1389
142	3	5	1565	1565
144	3	5	1575	1577
145	3	5	1655	1631
146	3	5	1620	1614
147	3	5	1585	1548
148	3	5	1490	1476
149	3	5	1490	1520
150	3	5	1540	1540

Annexe 8 : Résultats obtenus par analyse des comprimés de Diltiazem HCL sélectionnés au cours de la validation du procédé de fabrication

BATCH 1 5%			BATCH 1 10%			BATCH 1 15%		
Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
7,50	6,92	7,25	14,68	14,19	14,58	20,97	20,94	20,66
7,38	7,09	7,18	14,67	15,17	14,82	20,78	21,61	20,16
7,11	7,33	7,36	14,53	14,73	14,27	20,52	20,57	21,18
7,21	7,31	7,13	14,57	14,68	14,59	20,79	20,30	20,28
7,41	7,47	7,43	14,29	14,99	14,37	20,82	20,52	20,50
7,14	7,51	7,62	14,31	14,41	14,24	21,03	20,50	20,68
6,87	7,63	7,34	14,53	14,65	14,75	21,51	20,42	20,90
7,31	7,42	7,28	14,37	14,44	14,42	20,21	20,26	20,25
7,32	7,36	7,34	14,96	14,93	14,49	20,63	21,05	20,43
7,03	7,54	7,49	15,12	14,80	14,85	20,63	21,19	21,17
BATCH 2 5%			BATCH 2 10%			BATCH 2 15%		
Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
7,24	7,16	7,41	14,52	14,70	14,46	21,12	20,91	20,85
7,35	7,54	7,23	14,34	14,75	14,81	21,12	20,64	20,77
7,47	7,46	7,51	14,70	14,66	14,55	20,43	20,64	20,73
7,26	7,26	7,26	14,32	14,72	14,92	20,91	20,31	21,10
7,48	7,19	7,54	14,28	15,00	14,43	19,97	20,49	20,73
7,14	7,28	7,24	14,40	14,36	14,69	20,66	21,22	20,65
7,28	7,34	7,19	14,72	14,67	15,17	21,45	21,17	20,86
7,54	7,19	7,34	14,08	14,99	14,75	20,79	20,83	20,71
7,23	7,51	7,14	14,84	13,77	14,55	20,94	20,93	20,38
7,46	7,54	7,32	14,39	14,35	14,43	20,32	21,23	20,95
BATCH 3 5%			BATCH 3 10%			BATCH 3 15%		
Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
7,54	7,64	7,22	14,38	13,88	13,95	20,03	20,58	20,27
7,12	7,21	7,65	14,00	14,19	13,52	20,72	20,50	19,78
7,26	7,49	7,26	14,05	13,78	14,07	20,22	19,46	20,04
7,42	7,23	7,34	13,60	14,52	13,94	20,40	20,15	19,11
7,24	7,05	7,29	14,19	14,06	13,82	19,68	19,96	20,13
7,65	7,13	7,17	14,10	14,57	13,91	19,91	20,03	19,56
7,43	7,23	7,26	14,17	14,24	13,69	20,41	20,03	20,61
7,21	7,29	7,65	14,31	13,87	14,23	20,60	19,84	19,69
7,26	7,35	7,42	14,10	14,07	13,44	20,07	20,01	20,18
7,19	7,61	7,25	14,05	14,30	14,13	20,22	19,94	19,76

PUBLICATIONS

Comparison of FT-NIR transmission and UV-Vis spectrophotometry to follow the mixing kinetics and to assay low-dose tablets containing riboflavin

C. Bodson, W. Dewé, Ph. Hubert, L. Delattre

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41 (2006), 783-790.



Comparison of FT-NIR transmission and UV–vis spectrophotometry to follow the mixing kinetics and to assay low-dose tablets containing riboflavin

C. Bodson^{a,*}, W. Dewé^b, Ph. Hubert^c, L. Delattre^a

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology, University of Liège, 1 Avenue de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium

^b Lilly Services S.A., 11 Rue Granbonpré, 1348 Mont-Saint-Guibert, Belgium

^c Laboratory of Analytical Chemistry, University of Liège, 1 Avenue de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium

Received 28 October 2005; received in revised form 6 January 2006; accepted 12 January 2006
Available online 21 February 2006

Abstract

For several years, near-infrared spectroscopy (NIRS) has become an analytical technique of great interest for the pharmaceutical industry, particularly for the non-destructive analysis of dosage forms. The goal of this study is to show the capacity of this new technique to assay the active ingredient in low-dose tablets. NIR spectroscopy is a rapid, non-destructive technique and does not need any sample preparation.

As an example, a binary mixture of microcrystalline cellulose and riboflavin was used to prepare tablets of different weights by direct compression. A prediction model was built by using a partial least square regression fit method. The NIR assay was performed by transmission. The results obtained by NIR spectroscopy were compared with a conventional UV–vis spectrophotometry method.

The study showed that tablets can be individually analysed by NIR with high accuracy. It was shown that the variability of this new technique is less important than that of the conventional method which is the UV–vis spectrophotometry.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: FT-NIR transmission; PAT; Tablet assay; Validation; UV–vis assay; Solid dosage form; PLS model

1. Introduction

Currently, we hear a lot about the Food and Drug Administration's process analytical technology (PAT) initiative which is a collaboration effort with industry to facilitate the introduction of new and efficient manufacturing technologies.

PAT are systems for design, analysis, and control of manufacturing processes, based on timely measurements of critical quality and performance attributes of raw and in-process materials and products, to assure high quality of products at the completion of manufacturing (<http://www.fda.gov/cder>) [1]. PAT includes scientifically based process design that identifies key measurements of product quality and the critical process variables that affect them, appropriate measurement devices, statistical information technology tools, and feedback process control strategies

that work together to ensure production of final products with the desired quality.

Several vibrational spectroscopy techniques are used for the application of PAT in the on-line monitoring of the pharmaceutical process.

For several years, near-infrared spectroscopy (NIRS) has become an analytical technique of great interest for the pharmaceutical industry. NIR spectroscopy is a rapid, non-destructive technique and requires none or minimal sample pretreatment.

The NIR region spans the wavelength range 12,500–4000 cm^{-1} . In this region, absorption bands correspond mainly to overtones and combinations of fundamental vibrations [2].

In the pharmaceutical sector, several qualitative and quantitative applications of NIR spectroscopy have been described during manufacturing steps.

In the beginning of manufacturing process, NIR can be used for the identification of active substances and excipients [3–5]. By recording a NIR spectrum, it has been shown that identity, crystallinity, and water content are controlled

* Corresponding author. Tel.: +32 4366 43 01; fax: +32 4366 43 02.
E-mail address: cbodson@ulg.ac.be (C. Bodson).

making NIRS an interesting tool for the characterisation of raw materials.

The blending step can also be followed by NIRS [6]. It is well known that creating homogeneous powder blend is one of the most important step during manufacturing of solid dosage forms in pharmaceutical industries. Typically, the most time-consuming part of the blending process is not the blending itself but the analysis that must be performed to validate the final homogeneity of the drug substance in the blend. Usually, to test the homogeneity of the blend, manufacturers remove some samples which are representative of the powder bed with a thief probe. The samples are then analysed by traditional methods such as UV–vis spectrophotometry or high performance chromatography.

NIR spectrophotometry can also be used for the assay of pharmaceutical dosage forms. With advances in instrumentation and software, rapid characterisation of intact dosage forms has become a reality. As far as quantitative analysis is concerned, NIR spectroscopy allows the determination of active substances in various pharmaceutical preparations. More recently, the assay of active drugs in tablets has been reported. This assay can be performed by reflectance [7] or transmittance [8] but it was shown that the use of transmittance measurements has brought the advantage over reflectance NIR spectroscopy because these measurements are less sensitive to the heterogeneity of the material, which is a problem in reflectance analysis [9]. In their paper, Gottfries et al. have shown that models based on transmission spectra give a better prediction power than models based on diffuse reflectance spectra.

In practice the relationship between concentration and absorbance is empirically determined by calibration. In the first step, spectra of substances with known composition are recorded. Then, these acquired spectra and the data available from a reference analysis are used to determine a calibration function. In the second step, spectra of substances with unknown composition are measured and then used to determine the properties of interest by means of the calibration function [10,11].

Processing NIR data can be carried out in a number of ways to simplify the spectral information. It has been shown that data pretreatment could be a key step for success of NIR spectroscopy [12].

In this article, a NIR technique is described to monitor the blending process and to assay low-dosage tablets containing riboflavin. The aim of the study is to show the agreement between the NIR technique and a conventional UV–vis spectrophotometry assay method.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

2.1.1. Materials

Microcrystalline cellulose (Avicel® PH 200 FMC, Belgium) was used as diluent and binding agent. Riboflavin (Roche®, Germany) was chosen as a model drug substance.

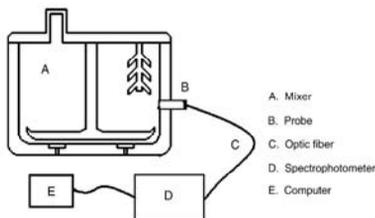


Fig. 1. NIR equipment for the powder blend on-line analysis.

2.1.1.1. Mixing homogeneity. The mixing was performed with a Gal 10 high shear mixer (GEA-Collette nv, Wommelgem, Belgium). The process bowl has a volume of 10 l. For in-line monitoring, the jacketed bowl was perforated to allow the introduction of a NIR fibre probe. Fig. 1 shows the instrumentation of the bowl. The mixing process was monitored for 30 min with the main impeller rotating at 400 rpm. The blend load was 1.5 kg.

Sampling: To confirm the end point of mixing obtained by NIR, a sampling technique was performed with a single compartment end-sampling thief probe. Ten samples were taken from the powder blend in the bowl. Samples were considered uniform if the drug concentration of each individual sample was within 10% of the average concentration and the relative standard deviation (R.S.D.) was less than 5%.

2.1.1.2. Tablets assay. Tablets were manufactured with a rotary press RO/2 from GEA-Courtoy (Belgium) using flat 7 mm diameter punches.

2.1.2. Analytical procedures

2.1.2.1. NIR spectroscopy. Equipment and software: The spectrometer used was a multi-purpose analyser (MPA) from Bruker Optics (Belgium). This spectrometer was designed for the routine lab as well as for at-line applications and method development.

The fibre optic module and the transmission unit were used in this application. The fibre optic module was used to follow the mixing kinetics and the transmission unit was used for the tablet assay.

The reflectance probe was a Series 400 Diffuse Reflectance Probe from Precision Sensing Devices (Massachusetts, USA). It was linked to the spectrometer with a bifurcated fibre optic from Precision Sensing Devices.

The detector used by both reflection and transmission measurements is a high sensitivity InGaAs detector.

The MPA was completely software controlled by the OPUS software Version 5.0 which was provided by Bruker Optics. OPUS IDENT is a software package designed to identify substances by their NIR spectra while OPUS Quant is designed for the quantitative analysis.

For this purpose, QUANT used a partial least square (PLS) fit method. In PLS, the calibration involves correlating the data in the spectral matrix X with the data in the concentration matrix Y .

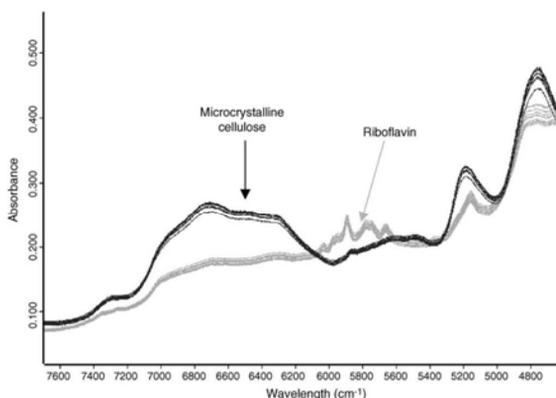


Fig. 2. NIR raw spectra of riboflavin and microcrystalline cellulose.

The X and Y matrices are reduced to only a few factors using all of the available information. The final model consists of a score matrix for X and a score vector for Y which are linearly related. This means that the factoring of the spectral data is more suited for concentration prediction.

Construction of the PLS model: In a first step a PLS regression model was built using calibration samples. The obtained model was chemometrically validated by leave-one-out cross-validation. The final PLS model was described by a selected spectral region, a certain spectra pretreatment and a number of PLS factors. To build the model, five different concentration tablets were prepared and ten tablets were measured per concentration.

To obtain these different concentrations, only the tablet weight was varied during the production on the rotary press. The tablet weights were 80, 100, 120, 140, and 160 mg with each tablet containing the same active substance centesimal composition. Each spectrum was the average of 32 scans and the spectrophotometer was operated at a resolution of 8 cm^{-1} .

Spectral data pretreatments: NIR spectra are affected by the state of the analysed material (i.e. powder surface, tablet surface, etc.). The baseline can drift and maximum absorbance may change. Spectral pretreatments correct these interferences [13,14]. In our study, a normalisation and a first derivative were used to enhance spectral information and to reduce baseline drift. The normalisation method used was a vector normalisation.

This method calculates the average y -value of the spectrum. The average value is subtracted from the spectrum decreasing the mid-spectrum to $y=0$. The sum of the squares of all y -values is calculated and the spectrum is divided by the square root of this sum.

After the normalisation, a first derivative was applied using the Savitzky-Golay algorithm. This algorithm allows a simulta-

neous smoothing of the spectrum to reduce the noise generated by derivation. The number of smoothing points was 17.

UV-vis reference method: The reference method was a UV-vis cell measurement of absorbance at 440 nm, path length 10 mm, using a HITACHI U-3010 spectrometer (Tokyo, Japan). As it is a destructive method, it was performed on powder sample or tablet one by one after the NIR measurement.

Riboflavin from each powder sample or tablet was dissolved in 25 ml of a 14 g/l anhydrous sodium acetate solution. Each solution was stirred for 1 h 30 min and then centrifuged at 4000 rpm for 15 min. A 1-ml volume of the supernatant was diluted to 20 ml with the sodium acetate solution.

2.1.3. Agreement between the two methods for unknown samples: validation of the model

Fifty unknown samples were randomly taken at different concentration levels. All these tablets were assayed by NIR spectroscopy using the building model for 3 days. The third day, these tablets were assayed by UV-vis spectrophotometry.

To compare the two techniques a statistical method described by Bland and Altman was used [15].

3. Results and discussions

3.1. Powder mix homogeneity

3.1.1. NIR spectroscopy

The conformity test was used to follow the mixing kinetics [16]. The conformity test is an easy method to test the deviation of measured NIR spectra within certain limits. To set these limits, samples of the final product are needed as reference spectra which belong to at least one batch or one production cycle. These reference spectra vary within the accepted range

of specifications. The NIR spectra of these samples reflect the different sample variations and give a confidence band in the spectral range. To pass the conformity test, the spectrum of a new sample has to be within this confidence band at each wavelength.

First, the average and the standard deviation σ of the absorbance values have to be calculated for each wavelength. The mean value \pm the standard deviation determines the confidence band within the spectral range and defines which amount of variations on each spectral wavelength is acceptable for the particular product.

Secondly, it has to be checked whether the spectrum of a sample to be tested is within the defined confidence band in the spectral range. The difference between this sample and the average of the reference samples is calculated on each wavelength i . This absolute deviation is weighted by the corresponding standard deviation σ at the respective wavelength, which results in a relative deviation referred to as conformity index (CI).

$$CI = \frac{A_{\text{reference},i} - A_{\text{sample},i}}{\sigma_{\text{reference},i}}$$

The first step of our study was to take the NIR reflectance spectra of the pure components. A range with a weak noise to signal ratio was selected (7500–4600 cm^{-1}). These spectra are shown in Fig. 2 whereas Fig. 3 shows the first derivative of these spectra.

In Fig. 4, a decrease of the conformity index is observed during the mixing. The homogeneity is reached when the conformity index remains constant.

3.1.2. Sample thief technique

The mixing homogeneity was confirmed by a validated UV–vis spectrophotometry method.

Ten samples were taken and assayed after each blend. Fig. 5 shows that each sample was within 10% of the mean concentration and that the relative standard deviation value was less than 5%.

3.2. Tablet assay

Fig. 6 shows the raw spectra obtained with the calibration samples. A vector normalisation was applied to these spectra.

From these spectra, two regions were selected, the first one between 11,250 and 8500 cm^{-1} (see Fig. 7), the second one between 7900 and 7350 cm^{-1} (see Fig. 8).

All tablets were also analysed by a validated UV–vis spectrophotometry method.

The linearity, the trueness, and the precision (repeatability and intermediate precision) were assessed.

3.2.1. Linearity

The linearity of an analytical method is its ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentrations (quantities) of the analyte in the sample [17,18].

A good linearity was obtained. The regression model gives the following equation:

$$Y = -0.00373 + 0.995X$$

where Y are the results (μg) and X is the introduced amount (μg).

The coefficient of determination (r^2) is equal to 0.997.

3.2.2. Trueness

The trueness of this validated UV–vis technique is presented in Table 1. The trueness refers to the closeness of agreement between a conventionally accepted value or reference value and

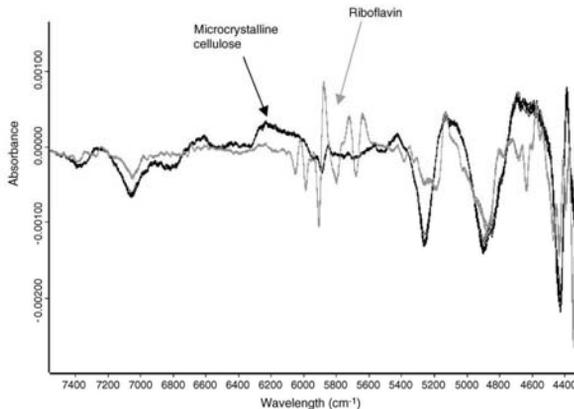


Fig. 3. First derivative spectra of microcrystalline cellulose and riboflavin.

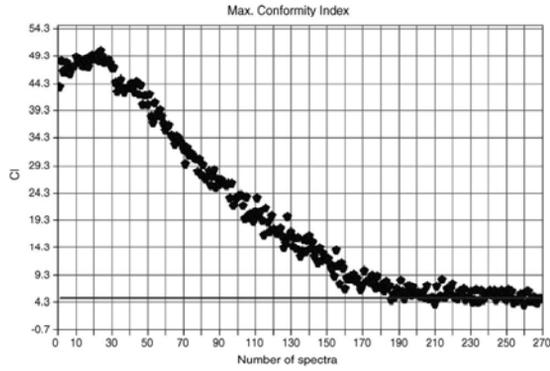


Fig. 4. Evolution of conformity index during mixing.

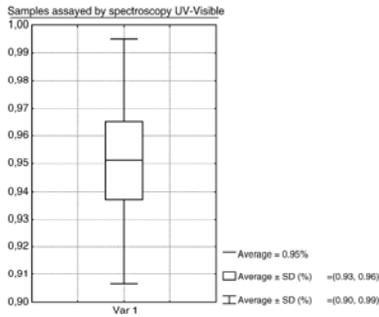


Fig. 5. Assay of powder blend samples by UV-vis spectrophotometry.

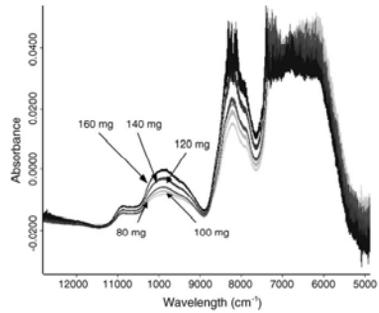


Fig. 6. NIR raw spectra of calibration tablet after vector normalisation.

Table 1
Trueness of the UV-vis tablet assay

Amount level	Absolute bias (μg)	Relative bias (%)	Recovery (%)
1	-1.67×10^{-3}	-6.59×10^{-2}	99.93
2	7.22×10^{-3}	0.15	100.1
3	-3.17×10^{-2}	-0.42	99.58
4	-1.44×10^{-2}	-0.15	99.85
5	5.01×10^{-3}	4.12×10^{-2}	100.0

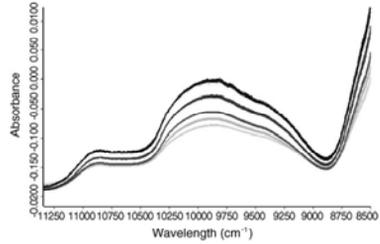
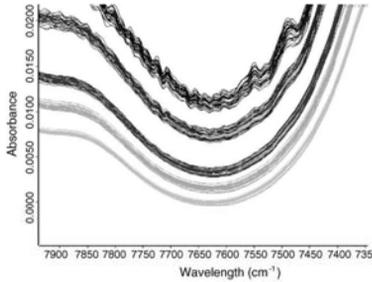


Fig. 7. Range between 11,250 and 8500 cm^{-1} .

Fig. 8. Range between 7900 and 7350 cm^{-1} .Table 2
Precision of the UV–vis tablet assay

Amount level	Repeatability (R.S.D.%)	Intermediate precision (R.S.D.%)
1	2.5	2.8
2	1.2	1.5
3	0.7	0.8
4	0.4	0.4
5	0.3	0.4

a mean experimental one [18]. It gives information on systematic error.

3.2.3. Precision

The precision of this validated UV–vis technique is presented in Table 2. Precision is the closeness of agreement among measurements from multiple sampling of a homogeneous sample under the recommended conditions [19]. It gives some infor-

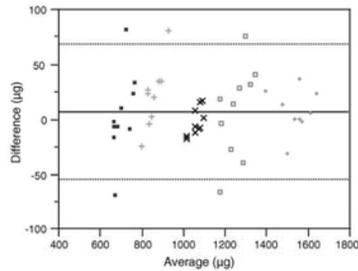


Fig. 10. Distribution of the differences between the two methods against their mean.

mation on random errors and it can be evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision.

To evaluate the predictability of the model, the relative standard error of prediction (RSEP) was used [19]:

$$\text{RSEP} (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (C_{\text{UV-vis}} - C_{\text{NIR}})^2}{\sum_{j=1}^n C_{\text{UV}}}}$$

where C is the amount of riboflavin as measured by the UV–vis (reference) and n is the number of samples.

The chosen model had a RSEP value of 2.7%. This regression model gave a coefficient of correlation (r^2) of 99.23. This regression is shown in Fig. 9.

3.3. Agreement between the two methods for unknown samples: validation of the model

According to Bland and Altman's method, the first step is to examine the data. A simple plot of the results given by a

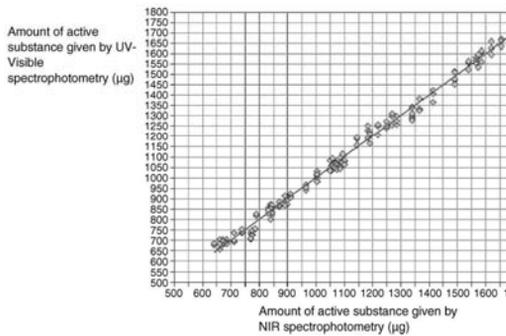


Fig. 9. Regression of the calibration samples.

Table 3
R.S.D. (%) of the amount of riboflavin obtained by the two techniques at each concentration level

	Concentration level				
	1	2	3	4	5
NIR	4.15	2.35	4.20	4.56	4.76
UV-vis	5.92	3.13	5.99	7.50	4.76

method versus those of the other one is a useful start. However, the data points will usually be clustered near the line and it will be difficult to assess between method differences so that a plot of the difference between the methods against their mean is chosen. This plot of data may be more informative. The lack of agreement could be summarised by calculating the bias, estimated by the mean difference \bar{d} and the standard deviation of the differences (S.D.). Fig. 10 shows the distribution of the differences against their mean.

Five points are outside of the limit $\bar{d} \pm 2$ S.D. This could be explained by a more important variability of the UV-vis spectrophotometry method compared to the NIR technique. The higher variability of the UV-vis technique could also be observed by the R.S.D. values (%) at each concentration level. Table 3 shows these R.S.D. values (%).

For each level concentration (except the last one), R.S.D. of the UV-vis absorbance values is always higher than R.S.D. of the NIR spectroscopy measurements.

The fact that five points are outside the limit ± 2 S.D. is not a problem because these points represent the difference between the two methods; moreover, in the range of interest (1000 μg), there is no problem.

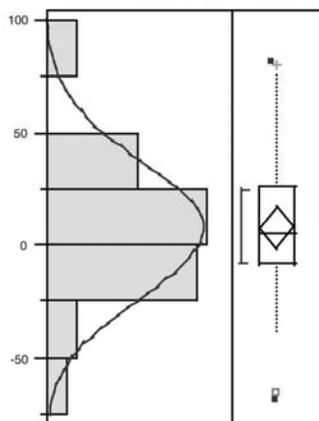


Fig. 11. Normal distribution of differences.

Table 4
Trueness of the NIR tablet assay

Amount level	Absolute bias (μg)	Relative bias (%)	Recovery (%)
1	8.0×10^{-2}	1.11×10^{-2}	100.0
2	-0.4786	-5.66×10^{-2}	99.94
3	0.86	8.03×10^{-2}	100.1
4	-0.27×10^{-2}	-2.12×10^{-2}	99.98
5	-5.00	-0.32	99.68

Table 5
Precision of the NIR tablet assay

Amount level	Repeatability (R.S.D.%)	Intermediate precision (R.S.D.%)
1	3.72	3.86
2	4.29	4.30
3	2.30	2.44
4	4.26	2.26
5	4.45	4.45

Afterwards, the distribution of differences has been observed (Fig. 11). This distribution is normal with a mean of 7.14 μg and a standard deviation of 30.46 μg .

After 3 days of measurement, the trueness, the precision, and the accuracy of the NIR method were evaluated as shown in Tables 4 and 5 and in Fig. 12.

Accuracy refers to the closeness of agreement between the test results and the accepted reference values. The accuracy takes into account the total error, i.e. systematic and random errors, related to the test result. The acceptance limits were set at $\pm 15\%$ as described in the European Pharmacopoeia for tablet containing less than 2 mg of active substance.

Fig. 12 shows the accuracy profile of the NIR technique. The plain line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits and the dotted curves represent the acceptance limit (15%) [18,20,21]. We can see on this graph that there is no relative bias in measurements when the predicted model is used.

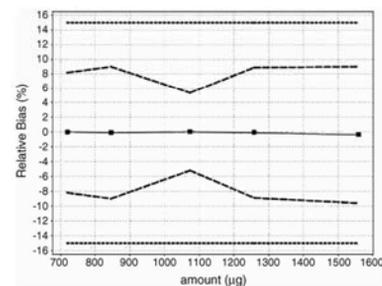


Fig. 12. Accuracy profile of the NIR technique.

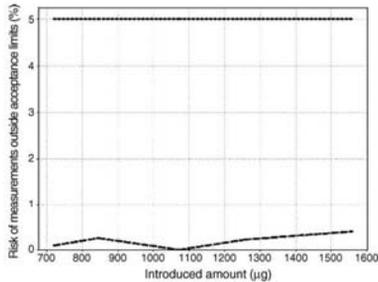


Fig. 13. Risk profile of the NIR technique.

This approach gives the guarantee that each further measurement of unknown samples is within the tolerance limits at the 5.0% level.

The risk profile of our method was evaluated and for all the range, the risk is less than 1%.

Fig. 13 shows the risk profile, the dotted line represents the maximum risk level chosen (5%).

4. Conclusions

It is most unlikely that different assay methods will agree by giving the identical result for all individual assays. In this study, we want to show how a new method differs from a conventional one. The results obtained in this study show that the NIR spectroscopy technique offers some advantages over the conventional UV–vis spectrophotometry method. Compared to the conventional technique, the NIR spectroscopy method is faster, non-destructive, and gives less variability. It has been shown that NIR spectroscopy can replace safely the UV–vis spectrophotometry.

Acknowledgements

Thanks to Bruker Belgium for supplying us the NIR equipment. Thanks also to GEA-Collette for the instrumentation of

the Gral 10 bowl. The Ministry of the French Community of Belgium financially supported this work.

References

- [1] PXT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance, FDA, 2004 (<http://fda.gov/cder>).
- [2] E.W. Ciurczak, J.K. Drennen, *Practical Spectroscopy Series: Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*, vol. 31, M. Dekker, New York, 2002, 192 pp.
- [3] W. Flügge, C. Van der Vlies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 797–803.
- [4] C.I. Gerhäuser, K.A. Kovar, *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 1594–1510.
- [5] M.J. Vredenberg, P.W.J. Caspers, R. Hoogerbrugge, D.M. Barends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 489–499.
- [6] S.S. Sekulic, H.W. Ward, P.K. Aldridge, *Anal. Chem.* 68 (1996) 509–513.
- [7] M. Blanco, A. Eustaquio, J.M. Gonzalez, D. Serrano, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 139–148.
- [8] C. Abrahamsson, J. Johansson, A. Sparen, F. Lindgren, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 69 (2003) 3–12.
- [9] J. Gottfried, H. Dupui, M. Fransson, M. Jongeneelen, M. Josefson, F.W. Langkilde, D.T. Witte, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495–1503.
- [10] P. Merckle, K.-A. Kovar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 365–374.
- [11] R.P. Cogdill, C.A. Anderson, J.K. Drennen, *Pharm. Technol.* (2004) 29–34.
- [12] J. Sun, *J. Chemom.* 11 (1997) 525–532.
- [13] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777.
- [14] T. Fear, *NIR News* 10 (1999) 10–11.
- [15] J.M. Bland, D.G. Altman, *Lancet* (1986) 307–310.
- [16] G.E. Ritchie, H. Mark, E.W. Ciurczak, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4 (2003) 1–10 (Article 24).
- [17] Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, Ph. Lagorce, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 135–148.
- [18] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586.
- [19] A. Eustaquio, P. Graham, R.D. Joe, A.C. Moffat, A.D. Trafford, *Analyst* 123 (1998) 2303–2306.
- [20] B. Boulanger, W. Dewé, P. Chiap, J. Crommen, Ph. Hubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 753–765.
- [21] R.D. Marini, P. Chiap, B. Boulanger, S. Rudaz, E. Rozet, J. Crommen, Ph. Hubert, *Talanta* 68 (2006) 1166–1175.

**Validation of manufacturing process of
Diltiazem HCl Tablets by NIR
spectrophotometry (NIRS)**

C. Bodson, E. Rozet, E. Ziemons, B. Evrard, Ph.
Hubert, L. Delattre

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
2007, in Press

Validation of manufacturing process of Diltiazem HCl Tablets by NIR spectrophotometry (NIRS)

C. Bodson^{a,*}, E. Rozet^b, E. Ziemons^b, B. Evrard^a, Ph. Hubert^b, L. Delattre^a

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology, University of Liege, 1 Avenue de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium

^b Laboratory of Analytical Chemistry, University of Liege, 1 Avenue de l'hôpital, 4000 Liège, Belgium

*Corresponding Author: cbodson@ulg.ac.be

TEL: 0032-4-3664301

Fax: 0032-4-3664302

Abstract

The goal of this study was to apply the Process Analytical Technology FDA's initiative in pharmaceutical tablets manufacturing. Near Infrared spectrophotometry (NIRS) was used as a non destructive, very fast technique requiring no sample preparation.

Direct compression powder blends containing Diltiazem HCl as a model drug were pressed into tablets for the calibration and the validation steps.

First, a partial least squares model was built to calibrate the NIR spectrometer. Then, this model was validated and compared with a validated UV spectrophotometry reference method. For this comparison, the Bland and Altman's statistical method was applied.

The manufacturing process was validated by producing three batches at three different concentration levels. The NIR analysis of these batches was performed during three days.

This study shows that NIRS can be used to validate the whole manufacturing process and not only as an analytical method for tablets assay. NIRS is an interesting tool to show possible variations during the manufacturing process which could lead the finished product to fall outside of specifications.

Keywords

NIR spectroscopy, validation, manufacturing process, tablet assay, PAT.

Introduction

Pharmaceutical controls are time-consuming and require a lot of sample preparation. Process Analytical Technology (PAT) implementation in the pharmaceutical industry would reduce these time consuming operations. One of the most interesting outcomes that PAT offers is the real time release once the last manufacturing step is finished [1]. The real time release is the ability to evaluate and ensure the quality of in-process and final product based on process data [2].

The present manufacturing process time compared to the time spent on quality testing after manufacturing is very low, so real time release offers some significant benefits for the manufacturer. PAT applications involve that sophisticated quality controls are moving from the laboratory to the process or manufacturing plant [3].

To perform this implementation, the use of analytical techniques capable of providing accurate results in a simple and a rapid manner is necessary [4]. During this study, the near-infrared spectroscopy (NIRS) which is a technique that meets these requirements has been used. NIRS is a nondestructive technique that permits determination of chemical and physical properties [5]. Other advantages include speed, simplicity and no sample preparation as required by conventional analytical methods. The NIR region spans the wavelength range $12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. NIRS is also remarkably versatile. If sample contains bonds such as C-H, N-H, or O-H, and if the concentration of

the analyte exceeds about 0.1% of the total composition, then it is very likely to yield acceptable results.

One example of studies in which quantitative analysis has been performed using the NIRS technique is the intact tablet assay [6, 7, 8, 9]. Usually, these publications present a comparison between the NIRS and a conventional technique. The validation is only focused on the analytical technique. The aim of this study is the validation of the whole manufacturing process by assaying the final dosage form with NIRS in transmission mode. The idea was to demonstrate that NIRS could be used as a real time release system if the analyzed final product meets suitable quality criteria.

In our work, the studied formulation was a direct compression formulation using Diltiazem HCl as the model drug.

Materials and Methods

Chemicals

Diltiazem hydrochloride (Pharm.Eur.5th) was purchased from Roig Farma[®] (Barcelona, Spain). Lactose monohydrate (DCL 15[®]) was provided by DMV International (Veghel, The Netherlands). Microcrystalline cellulose (Avicel PH 102[®]) was supplied by FMC (Brussels, Belgium). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200[®]) and Magnesium Stearate were obtained from Alpha Pharma (Braine-l'Alleud, Belgium).

All solvents used in the reference method were of analytical grade.

Tablets Manufacturing

For the NIRS equipment calibration, three different tablet concentration levels were manufactured: 5, 10 and 15 % (w/w). Blends were mixed in a high shear mixer Gral-10[®] (Collette, Wommelgem, Belgium) during 5 minutes without Magnesium Stearate at 400 rpm. The lubricant was then added and mixed during 1 minute.

Blends were directly tableted using a rotary press (RO/2, GEA-Courtoy, Halle, Belgium). Flat faced tablets were obtained using round punches with a diameter of 7 mm. Tablets weight was fixed approximately at 140 mg respectively for each concentration and the tablet hardness was fixed at ~90 N. The active ingredient amounts inside the tablets for the different batches were 7, 14 and 21 mg respectively.

FT-NIR Equipment

Intact tablets were analyzed by transmission mode with a multipurpose analyzer (MPA[®]) Fourier transform near infrared spectrometer (Bruker Optics, Brussels, Belgium) equipped with a room temperature-indium gallium arsenide (RT-INGaAs) external detector positioned above the tablet. The spectra were collected with the Opus software 5.0 (Bruker Optics, Brussels, Belgium). Each spectrum was the average of 32 scans and the resolution was 8 cm⁻¹ over the range from 12500 to 4000 cm⁻¹.

UV Reference Method

A validated UV spectrophotometry method was used as a reference method (see Table 1). The absorbance of sample was measured at 240 nm with an optical path length of 10 mm by using a HITACHI U-3010 (Tokyo, Japan). Each tablet was weighed and transferred to a 20-ml volumetric flask. The active ingredient was dissolved with a phosphate buffer at pH 6.5 (prepared with 0.05 M KH₂PO₄ and 0.6 mM NaOH in 1000 ml water). Each sample was centrifuged at 4000 rpm during 10 minutes. The supernatant were then analyzed after dilution in the buffer.

Development of Calibration Models

A Partial least squares (PLS) calibration model was used for the calibration of the NIRS equipment. In PLS, the calibration involves correlating the data in the spectral matrix X with the data in the concentration matrix Y. The X and the Y matrices are reduced to only a few factors using all available information. This model was validated and the risk to use this model in routine was evaluated.

The calibration model was developed with 120 tablets randomly taken in the three concentrations batches. For this step, a leave-one-out cross validation was performed.

The NIRS method was then validated to prove that this analytical method is suitable for its intended use and consequently to show the reliability of the results obtained within well defined limits. To perform this validation, three samples were assayed for each concentration level during three days [10 , 11].

Agreement between NIRS and Reference Method

The agreement between the two methods was evaluated by a statistical analysis described by Bland and Altman [12]. A plot of the differences between the two methods results against their average is used to compare conventional and NIRS techniques. This comparison was performed using nine tablets for each concentration level. This analysis is useful to conclude if the new technique is able to replace the conventional one.

Manufacturing Process Validation

The aim of this study was to demonstrate that the manufacturing process produces, with each batch, a finished product which complies with defined specifications. Three batches per concentration were produced during three days and some tablets were randomly selected from these batches and

analyzed with the validated NIRS technique. Ten tablets per batch and per day were analyzed consisting in a total of 90 samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation and agreement of the two methods

The NIR spectra used for the calibration after vector normalization are shown in Figure 1. The region above 7000 cm^{-1} was selected because below this wavenumber the amount of light reaching the detector is low and the detector signal becomes noisy [13 , 14].

Figure 2 shows the PLS regression with a correlation coefficient value of 0.9979 and a Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) of 0.272 mg. The PLS model chosen required three factors and included a wavenumber range from 10250 to 7000 cm^{-1} with vector normalization and first derivative as spectra pretreatment. These spectra pretreatments correct interferences such as the baseline drift caused by physical state differences of the analyzed samples or maximum absorbance variation.

The reference method and the NIRS method were validated and the validation results are presented in Table 1. No day effect is observed; repeatability and intermediate precision have the same values.

The accuracy and risk profiles were evaluated for each method [15, 16, 17]. The acceptance limits were set at $\pm 10\%$ because each assay was considered as an individual unit assay. Accuracy refers to the closeness of agreement between the test result and the accepted reference value [18]. Accuracy profiles are illustrated in Figure 3 for both analytical methods. The plain line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits and the dotted curves represent the acceptance limits ($\pm 10\%$). As the β -expectation tolerance limits for both analytical methods are included in the acceptance limits, it can be concluded that these methods will provide during routine use results with adequate accuracy.

Based on those accuracy profiles, the risk of having future measurements falling outside the acceptance limits was estimated for each technique. Figure 4 shows their corresponding risk profiles. For each concentration level, the risk to find future results outside the $\pm 10\%$ acceptance limit is below 5%, the maximum risk level chosen. This risk is smaller for the two highest levels than for tablet containing 7 mg of active principal ingredient (API). Once validated, the agreement between the two techniques was evaluated to know if the NIR method could replace the reference method. The Bland and Altman plot is showed in Figure 5. This plot represents the difference between the methods results against their average and displays their agreement. The tolerance interval limits (TI) delimits the area containing 95% of the difference values obtained. As these limits are confined inside the $\pm 10\%$ acceptance limits, the two methods agree sufficiently for the NIRS to replace safely the conventional UV-Visible spectrophotometry. For the manufacturing process validation, the NIRS was therefore used during routine analysis to determine if the produced batches give a finished product meeting the quality criteria.

Manufacturing Process Validation

For the manufacturing process validation, three tablet batches containing 3 levels of API amounts were manufactured each during three different days, resulting in a total of nine batches. Ten tablets were randomly selected from these batches and assayed during three days with the validated NIRS technique. To validate all the manufacturing process, it is useful to evaluate the influence of this process and not only the influence of the analytical method as it is often performed. Figure 6A shows the accuracy profile obtained with the nine batches. As can be seen, the total 95% tolerance intervals are all included in the $\pm 10\%$ acceptance limits demonstrating the ability of the whole process to provide products of adequate quality. In addition, for the three amount levels, we have evaluated the batch to batch

variation representing the production variability together with the day to day and repeatability variation representing the analytical method source of variability. Similarly to the analytical method validation results, no day effect for the three levels was observed. However a batch effect for tablets containing 14 and 21 mg of API (amount level 2 and 3) was present. As it can be seen on the accuracy profile of Figure 6A for these two amounts levels, the total 95% tolerance intervals are wider than the analytical 95% tolerance limits due to this batch effect. This means that although the manufacturing process has an influence on the amount of API included in the tablets, overall the drug products produced will be of acceptable quality.

Table 2 contains details about the tolerance limits for each API amount. The total risk to have a future sample outside the specification limits has been also evaluated. This risk including both the risk of the analytical method and the risk of the manufacturing process to obtain a result outside the specification is smaller than 5‰ for the three types of tablets. Therefore it guarantees to the laboratories as well as the regulatory bodies that in the future less than 5 tablet out of 1000 produced will have a quantity of API at more than 10% of the targeted dose.

Then, in order to improve the results, the final result of an assay was considered as the mean of two or five measurements. Figure 6B and C show respectively the improved accuracy profiles. The batch effect is always present, indeed the only variability that is improved is the repeatability variance of the analytical procedure which is reduced by a factor of $\sqrt{2}$ or $\sqrt{5}$ respectively. In the first situation the risk to have future measurement outside the specifications is reduced to maximum 1‰ whereas in the second one the risk amounts is reduced to maximum 0.4‰ of the API amount. Due to the batch observed, a profile with narrower acceptance limits cannot be envisaged in the case of the two highest quantity levels of Diltiazem HCl tablets.

This batch effect could be due to an artifact during the manufacturing process. During the manufacturing process investigation, the only problem

met is API agglomerates which appear with the highest API concentrations. Normally, these agglomerates are broken during the manufacturing process but maybe not enough for certain batches. These agglomerates could modify the mixing homogeneity and these homogeneity alterations could be therefore responsible of variations in API tablet amounts.

CONCLUSIONS

During this study, we showed that NIRS is an interesting tool as a real time release system. The validation of the manufacturing process has shown that there is not only an influence of the analytical technique but the manufacturing process should also be considered.

We have demonstrated that with our model we have a batch effect and no day effect. It means that the manufacturing process influences the finished product analysis and this should be taken into consideration during the finished product analyses. The risk to obtain future tablets exceeding the specification limits was also estimated. One way to reduce effectively this risk is to consider a result as an average of several independent results. This is a cost effective solution when considering NIRS as quality control technique for batch releases due to the rapidity of the analysis.

A validation of the manufacturing process has therefore been performed which fits with PAT concept allowed to manage the risk of obtaining out of specifications products.

Acknowledgements

The Ministry of the French Community of Belgium financially supported this work. Thanks are due to the Walloon Region and the European Social Fund for a research grant to E.R. (First Europe Objective 3 project No.215269).

Thanks to Arlenda[®] for the validation software.

Figure 1: NIR spectra used for the calibration of the NIR spectrometer

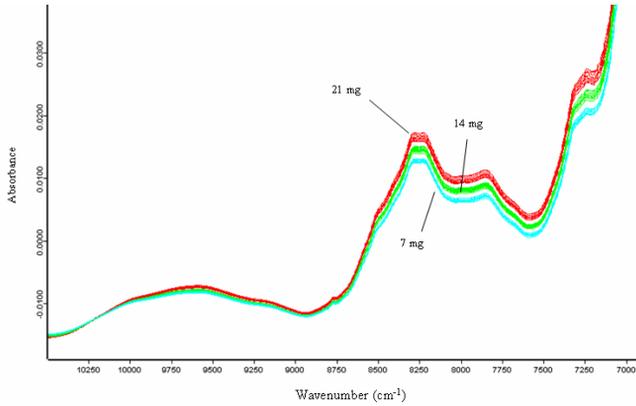


Figure 2: PLS calibration: API amount obtained by UV vs NIR spectrophotometry

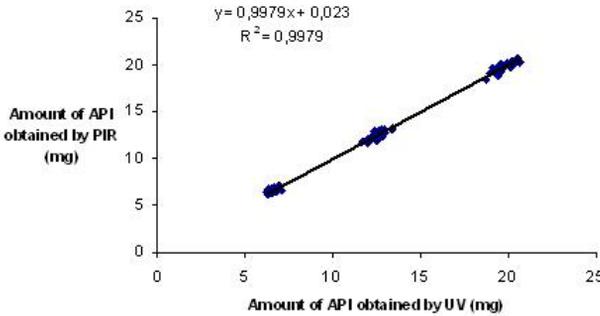


Figure 3: Accuracy profiles obtained during validation of UV Reference method and NIRS method. The plain line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits and the dotted curves represent the $\pm 10\%$ acceptance limits. The dots represent the individual results.

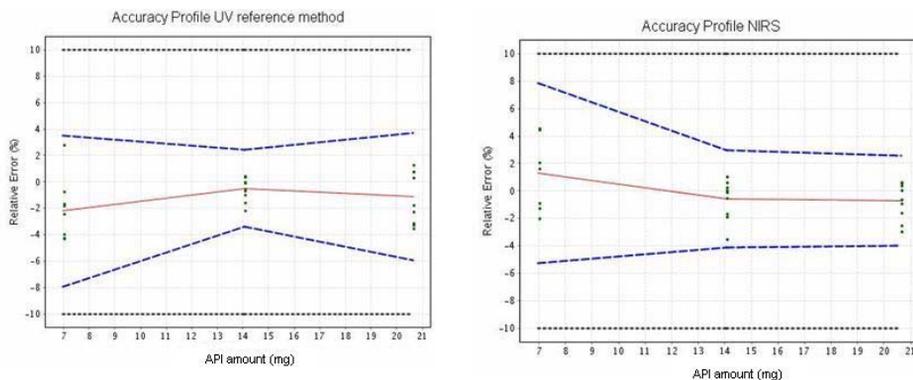


Figure 4: Risk profiles to have a sample outside the specifications for UV reference method and NIRS method. The dotted line represents the maximum tolerated risk settled at 5%. The dashed line represents the effective risk of having future results falling outside the $\pm 10\%$ acceptance limits.

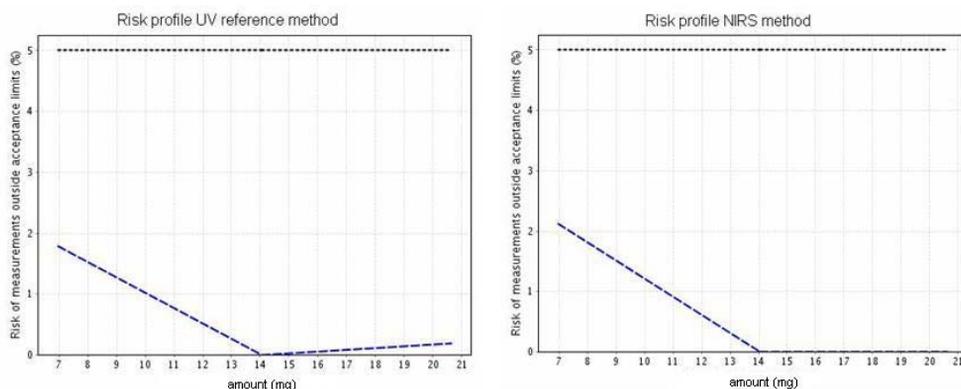


Figure 5: Bland and Altman's plot: Differences between the 2 methods against mean for each concentration level. The continuous lines are the $\pm 10\%$ acceptance limits. The dashed lines are the 95% agreements limits.

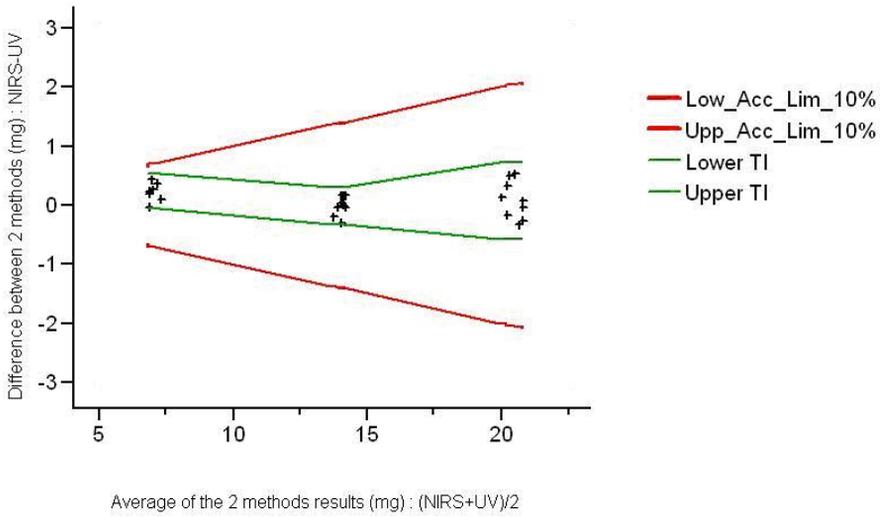


Figure 6: Accuracy profiles obtained after batches analysis considering the final result of an assay directly (A) or as the mean of 2 (B) or 5 measurements (C).

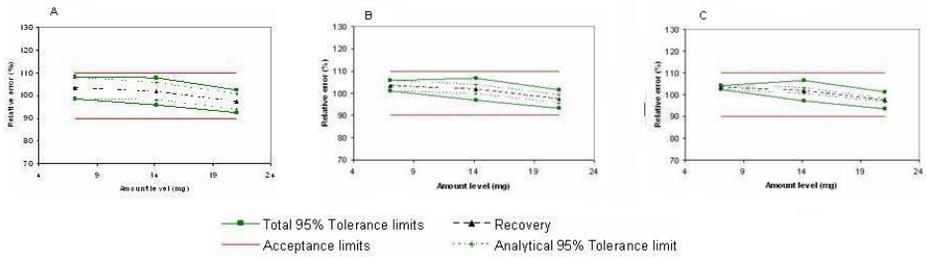


Table 1: Validations results of Reference UV-Method and NIRS method

Parameter	API content (mg)	UV Reference method	NIRS method
Trueness (recovery%)	7	97.8	101.3
	14	99.5	99.9
	21	98.9	99.3
Repeatability (RSD%)	7	2.3	2.7
	14	0.6	1.4
	21	1.9	1.3
Intermediate precision (RSD %)	7	2.3	2.7
	14	0.9	1.4
	21	1.9	1.3
Linearity of results	Intercept	-0.076	0.189
	Slope	0.9945	0.9831
	r ²	0.998	0.998
Limits of quantification (LOQ) mg	Lower LOQ	7.0	7.0
	Upper LOQ	21.6	21.6

Table 2: Results of batches analysis and manufacturing process validation

Amount (mg)	Recovery (%)	Total Relative upper tolerance limit (%)	Total Relative lower tolerance limit (%)	Analytical Relative upper tolerance limit (%)	Analytical Relative lower tolerance limit (%)	Total risk (%)
7.1	103.3	108.0	98.6	108.0	98.6	0.3
14.2	101.8	107.7	95.9	105.7	97.9	0.4
21.6	97.4	102.5	92.3	100.8	94.0	0.2

REFERENCES

- [1] E. T. S. Skibsted, PhD thesis: PAT and Beyond. 2005.
- [2] American Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. FDA. 2004.
- [3] L. Rodrigues, T. Alves, J. Cardoso, and J. Menezes, *IDrugs* 9 (2006) 44-48.
- [4] M. Blanco, M. Alcalá, J. M. Gonzalez, and E. Torras, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2137-2144.
- [5] E.W. Ciurczak and J.K.Drennen, *Handbook of near-infrared analysis*, D. A. Burns and Ciurczak E.W. (Eds), 2001, pp. 609-632.
- [6] Y. Chen, S. S. Thosar, R. A. Forbess, M. A. Kemper, R. Rubinovitz, and A. J. Shukla, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 623-631.
- [7] J. D. Kirsch and J. K. Drennen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 351-362.
- [8] M. Laasonen, T. Harmia-Pulkkinen, C. Simard, M. Rasanen, and H. Vuorela, *Anal. Chem.* 75 (2003) 754-760.
- [9] T. Li, A. D. Donner, and C. Choi, *J Pharm Sci* 92 (2003) 1526-1530.
- [10] B.Boulanger, W.Dewé, P.Chiap, J.Crommen, and Ph.Hubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 753-765.
- [11] J. J. N.-H. Ph.Hubert, E. C. P. C. B.Boulanger, P.-A. C. W. D. M. F. M. L. N.Cohen, N. M. M.Laurentie, G.Muzard, C.Nivet, and L.Valat, *J Pharm Biomed. Anal.* 36 (2004) 579-586.
- [12] J. M. Bland and D. G. Altman, *Lancet* 1 (1986) 307-310.
- [13] J. L. Ramirez, M. K. Bellamy, and R. J. Romanach, *AAPS PharmSciTech* 2 (2001) 1-10.

[14] J. Gottfries, H. Depui, M. Fransson, M. Jongeneelen, M. Josefson, F. W. Langkilde, and D. T. Witte, *J Pharm Biomed. Anal.* 14 (1996) 1495-1503.

[15] R. D. S. A.-C. Marini, E. Rozet, P. Chiap, B. Boulanger, S. Rudaz, J. Crommen, P. Hubert, and M. Fillet, *J. Chrom. A.* 1120 (2006) 102.

[16] E. Rozet, R. Morello, F. Lecompte, G. B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K. S. Boos, and P. Hubert, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 251-260.

[17] B. Boulanger, W. Dewe, A. Gilbert, B. Govaerts, and M. Maumy-Bertrand, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, In press.

[18] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva 2005.

