



WORLD HEALTH ORGANIZATION  
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE



Ce document est destiné à être joint aux spectres infrarouges internationaux de référence. Le Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques l'a adopté à titre provisoire lors de sa réunion du 30 novembre au 4 décembre 1992. Les experts, de même que les institutions et les spécialistes intéressés sont maintenant invités à présenter leurs observations en vue de la rédaction de la version finale du document. Ces observations doivent être envoyées au Dr A. Mechkovski, Assurance de la qualité des médicaments, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse avant la fin du mois d'avril 1993.

## RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES POUR LA PRÉPARATION ET L'UTILISATION DES SPECTRES INFRAROUGES DANS L'ANALYSE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

### Introduction

Le domaine infrarouge du spectre électromagnétique utilisé en analyse pharmaceutique est l'infrarouge moyen, qui s'étend de  $4000$  à  $600 \text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$ - $16,7 \mu\text{m}$ ).

Les mesures spectrophotométriques dans l'infrarouge sont principalement utilisées pour l'identification. Chaque substance est caractérisée par un spectre infrarouge unique (à l'exception des énantiomères, dont les spectres sont identiques en solution). Toutefois, le polymorphisme et d'autres facteurs comme la taille et l'orientation des cristaux, le procédé de broyage utilisé et la formation éventuelle d'hydrates, peuvent entraîner de petites modifications du spectre d'un composé à l'état solide. La présence de petites quantités d'impuretés dans la substance examinée n'affecte généralement qu'assez peu le spectre infrarouge. L'identification d'une substance consiste à comparer son spectre avec celui d'une substance de référence préparée simultanément ou avec un spectre étalon de référence.

Les termes *densité optique* (ou *absorbance*), *transmission*, *absorptivité* et *spectre d'absorption* sont définis dans la *Pharmacopée internationale*, 3e édition, volume 1, pages 33-34 sous le titre "Spectrophotométrie dans le visible et l'ultraviolet", tandis que le terme *extinction spécifique* est mentionné dans la préface du volume 3, page 10.

### Appareillage

Les spectrophotomètres infrarouges classiques utilisent des réseaux ou des prismes pour disperser le rayonnement infrarouge. En outre, grâce aux progrès réalisés dans le matériel électronique de

This document is not issued to the general public, and all rights are reserved by the World Health Organization (WHO). The document may not be reviewed, abstracted, quoted, reproduced or translated, in part or in whole, without the prior written permission of WHO. No part of this document may be stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means - electronic, mechanical or other - without the prior written permission of WHO.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas destiné à être distribué au grand public et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Il ne peut être commenté, résumé, cité, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, sans une autorisation préalable écrite de l'OMS. Aucune partie ne doit être chargée dans un système de recherche documentaire ou diffusée sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit - électronique, mécanique, ou autre - sans une autorisation préalable écrite de l'OMS.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

laboratoire, il est maintenant possible de coupler un interféromètre à un ordinateur pour générer un spectre infrarouge en opérant une transformation de Fourier sur l'interférogramme. Ces instruments sont appelés spectrophotomètres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR). A quelques petites différences près concernant la fréquence inférieure de coupure, tous ces instruments fournissent des données comparables et on peut en général utiliser les uns ou les autres indifféremment pour les analyses qualitatives. Toutefois, chaque instrument possède des caractéristiques particulières en ce qui concerne le rapport signal/bruit et la résolution.

Les spectrophotomètres utilisables pour les épreuves d'identification fonctionnent dans la région du spectre qui s'étend de  $4000$  à  $600\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$ - $16,7\text{ }\mu\text{m}$ ), et dans certains cas jusqu'à  $250\text{ cm}^{-1}$  ( $40\text{ }\mu\text{m}$ ). Si l'on a recours à la technique de réflexion totale atténuée, l'appareil devra comporter un dispositif approprié à réflexion unique ou multiple. Ce dispositif et son support doivent pouvoir être alignés dans le spectrophotomètre de façon à obtenir une transmission maximale.

#### Méthode de vérification de l'échelle du nombre d'onde et de la résolution

Enregistrer le spectre d'un film de polystyrène de  $0,05\text{ mm}$  d'épaisseur. Les nombres d'ondes, exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ , des maximums d'absorption sont les suivants:

$3027, 2851, 1944, 1871, 1802, 1601, 1583, 1181, 1154, 1069, 1028, 907, 699$ . Les écarts tolérés sont de  $\pm 8\text{ cm}^{-1}$  dans la plage  $4000$ - $2000\text{ cm}^{-1}$  et  $\pm 4\text{ cm}^{-1}$  dans la plage  $2000$ - $600\text{ cm}^{-1}$ .

La différence entre le pourcentage de transmission au minimum d'absorption de  $2870\text{ cm}^{-1}$  et au maximum de  $2851\text{ cm}^{-1}$  doit être supérieure à 18 et la différence entre le pourcentage de transmission au minimum d'absorption de  $1589\text{ cm}^{-1}$  et au maximum de  $1583\text{ cm}^{-1}$  supérieure à 12.

#### Milieu ambiant

On évitera de préparer les échantillons à examiner dans une zone où l'humidité est élevée. Il est souhaitable de conserver les halogénures, les plaques de chlorure de sodium et tous les accessoires nécessaires sur gel de silice dans un dessiccateur à la température ambiante. Il est également souhaitable de préparer les échantillons dans une pièce où il est possible de régler la température et l'humidité. Une autre solution consiste à effectuer toutes les manipulations sous une lampe à infrarouges.

#### Utilisation de solvants

Les solvants utilisés en spectrophotométrie infrarouge ne doivent pas attaquer les cuves, qui sont généralement en chlorure de sodium, bromure de potassium ou un autre halogénure. Chaque fois que cela sera possible, on utilisera des solvants pour spectrophotométrie.

Il n'existe pas de solvant qui soit complètement transparent sur toute l'étendue du spectre infrarouge. Le tétrachlorure de carbone R est pratiquement transparent (jusqu'à  $1\text{ mm}$  d'épaisseur) de  $4000$  à  $1700\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$  à  $6\text{ }\mu\text{m}$ ). Le chloroforme R, le dichlorométhane R et le dibromométhane R peuvent également être utilisés comme solvants. (Le tétrachlorure de carbone R et le chloroforme R ne doivent être utilisés qu'exceptionnellement en raison de leur toxicité). Le sulfure de carbone IR (jusqu'à  $1\text{ mm}$  d'épaisseur) est utilisable jusqu'à  $250\text{ cm}^{-1}$  ( $40\text{ }\mu\text{m}$ ), sauf dans les régions allant de  $2400$  à  $2000\text{ cm}^{-1}$  ( $4,2$  à  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) et de  $1800$  à  $1300\text{ cm}^{-1}$  ( $5,5$  à  $7,7\text{ }\mu\text{m}$ ), où il absorbe fortement. On notera également qu'il présente une faible absorption entre  $875$  et  $845\text{ cm}^{-1}$  ( $11,4$  à  $11,8\text{ }\mu\text{m}$ ). Le domaine de transparence des autres solvants est relativement étroit.

### Préparation de la substance à examiner

Avant d'enregistrer le spectre infrarouge d'une substance, on doit lui faire subir une préparation, selon les instructions ci-après. Les liquides peuvent être examinés directement ou en solution dans un solvant convenable. Dans le cas des solides, les méthodes habituelles de préparation sont les suivantes : on peut disperser l'échantillon solide finement pulvérisé dans de l'huile de paraffine, le mélanger intimement avec un halogénure de potassium desséché et compresser le mélange dans un moule spécial de façon à obtenir une pastille ou un disque transparent, ou encore préparer une solution dans un solvant convenable. La préparation de la substance pour la technique de réflexion totale atténuée est décrite à part.

#### Méthode 1

Triturer la substance solide avec un halogénure de potassium sec et finement pulvérisé (en général du bromure de potassium). Lorsqu'on examine un chlorhydrate, il convient d'employer du chlorure de potassium pour éviter le risque d'échange d'halogénures.

La proportion de substance par rapport à l'halogénure doit être de 1 pour 200 environ – par exemple 1,5 mg dans 300 mg d'halogénure – lorsqu'on utilise un instrument à prisme, ou d'environ 1,0 mg dans 300 mg d'halogénure (1:300) lorsqu'on utilise un instrument à réseau ou à transformée de Fourier. Broyer soigneusement le mélange à l'aide d'un pilon et d'un mortier en agate pendant une minute. Dans des cas exceptionnels, il peut être indiqué d'utiliser un broyeur à bille, mais en général le risque de modification polymorphique est supérieur à l'avantage escompté du point de vue de la résolution. Répartir uniformément le mélange dans un moule spécial et appliquer une pression d'environ 800 MPa. Il est également possible de préparer des disques d'halogénure de potassium à l'aide d'une mini-presse actionnée à la main. Placer le disque obtenu sur un portoir approprié.

Un certain nombre de facteurs peuvent donner lieu à des disques défectueux, par exemple un broyage insuffisant ou excessif, ou bien la présence d'impuretés ou d'humidité dans l'halogénure. A moins que sa préparation ne présente des difficultés particulières, tout disque qui offre un défaut d'uniformité à l'inspection visuelle ou dont la transmission aux environs de  $2000\text{ cm}^{-1}$  ( $5\ \mu\text{m}$ ), en l'absence d'une bande d'absorption spécifique, est inférieure à 75% sans compensation, doit être rejeté.

Il est souvent possible d'améliorer la qualité du spectre en plaçant dans le faisceau de référence un disque d'halogénure de potassium pur de la même épaisseur que le disque à examiner.

#### Méthode 2

Triturer une petite quantité de substance finement pulvérisée avec une quantité minimale d'une huile de paraffine convenable (nujol, par exemple) ou tout autre liquide approprié jusqu'à obtention d'une pâte lisse et crémeuse; 2 à 5 mg de substance suffisent la plupart du temps pour préparer une pâte satisfaisante qui devra être translucide ou transparente. Comprimer une partie de la pâte entre deux plaques de chlorure de sodium ou d'un autre halogénure convenable.

#### Méthode 3

Utiliser une pellicule capillaire de liquide maintenue entre deux lames de chlorure de sodium ou dans une cuve d'épaisseur convenable.

#### Méthode 4

Préparer une solution dans un solvant approprié et utiliser une concentration et une épaisseur de cuve donnant un spectre satisfaisant dans un intervalle de longueur d'onde suffisamment large. En général, on obtient des spectres de bonne qualité avec des concentrations de 1 à 10% p/v pour une

épaisseur de cuve de 0,1 à 0,5 mm. Pour compenser l'absorption du solvant, placer dans le faisceau de référence une cuve identique contenant du solvant pur ou obtenir le spectre de celui-ci pour pouvoir distinguer l'absorption du solvant de celle de l'échantillon. Il est également possible d'enregistrer les spectres d'absorption du solvant et de la solution par rapport à l'air et d'obtenir le spectre de la substance par différence. (Lorsqu'on utilise un FTIR, le spectre du solvant enregistré dans des conditions identiques peut être soustrait numériquement).

### Méthode 5

Les gaz peuvent être examinés dans une cuve transparente au rayonnement infrarouge dont le trajet optique est d'environ 100 mm. Après avoir fait le vide dans la cuve, la remplir à la pression désirée en reliant le récipient contenant la substance à examiner à la cuve par une conduite convenable munie d'un robinet ou d'une soupape à aiguille. Au besoin, amener la cuve à la pression atmosphérique en y introduisant un gaz transparent au rayonnement infrarouge (par exemple de l'azote R ou de l'argon R). Pour éviter les erreurs dues à l'absorption de l'eau, du dioxyde de carbone ou d'autres gaz atmosphériques, placer dans le faisceau de référence une cuve identique ou remplie d'un gaz transparent au rayonnement infrarouge.

#### Identification au moyen d'une substance de référence

Préparer la substance à examiner et la substance de référence selon la même technique, puis enregistrer le spectre de chacune d'elles entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$  (2,5 à 16,7  $\mu\text{m}$ ) environ au moyen d'un spectrophotomètre infrarouge. La concentration de la substance doit être telle que le maximum d'absorption le plus élevé qui lui soit attribuable corresponde à une transmission d'environ 10%.

Si les courbes obtenues par les méthodes 2 ou 3 révèlent que la position et l'intensité relatives des maximums d'absorption du spectre de la substance examinée ne sont pas identiques à celles des maximums de la substance de référence, cela peut être dû à des différences de forme cristalline. Pour éviter ce genre de difficulté, utiliser l'une des méthodes suivantes:

- a) Examiner la substance de référence et l'échantillon en solution à des concentrations semblables.
- b) Déposer 2 à 3 gouttes de solution concentrée dans un solvant organique volatil sur un disque d'halogénure de potassium pur et évaporer à sec dans une étuve à 105 °C. Traiter de la même façon la substance de référence et la substance à examiner.
- c) Recristalliser la substance de référence et la substance à examiner à partir d'un solvant approprié.

Si l'on est gêné dans les régions intéressantes du spectre par l'absorption de l'huile de paraffine utilisée selon la méthode 2, on pourra préparer une autre dispersion de la substance, par exemple dans un hydrocarbure fluoré convenable ou dans l'hexachlorobutadiène R et enregistrer le spectre de cette dispersion dans les régions où l'huile de paraffine absorbe fortement.

#### Identification au moyen d'un spectre de référence

Préparer la substance à examiner en suivant exactement les indications fournies par la note qui accompagne le spectre international de référence et enregistrer le spectre entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$  environ (2,5-16,7  $\mu\text{m}$ ) au moyen d'un appareil soumis à des contrôles fréquents de conformité aux normes établies de fonctionnement. Pour tenir compte d'une éventuelle différence dans l'étalonnage en longueur d'onde entre l'appareil sur lequel le spectre international de référence a été enregistré et celui qui doit être utilisé pour la substance à examiner, comparer le spectre d'un échantillon de polystyrène au spectre international de référence en superposant les maximums d'absorption situés

vers  $2851\text{ cm}^{-1}$  ( $3,5\ \mu\text{m}$ ),  $1601\text{ cm}^{-1}$  ( $6,25\ \mu\text{m}$ ) et  $1028\text{ cm}^{-1}$  ( $9,73\ \mu\text{m}$ ), en utilisant de préférence une encre de couleur différente. Superposer de même les maximums de référence sur ceux du spectre de la substance. Compte tenu de ces maximums d'absorption du polystyrène, on considère qu'il y a identité lorsque les principaux maximums d'absorption du spectre de la substance à examiner coïncident avec les maximums correspondants du spectre international de référence. En comparant les deux spectres, on veillera à tenir compte du fait que l'appareil sur lequel a été enregistré le spectre international de référence et celui qui a été utilisé pour la substance à examiner peuvent ne pas avoir le même pouvoir de résolution. Pour évaluer cette différence éventuelle, on utilisera le spectre international de référence du polystyrène, enregistré sur le même appareil que la collection des spectres internationaux de référence. Les variations les plus importantes dues à des différences de pouvoir de résolution se produisent en général dans la région située entre  $4000$  et  $2000\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$  à  $5\ \mu\text{m}$ ). Toutefois, si les courbes obtenues par les méthodes 2 ou 3 révèlent que la position et l'intensité relatives des maximums d'absorption du spectre de la substance examinée ne sont pas identiques à celles des maximums de la substance de référence, cela peut être dû à des différences de forme cristalline. Dans ce cas, utiliser les autres méthodes décrites ci-dessus sous le titre "Identification au moyen d'une substance de référence."

Lorsqu'on sait qu'une substance peut se présenter sous plusieurs formes polymorphes, la note accompagnant le spectre de référence peut indiquer une autre méthode.

### Techniques de réflexion

#### a) Technique de la réflexion totale atténuée

Pour enregistrer le spectre d'absorption infrarouge d'une substance par la technique de réflexion totale atténuée, il faut en général pulvériser finement la substance solide. La poudre obtenue sera alors soit tassée directement contre l'élément réflecteur du dispositif, soit fixée à l'aide d'un ruban adhésif pour permettre un meilleur contact. Dans ce cas, la substance pulvérulente est étalée sur la face adhésive du ruban pour former une couche presque translucide, après quoi on presse la face du ruban portant la poudre contre l'élément réflecteur. On fixe ensuite la plaque de soutien ou bien on applique une pression modérée au moyen d'une pince convenable pendant une ou deux minutes, puis l'on place l'élément réflecteur sur le portoir. Le ruban utilisé doit contenir de préférence un adhésif au caoutchouc naturel. Certaines matières plastiques peuvent être placées directement sur l'élément réflecteur.

On veillera à ce que le dispositif soit correctement aligné avec les autres éléments optiques de l'appareil.

#### b) Réflexion diffuse

Cette technique est ainsi nommée parce que la surface de l'échantillon reflète la lumière dans de nombreuses directions différentes. Pulvériser finement la substance solide avec une matrice non absorbante (par exemple du bromure ou du chlorure de potassium). Placer le mélange directement dans le porte-échantillon de l'appareil. Le spectre de la matrice, enregistré dans des conditions identiques, doit être soustrait numériquement. Certaines matières plastiques peuvent être placées directement dans le porte-échantillon de l'appareil.

\*\*\*