ІИЯ КРИВЫХ ХТРАЛЬНЫХ Д ИАХ ранцев<sup>\*, \*\*</sup> демии наук

УДК 543.421/.424

## — ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

# ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА РАЗРЕШЕНИЯ КРИВЫХ ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ В ДВУХСЛОЙНЫХ СИСТЕМАХ

© 2016 г. О. Е. Родионова\*, <sup>1</sup>, А. Л. Померанцев\*, \*\*

\*Институт химической физики Российской академии наук 119991 Москва, ул. Косыгина, 4 <sup>1</sup>E-mail: rcs@chph.ras.ru \*\*Институт природно-технических систем Российской академии наук 354024 Сочи, Курортный просп., 99/18 Поступила в редакцию 21.10.2014 г., после доработки 02.07.2015 г.

Предложен способ восстановления индивидуальных спектров компонентов в двухслойных системах с помощью метода разделения кривых — чередующихся наименьших квадратов. Метод применим при регистрации спектров в ближней инфракрасной области как режиме пропускания, так и в режиме диффузного отражения. Работоспособность метода проверена на модельной системе полимерная пленка—полимерная пленка и на реальных образцах полимерная упаковочная пленка—бесконечный порошкообразный слой продукта.

Ключевые слова: хемометрика, спектроскопия ближней инфракрасной области, разделение сигналов, полиэтилен, таурин.

DOI: 10.7868/S0044450216010126

Метод ближней инфракрасной (БИК) спектроскопии (12500-4000 см<sup>-1</sup>) совместно с хемометрической обработкой, называемый БИК-анализом, позволяет без пробоподготовки проводить контроль химических и физических свойств фармацевтической продукции - как готовых форм, так и исходных субстанций [1, 2]. Регистрацию спектров можно осуществлять непосредственно через упаковку, такую как полиэтиленовые ( $\Pi \Theta$ ) пакеты [3], стеклянные ампулы [4], пластиковые бутылки [5], блистеры из поливинилхлорида [6, 7]. При работе с твердыми и порошкообразными образцами БИКспектры преимущественно регистрируют в режиме диффузного отражения. Использование оптиковолоконных зондов позволяет проводить измерения не только в лабораториях, но и непосредственно на складах.

После построения хемометрической модели на базе библиотеки спектров подтверждение качества новых образцов занимает несколько минут. В частности, это позволяет проверять каждую упаковку входного сырья, что соответствует современным нормам аналитического контроля [8, 9] фармацевтической продукции. Необходимо учитывать, что полимерные упаковочные материалы имеют собственные полосы поглощения в БИК-области, поэтому регистрируемые спектры представляют сложную суперпозицию полос поглощения субстанции и упаковки. Случайное изменение толщины упаковки или числа ее слоев влияет на регистрируемый спектр, что может привести к ошибочным результатам анализа.

Рассматриваемая задача состоит в разработке процедуры, позволяющей оценить вклад упаковки в регистрируемый спектр и, по возможности, разделить спектр образца и спектр упаковки. Необходимость такой процедуры продемонстрирована на реальном примере оценки подлинности входного сырья на складе фармацевтического предприятия. Для того, чтобы быстро оценить качество субстанции не вскрывая ПЭ-упаковку, предложено [3] применить БИК-анализ, а накопленные в библиотеке спектры использовать для решения задачи верификации.

С математической точки зрения верификация это задача построения одноклассового классификатора [10, 11], позволяющего ответить на вопрос, принадлежит ли новый образец к целевому классу (классу подлинных образцов исследуемой субстанции) или нет. Для построения классификатора необходимо собрать спектры образцов, про которые точно известна их принадлежность к

целевому классу. Такой набор, называемый обучающим, должен учитывать естественные вариации как внутри одной партии субстанции, так и между различными партиями. На основе обучающего набора строят модель верификации и оценивают риски принятия неверных решений, т.е. ошибки первого рода (доля ошибочно отвергнутых образцов целевого класса), и ошибки второго рода (доля посторонних образцов, неверно отнесенных к целевому классу) [11, 12].

Качество обучающего набора существенно влияет на результаты анализа. В рассматриваемом далее примере предварительный анализ показал, что набор спектров, собранный на основе заведомо качественных образцов, неоднороден. Причиной разброса являются искажения спектров субстанции за счет регистрации спектров через слой ПЭ, толщина которого, точнее – число слоев упаковки, неодинакова при различных измерениях. Нами была разработана итерационная процедура разделения образцов на группы в зависимости от числа слоев ПЭ [3]. В первом приближении выделены две группы: группа образцов А0, спектры которых не искажены, далее использовавшаяся для построения модели классификации, и группа "сомнительных образцов" А1 [3, 12]. Последующий анализ [11] показал, что группа А1 разделяется на четыре подгруппы, А1,..., А4, определяемые, по-видимому, числом слоев ПЭ, через которые проводились измерения. Подробный анализ образцов, не входящих в целевой класс А0, позволил оценить ошибки первого и второго рода. Использовавшаяся при этом процедура разделения образцов на классы оказалась весьма трудоемкой, поэтому для широкого применения требуется найти более простой инструмент анализа данных.

В настоящей работе, в качестве математического инструмента для предварительного анализа спектров образцов использован метод декомпозиции многомерных сигналов [13], называемый "метод разрешение кривых — чередующиеся наименьшие квадраты" (multivariate curve resolution – alternative least squares, MCR-ALS). Этот метод широко применяют для изучения кинетики различных процессов, поскольку он позволяет оценивать спектры промежуточных соединений, образующихся в ходе реакций [14]. Дополнение алгоритма кинетическими схемами переводит метод из разряда формального в область содержательного физико-химического моделирования [15]. Последнее время этот подход стали широко применять для количественного анализа, когда требуется определять концентрации компонентов сложных смесей по спектральным данным. Для этого в алгоритм вводят дополнительные корреляционные ограничения [16]. Применение MCR-ALS, в отличие от широко используемого метода проекций на латентные переменные, позволяет не только оценить концентрации компонентов, но и получить их "чистые" спектры [17]. Недавно показано, что нелинейный вариант MCR-ALS способен решать задачи градуировки даже в случаях, когда спектры смесей имеют насыщение на отдельных участках [18].

### ХЕМОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Метод главных компонент (МГК) [19, 20] применяют как самостоятельный метод для первичного анализа данных. Кроме того, МГК широко используют в хемометрике как составную часть других методов: классификации, разрешения кривых, градуировки и т.д.

Рассмотрим матрицу X размера  $(I \times J)$ , которая получилась после предварительной рутинной обработки исходной матрицы спектров Х<sub>гаw</sub>. Матрица Х состоит из спектров І образцов, полученных для J длин волн. Декомпозиция матрицы X с помощью МГК процедуры определяется формулой

$$X = TP^t + E, (1)$$

где T =  $\{t_{ia}\}$  – матрица счетов размерности ( $I \times A$ ),  $\mathbf{P} = \{p_{ja}\}$  — матрица нагрузок размерности ( $J \times A$ );  $\mathbf{E} = \{e_{ij}\}$  — матрица остатков размерности ( $I \times J$ ), А – число главных компонент. Разложение строится так, что матрица  $\Lambda = T^{t}T = \text{diag}(\lambda_{1}, ..., \lambda_{A})$ это диагональная (A × A) матрица, где диагональные элементы  $\lambda_a = \sum_{i=1}^{I} t_{ia}^2$  являются собственны-ми числами матрицы X<sup>I</sup>X, расположенными в порядке убывания.

Классификация. Метод одноклассовой классификации (data driven soft independent modeling of class analogy, DD-SIMCA) [11, 12, 21] включает следующие шаги:

1) построение МГК-модели целевого класса, описывающей совокупность исследуемых образцов;

2) построение области принятия решения, отделяющей образцы целевого класса от всех других образцов;

3) оценка рисков принятия неверных решений, т.е ошибок первого и второго рода.

В методе DD-SIMCA для каждого образца используют две величины, характеризующие как объекты из обучающего набора, так и новые образцы.

Первая величина – это расстояние внутри МГК модели,

$$h_i = t_i^t (T^t T)^{-1} t_i = \sum_{a=1}^A \frac{t_{ia}^2}{\lambda_a}, i = 1, ..., I.$$
 (2)

59

Обозначение образца	Число слоев ПЭ	Условная концентрация	
		ПС	ПЭ
PS0	0	1.01	0.03
PS1	1	1.00	0.98
PS3	3	0.99	3.00
PS5	5	0.96	5.01
PS7	7	1.00	7.05

ПС с несколькими слоями пленки ПЭ

$$\mathbf{C}_{\text{in}} = \mathbf{X} \mathbf{S}_{\text{hat}} (\mathbf{S}_{\text{hat}}^{\text{t}} \mathbf{S}_{\text{hat}})^{-1}.$$
(8)

На S-шаге фиксируется  $C \equiv C_{hat}$  и находится МНК-оценка матрицы спектров

$$\mathbf{S}_{\text{in}} = \mathbf{X}^{\text{t}} \mathbf{C}_{\text{hat}} (\mathbf{C}_{\text{hat}}^{\text{t}} \mathbf{C}_{\text{hat}})^{-1}.$$
 (9)

Процедура проводится до сходимости процесса, которая зависит от того, насколько удачными были выбраны начальные приближения, и сколь велика норма матрицы Е.

Важно отметить, что решение уравнения (6) не является единственным, а существуют вращательная и масштабная неопределенности [20]. Для того, чтобы избавиться от вращательной неопределенности и получить оценки концентраций и спектров, имеющих физический смысл, в итерационную процедуру включают различные ограничения, например, неотрицательность концентраций, неотрицателность спектров и т.д. При этом масштабная неопределенность сохраняется.

Процедура MCR-ALS требует предварительного этапа — инициализации. На этом этапе оценивается число чистых компонентов в смеси, а также начальные приближения либо для матрицы спектров S, либо для матрицы концентраций C. Если нет никакой дополнительной информации, то в общем случае начальное приближение для матрицы S ищется каким-либо подходящим методом, например, с помощью SIMPLISMA [22].

В нашем случае в качестве начального приближения для одного из компонентов использовали усредненный спектр ПЭ, а для второго брали разницу между спектром ПЭ и средним спектром всей системы. MCR-ALS является абсолютным методом, так как не требует знания спектров исходных компонентов. Однако включения такой информации в процедуру упрощает вычисления. Все вычисления проводили с использованием надстройки Chemometrics Add-In для Excel [20].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперимент 1. Исследовали образцы многослойных объектов, состоящих из одного слоя пленки полистирола (ПС) толщиной 3 мм и нескольких покрывающих слоев пленки ПЭ низкой плотности толщиной 0.087 мм. Всего исследовано 5 образцов (таблица).

Измерения проводили на Фурье-спектрометре Nicolet 6700 (ThermoFisher) в режиме пропускания в диапазоне 12500–4000 см<sup>-1</sup> с шагом 8 см<sup>-1</sup>. В качестве фона измеряли пустое кюветное отделение. Пленку ПС, задействованную в эксперименте, часто используют в качестве стандарта при проверке точности волновой шкалы БИК-спектрометров в режиме пропускания.

Вторая — это ортогональное расстояние до модели,

$$v_i = \sum_{i=1}^{J} e_{ij}^2, i = 1, ..., I.$$
 (3)

На основе этих двух расстояний вводится [11, 12] совокупное расстояние  $q_i$ , которое вычисляют как взвешенную сумму расстояний (2)и (3) по формуле

$$q_i = N_h \frac{h_i}{h_0} + N_v \frac{v_i}{v_0}, i = 1, ..., I.$$
(4)

Учитывая, что величины h, v, и q подчиняются распределению хи-квадрат с числом степеней свободы соответственно  $N_v$ ,  $N_h$ ,  $N_v + N_h$ , принадлежность к классу определяют по формуле

$$q \le \chi^{-2}(1-\alpha, N_h + N_v),$$
 (5)

где  $\alpha$  — это величина ошибки первого рода.

Метод разделения кривых. Одним из широко используемых способов обработки результатов экспериментов является метод MCR-ALS [20, 22]. Метод основан на билинейной модели

$$X = CS^t + E, (6)$$

где X — это ( $I \times J$ ) матрица, содержащая спектры I образцов на J длинах волн, C — это ( $I \times N$ ) матрица концентраций чистых компонентов, а S — это ( $J \times N$ ) матрица спектров чистых компонентов. N— это число чистых компонентов в системе, E — это ( $I \times J$ ) матрица погрешностей.

С вычислительной точки зрения MCR-ALS – это итерационная процедура, в которой с помощью метода наименьших квадратов

minimize 
$$\left\| \mathbf{X} - \mathbf{C}\mathbf{S}^{t} \right\|^{2}$$
 (7)

попеременно определяются матрицы S и C. На C-шаге фиксируется значение  $S \equiv S_{hat}$  и вычисляется очередное приближение для профиля концентраций, т.е. матрицы  $C_{in}$ 



**Рис. 1.** Экспериментальные БИК-спектры пленки полистирола, покрытой несколькими слоями пленки полиэтилена. Число слоев пленки: PS0 – 0, PS3 – 3, PS5 – 5 (таблица).

Эксперимент 2. Исследуемые образцы – это фармацевтическая субстанция таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота, C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S) в виде белого кристаллического порошка, упакованного в ПЭ-пакеты по 20 кг. Каждый пакет находится в картонном барабане с крышкой. Для измерений использовали Фурье-спектрометр Spectrum 100N (PerkinElmer), снабженный оптико-волоконным зондом. БИК-спектры регистрировали в режиме диффузного отражения в спектральном диапазоне 10000-4000 см<sup>-1</sup> с шагом 2 см<sup>-1</sup>. Основную часть измерений проводили непосредственно через ПЭ-упаковку. Исследовали упаковки в 82 барабанах, причем для каждой упаковки регистрировали по 3 спектра. Всего получено 246 спектров. Три пакета вскрывали и проводили по 5 повторных измерений субстанции без упаковки. Получали также спектры 18 пустых ПЭ-пакетов, в которых ранее находилась субстанция. Детальное описание эксперимента дано в работе [3].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент 1. В этом случае регистрируемый спектр является суперпозицией спектров слоев, по крайней мере, при небольшом изменении толщины каждого слоя, т.е. регистрируемый спектр – это сумма спектров ПЭ и ПС. При увеличении количества слоев ПЭ его абсорбционные пики возрастают пропорционально общей толщине слоя ПЭ. Высоты характерных пиков ПС (8720–8430 см<sup>-1</sup>, 5000–4480 см<sup>-1</sup>) не изменяются, если они располагаются в окнах прозрачности ПЭ и складываются с пиками ПЭ (5900–5600 см<sup>-1</sup>), если они перекрываются (рис. 1). Это согласуется с законом Ламберта–Бера с учетом того, что в исследуемой системе не



**Рис. 2.** Измеренный (тонкий черный *I*) и восстановленный (толстый серый *2*) спектры ПЭ (а) и ПС (б).

изменяются концентрации компонентов, а изменяется длина оптического пути в соответствии с количеством слоев ПЭ.

Применяя процедуру разделения кривых MCR-ALS, можно выделить спектры чистых компонентов и оценить число слоев пленки ПЭ. Для этого в формуле (6) в качестве матрицы X использовали матрицу БИК-спектров, I = 5, J = 2360, N=2. Спектры чистых компонентов (матрица S) показаны на рис. 2.

Матрица концентраций С, представленная в последних столбцах таблицы, состоит из 5 строк (число образцов) и двух столбцов (условные концентрации). Первый столбец отвечает за концен-

61



**Рис. 3.** Спектры в эксперименте 2 после MSC-коррекции. Отмечены характерные полосы поглощения таурина (Taurine) и ПЭ (РЕ).

трацию ПС и все эти значения близки к 1. Значения во втором столбце, соответствующие ПЭ, растут линейно и приблизительно равны числу слоев. В связи с этим важно разъяснить следующие существенные обстоятельства. Термин "матрица концентраций", традиционно используемый в задачах разрешения кривых, в рассматриваемом подходе используется условно, так как сами по себе концентрации не меняются, но изменяется длина оптического пути, что влияет на величину абсорбции. В дальнейшем будем употреблять термин "условная концентрация".

Таким образом, в простейшем случае показана возможность восстановления чистых спектров двухкомпонентной слоистой системы при изменении толщины слоя одного из слоев. Подчеркнем, что для восстановления спектров не используется информация об одном или нескольких компонентах.

Эксперимент 2. Здесь рассматривается более сложная, чем в первом случае, двухкомпонентная система. Измеряемые образцы представляли пленку ПЭ толщиной ~ 0.060 мм и слой порошкообразной субстанции, который можно считать бесконечным, так как его толщина много больше глубины проникновения луча источника. Субстанция содержится в закрытом пакете, поэтому из-за складок ПЭ заранее не известна фактическая толщина ПЭ-пленки, попавшей под датчик зонда, даже при измерениях одной и той же упаковки в разных местах пакета.

На рис. 3 приведены спектры исследуемых образцов после MSC-коррекции [19]. Как видно, имеются полосы поглощения субстанции (около 8510 и 4720 см<sup>-1</sup>), полосы поглощения ПЭ (около 8100 и



**Рис. 4.** Характерные спектры поглощения. А0 – образец с незначительным влиянием ПЭ; А3 – образец с сильным влиянием ПЭ; Taurine – субстанция из открытого пакета; РЕ – пустой ПЭ-пакет, сложенный в несколько слоев.

5770 см<sup>-1</sup>), а также перекрывающиеся пики обоих компонентов.

В отличие от регистрации спектров в режиме пропускания, при работе в режиме диффузного отражения происходит не только наложение спектра ПЭ на спектр субстанции, а еще и ослабление сигнала от субстанции под слоем ПЭ (рис. 4). Исследование спектров показало, что влияние ПЭ, т.е. эффективная толщина слоя ПЭ, различается для разных образцов.

Для того, чтобы отделить спектры, измеренные через один слой ПЭ, от образцов, неудачно измеренных через несколько слоев, и тем самым выделить обучающий набор, применили процедуру MCR-ALS. В формуле (6) матрица X – это матрица спектров всех образцов в пакетах, С– матрица "условных концентраций", а S – матрица спектров чистых компонентов. Под спектрами чистых компонентов понимаются спектры ПЭ и субстанции. Под "условными концентрациями" понимается соотношение между вкладом от спектра субстанции и спектра ПЭ. Число образцов I = 246, число длин волн J = 2301. Рабочий спектральный диапазон 9000–4450 см<sup>-1</sup>. Число компонентов N равно двум.

Процедура MCR-ALS позволила оценить величину  $C_h$  – "условную концентрацию" ПЭ в образцах, т.е. определить относительную толщину пленки ПЭ, что и являлось нашей задачей. Теперь можно отсортировать образцы по возрастанию  $C_h$ (числа слоев ПЭ) и сравнить полученные результаты с ранее проведенным анализом [11]. На рис. 5а по оси абсцисс отложены значения первого столбца матрицы С, т.е. относительной толщины слоя ПЭ  $C_h$ . По оси ординат – логарифм расстояний  $q_i$ ,



**Рис. 5.** Анализ образцов в эксперименте 2. (а) – Связь между толщиной ПЭ ( $C_h$ ) и разделением на группы методом DD-SIMCA (q) (значения по осям представлены в условных единицах). (б) – Спектры поглощения субстанции. Измеренный (тонкий черный, I) и восстановленный (толстый серый, 2) спектры.

вычисленных при решении задачи классификации по формуле (4). Каждая серия соответствует группе образцов, определенной нами ранее [11] при решении задачи классификации. Видно, что несколько образцов из группы A1 попадают в группу A0. В остальном ранее построенное разбиение на группы хорошо совпадает с оценкой толщины слоя ПЭ. Кроме того, MCR-ALS позволяет достаточно точно восстановить "чистый" спектр субстанции (рис. 5б). Так как при рутинном контроле на складе упаковка не должна нарушаться, получение этого спектра важно для принятия решения о качестве субстанции.

Таким образом, с помощью метода разделения кривых MCR-ALS можно просто восстановить спектры двухслойных систем полимерная пленкаполимерная пленка и полимерная пленка-"бесконечный" порошкообразный образец. Процедура применима как при регистрации БИК-спектров в режиме пропускания, так и при измерениях в режиме диффузного отражения. При этом можно восстановить относительную толщину полимерной пленки. Так как для начала процедуры разделения кривых не требуется измерения спектров чистых компонентов, а только некоторое начальное приближение, процедуру можно отнести к разряду абсолютных. Такой подход позволяет существенно упростить анализ результатов измерений, выполняемых через полимерные пленки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roggo Y., Chalus P., Lene Maurer L., Lema-Martinez C., Edmond A., Jent N. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. V. 44. № 3. P. 683.
- 2. *Rodionova O.Ye., Pomerantsev A.L.* // Trends Anal. Chem. 2010. V. 29. № 8. P. 795.
- 3. *Rodionova O.Ye., Sokovikov Y.V., Pomerantsev A.L.* // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 642. № 1–2. P. 222.
- Rodionova O.Ye., Pomerantsev A.L., Houmuller L., Shpak A.V., Shpigun O.A. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 397. № 5. P. 1927.
- Broad N.W., Jee R.D., Moffat A.C., Eaves M.J., Mann W.C., Dziki W. // Analyst. 2000. V. 125. № 11. P. 2054.
- Rodionova O.Ye., Balyklova K.S., Titova A.V., Pomerantsev A.L. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. V. 98. № 9. P. 186.
- Guoa Q., Wub W., Massart D.L., Bouconc C., de Jong S. // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 446. № 1–2. P. 85.
- U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry, PAT – a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance, September 2004.
- Pomerantsev A.L., Rodionova O.Ye. // J. Chemom. 2012. V. 26. № 6. P. 299.
- 10. *Tax D*. Doctoral Dissertation, University of Delft, the Netherlands, 2001. 190 p.
- Pomerantsev A.L., Rodionova O.Ye. // J. Chemom. 2014. V. 28. № 6. P. 518.
- Pomerantsev A.L., Rodionova O.Ye. // J. Chemom. 2014. V. 28. № 5. P. 429.

- Монахова Ю.Б., Астахов С.А, Муштакова С.П., Грибов Л.А. // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 66. № 4. С. 362. (Monakhova Yu.B, Astakhov S.A., Mushtakova S.P., Gribov L.A. // J. Analyt. Chem. 2011. V. 66. № 4. Р. 351.)
- *de Juan A, Tauler R.* // Crit. Rev. Anal. Chem. 2006. V. 36. № 3–4. P. 163.
- 15. Diewok J., de Juan A., Maeder M., Tauler R., Lendl B. // Anal. Chem. 2003. V. 75. № 3. P. 641.
- 16. *de Oliveira R.R., de Lima K.M.G., Tauler R., de Juan A. //* Talanta. 2014. V. 125. P. 233.
- 17. Azzouz T., Tauler R. // Talanta 2008. V. 74. P. 1201.
- Pomerantsev A.L., Zontov Y.V., Rodionova O.Ye. // J. Chemom. 2014. V. 28. № 10. P. 740

- Эсбенсен К. Анализ многомерных данных. Сокр. пер. с англ. под ред. Родионовой О. Черноголовка: Изд-во ИПХФ РАН, 2005. (*Esbensen. K.H.* Multivariate Data Analysis – in practice 4-th Ed., Oslo: CA-MO, 2000.)
- 20. Померанцев А.Л. Хемометрика в Excel: учебное пособие, Томск: Из-во ТПУ, 2014. 435 с. (*Pomerantsev A.L.* Chemometrics in Excel, Hoboken: John Wiley & Sons, 2014. 314 p.)
- 21. *Pomerantsev A.L.* // J. Chemom. 2008. V. 22. № 11–12. P. 601.
- 22. *de Juan A., Rutan S.C., Maeder M., Tauler R.* / Comprehensive Chemometrics. V. 2 / Eds. Brown D., Tauler R., Walczak B. Amsterdam: Elsevier, 2009. P. 325. P. 473.