

Guide technique

pour l'élaboration des monographies

Pharmacopée Européenne

Direction Européenne de la Qualité du Médicament

4^e Edition - 2005

© Conseil de l'Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France - 2005

La reproduction de ce fichier à des fins commerciales ou sa publication sur un site ouvert à la consultation publique est strictement interdite.

GUIDE TECHNIQUE POUR L'ELABORATION DES MONOGRAPHIES

4^e Edition – 2005

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	5
1.1	OBJECTIF DU GUIDE.....	5
1.2	PROCEDURES D'ESSAI.....	5
1.3	EQUIPEMENT.....	6
1.4	PRISES D'ESSAI.....	6
1.5	REACTIFS.....	8
1.6	DENOMINATIONS COMMERCIALES.....	8
1.7	ETALONS DE REFERENCE.....	8
2	MONOGRAPHIES DE SUBSTANCES POUR USAGE PHARMACEUTIQUE	9
2.1	DEFINITION.....	10
2.1.1	<i>Combinaisons</i>	11
2.1.2	<i>Teneur</i>	11
2.2	CARACTERES.....	12
2.2.1	<i>Aspect</i>	12
2.2.2	<i>Saveur</i>	13
2.2.3	<i>Odeur</i>	13
2.2.4	<i>Solubilité</i>	13
2.2.5	<i>Instabilité</i>	13
2.2.6	<i>Hygroscopicité</i>	13
2.2.7	<i>Propriétés à l'état solide</i>	14
2.2.8	<i>Autres caractéristiques</i>	14
2.2.9	<i>Comportement en solution</i>	14
2.3	IDENTIFICATION.....	15
2.3.1	<i>Généralités</i>	15
2.3.1.1	Méthodes requérant une instrumentation complexe.....	16
2.3.1.2	Autres méthodes.....	16
2.3.2	<i>Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge</i>	16
2.3.2.1	Sels d'acides ou de bases organiques.....	16
2.3.2.2	Substances chimiquement apparentées.....	16
2.3.2.3	Polymorphisme.....	17
2.3.2.4	Isomères optiques.....	17
2.3.3	<i>Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible</i>	17
2.3.4	<i>Point de fusion, point de solidification et point d'ébullition</i>	18
2.3.5	<i>Pouvoir rotatoire spécifique</i>	18
2.3.6	<i>Chromatographie sur couche mince</i>	19
2.3.7	<i>Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide</i>	19
2.3.8	<i>Réactions chimiques</i>	19
2.4	ESSAI.....	20
2.4.1	<i>Généralités</i>	20
2.4.2	<i>Titre</i>	20
2.4.3	<i>Solution S</i>	20
2.4.4	<i>Aspect de la solution</i>	22
2.4.4.1	Limpidité et degré d'opalescence.....	22
2.4.4.2	Degré de coloration.....	22

2.4.5	<i>pH ou acidité/alcalinité</i>	23
2.4.6	<i>Pouvoir rotatoire</i>	24
2.4.7	<i>Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible</i>	25
2.4.8	<i>Substances apparentées</i>	26
2.4.8.1	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
2.4.8.2	Chromatographie liquide (CL).....	29
2.4.8.3	Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	32
2.4.8.4	Electrophorèse capillaire.....	33
2.4.9	<i>Substances facilement carbonisables</i>	34
2.4.10	<i>Anions et/ou cations étrangers</i>	34
2.4.11	<i>Métaux lourds</i>	35
2.4.12	<i>Perte à la dessiccation</i>	36
2.4.13	<i>Thermogravimétrie (2.2.34)</i>	37
2.4.14	<i>Semi-microdosage de l'eau (Karl Fischer – 2.5.12)</i>	37
2.4.15	<i>Microdosage de l'eau (2.5.32)</i>	37
2.4.16	<i>Dosage de l'eau par chromatographie en phase gazeuse</i>	37
2.4.17	<i>Détermination de l'eau par entraînement (2.2.13)</i>	37
2.4.18	<i>Cendres sulfuriques</i>	37
2.4.19	<i>Résidu à l'évaporation</i>	38
2.4.20	<i>Solvants résiduels</i>	38
2.5	DOSAGE.....	38
2.5.1	<i>Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible</i>	39
2.5.1.1	Mesure directe.....	39
2.5.1.2	Mesure après réaction colorée.....	39
2.5.2	<i>Analyse volumétrique</i>	39
2.5.3	<i>Méthodes chromatographiques</i>	40
2.5.4	<i>Dosage de l'azote après minéralisation par l'acide sulfurique (semi-microdosage)</i>	40
2.6	CONSERVATION.....	41
2.7	ETIQUETAGE.....	41
2.8	IMPURETES.....	41
2.9	CARACTERISTIQUES LIEES A LA FONCTIONNALITE.....	42
3	VALIDATION ANALYTIQUE	42
3.1	TERMES ET DEFINITIONS.....	42
3.1.1	<i>Introduction</i>	42
3.1.2	<i>Différents types de procédures analytiques</i>	43
3.1.3	<i>Paramètres et exigences de validation</i>	44
3.1.4	<i>Glossaire</i>	45
3.2	METHODOLOGIE.....	47
3.2.1	<i>Introduction</i>	47
3.2.2	<i>Spécificité</i>	47
3.2.2.1	Identification.....	48
3.2.2.2	Dosage et essais de pureté.....	48
3.2.3	<i>Linéarité</i>	49
3.2.4	<i>Intervalle (de mesure)</i>	49
3.2.5	<i>Exactitude</i>	50
3.2.5.1	Dosage.....	50
3.2.5.2	Impuretés (quantification).....	51
3.2.5.3	Recommandations sur les données à fournir.....	51
3.2.6	<i>Fidélité</i>	51

3.2.6.1	Répétabilité.....	51
3.2.6.2	Fidélité intermédiaire.....	51
3.2.6.3	Reproductibilité.....	51
3.2.6.4	Recommandations sur les données à fournir.....	52
3.2.7	<i>Limite de détection</i>	52
3.2.7.1	Evaluation visuelle.....	52
3.2.7.2	Rapport signal/bruit.....	52
3.2.7.3	Ecart type des réponses et pente.....	52
3.2.7.4	Recommandations sur les données à fournir.....	53
3.2.8	<i>Limite de quantification</i>	53
3.2.8.1	Evaluation visuelle.....	53
3.2.8.2	Rapport signal/bruit.....	53
3.2.8.3	Ecart type des réponses et pente.....	53
3.2.8.4	Recommandations sur les données à fournir.....	54
3.2.9	<i>Robustesse</i>	54
3.2.10	<i>Vérification de la conformité du système</i>	54
3.3	APPLICATION SPECIFIQUE A DES METHODES UTILISEES DANS LA PHARMACOPEE.....	55
3.3.1	<i>Pouvoir rotatoire (2.2.7)</i>	55
3.3.1.1	Introduction.....	55
3.3.1.2	Identification.....	55
3.3.1.3	Essai.....	55
3.3.1.4	Dosage.....	56
3.3.2	<i>Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25)</i>	56
3.3.2.1	Identification.....	56
3.3.2.2	Essais limites.....	56
3.3.2.3	Dosage.....	56
3.3.3	<i>Essais limites non instrumentaux</i>	56
3.3.3.1	Aspect de la solution (2.2.1 et 2.2.2).....	56
3.3.3.2	Acidité / alcalinité.....	57
3.3.3.3	Essais limites des anions/cations (2.4...).....	57
3.3.4	<i>Spectrométrie d'absorption atomique (2.2.23)</i>	58
3.3.4.1	Spécificité.....	58
3.3.4.2	Etalonnage.....	58
3.3.4.3	Effets de matrice.....	59
3.3.4.4	Limites de détection et de quantification (estimation fondée sur l'écart type du blanc).....	59
3.3.5	<i>Techniques séparatives</i>	60
3.3.5.1	Chromatographie sur couche mince (2.2.27).....	60
3.3.5.2	Chromatographie liquide (2.2.29).....	61
3.3.5.3	Chromatographie en phase gazeuse (2.2.28).....	62
3.3.6	<i>Semi-microdosage de l'eau (2.5.12)</i>	64
3.3.7	<i>Titrages volumétriques (2.5.11 - 2.2.19 - 2.2.20)</i>	64

GUIDE TECHNIQUE POUR L'ELABORATION DES MONOGRAPHIES

1 INTRODUCTION

1.1 OBJECTIF DU GUIDE

Ce document constitue un guide à l'usage des rédacteurs de monographies, ainsi qu'un outil permettant de faire connaître aux utilisateurs de la Pharmacopée européenne, notamment l'industrie, les autorités d'enregistrement et les laboratoires officiels de contrôle des médicaments, les principes directeurs de l'élaboration des monographies. Comme les principes définis et les indications fournies pour l'élaboration des monographies sont les mêmes que ceux appliqués par les autorités d'enregistrement, le *Guide Technique* peut également servir de ligne directrice pour l'élaboration de spécifications destinées à figurer dans les dossiers d'enregistrement.

Il est important de rappeler que les monographies constituent des normes d'application obligatoire dans le cadre des procédures d'enregistrement dans l'ensemble des États signataires de la *Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée européenne*. Les procédures d'essai et de dosage prescrites dans les monographies individuelles doivent donc avoir été validées conformément à la pratique en cours au moment de leur élaboration.

1.2 PROCEDURES D'ESSAI

Les méthodes choisies pour les identifications, les essais de pureté et le(s) dosage(s) qui constituent l'essentiel d'une monographie de pharmacopée sont, de préférence, celles déjà décrites et appliquées dans la Pharmacopée européenne. A cet égard, l'auteur d'une monographie doit se référer non seulement aux méthodes générales décrites dans la Pharmacopée européenne, mais également aux monographies déjà publiées sur des substances similaires. Ces recommandations ont pour but d'assurer un degré raisonnable d'harmonisation au sein de la Pharmacopée et ne sont valables que si les méthodes sont jugées adaptées aux fins envisagées. Il convient néanmoins de tenir compte également du développement de nouvelles méthodes apportant un progrès significatif en matière de sensibilité, de fidélité, d'exactitude ou de pouvoir discriminant (sélectivité).

Les méthodes figurant dans les monographies doivent être validées comme décrit dans la section "Validation analytique" de ce guide ou d'autres sections spécifiques applicables en la matière. Les rapports de validation sont transmis à la DEQM, mais ne sont ni publiés ni communiqués aux utilisateurs.

Toute procédure analytique décrite dans une monographie doit faire l'objet d'une vérification par au moins deux laboratoires, qui communiquent à la DEQM les résultats obtenus, afin d'assurer la traçabilité.

Les instructions entrant dans la description des procédures analytiques doivent couvrir l'ensemble des facteurs qui sont susceptibles d'affecter les résultats et sont jugés essentiels pour permettre à un analyste expérimenté, travaillant conformément aux pratiques de laboratoire reconnues mais n'ayant pas pour autant une connaissance préalable de l'analyse en question, d'effectuer cette analyse. Toute divergence dans la description de méthodes similaires est à éviter.

1 S'il est envisagé, ou envisageable, qu'une méthode d'analyse devienne d'utilisation générale,
2 ou si elle requiert une longue description et est utilisée dans plus d'un cas, il peut être proposé
3 de l'inclure dans les chapitres généraux de la Pharmacopée comme méthode générale à
4 laquelle renverront les monographies individuelles. Les méthodes sont appliquées à l'échelle
5 conventionnellement utilisée dans la Pharmacopée, sauf dans les cas où une analyse à petite
6 échelle semble préférable pour des raisons de disponibilité du produit analysé, ou en raison
7 de sa toxicité ou de son coût.

8 **1.3 EQUIPEMENT**

9 Si l'équipement utilisé pour une méthode d'analyse n'est pas disponible dans tous les Etats
10 signataires de la Convention de la Pharmacopée européenne, il doit pouvoir être construit à
11 partir de sa description dans la Pharmacopée.

12 **1.4 PRISES D'ESSAI**

13 Pour prescrire les prises d'essai, c'est-à-dire les masses et volumes de substances, réactifs et
14 solvants à utiliser pour les identifications, essais et dosages, la pratique en vigueur dans la
15 Pharmacopée est d'indiquer le degré de précision avec laquelle il convient de les mesurer
16 (voir les *Prescriptions Générales*). Cet aspect est donc à prendre en compte pour la rédaction
17 des textes de la Pharmacopée.

18 Pour réduire au minimum l'erreur associée à la préparation des solutions à analyser, il
19 convient de consulter le tableau 1, qui fournit des estimations de l'incertitude relative.

20 Afin d'éviter l'emploi de prises d'essai trop faibles ou une consommation inutile de solvants,
21 il est souvent nécessaire de prescrire des dilutions en série pour la préparation des solutions
22 utilisées, notamment, pour les mesures spectrophotométriques. Dans ce cas, les différentes
23 combinaisons d'étapes de dilution (habituellement au nombre de deux ou trois) ne sont pas
24 toutes équivalentes du point de vue de l'erreur aléatoire associée à la dilution. Si nécessaire, il
25 convient de prescrire la méthode de dilution optimale compte tenu de l'erreur relative
26 (tolérance de capacité divisée par volume nominal) associée aux différentes tailles de pipettes
27 et fioles jaugées communément utilisées pour ces opérations (l'erreur relative de dilution est
28 estimée d'après la formule habituelle : racine carrée de la somme des carrés des erreurs
29 relatives individuelles).

30 On trouve dans la littérature des tableaux indiquant le nombre optimal et la nature des
31 dilutions successives nécessaires pour obtenir un rapport de dilution donné, sur la base des
32 spécifications relatives aux tolérances de capacité de la verrerie jaugée. Le tableau 2 fournit
33 des indications sur ce point (à noter que les facteurs indiqués n'incluent pas les erreurs de
34 lecture).

1 **Tableau 1 — Incertitude relative associée à la préparation des solutions**

Concentration souhaitée	Préparation de la solution	Incertitude relative (en pourcentage)		
		Masse	Volume	Total
10g/1000 ml	10g/1000ml	< 0,01	0,05	0,05
	1g/100ml	0,02	0,12	0,12
	0,5g/50ml	0,04	0,17	0,17
	0,25g/25ml	0,08	0,23	0,24
	0,1g/10ml	0,02	0,50	0,54
1g/1000 ml	1g/1000ml	0,02	0,05	0,05
	0,5g/500ml	0,04	0,07	0,08
	0,25g/25ml	0,08	0,23	0,24
	100mg/100ml	0,2	0,12	0,23
	50mg/50ml	0,4	0,17	0,43
10mg/10ml	2,0	0,50	2,06	
0,1g/1000 ml	100mg/1000ml	0,2	0,05	0,21
	50mg/500ml	0,4	0,07	0,41
	25mg/250ml	0,8	0,08	0,80
	10mg/100ml	2,0	0,12	2,0
	5mg/50ml	4,0	0,17	4,0
	1mg/10ml	20,0	0,50	20,0
0,01g/1000 ml	10mg/1000ml	2,0	0,05	2,0
	5mg/500ml	4,0	0,07	4,0
	1mg/100ml	20,0	0,12	20,0

2 Le calcul des incertitudes relatives a été effectué sur la base d'une incertitude de pesée de 0,2 mg.

3

4 **Tableau 2 — Erreur relative associée à la dilution à l'aide de verrerie jaugée**
 5 **(P : pipette / F : fiole)**

Rapport de concentration	Nombre d'étapes	Étape 1		Étape 2		Erreur relative
		P	F	P	F	
1/2	1	25	50			0,16
1/2,5	1	20	50			0,18
1/5	1	20	100			0,17
1/10	1	25	250			0,13
1/12,5	1	20	250			0,16
1/30	1	15	500			0,20
1/50	1	20	1000			0,15
1/100	1	25	250	25	250	0,18
1/125	2	20	250	25	250	0,20
1/160	2	25	1000	25	100	0,19
1/200	2	25	500	25	100	0,18
1/250	2	20	250	25	500	0,20
1/400	2	25	250	25	1000	0,18
1/500	2	20	500	25	500	0,20
1/1000	2	20	1000	25	500	0,20

6 Source : R B Lam et T L Isenhour, Minimizing relative error in preparation of standard solutions by judicious choice of
 7 volumetric glassware, *Analytical Chemistry*, 1980, **53**, 1158-1161.

1.5 REACTIFS

Lorsque la qualité d'un réactif est à un ou plusieurs égards critique pour l'usage auquel il est destiné, il importe de bien définir la qualité requise, au besoin en prescrivant des essais permettant de démontrer que le réactif est de qualité adéquate. En règle générale, toutefois, les réactifs utilisés sont de qualité analytique et il suffit d'indiquer leur nom, leur code CAS et leur formule.

Il convient d'utiliser chaque fois que possible les réactifs, solutions de réactifs, solutions titrées et solutions étalons pour essais limites déjà décrits dans la Pharmacopée. Les solutions simples de réactifs ou les solutions qui ne sont utilisées qu'une fois sont décrites dans la monographie elle-même.

L'emploi de réactifs reconnus comme fortement toxiques ou dangereux à d'autres titres (par exemple parce que cancérigènes) est à éviter, surtout dans des conditions où ces propriétés sont difficiles à contrôler, comme lors de leur manipulation sous forme de poudre fine ou de nébulisat. Il faut également éviter l'emploi de certaines substances interdites ou soumises à restriction dans un ou plusieurs des États signataires de la Convention de la Pharmacopée européenne.

1.6 DENOMINATIONS COMMERCIALES

Les dénominations commerciales sont indiquées systématiquement dans les projets de monographies, en note de bas de page, pour les plaques/colonnes chromatographiques ainsi que dans tous les autres cas où cette information présente une utilité pour l'analyste (trousses d'analyse, réactifs disponibles auprès d'un seul fournisseur, etc.). Cette indication est supprimée du texte après son adoption, mais elle reste disponible sur le site internet de la DEQM, dans la base de données *Knowledge*, après publication du texte dans la Pharmacopée.

1.7 ETALONS DE REFERENCE

La politique et les procédures suivies en matière d'étalons de référence sont décrites dans le chapitre général 5.12. *Etalons de référence* (actuellement à l'état d'un projet). L'obtention, l'établissement, la conservation et le monitoring des étalons de référence sont du ressort de la DEQM. De nombreux étalons de référence, notamment ceux utilisés pour le contrôle des impuretés, ne sont disponibles qu'en quantité limitée. Avant la publication d'une monographie dans *Pharmeuropa*, il est souhaitable que les étalons de référence soient fournis en quantité requise à la DEQM, qui indiquera également la meilleure stratégie à suivre pour optimiser l'emploi de substances disponibles en quantité limitée (par exemple, la préparation d'un échantillon dopé de la substance plutôt que l'envoi de la substance en l'état). L'objectif de la DEQM est de présenter l'étalon de référence pour adoption en même temps que la monographie ou, à défaut, au plus tard au moment de la publication.

Depuis la 5^e Édition, un changement a été apporté à la politique suivie en matière d'établissement de spectres IR de référence, qui était jusqu'alors l'option recommandée lorsqu'un étalon de référence servait uniquement pour l'identification IR. La préférence est désormais donnée aux substances chimiques de référence plutôt qu'aux spectres de référence, sauf dans certains cas spéciaux (par exemple lorsque la mise à disposition d'une substance de référence pose des difficultés pratiques).

1 De nombreux étalons de référence, notamment ceux d'impuretés, ne sont disponibles qu'en
2 quantité limitée ; il faut alors prescrire, pour la préparation des solutions, l'utilisation d'une
3 quantité d'étalon aussi faible que possible.

4 **2 MONOGRAPHIES DE SUBSTANCES POUR USAGE** 5 **PHARMACEUTIQUE**

6 Les monographies reposent sur les spécifications s'appliquant aux substances qui entrent dans
7 la composition des médicaments approuvés dans les États membres. Lorsqu'une monographie
8 est inscrite au programme de travail, la DEQM lance une enquête pour identifier les
9 fabricants de la substance, et toutes les données reçues sont prises en compte pour
10 l'élaboration de la monographie. Il convient d'inviter les parties intéressées à participer à
11 l'élaboration de la monographie avant sa publication dans Pharmeuropa, car la période
12 d'enquête publique de 3 mois est souvent trop courte pour que toutes puissent vérifier le
13 projet de monographie.

14 Préalablement à l'élaboration de toute monographie, il est indispensable de réunir le plus
15 d'informations possible sur la substance à étudier.

16 Il importe, en particulier, d'établir :

- 17 • si la substance en question est d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique,
- 18 • s'il s'agit d'un mélange ou d'une entité unique,
- 19 • le détail du (des) procédé(s) de préparation employé(s),
- 20 • s'il existe différentes formes cristallines, car ce paramètre peut avoir une influence sur
21 les propriétés de la substance,
- 22 • s'il existe à la fois un énantiomère et le racémate ou d'autres mélanges d'énantiomères,
- 23 • s'il existe différentes formes hydratées,
- 24 • s'il existe différentes entités (acide, base, sel, etc.).

25 Il convient de consulter la Pharmacopée ainsi que tout autre document utile sur l'état des
26 travaux, pour déterminer si des monographies portant sur des substances similaires ont été
27 publiées ou sont en cours d'élaboration. Si tel est le cas, il est important de reprendre la même
28 approche pour la nouvelle monographie, à moins qu'il existe de bonnes raisons de s'en écarter
29 (par exemple des développements récents en matière de techniques d'analyse).

30 Il arrive que la substance à décrire dans une monographie fasse partie d'un groupe de
31 substances étroitement apparentées (famille). Ceci est notamment le cas pour certains
32 excipients tels que les macrogols. Il convient alors de rédiger une monographie cadre qui
33 décrive clairement les éléments communs à toutes les substances de la famille et puisse être
34 utilisée pour identifier individuellement chacune de ces substances (monographie de famille).

35 Toutes les substances actives et tous les excipients décrits dans la Pharmacopée européenne
36 sont soumis aux dispositions de la monographie générale *Substances pour usage*
37 *pharmaceutique (2034)*.

38 **Titre**

39 Il convient d'utiliser, lorsqu'elle existe, la Dénomination Commune Internationale (DCI)
40 établie par L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ; cette dénomination est au besoin

1 complétée par le nom de l'anion ou du cation associé et par la mention "hydrate", "dihydrate",
2 "hydraté" (pour les degrés d'hydratation indéfinis) ou "anhydre" (lorsque l'on sait qu'il existe
3 également une forme hydratée). Dans le passé, le degré d'hydratation n'était pas précisé dans
4 le titre sauf en cas d'existence connue de deux formes hydratées différentes ; les titres
5 existants de ce type ne sont pas modifiés lors des révisions, sauf en cas d'existence connue de
6 deux formes hydratées ou d'impératif de santé publique (par exemple, une teneur en eau
7 élevée pouvant conduire à des erreurs de formulation). La désignation des anions et cations
8 comporte le cas échéant la précision "mono-", "di-", "tri-".

9 Lorsqu'une substance est utilisée dans des médicaments à usage exclusivement vétérinaire
10 approuvés dans les états membres, le titre comporte la mention "pour usage vétérinaire".

11 **2.1 DEFINITION**

12 Il convient de vérifier la structure chimique avec le plus de précision possible, afin de pouvoir
13 établir exactement :

- 14 • la formule développée,
- 15 • la formule brute et la masse moléculaire relative,
- 16 • la dénomination chimique.

17 Ceci implique d'étudier en particulier :

- 18 • l'existence éventuelle d'isomères, de façon à spécifier quel est l'isomère utilisé ou, au
19 contraire, à préciser que le produit est un mélange d'isomères ;
- 20 • dans le cas d'un isomère optique, il est insuffisant de se limiter au sens du pouvoir
21 rotatoire ; il convient d'indiquer la configuration absolue au moyen du système R/S
22 pour les centres d'asymétrie, ou de tout autre système approprié (par exemple pour les
23 glucides et les acides aminés) ;
- 24 • l'état d'hydratation ou de solvation, de façon à clairement distinguer les hydrates ou
25 solvates bien définis des produits contenant des quantités variables de solvant(s). Pour
26 les premiers, des intervalles de teneur en eau ou en solvant(s) sont spécifiés alors que,
27 pour les seconds, on ne mentionne généralement qu'une teneur maximale. Lorsqu'une
28 substance existe à la fois sous forme exempte d'eau ou de solvant(s) et sous forme
29 d'hydrate(s) ou de solvate(s) à teneurs en eau ou en solvant(s) différentes, et que
30 toutes ces formes sont utilisées, elles sont habituellement traitées comme des
31 substances distinctes faisant l'objet de monographies séparées.

32 Certaines substances chimiques, en particulier celles obtenues à partir de matières premières
33 d'origine naturelle ou de substances obtenues par fermentation, peuvent être difficiles à
34 séparer de certaines substances apparentées (exemple : sels de quinine). Ces substances
35 peuvent être traitées comme :

- 36 • une substance chimique, lorsqu'elles sont obtenues à un état de haute pureté et
37 peuvent être dosées par une méthode physico-chimique,
- 38 • une substance accompagnée d'une certaine proportion de substances apparentées,
39 auquel cas seul le composant principal est défini exactement (exemple : néomycine),
- 40 • un mélange de plusieurs composants, parfois difficile à définir, auquel cas une
41 description globale peut suffire (exemple : nystatine).

1 Il convient, s'il y a lieu, de spécifier l'origine de la substance (nom et souche de l'organisme à
2 partir duquel est obtenue la substance). Le cas échéant, la monographie précise que la
3 substance est un produit semi-synthétique dérivé d'un produit de fermentation [pour clarifier
4 l'application de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*].

5 **2.1.1 Combinaisons**

6 On utilise parfois en thérapeutique des combinaisons chimiques plus ou moins bien définies
7 (exemple : théophylline-éthylènediamine), voire des mélanges. Il est alors indispensable de
8 définir précisément chacun des constituants de la combinaison ou du mélange, avec sa
9 structure chimique et la proportion dans laquelle il est présent.

10 **2.1.2 Teneur**

11 La substance décrite dans une monographie n'est jamais une espèce chimique parfaitement
12 pure, mais contient une proportion limitée d'impuretés. La teneur est donc un terme important
13 de la définition et elle est donnée sous forme de limites à l'intérieur desquelles doit se situer le
14 résultat du dosage. Les limites de teneur doivent tenir compte à la fois de la fidélité de la
15 méthode de dosage et de la pureté acceptable de la substance. Elles sont normalement
16 exprimées par rapport à la substance desséchée ou anhydre ; la correction de teneur en
17 solvants résiduels est sous-entendue [voir *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*].

18 Dans le cas d'un dosage non spécifique (par exemple titrimétrique), les limites de teneur
19 spécifiées sont généralement de 99,0 - 101,0 pour cent (sauf exception justifiée). Dans le cas
20 d'un dosage spécifique effectué par une technique séparative (par exemple chromatographie
21 liquide ou en phase gazeuse), la limite supérieure de teneur est normalement de 102,0 pour
22 cent ; la limite inférieure est établie en tenant compte des teneurs en impuretés présentes (le
23 cas échéant) est peut donc être inférieure à 98,0 pour cent.

24 Ces limites de teneur en principe actif sont établies en tenant compte :

- 25 • du procédé de préparation, qui détermine le degré de pureté pouvant être
26 raisonnablement exigé,
- 27 • de la reproductibilité et de l'exactitude de la méthode analytique,
- 28 • lorsqu'une technique séparative est utilisée à la fois pour l'essai des substances
29 apparentées et pour le dosage, de la teneur maximale admise en impuretés et de
30 l'erreur analytique,
- 31 • de l'évaluation du degré de détérioration tolérable en cours de conservation,
- 32 • de résultats expérimentaux obtenus en nombre suffisant à partir de plusieurs lots (au
33 minimum 3), si possible d'origine et d'âge différents.

34 Lorsque la substance à examiner contient exclusivement des impuretés n'interférant pas dans
35 le dosage, ou une très faible proportion d'impuretés interférant dans le dosage, les résultats du
36 dosage peuvent être utilisés directement. Il est alors spécifié que la substance à examiner
37 contient au minimum x pour cent et au maximum l'équivalent de y pour cent (*au moins*
38 *100,5 pour cent, mais souvent un peu plus*) de ... (*définition chimique de la substance*). La
39 teneur est habituellement exprimée par rapport à la substance anhydre ou desséchée. Dans
40 certains cas, il est nécessaire de l'exprimer par rapport à la substance exempte de solvant(s),
41 ou anhydre et exempte de solvant(s). La monographie générale *Substances pour usage*
42 *pharmaceutique (2034)* indique que la teneur est calculé par rapport à la substance exempte

1 de solvant(s), ce qui couvre le cas où l'essai de solvant résiduel n'est pas mentionné dans la
2 monographie spécifique.

3 Lorsque la substance à examiner contient une proportion relativement importante (de l'ordre
4 de quelques pour cent) d'impuretés, qui sont dosées en même temps que le principe actif, il
5 convient d'employer une formulation appropriée (par exemple, dans le cas des sels de
6 quinine : « x pour cent de sels d'alcaloïdes totaux, exprimés en sels de quinine »).

7 A titre exceptionnel, il peut n'être fait référence qu'à une partie ou à un élément particulier de
8 la molécule (exemple : dosage de l'oxyde de magnésium dans le carbonate de magnésium
9 léger, ou du magnésium dans le stéarate de magnésium).

10 Dans le cas des antibiotiques titrés par voie microbiologique, la teneur en principe actif est
11 exprimée en Unités Internationales, lorsqu'elles existent, avec mention d'une teneur minimale
12 uniquement.

13 Voir également la section 2.5 Dosage du présent Guide.

14 **2.2 CARACTERES**

15 Comme indiqué dans les *Prescriptions Générales*, les descriptions figurant sous
16 CARACTÈRES ne sont pas à interpréter au sens strict et ne sont pas considérées comme des
17 exigences analytiques.

18 Les points principaux auxquels il peut être fait référence sous ce titre sont les suivants.

19 **2.2.1 Aspect**

20 Cette description inclut normalement la couleur et la forme physique. Il faut veiller à ne pas
21 utiliser le mot « blanc » sans autre précision car, par rapport à une substance témoin blanche,
22 très peu de substances pharmaceutiques paraissent réellement blanches. Cette comparaison
23 n'est bien entendu pas supposée être effectuée, mais l'expérience montre que certains
24 utilisateurs de la Pharmacopée persistent à l'effectuer au titre d'un contrat d'achat. Il convient
25 donc d'employer l'expression « blanc ou sensiblement blanc » . La description des couleurs
26 est faite en termes de couleurs primaires ou de combinaisons de couleurs primaires.

27 *Couleur.* Les qualificatifs utilisés sont les suivants :

28	noir	vert	rouge
29	bleu	gris	violet
30	brun	orangé	blanc/sensiblement blanc
31	incolore	rose	jaune

32 avec parfois des compositions telles que :

33	<i>Français</i>	<i>Anglais</i>
34	bleu-vert	greenish-blue
35	vert-bleu	bluish-green
36	rouge-violet	violet-red
37	violet-rouge	reddish-violet
38	rouge-brun	brownish-red
39	brun-rouge	reddish-brown

1 En français, la couleur dominante vient en premier ; en anglais elle est placée en second. Les
2 expressions telles que jaune citron, chamois, rose saumon sont à éviter ; on trouve dans les
3 dictionnaires courants, pour ce genre de termes, des équivalents en couleurs spectrales
4 précisées par des qualificatifs appropriés (la couleur "chamois", par exemple, est décrite
5 comme un "jaune terne"). Les adjectifs suivants sont également utilisés : clair, faible,
6 fluorescent, intense, pâle, terne, foncé.

7 Il est à noter que les règles définies pour la description des couleurs ou combinaisons de
8 couleurs s'appliquent également aux changements de coloration des indicateurs dans les
9 essais d'acidité/alcalinité et les titrages volumétriques.

10 **2.2.2 Saveur**

11 La saveur n'est pas à prendre en considération.

12 **2.2.3 Odeur**

13 Il n'est pas fait référence à l'odeur en règle générale, et en particulier pour les substances qui
14 présentent un risque à l'inhalation. Dans les autres cas, la mention de l'odeur doit être
15 justifiée.

16 **2.2.4 Solubilité**

17 Le chapitre général 5.11 *Rubrique Caractères dans les monographies* décrit une méthode
18 recommandée pour l'estimation de la solubilité. Toute indication de solubilité est à exprimer
19 dans les termes définis dans les *Prescriptions Générales*. Les solvants cités se limitent
20 normalement à l'eau, l'alcool et un solvant lipophile. La solubilité dans le chloroforme et dans
21 l'éther n'est pas mentionnée. Il peut arriver que la solubilité de différents échantillons d'une
22 substance varie sensiblement même si leur composition se situe dans les limites prescrites par
23 la monographie. Dans ce cas, la solubilité dans les différents solvants concernés est indiquée
24 de façon à couvrir plusieurs classes de solubilité (exemple : « assez soluble à soluble
25 dans... », etc.). La solubilité ou miscibilité dans d'autres solvants auxquels la substance est
26 souvent associée en pratique (huiles grasses, etc.) peut également être mentionnée. Dans
27 certains cas, il peut être utile de préciser la solubilité dans les bases ou les acides et, en cas
28 d'insolubilité très marquée dans les solvants mentionnés ci-dessus, un solvant particulier peut
29 être mentionné (diméthylformamide ou diméthylsulfoxyde par exemple). Il n'est pas
30 nécessaire de spécifier la solubilité dans tous les solvants utilisés pour réaliser les essais de la
31 monographie.

32 **2.2.5 Instabilité**

33 Toute manifestation d'instabilité liée à l'exposition à l'air, la lumière et/ou l'humidité est à
34 signaler (exemple : virage au rouge du sulfate de physostigmine lorsqu'il est exposé à l'air et à
35 la lumière). Cette indication, sous CARACTÈRES, fait l'objet d'une mention distincte de la
36 description de la substance.

37 **2.2.6 Hygroscopicité**

38 Le chapitre général 5.11 *Rubrique Caractères dans les monographies* décrit une méthode
39 pragmatique recommandée pour évaluer la tendance d'une substance à capter l'eau
40 atmosphérique (plutôt qu'une réelle détermination de l'hygroscopicité). Le caractère
41 hygroscopique ou déliquescent de certaines substances peut poser des difficultés de pesée. Il

1 convient alors de l'indiquer, en utilisant les termes définis dans le chapitre 5.11, pour
2 informer l'analyste et l'alerter sur les précautions à prendre pour manipuler la substance.

3 Lorsqu'une substance est caractérisée comme hygroscopique ou déliquescente, sa
4 conservation en récipient étanche est prescrite.

5 **2.2.7 Propriétés à l'état solide**

6 Les propriétés à l'état solide comprennent la cristallinité et le polymorphisme ainsi que la
7 masse volumique, la granulométrie et la surface spécifique des solides. Ces propriétés,
8 notamment le polymorphisme et le pseudopolymorphisme, peuvent avoir un impact sur la
9 biodisponibilité de la substance et la production du médicament. Il convient de se référer au
10 Chapitre général 5.9 *Polymorphisme*.

11 Le chapitre général 5.11 *Rubrique Caractères dans les monographies* décrit une méthode
12 recommandée pour déterminer la cristallinité.

13 Dans les monographies d'excipients, les propriétés à l'état solide ayant un impact sur la
14 fonctionnalité peuvent être traitées sous la rubrique CARACTERISTIQUES LIEES A LA
15 FONCTIONNALITE (voir plus loin).

16 La mention dans la Pharmacopée de l'existence d'un polymorphisme vise à alerter les
17 utilisateurs sur la nécessité d'évaluer ce phénomène lors du développement d'une forme
18 pharmaceutique. Lorsque l'existence d'un polymorphisme est connue, elle est signalée sous la
19 forme d'une mention séparée (« Le ... présente le phénomène du polymorphisme »).

20 Deux cas sont à distinguer lorsque l'existence d'un polymorphisme est connue :

- 21 • dans le cas général, la monographie n'exclut aucune des formes cristallines possibles,
- 22 • dans certains cas exceptionnels, si la substance est exclusivement utilisée dans des
23 formes pharmaceutiques solides et s'il est établi que l'une des formes cristallines est
24 préférable du point de vue de la biodisponibilité ou présente un meilleur profil
25 d'innocuité/efficacité, la monographie peut être restreinte à cette forme. Les
26 techniques requises pour l'identifier figurent alors sous la rubrique IDENTIFICATION.

27 **2.2.8 Autres caractéristiques**

28 D'autres caractéristiques physiques qui peuvent être utiles à titre d'information mais ne sont
29 pas suffisamment précises pour figurer sous IDENTIFICATION ou ESSAI peuvent être
30 mentionnées sous CARACTERES. Tel est généralement le cas pour le point de fusion lorsqu'il
31 n'est pas assez précis pour qu'un intervalle puisse être indiqué (lorsque l'établissement d'un
32 intervalle est possible, le point de fusion peut être indiqué sous IDENTIFICATION). Si une
33 décomposition peut se produire, cette caractéristique doit être signalée. Il peut être utile de
34 mentionner sous CARACTERES d'autres caractéristiques générales, par exemple le sens de la
35 rotation optique dans un solvant particulier ou, pour les substances radioactives, la demi-vie
36 du radionucléide et le type de rayonnement émis.

37 **2.2.9 Comportement en solution**

38 Lorsque l'on sait qu'une dégradation rapide peut se produire en solution, cette information est
39 donnée sous forme d'avertissement.

2.3 IDENTIFICATION

2.3.1 Généralités

Dans une monographie, le but de la rubrique IDENTIFICATION est de confirmer l'identité de la substance. L'identification, au sens de la Pharmacopée, est donc généralement de portée beaucoup plus limitée que l'élucidation de la structure d'une substance inconnue ou la détermination de la composition d'un mélange inconnu. La tâche d'identifier une substance ne doit pas être confondue avec l'évaluation de sa pureté ou la détermination de sa concentration même si, *in fine*, ces trois aspects sont complémentaires.

Il s'ensuit que l'objectif premier des essais et réactions physiques et/ou chimiques décrits sous IDENTIFICATION, considérés comme un ensemble, est d'assurer autant que possible la spécificité. L'identification doit être suffisamment spécifique pour permettre de distinguer les uns des autres les excipients ou substances actives possédant des structures voisines. Les identifications ne doivent pas être trop sensibles, pour ne pas donner de fausses réactions dues à la présence d'impuretés tolérées, ni exiger un travail expérimental plus important que nécessaire pour différencier la substance en question d'autres substances pharmaceutiques disponibles dans le commerce. A cet égard, il convient de tenir compte également du temps requis pour réaliser un essai.

Un seul ensemble d'essais d'identification est normalement prescrit. Dans des cas justifiés, pour offrir aux utilisateurs de la Pharmacopée le choix entre des méthodes nécessitant des appareillages complexes et des méthodes plus simples, deux séries d'identifications peuvent être proposées. Ceci est habituellement le cas lorsque la substance est utilisée dans les pharmacies hospitalières et/ou en officine. La monographie comprend alors deux séries d'essais respectivement intitulées « Première identification » et « Seconde identification ». Le ou les essais de la « Seconde identification » peuvent être utilisés en remplacement de ceux de la « Première identification » s'il peut être établi que la substance ou le médicament provient bien d'un lot certifié conforme à l'ensemble des exigences de la monographie.

Certains des essais de pureté d'une monographie peuvent également servir à l'identification, éventuellement sous une forme modifiée. Dans ce cas, il est possible d'utiliser un système de renvoi à la rubrique ESSAI. Cette approche est notamment indiquée lorsque la différenciation de substances étroitement apparentées dépend de propriétés qui interviennent également dans le contrôle de la pureté et de la composition, par exemple la teneur en eau de différents hydrates, le pouvoir rotatoire de différents isomères, la viscosité de différents homologues de longueur de chaîne d'un polymère. La rubrique IDENTIFICATION doit être autosuffisante, même si elle comporte des renvois à d'autres rubriques de la monographie.

La monographie d'une substance ne doit pas être traitée isolément. Lors de l'élaboration d'une série d'identifications, il convient d'examiner en parallèle d'autres substances similaires, qu'elles fassent ou non l'objet de monographies de la Pharmacopée, pour vérifier qu'une combinaison particulière d'identifications, dans une série, permet de distinguer entre elles des substances similaires. Cette vérification doit être effectuée systématiquement.

Dans le cas d'une monographie de famille, l'identification du type de substances peut être complétée par des essais non spécifiques, mais discriminants, portant sur l'identification individuelle des substances de la famille.

Des exemples de méthodes d'identification sont donnés ci-dessous, avec pour certaines d'entre elles des indications détaillées sur leur mise en oeuvre.

2.3.1.1 Méthodes requérant une instrumentation complexe

- 1 • Analyse spectrophotométrique, par exemple enregistrement de spectres infrarouges ou
2 de spectres de résonance magnétique nucléaire.
- 3 • Examen chromatographique par chromatographie en phase gazeuse ou
4 chromatographie liquide.

2.3.1.2 Autres méthodes

- 5 • Détermination de constantes physiques telles que le point de fusion, le point de
6 solidification, le point d'ébullition, le pouvoir rotatoire spécifique, l'angle de rotation
7 optique, le spectre UV, l'absorbance spécifique, la densité, l'indice de réfraction et la
8 viscosité.
- 9 • Réactions chimiques telles que réactions de coloration ou de précipitation (y compris
10 la formation de dérivés ou de produits de dégradation, qui peuvent ensuite être soumis
11 à un examen physique) et détermination de constantes chimiques (indice de
12 saponification, d'esters, d'hydroxyle et d'iode).
- 13 • Examen chromatographique par chromatographie sur couche mince.

14 2.3.2 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

15 La spectrophotométrie IR est généralement considérée comme une méthode autosuffisante
16 pour vérifier l'identité des substances organiques non ionisées autres que les sels d'acides ou
17 de bases organiques. Cette méthode nécessite toujours l'utilisation d'une substance ou d'un
18 spectre de référence. L'emploi de substances de référence est aujourd'hui préférée à celle de
19 spectres de référence. Ceux-ci sont utilisés lorsque la mise à disposition de substances de
20 référence pose des difficultés pratiques.

21 Les sels organiques de substances organiques, et certains sels inorganiques de substances
22 organiques (phosphates et sulfates par exemple) sont faciles à différencier les uns des autres.
23 Dans le cas des sulfates, toutefois, il est nécessaire d'étendre la gamme habituelle
24 d'enregistrement ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) à $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

25 La méthode de préparation des échantillons (pastille, film entre 2 plaques d'un sel halogéné,
26 pâte, etc.) n'est pas spécifiée dans la monographie, sauf si l'on a constaté lors des travaux
27 d'élaboration que l'obtention d'un spectre satisfaisant en dépend.

28 Dans certains cas, décrits ci-dessous, le spectre IR seul ne suffit pas à confirmer l'identité de
29 la substance et il est nécessaire de le compléter par d'autres essais.

2.3.2.1 Sels d'acides ou de bases organiques

30 Pour certains ions ou groupes fonctionnels faisant partie de substances organiques, plusieurs
31 identifications sont décrites dans les méthodes générales. Il est toutefois généralement
32 suffisant d'en utiliser une seule.

2.3.2.2 Substances chimiquement apparentées

33 Certaines substances étroitement apparentées à la substance à examiner peuvent présenter des
34 spectres trop proches de celui de la substance en question pour qu'une identification sans
35 ambiguïté soit possible. Dans ce cas, la spectrophotométrie IR est accompagnée d'un autre
36 essai simple, par exemple le point de fusion ou une chromatographie sur couche mince
37 effectuée par comparaison à une substance de référence.

2.3.2.3 Polymorphisme

1 Le chapitre général prévoit une recristallisation avant enregistrement du spectre. Lorsqu'une
2 monographie mentionne l'existence d'un polymorphisme, une méthode de recristallisation y
3 est décrite à moins que l'on ne souhaite restreindre le champ d'application de la monographie
4 à la forme cristalline représentée par la substance chimique de référence. Dans ce dernier cas,
5 la monographie indique que le spectre est enregistré "sans recristallisation".

6 Si, par exception, la monographie décrit une ou plusieurs formes cristallines spécifiques, et si
7 le spectre IR n'est pas caractéristique, un essai complémentaire est introduit.

2.3.2.4 Isomères optiques

8 Pour identifier un isomère particulier ou un racémate, un essai du pouvoir rotatoire spécifique
9 ou de l'angle de rotation optique est introduit.

10 2.3.3 Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible

11 A la différence de la spectrophotométrie IR, cette méthode est habituellement non spécifique
12 (en tant qu'identification), à moins que la courbe d'absorption ne présente plusieurs
13 maximums et minimums, des régions d'absorption inhabituellement fortes ou faibles, etc. Il
14 est peu fréquent que des substances de référence soient utilisées. Le spectre UV d'une
15 substance peut donc rarement servir à lui seul de critère d'identification.

16 La concentration de la solution à examiner est telle que l'absorbance, déterminée sous une
17 épaisseur de 1 cm, se situe de préférence entre 0,5 et 1,5.

18 L'intervalle des longueurs d'onde à explorer doit être indiqué ; en général, il ne s'étend pas
19 jusqu'à la zone probable de fin d'absorption ou d'interférence du solvant. Les longueurs
20 d'onde de maximums et minimums en forme de pics aigus sont indiquées par une valeur
21 unique, avec un écart admis de ± 2 nm, tandis qu'un intervalle est indiqué pour les bandes
22 plus larges. Lorsqu'il est jugé nécessaire de mentionner la longueur d'onde des épaulements,
23 etc., le terme « environ » peut être utilisé.

24 Les absorbances spécifiques sont également exprimées sous forme d'intervalle (généralement
25 ± 5 pour cent) afin de couvrir les variations de teneur de la substance absorbante et l'erreur
26 expérimentale. Il est à noter que la tolérance instrumentale pour l'absorbance est de $\pm 0,01$, ce
27 qui signifie que l'écart en pourcentage dû à cette source de variation dépend de la valeur
28 absolue de l'absorbance. De plus, la teneur en substance absorbante varie avec la teneur en
29 eau (ou autre solvant) autorisée ; lorsque celle-ci ne dépasse pas 1 pour cent ou se situe dans
30 des limites bien définies, il convient généralement de calculer l'absorbance spécifique de la
31 substance « en l'état » et d'établir les limites en conséquence. Lorsque le spectre présente
32 plusieurs maximums, il est possible de spécifier le(s) rapport(s) entre les absorbances
33 correspondantes, plutôt que les absorbances spécifiques individuelles, à condition que ce
34 rapport soit inférieur ou égal à 5 ; ceci évite d'avoir à corriger les absorbances pour tenir
35 compte de la teneur en solvant de la substance.

36 Il est important de choisir avec soin les solvants prescrits pour la spectrophotométrie UV, et
37 de veiller à leur pureté, afin d'éviter la présence d'impuretés susceptibles d'affecter
38 l'absorbance des substances à examiner.

39 Dans certains cas d'identification par spectrophotométrie d'absorption dans la région UV-VIS,
40 la résolution de l'instrument peut constituer un facteur critique pour l'observation des
41 caractéristiques spectrales recherchées (exemple : spectres de type benzénique présentant une

1 structure fine). Dans certains cas, la résolution minimale requise est indiquée dans la
2 monographie. Pour déterminer cette valeur, il convient de faire varier la largeur de fente
3 jusqu'à obtention d'un spectre parfaitement adapté à l'objectif recherché. La résolution
4 correspondant à ce réglage est alors définie expérimentalement sur la base du rapport des
5 absorbances obtenu avec une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent *V/V* dans l'*hexane R*,
6 comme prescrit dans la méthode générale 2.2.25. Le rapport minimal est indiqué dans la
7 monographie avec deux chiffres significatifs.

8 Le tableau 3 montre, à titre d'information, la relation approximative qui existe entre largeur
9 de fente et rapport des absorbances.

Tableau 3 — Résolution des spectrophotomètres en fonction de la largeur de fente

Largeur de fente (nm)	Rapport des absorbances
0,25	2,3
0,5	2,2
1,0	2,0
2,0	1,4
3,0	1,1
4,0	1,0

10 **2.3.4 Point de fusion, point de solidification et point d'ébullition**

11 L'utilisation de ces constantes physiques pour l'identification n'est appropriée que si leur
12 valeur est bien définie et si leur détermination ne s'accompagne pas d'une décomposition
13 risquant de les rendre excessivement tributaires du mode opératoire. L'existence possible d'un
14 polymorphisme doit également être prise en compte ; les différences éventuelles de point de
15 fusion doivent être indiquées même lorsqu'elles sont signalées sous CARACTERES. Dans les
16 cas exceptionnels où il est nécessaire de distinguer une forme cristalline spécifique, la
17 détermination du point de fusion peut aider à exclure la ou les forme(s) indésirable(s).

18 Néanmoins, il est important de ne pas oublier que la valeur observée peut correspondre à un
19 point de fusion apparent : une transition polymorphe solide-solide peut intervenir au cours de
20 l'essai et le point de fusion mesuré sera alors celui de la forme résultante.

21 La détermination du point de fusion, seule ou combinée à une réaction chimique, ne suffit pas
22 à confirmer l'identité d'une substance. Néanmoins, il suffit souvent de le compléter par une
23 autre identification, telle que la CCM. Le point de fusion déterminé par la méthode capillaire
24 habituelle est défini dans la Pharmacopée comme point de fusion de la dernière particule de
25 substance. Il ne doit pas être confondu avec l'intervalle de fusion, même si ces deux valeurs
26 sont données sous forme d'intervalle.

27 **2.3.5 Pouvoir rotatoire spécifique**

28 Lorsqu'une monographie décrit un énantiomère, la rubrique IDENTIFICATION comporte une
29 détermination du pouvoir rotatoire ou renvoie à un essai de pureté énantiomérique figurant
30 sous ESSAI. Lorsque le racémate (ou le mélange racémique) et l'énantiomère sont tous deux
31 disponibles, la monographie du racémate contient un essai du pouvoir rotatoire auquel
32 renvoie la rubrique IDENTIFICATION. Lorsque seul le racémate est disponible, une
33 détermination du pouvoir rotatoire est prescrite sous ESSAI à condition que le pouvoir

1 rotatoire spécifique de la forme chirale soit connu et suffisamment élevé pour permettre la
2 confirmation du caractère racémique.

3 **2.3.6 Chromatographie sur couche mince**

4 Cette méthode d'identification requiert l'emploi de substances de référence. Il est possible
5 d'améliorer sa sélectivité en combinant chromatographie sur couche mince et réactions
6 chimiques *in situ*, c'est-à-dire en employant des réactifs de pulvérisation appropriés. Dans ce
7 cas, il n'y a pas lieu de répéter en tube à essai la même réaction ou une réaction similaire.

8 S'il est très important d'assurer la séparation d'un couple critique dans un essai des substances
9 apparentées, cette séparation ne joue par contre qu'un rôle mineur dans une identification. La
10 séparation d'un couple critique n'est plus exigée dans le cadre des essais individuels
11 d'IDENTIFICATION, mais est maintenue dans la rubrique ESSAI. Néanmoins, au cours du
12 développement et de la validation, la séparation de la substance de substances voisines doit
13 être démontrée.

14 Un essai de séparation chromatographique est décrit dans le chapitre REACTIFS pour permettre
15 de vérifier les performances du type de plaque concerné. Cet essai est conçu comme une
16 procédure de contrôle qualité, mise en œuvre de temps en temps par l'utilisateur de la plaque
17 CCM. Il est clair qu'une procédure générale de ce type ne peut être adaptée à tous les
18 problèmes de séparation chromatographique, et qu'il est parfois nécessaire de décrire un
19 critère de séparation pour assurer l'identification de la substance. Dans de tels cas, qui restent
20 exceptionnels, un critère de séparation est spécifié dans la rubrique IDENTIFICATION.

21 Si un système CCM est utilisé dans la monographie pour un essai de pureté, il est
22 recommandé de l'employer également pour l'identification, s'il est approprié. Pour
23 l'identification, la concentration de la solution à examiner et de la solution témoin
24 correspondante est généralement réduite de façon à ce que la quantité déposée sur la plaque
25 soit de l'ordre de 5 µg à 20 µg. Il peut également être nécessaire de passer d'un système de
26 détection général à un système plus discriminant.

27 Des indications techniques sur cette méthode chromatographique figurent également dans la
28 section traitant de l'essai des substances apparentées.

29 **2.3.7 Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide**

30 Les principes de base présentés pour l'identification par chromatographie sur couche mince
31 s'appliquent ici *mutatis mutandis*. La chromatographie en phase gazeuse et la
32 chromatographie liquide sont rarement utilisées pour les identifications et, lorsqu'elle le sont,
33 renvoient à un essai ou un dosage effectué par la même méthode dans la monographie. Ces
34 techniques ne sont utilisées qu'en l'absence d'autre méthode appropriée, et jamais comme
35 unique essai d'identification. Des indications techniques sur la chromatographie en phase
36 gazeuse et la chromatographie liquide figurent également dans la section traitant de l'essai des
37 substances apparentées.

38 **2.3.8 Réactions chimiques**

39 Plusieurs réactions d'identification de nature chimique couramment utilisées sont décrites
40 dans les méthodes générales de la Pharmacopée, et il convient de les utiliser chaque fois que
41 possible. Lorsque le chapitre général 2.3.1 décrit plusieurs réactions pour un ion ou un
42 groupement fonctionnel, il n'est normalement nécessaire de n'en prescrire qu'une dans la
43 monographie. Soulignons qu'il est nécessaire de préciser la quantité de substance, ou de

1 solution, à utiliser pour la réaction d'identification en question. Il en va de même pour les
2 réactions qui doivent être décrites en détail dans la monographie.

3 Les critères d'identification faisant appel à la reconnaissance d'une odeur ou saveur sont à
4 éviter.

5 Chaque réaction chimique doit être choisie dans l'objectif de démontrer la présence d'une
6 partie différente de la molécule à identifier.

7 Pour différencier au sein d'un même groupe (famille) des substances se distinguant par :

- 8 • le niveau de condensation,
- 9 • la longueur de la chaîne hydrocarbonée (exemple : acides gras),

10 il est nécessaire de renvoyer à un ou plusieurs essai(s) de pureté approprié(s) portant sur la
11 détermination de certains indices (indice d'iode, indice de saponification, ...).

12 **2.4 ESSAI**

13 **2.4.1 Généralités**

14 La rubrique ESSAI vise essentiellement à limiter les impuretés dans les substances chimiques.
15 Le chapitre général *5.10 Contrôle des impuretés dans les substances pour usage*
16 *pharmaceutique* décrit dans le détail la politique à appliquer.

17 Si l'une des fonctions essentielles des monographies est d'assurer une pureté adéquate des
18 substances, dans l'intérêt de la santé publique, l'objectif de la Pharmacopée n'est pas pour
19 autant d'imposer aux fabricants des exigences excessives qui limiteraient inutilement leur
20 capacité à produire des produits conformes.

21 Dans un souci de transparence, des informations sont fournies chaque fois que possible sur
22 les impuretés contrôlées par un essai et sur la teneur approximative (en pourcentage, ppm,
23 etc.) qui équivaut à la limite prescrite pour les impuretés ou classes d'impuretés définies.
24 L'information associée à la limite imposée peut être une teneur nominale déterminée au vu
25 des conditions d'essai, ou être fondée sur des données issues d'expériences de recouvrement.

26 Il peut arriver qu'un essai s'applique spécifiquement à une qualité spéciale de la substance
27 (destinée à l'administration parentérale, à la préparation de solutions pour dialyse, etc.), ou
28 comporte une limite spécifique s'appliquant à un usage particulier ; le champ d'application
29 particulier de l'essai/limite est alors précisé dans l'essai.

30 **2.4.2 Titre**

31 Chaque fois que possible, le titre doit indiquer quelle est l'impureté ou classe d'impuretés
32 limitée par l'essai (par ex. : Acide oxalique, Potassium, Cuivre, Chlorures, etc.). Les essais
33 limites non spécifiques portent un titre plus général, convenablement choisi à partir de la
34 terminologie usuelle de la Pharmacopée (par ex. : Aspect de la solution, pH, Acidité ou
35 alcalinité, Métaux lourds, etc.), ou un intitulé similaire. Les titres qui se réfèrent simplement à
36 la méthodologie employée dans l'essai (par ex. : Absorbance, Pouvoir rotatoire spécifique)
37 sont à éviter dans la mesure du possible.

38 **2.4.3 Solution S**

39 Une solution de la substance à examiner, appelée « Solution S », est préparée lorsque la
40 même solution est utilisée dans plusieurs essais (et/ou identifications).

1 Si nécessaire, plusieurs solutions S (dites S1, S2, ...) peuvent être préparées selon des
2 modalités différentes, chacune étant toujours utilisée pour au moins 2 essais.

3 Pour les substances insolubles, la solution S peut être préparée par extraction.

4 Le solvant utilisé dépend de la solubilité de la substance à examiner et de celle des impuretés
5 potentielles ; il peut s'agir

6 • d'eau (cas le plus général) :

7 ○ eau exempte de dioxyde de carbone si la présence de dioxyde de carbone peut
8 affecter de façon notable les résultats d'un essai (par ex. essais « pH » ou
9 « Acidité/alcalinité », voir plus loin),

10 ○ eau distillée si la solution S sert pour les essais du baryum, du calcium ou des
11 sulfates,

12 ○ eau exempte de dioxyde de carbone préparée à partir d'eau distillée lorsque les
13 deux conditions ci-dessus s'appliquent,

14 • d'un acide dilué ou d'une solution alcaline,

15 • plus rarement, d'autres solvants (alcools, tétrahydrofurane, ...) qui fournissent des
16 solutions de champ d'utilisation plus réduit que celui des solutions aqueuses.

17 Le solvant utilisé et la concentration retenue dépendent de la solubilité de la substance à
18 examiner et de la nature des essais à effectuer. Le solvant doit permettre de procéder aux
19 essais prévus, soit directement, soit après dilution appropriée explicitement indiquée dans
20 chaque essai. Généralement, la concentration est de l'ordre de 20 g/l à 50 g/l, mais elle peut
21 être plus faible (10 g/l) ou plus élevée (100 g/l, ou même davantage dans des cas
22 exceptionnels). La quantité de solution S préparée doit suffire pour effectuer chacun des
23 essais auxquels elle est destinée. Si la solution S doit être filtrée, il convient de tenir compte
24 de la perte intervenant lors de la filtration ; quand la partie insoluble ainsi séparée doit servir
25 pour un autre essai, cela est clairement signalé.

26 L'utilisation d'une même prise d'essai de solution S pour plusieurs essais est à éviter, sauf
27 dans les cas où il paraît souhaitable d'économiser la substance (parce qu'elle est d'un coût
28 élevé ou soumise à des restrictions) ; cette latitude est alors clairement spécifiée dans la
29 monographie.

30 Selon les essais, la concentration de la solution S est définie avec une plus ou moins grande
31 précision :

32 • pour les essais "Aspect de la solution", "pH" et certaines identifications, une précision
33 de 5 à 10 pour cent est suffisante,

34 • pour la plupart des essais limites, une précision de l'ordre de 2 pour cent convient,

35 • pour certains essais tels que la détermination du pouvoir rotatoire spécifique, de
36 l'absorbance spécifique ou de divers indices chimiques, et plus généralement pour les
37 essais dont le résultat est obtenu par le calcul, une plus grande précision est
38 nécessaire.

39 La précision avec laquelle est définie la concentration de la solution S est celle requise par
40 l'essai le plus contraignant.

41 La description de la préparation de la solutions S doit donc inclure :

- 1 • la quantité de substance à examiner, avec la précision requise (voir Prescriptions
2 Générales),
- 3 • le volume, avec une décimale (10,0 ml, 25,0 ml ...) lorsque la concentration doit être
4 connue à moins de 1 pour cent près et sans décimale (10 ml, 25 ml ...) lorsqu'une
5 précision moindre est suffisante.

6 **2.4.4 Aspect de la solution**

7 Cet essai permet d'apprécier la pureté générale d'une substance par mise en évidence
8 d'impuretés insolubles dans le solvant choisi, ou d'impuretés colorées.

9 Il est presque systématiquement prescrit pour les substances destinées aux préparations pour
10 usage parentéral. En dehors de ce cas, il n'est à utiliser que s'il apporte des indications utiles
11 sur la pureté générale de la substance.

12 Il peut comporter les deux essais suivants, ou seulement l'un d'eux :

- 13 • limpidité et degré d'opalescence des liquides (2.2.1),
- 14 • degré de coloration des liquides (2.2.2).

15 Ces deux essais sont presque toujours effectués sur des solutions identiques, généralement la
16 solution S, mais ils peuvent aussi être réalisés sur des solutions différentes.

17 Le solvant utilisé est habituellement de l'eau, mais d'autres solvants peuvent être préférables
18 selon la solubilité de la substance à examiner.

19 Lorsqu'un solvant organique est utilisé pour préparer la solution S, il peut être nécessaire de
20 s'assurer qu'il satisfait lui-même à l'essai, surtout lorsque la norme appliquée est très sévère.

21 L'essai est d'autant plus sévère que la solution est plus concentrée. Pour les substances très
22 pures ou utilisées à dose élevée, la concentration choisie est de 50 g/l à 100 g/l, alors que pour
23 les substances moins pures ou administrées à faible dose la concentration retenue est de 10 g/l
24 à 20 g/l.

2.4.4.1 *Limpidité et degré d'opalescence*

25 Cet essai est surtout mis en oeuvre pour les substances incolores ou donnant des solutions
26 faiblement colorées, pour permettre une bonne comparaison avec les suspensions témoins.

27 La quantité de solution nécessaire dépend du diamètre des tubes utilisés : elle varie de 7 ml à
28 20 ml pour les tubes d'un diamètre de 15 mm à 25 mm prescrits dans la méthode générale.
29 C'est donc ce dernier volume qu'il convient de prendre en compte.

30 Le plus souvent, la solution examinée doit être « limpide » (au sens de la Pharmacopée).
31 Dans certains cas cependant, pour des substances non destinées à être utilisées en solution,
32 une opalescence plus marquée peut parfois être tolérée.

2.4.4.2 *Degré de coloration*

33 Cet essai s'applique aux substances elles-mêmes incolores mais susceptibles de contenir, ou
34 de former par dégradation, des impuretés colorées qu'il est possible de contrôler en
35 appliquant une limite de coloration de la solution.

36 Deux procédés sont décrits dans le chapitre général (2.2.2) de la Pharmacopée :

- 1 • le procédé I nécessite l'emploi de 2 ml de solution seulement, mais il est rarement
2 prescrit sauf pour des substances donnant des solutions très colorées,
- 3 • le procédé II, plus discriminant et donc plus fréquemment utilisé, nécessite l'emploi
4 d'un volume plus important de solution, identique à celui de l'essai de limpidité.

5 Les résultats obtenus par ces 2 procédés ne coïncident pas nécessairement ; la monographie
6 doit donc préciser lequel des deux utiliser.

7 La solution est décrite comme incolore lorsqu'elle est moins colorée que la solution témoin
8 B₉. Lorsqu'elle est légèrement colorée, elle est comparée à la solution témoin appropriée
9 (2.2.2). Lorsque la nuance de coloration varie selon les échantillons, il est admis de
10 mentionner deux solutions témoins (ou plus) de même degré de coloration, ou seulement le
11 degré de coloration sans spécifier la couleur réelle.

12 Pour les substances destinées à un usage parentéral ou les solutions fortement colorées,
13 notamment lorsque l'emploi du procédé I est envisagé, il est préférable d'indiquer une limite
14 d'absorbance, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde
15 appropriée (habituellement comprise entre 400 nm et 450 nm). La concentration de la
16 solution et la limite d'absorbance doivent être précisées. Les conditions opératoires et la
17 limite doivent être établies sur la base de la courbe d'absorbance entre 400 nm et 450 nm et
18 des résultats obtenus avec un certain nombre d'échantillons appropriés, y compris si
19 nécessaire des échantillons examinés après conservation ou dégradation.

20 **2.4.5 pH ou acidité/alcalinité**

21 Cet essai permet de limiter les impuretés acides ou alcalines dues à la méthode de préparation
22 ou de purification employée, ou résultant de la dégradation de la substance (par exemple dans
23 des conditions de conservation inadéquates). Il peut également servir à vérifier la
24 composition stœchiométrique de certains sels.

25 Deux types d'essais sont appliqués dans la Pharmacopée pour les impuretés protéolytiques :
26 un titrage semi-quantitatif utilisant des indicateurs colorés ou des mesures électrométriques
27 pour définir des limites (essai d'acidité/alcalinité), ou une détermination du pH.

28 La détermination du pH est à retenir si la substance possède un pouvoir tampon ; dans le cas
29 contraire, il est recommandé d'employer une méthode titrimétrique.

30 Le choix entre l'essai d'acidité/alcalinité et la détermination du pH peut être effectué sur la
31 base d'une estimation du pouvoir tampon de la substance. A cette fin, une courbe de titrage
32 peut être établie à partir d'une solution aqueuse (ou, si besoin est, d'un extrait) à la
33 concentration prévue (10 g/l à 50 g/l) d'un échantillon, de préférence pur, de la substance à
34 examiner, en utilisant respectivement de l'*acide chlorhydrique 0,01 M* et de l'*hydroxyde de*
35 *sodium 0,01 M* et en mesurant le pH par potentiométrie.

36 Le point d'inflexion de la courbe de titrage représente le pH réel de la solution ; il se trouve,
37 pour une substance pure, au point d'intersection avec l'axe des pH. Le pouvoir tampon de la
38 solution à examiner est donné par le déplacement total du pH, ΔpH , lu sur la courbe de titrage
39 après addition d'une part de 0,25 ml d'*hydroxyde de sodium 0,01 M* à 10 ml de la solution,
40 d'autre part de 0,25 ml d'*acide chlorhydrique 0,01 M* à 10 ml de la même solution. Le pouvoir
41 tampon est d'autant plus faible que ΔpH est élevé. Pour un échantillon non totalement pur, il
42 convient d'effectuer une translation de la courbe de titrage, de façon à amener le pH réel de la
43 solution sur l'axe des pH, avant de procéder à la lecture de ΔpH .

1 Le choix de la méthode à utiliser pour limiter les impuretés protéolytiques est déterminé par
 2 l'ordre de grandeur de ΔpH pour la solution examinée, suivant le schéma suivant. La
 3 classification adoptée repose sur le fait que le virage de la plupart des indicateurs colorés
 4 intervient sur un intervalle de 2 unités pH.

Classe A	$\Delta\text{pH} > 4$	Essai « Acidité/alcalinité » avec deux indicateurs appropriés
Classe B	$4 > \Delta\text{pH} > 2$	Essai « Acidité/alcalinité » avec un seul indicateur approprié
Classe C	$2 > \Delta\text{pH} > 0,2$	Mesure directe du pH
Classe D	$\Delta\text{pH} < 0,2$	La pureté protéolytique ne peut pas être raisonnablement contrôlée. Les sels composés d'ions possédant plusieurs fonctions basiques et/ou acides appartiennent à cette classe et pour eux, une mesure du pH peut contribuer à vérifier la composition si les limites sont suffisamment étroites

5 Il est évident que le fait de changer la concentration de la solution à examiner peut dans une
 6 certaine mesure modifier la classification de la substance considérée dans l'une ou l'autre des
 7 classes de pouvoir tampon définies plus haut, puisque la forme de la courbe de titrage sera
 8 également modifiée. Toutefois, il convient de ne pas dépasser l'intervalle de concentration
 9 indiqué ci-dessus, sauf si la faible solubilité de la substance dans l'eau rend inévitable
 10 l'utilisation d'une solution plus diluée.

11 Dans certains cas, il est impossible d'effectuer un essai d'acidité/alcalinité au moyen
 12 d'indicateurs en raison, par exemple, de la coloration de la solution à examiner ; les limites
 13 sont alors contrôlées par électrométrie. D'autre part, si l'addition de l'acide ou de la base
 14 provoque une décomposition ou une précipitation de la substance à examiner, il peut être
 15 nécessaire de prescrire une détermination du pH quel que soit le pouvoir tampon.

16 Lorsque, pour les raisons particulières mentionnées ci-dessus, une mesure du pH doit être
 17 prescrite pour des solutions dont le pouvoir tampon est faible ou nul, la solution à examiner
 18 est préparée avec de l'eau exempte de dioxyde de carbone. Par contre, il n'est pas nécessaire
 19 d'employer de l'eau exempte de dioxyde de carbone pour la préparation de solutions dont le
 20 pouvoir tampon est suffisant pour permettre une mesure directe du pH, car la précision
 21 requise, qui dépasse rarement 1/10 d'unité pH, ne s'en trouvera pas affectée. Lorsque, pour
 22 exprimer une exigence d'acidité, il est spécifié que le volume d'hydroxyde de sodium 0,01 M
 23 requis n'excède pas 0,1 ml pour 10 ml de solution à examiner, cette dernière doit être
 24 préparée avec de l'eau exempte de dioxyde de carbone. Lorsque la solution S doit être utilisée
 25 dans un essai de pureté protéolytique, il convient de tenir compte de ces considérations en
 26 prescrivant sa composition.

27 **2.4.6 Pouvoir rotatoire**

28 Bien qu'étant parfois utile pour l'identification, la mesure du pouvoir rotatoire est surtout
 29 utilisée comme essai de pureté pour :

- 30 • soit apprécier globalement la pureté d'une substance optiquement active, (liquide ou
 31 solide en solution), en calculant le « Pouvoir rotatoire spécifique » (titre de l'essai),
- 32 • soit limiter des impuretés optiquement actives dans une substance optiquement
 33 inactive (racémate ou mélange racémique), si le pouvoir rotatoire spécifique à
 34 589,3 nm est suffisant pour assurer une sensibilité satisfaisante. L'intervalle
 35 normalement spécifié est alors de $+ 0,10^\circ$ à $- 0,10^\circ$, pour couvrir les substances qui ne

1 sont pas de vrais racémates. On mesure dans ce cas l'« Angle de rotation optique »
2 (titre de l'essai) du liquide ou du solide en solution, dans des conditions définies.

3 Il est généralement plus approprié de contrôler ces impuretés par des méthodes de séparation
4 chirale, car le pouvoir rotatoire spécifique est souvent insuffisant pour permettre de limiter
5 l'énantiomère indésirable (distomère) en présence de l'énantiomère actif (eutomère).

6 L'essai n'est pas applicable aux solutions fortement colorées ou opalescentes (dans ce dernier
7 cas, une filtration peut parfois rendre possible la détermination).

8 Dans la description de l'essai, il convient de prendre en compte les paramètres suivants :

- 9 • la nature du solvant, qui dépend de la solubilité de la substance à examiner et de son
10 pouvoir rotatoire dans ce solvant ; la pureté et surtout la teneur en eau des solvants
11 non aqueux doivent souvent être définies avec soin,
- 12 • la concentration de la solution, qui doit être assez élevée pour permettre une lecture
13 fiable de l'angle de rotation,
- 14 • la quantité de substance à utiliser, qui doit être déterminée avec une incertitude
15 relative suffisante (en général 1 pour cent), tout comme le volume auquel compléter
16 (indiqué avec une décimale),
- 17 • le volume de solution requis, qui dépend de l'appareillage utilisé ; toutefois, comme il
18 n'excède généralement pas 25,0 ml, c'est ce volume qui est habituellement spécifié,
- 19 • le degré d'hydratation ou de solvation organique de la substance, nécessaire au
20 calcul du résultat,
- 21 • le résultat est la moyenne d'au moins 5 mesures effectuées, dans le cas d'une
22 détermination visuelle, avec un appareil permettant la lecture à 0,01° près,
- 23 • les valeurs mesurées de l'angle de rotation optique (rarement supérieures à 2°) sont
24 indiquées avec 2 décimales,
- 25 • les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique sont indiquées avec 2 ou 3 chiffres
26 significatifs : 2 pour les valeurs inférieures à 10° et 3 pour les valeurs égales ou
27 supérieures à 10°,
- 28 • la limite de composition des racémates ou mélanges racémiques.

29 **2.4.7 Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible**

30 L'absorption du rayonnement électromagnétique peut être utilisée pour les essais de pureté,
31 dans le cadre d'essais limites portant sur certaines impuretés. Le cas type est celui des
32 impuretés qui absorbent le rayonnement dans une région où la substance elle-même est
33 transparente. On mesure alors l'absorbance d'une solution de la substance à examiner, soit :

- 34 • par mesure directe sur la solution ; une absorbance maximale à une longueur d'onde
35 donnée ou sur un intervalle de longueurs d'onde donné est alors prescrite,
- 36 • après une réaction chimique conduisant à la formation, à partir de l'impureté, d'un
37 produit de réaction absorbant à une longueur d'onde où la substance à examiner est
38 transparente ; une absorbance maximale à cette longueur d'onde est alors prescrite.

39 Pour les mesures dans l'ultraviolet, il est conseillé de ne pas opérer au-dessous de 230 nm.

40 Il est important de décrire précisément les conditions opératoires, en particulier le mode de
41 préparation des solutions obtenues par dilutions successives.

2.4.8 Substances apparentées

La politique suivie en matière de contrôle des impuretés est décrite dans le chapitre général *5.10 Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique* et dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*. Les monographies doivent être élaborées conformément à cette politique. Elles ont pour vocation de couvrir les substances entrant dans la composition de médicaments autorisés dans les États membres, et doivent permettre un contrôle approprié de toutes les impuretés présentes dans ces substances, sous réserve que les informations et échantillons (substance et impuretés) requis puissent être obtenus des fabricants. Si, pour une voie de synthèse donnée, les informations et échantillons requis ne sont pas disponibles, la monographie risque de ne pas couvrir le profil d'impuretés correspondant.

Les dispositions concernant les substances apparentées de la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* s'appliquent à toutes les substances actives qui font l'objet d'une monographie de la Ph Eur, sauf indication contraire. La monographie générale indique les exceptions suivantes :

produits biologiques ou biotechnologiques, aux peptides, aux oligonucléotides, aux produits radiopharmaceutiques, aux produits de fermentation et produits semi-synthétiques dérivés, aux produits bruts d'origine animale ou végétale ou aux produits végétaux.

Si une exception doit être faite dans le cas d'une autre substance, la monographie spécifique l'indique :

« Les seuils indiqués sous « Substances apparentées » (Tableau 2034.-1) dans la monographie générale *Substances pour Usage Pharmaceutique (2034)* ne s'appliquent pas. »

Les monographies doivent normalement spécifier des critères d'acceptation pour :

- chaque impureté spécifiée,
- les impuretés non spécifiées ("toute autre impureté"), pour lesquelles le critère correspond normalement au seuil d'identification,
- les impuretés totales.

Les impuretés à contrôler comprennent : les intermédiaires et sous-produits de synthèse, les substances co-extraites dans les produits d'origine naturelle, les produits de dégradation. Les monographies de substances chimiques organiques comportent généralement un essai intitulé "Substances apparentées" (ou un essai assurant une fonction similaire mais sous un titre différent), dont l'objectif est d'assurer le contrôle des impuretés organiques ; les impuretés inorganiques sont, le cas échéant, généralement couvertes par d'autres essais. Les solvants résiduels font l'objet de dispositions spécifiques [voir plus loin, ainsi que les textes *5.4 Contrôle des solvants résiduels* et *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*].

La méthode privilégiée, et la plus couramment utilisée, pour contrôler les impuretés organiques est la chromatographie liquide ; la chromatographie en phase gazeuse ou l'électrophorèse capillaire peuvent dans certains cas lui être préférées. Beaucoup de monographies existantes font encore appel à la chromatographie sur couche mince, mais la politique recommandée aujourd'hui est de réserver cette méthode à des impuretés spécifiques pouvant difficilement être contrôlées par CL ou CPG. Les essais par CCM qui ne sont pas conformes à cette politique seront progressivement remplacés, au fur et à mesure que les informations requises sur des essais CL ou CPG appropriés seront disponibles.

1 Il est fréquent qu'une monographie doive être conçue de façon à couvrir différents profils
2 d'impuretés, en raison de la multiplicité des voies de synthèse et procédures de purification
3 utilisées par les producteurs. La pratique usuelle est alors de décrire un essai CL de portée
4 générale complété si nécessaire par d'autres essais (CL, CPG, EC, CCM, ou autres
5 techniques) visant des impuretés spécifiques. Il est toutefois de plus en plus compliqué, dans
6 certains cas, de mettre au point un essai général simple, et il faut alors décrire plusieurs essais
7 généraux dont l'objet est défini dans l'essai même, avec renvoi à la rubrique IMPURETES.

8 Les monographies couvrent un certain nombre d'impuretés spécifiées, désignées dans la
9 rubrique IMPURETES ; sont dites "spécifiées" les impuretés qui sont présentes dans les lots
10 actuels de substances utilisées dans des médicaments autorisés, et auxquelles est associé un
11 critère d'acceptation individuel. Chaque fois que possible, les monographies spécifient
12 également des critères d'acceptation pour d'autres impuretés (au seuil d'identification
13 applicable à la substance) et une limite de teneur totale en impuretés (ou de teneur totale en
14 impuretés autres que certaines impuretés spécifiées, explicitement identifiées) au-dessus du
15 seuil de déclaration. Le critère d'acceptation des impuretés spécifiées peut correspondre au
16 seuil d'identification applicable à la substance.

17 Les critères d'acceptation des impuretés spécifiées doivent à la fois tenir compte :

- 18 1. des données de qualification (le cas échéant), la limite spécifiée ne devant pas
19 dépasser la valeur à laquelle l'impureté est qualifiée ; les informations relatives à la
20 qualification sont fournies par le producteur, et la compatibilité de la limite avec les
21 données de qualification et les spécifications approuvées est vérifiée par les autorités
22 compétentes pendant l'élaboration de la monographie et/ou la phase d'enquête
23 publique via Pharmedia,
- 24 2. des résultats d'analyse de lots, les critères d'acceptation étant établis en tenant compte
25 de la production normale ; ces données sont fournies par le producteur pour des lots
26 types et vérifiées lors de l'élaboration de la monographie sur 3 lots au moins.

27 **Méthodes séparatives.** Dans le cadre de la pharmacopée, l'objectif des essais de pureté
28 effectués par une méthode séparative est habituellement de contrôler les impuretés dérivant
29 des différents procédés de fabrication et processus de dégradation connus. Cependant, les
30 conditions expérimentales choisies, notamment le système de détection, ne doivent pas
31 réduire excessivement la portée de l'essai. Les essais de pureté par chromatographie
32 constituent souvent le meilleur moyen de mettre globalement en évidence les impuretés
33 organiques dérivant de nouveaux procédés de fabrication ou d'une contamination
34 accidentelle. Il peut être intéressant de compléter un essai chromatographique par d'autres
35 essais, chromatographiques ou autres.

36 Comme mentionné dans la section traitant de l'identification, un système chromatographique
37 utilisé pour les essais de pureté peut, s'il est approprié, servir également à l'identification.

38 Lorsqu'un essai des substances apparentées utilisant une technique chromatographique est
39 prescrit, un chromatogramme représentatif est publié en même temps que la monographie
40 dans *Pharmedia*.

41 Lorsque l'on ne dispose pas d'échantillons des différentes impuretés comme substances de
42 référence, ou que le nombre des impuretés pouvant être détectées dans la substance est élevé,
43 un chromatogramme représentatif est fourni avec la substance de référence.

1 Les monographies doivent comporter un moyen fiable de situer les impuretés spécifiées dans
2 le chromatogramme. L'identification des impuretés non spécifiées est nécessaire si un facteur
3 de correction doit être appliqué. Les pics peuvent être identifiés au moyen :

- 4 — d'une substance chimique de référence pour chaque impureté ;
- 5 — d'une substance chimique de référence contenant un mélange des impuretés,
6 accompagnée d'un chromatogramme.

7 L'identification au moyen de la rétention relative n'est pas en général considérée suffisante
8 dans le cadre d'une monographie de pharmacopée, notamment dans le cas où un gradient
9 d'élution est appliqué.

10 Si une substance chimique sous forme d'un mélange d'impuretés doit être utilisée, un
11 échantillon de chaque composant du mélange doit être fourni à la DEQM afin de permettre
12 l'établissement de la substance de référence.

13 Quelques considérations générales s'appliquent à l'ensemble des techniques séparatives :

- 14 • les concentrations/charges utilisées sont généralement élevées, car la symétrie du
15 pic principal ou la forme de la tache ne constituent pas des facteurs critiques dans
16 les essais de pureté, du moins en l'absence d'interférence ; lorsque l'on utilise un
17 étalon externe à des fins de détermination quantitative, il n'est pas nécessaire que
18 la réponse du pic principal se situe dans l'intervalle de linéarité du détecteur,
- 19 • dans un essai des substances apparentées de portée générale, la substance à
20 examiner ne doit pas faire l'objet d'une modification chimique (par ex.
21 dérivatisation) avant réalisation de l'essai de pureté, en raison du risque de
22 modification du profil d'impuretés,
- 23 • de même, l'extraction de la base ou de l'acide libre avant réalisation de l'essai de
24 pureté est à éviter.

2.4.8.1 *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

25 La chromatographie sur couche mince ne doit normalement être utilisée que pour le contrôle
26 d'une impureté spécifiée, lorsque ni la chromatographie liquide, ni la chromatographie en
27 phase gazeuse ni l'électrophorèse capillaire ne conviennent (en général à cause de l'absence
28 de système de détection approprié).

29 Il convient d'utiliser des plaques préfabriquées disponibles dans le commerce, décrites dans le
30 chapitre REACTIFS de la pharmacopée ; **la dénomination commerciale des plaques qui se
31 sont avérées convenir est précisée en note de bas de page dans le projet de
32 monographie** ; cette indication est supprimée de la monographie après son adoption, mais
33 reste disponible sur le site internet de la DEQM, dans la base de données *Knowledge*. La
34 description des plaques dans le chapitre REACTIFS comprend, en plus des informations
35 concernant la phase stationnaire utilisée (type de gel, type de liant), une procédure de contrôle
36 d'acceptabilité. La monographie doit décrire le type de plaque à utiliser et spécifier un critère
37 de conformité du système. Il arrive souvent que les substances qui conviendraient le mieux
38 pour le test de conformité du système soient difficiles à obtenir individuellement ; dans ce
39 cas, il est admis de prescrire l'utilisation d'un échantillon de la substance à examiner les
40 contenant comme contaminants, voire d'un échantillon délibérément dopé avec ces
41 substances. Les plages de variation admises pour les différents paramètres opératoires sont
42 précisées dans le chapitre général 2.2.46 *Techniques de séparation chromatographique*.

1 Si la bonne réalisation de l'essai exige d'effectuer un prétraitement ou de réaliser la
2 chromatographie dans des conditions de non saturation, cette information doit figurer dans le
3 texte de la monographie (ceci s'applique notamment aux plaques en phase inversée).

4 L'utilisation d'une ou plusieurs dilutions de la substance à examiner comme solutions témoins
5 s'avère souvent adéquate à condition que les impuretés sur lesquelles porte la comparaison
6 présentent un comportement similaire dans les conditions chromatographiques choisies. Ceci
7 suppose que les taches à comparer aient des R_f suffisamment proches, pour que l'erreur due
8 aux différences de diffusion des substances pendant leur migration ne soient pas trop
9 importante. Dans le cas contraire, il convient d'employer des solutions témoins contenant les
10 impuretés spécifiées. Il peut être nécessaire de demander à l'analyste de négliger une tache
11 restant sur la ligne de départ — souvent due à l'ion apparié d'un sel, qui ne migre pas.

12 La sommation des réponses correspondant aux différentes taches n'est acceptable que si
13 l'emploi d'un instrument adéquat est prescrit. Il n'est pas recommandé de prescrire une ou
14 plusieurs limites de concentration en impuretés sans spécifier de limite pour le nombre des
15 impuretés, sous peine d'atteindre une teneur totale théorique en impuretés inacceptablement
16 élevée. On peut contourner cette difficulté en introduisant plusieurs (au moins deux) niveaux
17 de limitation des impuretés, et en autorisant la présence d'un nombre défini d'entre elles au
18 taux le plus élevé et le reste au-dessous du taux le plus bas. Par exemple, l'essai peut spécifier
19 qu'aucun contaminant ne peut dépasser une teneur relative de 1 pour cent et un seul
20 contaminant peut dépasser 0,25 pour cent ; ou qu'aucun contaminant ne peut dépasser une
21 teneur relative de 1 pour cent, un seul contaminant peut dépasser 0,5 pour cent et au
22 maximum 4 contaminants peuvent dépasser 0,25 pour cent.

2.4.8.2 *Chromatographie liquide (CL)*

23 La définition d'un système chromatographique approprié constitue souvent l'un des
24 problèmes majeurs à résoudre pour élaborer un essai de pureté par chromatographie liquide.
25 Dans le cas de la CL, la situation est encore compliquée par l'existence de nombreuses
26 variantes des phases stationnaires (particulièrement dans le cas des phases inversées
27 chimiquement liées, où il existe des variations, non seulement de marque à marque mais
28 parfois aussi de lot à lot, qui peuvent influencer une séparation donnée). La dénomination
29 commerciale de la ou des phases stationnaires/colonnes qui se sont avérées convenir lors des
30 travaux d'élaboration est précisée en note de bas de page dans le projet de monographie ;
31 cette indication est supprimée de la monographie après son adoption, mais reste disponible
32 sur le site internet de la DEQM, dans la base de données *Knowledge*.

33 Les exigences de validation sont décrites dans la Section 3. Les paramètres à considérer sont
34 les suivants :

- 35 • spécificité,
- 36 • limite de détection,
- 37 • limite de quantification,
- 38 • fidélité,
- 39 • facteurs de réponse (pour les impuretés individuelles),
- 40 • linéarité (sur l'intervalle à considérer pour un essai des substances apparentées).

41 La description du système chromatographique doit comprendre les indications suivantes :
42 dimensions de la colonne (longueur et diamètre intérieur), nature de la phase stationnaire

1 (dans le détail), avec éventuellement étapes de préparation ou de prétraitement, composition
2 et débit de la phase mobile, avec le cas échéant le programme d'élution, température de la
3 colonne (si elle diffère de la température ambiante ou est réglée à l'aide d'un thermostat),
4 méthode d'injection (si cette précision est importante), volume d'injection et méthode de
5 détection. Les plages de variation admises pour les différents paramètres opératoires sont
6 précisées dans le chapitre général 2.2.46 *Techniques de séparation chromatographique*.

7 Lorsque, après essai de différents types de phase stationnaire, un seul d'entre eux s'est avéré
8 donner une séparation satisfaisante, il doit en être fourni une description précise comportant
9 par exemple les informations suivantes : type des particules (irrégulières ou sphériques), taille
10 des particules, surface spécifique (m^2/g), dimension des pores (nm) et, dans le cas des
11 colonnes en phase inversée, proportion de carbone (en pourcentage) et utilisation éventuelle
12 d'un post-greffage ou autre traitement destiné à inactiver les groupes silanol résiduels (ceci
13 est particulièrement important lorsque des substances basiques doivent être examinées et qu'il
14 existe un risque de traînée sur les pics).

15 Pour préparer la solution à examiner et les solutions témoins, il convient chaque fois que
16 possible d'utiliser la phase mobile comme solvant afin de limiter les anomalies des pics.

17 Pour plus de simplicité et pour une meilleure reproductibilité, il est préférable de recourir à
18 une élution isocratique et d'opérer à température ambiante (18-22 °C). Lorsque l'emploi de
19 températures différentes présente un avantage, la température est spécifiée (≥ 30 °C).
20 Lorsqu'un système à gradient d'élution est décrit, tous les paramètres utiles doivent être
21 clairement indiqués : composition des phases mobiles, conditions d'équilibre, conditions de
22 gradient (linéaire ou par paliers), etc.

23 De nombreuses substances pharmaceutiques actives possèdent plusieurs voies de synthèse ; la
24 liste des impuretés potentielles à limiter peut donc être longue et leur séparation peut
25 constituer un véritable défi analytique. Les méthodes de chromatographie liquide isocratiques
26 n'étant parfois pas suffisamment sélectives, il est de plus en plus fréquent d'avoir à recourir à
27 des méthodes à gradient. Il faut alors avoir conscience des embûches que peuvent recéler des
28 différences significatives du volume compris entre mélangeur et colonne lors d'un transfert de
29 méthode.

30 Lorsque l'on envisage de recourir à un gradient d'élution en chromatographie liquide, le
31 volume mort compris entre la chambre de mélange des solvants et le sommet de la colonne
32 (parfois appelé *dwel volume* en anglais, et on parle également de "délai") est un important
33 paramètre à considérer. Ce volume est noté V_D . D'importantes différences de volume V_D entre
34 systèmes de pompage entraînent des différences dans l'élution des pics. Ce volume dépend de
35 la configuration du système de pompage, et notamment des dimensions des capillaires, de la
36 chambre de mélange des solvants et de la boucle d'injection ; il est constant pour un système
37 particulier. Son influence sur les temps de rétention affecte principalement les substances peu
38 retenues. Il faut donc veiller à concevoir les systèmes à gradient de telle sorte que les analytes
39 ne soient pas élués en début de gradient. La meilleure solution est de procéder à l'élution des
40 composants les moins fortement retenus au moyen d'une phase isocratique initiale, qui sera
41 suivie d'un gradient assurant l'élution des composants plus fortement retenus. L'effet du
42 volume V_D est alors atténué. Par ailleurs, une phase isocratique initiale permet de pallier des
43 différences marquées de volume V_D entre systèmes de pompage.

44 Il semble que les spécifications relatives à V_D soient similaires pour les systèmes de pompage
45 haute pression et basse pression (moins de 1,0 ml dans tous les cas). Il faut toutefois procéder
46 à une détermination expérimentale de V_D ; si le volume mesuré n'excède pas 1,0 ml, les
47 différences de temps de rétention ou de rétention relative entre systèmes seront minimales.

1 En conclusion, il est recommandé de recourir chaque fois que possible à des systèmes
2 isocratiques ; si toutefois l'emploi d'un gradient d'élution est inévitable, il faudra :

- 3 • décrire en détail les caractéristiques de la phase stationnaire utilisée,
- 4 • faire précéder le gradient d'élution d'une étape isocratique assurant l'élution des
5 composants les moins retenus,
- 6 • faire en sorte d'obtenir, pendant la phase gradient, un profil d'élution tel que les
7 analytes ne soient pas élués en début de gradient,
- 8 • s'assurer que le système de pompage utilisé pour développer la méthode présente un
9 volume mort V_D entre mélangeur et colonne inférieur à 1,0 ml.

10 Si la méthode est développée avec un système présentant un volume V_D supérieur à 1,0 ml, il
11 est essentiel de prévoir une étape isocratique initiale appropriée.

12 Lors de la validation de la méthode, il convient de tester plusieurs phases stationnaires ; la
13 dénomination des produits qui se sont avérés adéquats sera indiquée en note de base de page
14 dans le projet de monographie publié dans *Pharmeuropa*.

15 **2.4.8.2.1 Critères de conformité du système**

16 Un ou plusieurs critères de conformité du système doivent figurer dans l'essai. Les exigences
17 du chapitre 2.2.46 *Techniques de séparation chromatographique* sont également applicables.

18 **CAPACITE DE SEPARATION**

19 Un critère de ce type est nécessaire dans tous les cas où une technique de séparation est
20 employée pour un dosage et/ou un essai des substances apparentées. Différentes approches,
21 détaillées ci-après, sont acceptables pour vérifier la conformité du système sous cet aspect ;
22 elles reposent pour la plupart sur la séparation d'un couple critique.

23 **Résolution.** Elle est calculée, par la formule indiquée dans la méthode générale (2.2.29), pour
24 deux pics voisins correspondant de préférence à la substance elle-même et à une impureté
25 potentielle. Toutefois, si les temps de rétention de ces deux pics sont très différents, donc la
26 résolution élevée ($> 5,0$), l'emploi de la résolution comme critère de conformité est d'un
27 intérêt limité. Il est alors préférable d'utiliser une autre impureté, ou une autre substance
28 chimiquement apparentée à la substance considérée, donnant une résolution moins élevée.
29 Des pics de hauteur différente peuvent être utilisés pour calculer la résolution, mais des
30 différences trop importantes compromettront l'utilité de ce critère.

31 **Rapport pic/vallée.** Ce paramètre peut être employé lorsqu'il est impossible d'obtenir une
32 séparation complète entre 2 pics adjacents, c'est à dire lorsque la résolution est inférieure à
33 1,5.

34 **Dégradation *in situ*.** Cette approche est envisageable pour établir la conformité du système à
35 condition qu'une dégradation de la substance en solution soit possible dans des conditions de
36 "stress" modéré et dans un temps raisonnablement court, et qu'elle donne des produits de
37 décomposition dont les pics peuvent servir à déterminer une résolution ou un rapport
38 pic/vallée.

39 **Chromatogramme d'une substance impure ou "dopée".** Cette méthode constitue un autre
40 moyen possible de définir le système. Elle peut être utilisée lorsqu'une impureté éluee près du
41 pic principal est difficile à isoler en quantité suffisante pour établir une substance de
42 référence. Dans ce cas, un chromatogramme peut être fourni avec la SCR pour conformité du

1 système, ou publié avec la monographie, ou encore décrit dans le texte de l'essai des
2 substances apparentées.

3 L'emploi d'une substance impure ou dopée nécessite de pouvoir se la procurer en quantité
4 suffisante pour permettre l'établissement de la substance de référence, et la remplacer
5 ultérieurement par un matériel présentant les mêmes caractéristiques.

6 Les méthodes à privilégier pour établir la conformité du système sont le calcul de la
7 résolution et du rapport pic/vallée, et ceci est également valable lorsque l'on utilise une SCR
8 constituée d'une substance impure ou dopée. Si l'on opère avec un gradient d'élution, il est
9 préférable de spécifier une exigence de conformité du système pour chaque étape critique du
10 gradient.

11 Notons que l'indication de temps de rétention ou de rétentions relatives sert exclusivement à
12 l'identification des pics et ne peut être utilisée comme critère de conformité du système.

13 **2.4.8.2.2 Quantification**

14 La quantification est nécessaire dans l'application des limites pour les impuretés spécifiées et
15 non spécifiées et pour le total des impuretés. Elle est le plus souvent effectuée au moyen d'un
16 étalon externe ou exceptionnellement par le procédé dit « de normalisation ». Lorsqu'une
17 limite pour le total des impuretés est donnée, une limite d'exclusion est définie,
18 habituellement au seuil de déclaration [voir *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*];
19 une dilution de la solution à examiner est en général utilisée pour établir la limite d'exclusion.

20 *Etalon externe.* Une dilution de la solution/substance à examiner est utilisée, sauf s'il y a une
21 différence notable dans la réponse du détecteur vis-à-vis d'une impureté spécifiée (et
22 exceptionnellement d'une impureté non spécifiée); un étalon externe spécifique est alors
23 nécessaire et peut être constitué par :

24 · une solution de l'impureté ;

25 · une solution de la substance à examiner ayant une teneur connue de l'impureté.

26 Dans le cas d'utilisation d'une dilution de la substance à examiner en tant qu'étalon externe,
27 si la réponse du détecteur vis-à-vis de l'impureté diffère de plus de 20 pour cent de celle vis-
28 à-vis de la substance à examiner, un facteur de correction est indiqué dans la monographie.

29 .

30 *Normalisation.* La quantification par normalisation des surfaces exige d'être sûr que tous les
31 solutés sont élués et détectés, de préférence avec des facteurs de réponse uniformes, et qu'il
32 existe une relation linéaire entre la réponse du détecteur et les concentrations employées. Ces
33 aspects doivent être validés.

2.4.8.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

34 Les difficultés que pose la définition d'un système chromatographique approprié sont
35 comparables à celles mentionnées pour la chromatographie liquide, bien que pouvant
36 concerner d'autres aspects. Les détails expérimentaux à décrire dans un essai de pharmacopée
37 doivent donc être ici encore formulés comme des exemples, pour qu'il soit possible de faire
38 varier les paramètres chromatographiques afin d'atteindre les performances exigées. La nature
39 de la phase stationnaire, c'est-à-dire la composition du matériau recouvrant le support (y
40 compris sa concentration) et le support inerte lui-même (y compris la taille des particules et
41 les prétraitements éventuels) doivent être décrits en termes généraux, mais les références
42 détaillées des colonnes sont à notifier pour publication dans *Pharmeuropa*.

1 Dans la description du système chromatographique, les facteurs à mentionner sont pour
2 l'essentiel les mêmes que pour la chromatographie liquide, avec les adaptations appropriées :
3 programme de température (le cas échéant) au lieu du programme d'élution, température de la
4 chambre à injection et du détecteur, etc. L'emploi de colonnes remplies est à éviter. Les
5 plages de variation admises pour les différents paramètres opératoires sont précisées dans le
6 chapitre général 2.2.46 *Techniques de séparation chromatographique*.

7 Pour plus de simplicité et pour une meilleure reproductibilité, il est préférable d'opérer dans
8 des conditions isothermes. La quantification repose généralement sur l'utilisation d'un étalon
9 interne ou du procédé de normalisation des surfaces. Les limitations mentionnées pour la CL
10 quant à la sommation des pics s'appliquent également ici.

2.4.8.4 *Électrophorèse capillaire*

11 L'électrophorèse capillaire est de plus en plus utilisée pour séparer et contrôler les impuretés
12 lorsqu'elles sont nombreuses et présentent d'importantes différences de polarité. Elle permet
13 également de contrôler la teneur de l'énantiomère indésirable dans les substances
14 pharmaceutiques chirales. Lorsque la séparation est effectuée en capillaire de silice fondue, le
15 problème de variabilité des performances en fonction de la phase stationnaire, rencontré en
16 chromatographie liquide en phase inversée, est éliminé.

17 La détermination s'accompagne d'une production de chaleur par effet Joule et il est
18 nécessaire, pour obtenir une reproductibilité satisfaisante, de maintenir une température
19 constante à l'aide d'un thermostat ou, à défaut, d'opérer à basse tension.

20 La limite de détection peut également poser problème du fait des très petits volumes injectés
21 et de la brièveté de la fenêtre de détection dans le capillaire, même si l'on a recours à des
22 techniques de tassement. Pour le contrôle des impuretés ou les dosages, l'emploi d'un étalon
23 interne est recommandé pour obtenir la fidélité requise. Pour le reste, les principes à suivre
24 sont similaires à ceux décrits plus haut pour la chromatographie liquide.

25 En analyse chirale, un sélecteur chiral est ajouté au tampon d'électrophorèse. Ce sélecteur
26 doit être soigneusement décrit dans la monographie ou comme Réactif, en particulier s'il
27 s'agit d'un dérivé de cyclodextrine. Beaucoup de ces dérivés étant substitués de façon
28 aléatoire, il est important d'indiquer le degré précis ou moyen et le site de substitution. Lors
29 de la validation de la méthode, il convient d'utiliser plusieurs lots du dérivé de cyclodextrine.

30 ***Paramètres expérimentaux à considérer pour inclusion dans la monographie***

- 31 • Paramètres instrumentaux : tension, polarité, température, dimensions du capillaire
32 (diamètre et longueur – longueur totale et longueur efficace jusqu'au détecteur)
- 33 • Matériau greffé sur le capillaire (le cas échéant)
- 34 • Tampon : pH, molarité, composition
- 35 • Solvant de l'échantillon
- 36 • Séparation : polarité, U , I
- 37 • Injection : t , $U/\Delta p$
- 38 • Détection : longueur d'onde, instrumentation
- 39 • Température
- 40 • Durée de conservation des solutions, le cas échéant

- 1 • Procédures de rinçage (temps, réactifs, Δp) requises pour stabiliser les temps de
- 2 migration et la résolution des pics
- 3 • Préconditionnement des nouveaux capillaires
- 4 • Préconditionnement du capillaire avant une série de mesures
- 5 • Rinçage entre déterminations

6 En *note de bas de page*, pour transfert dans la base de données *Knowledge* de la DEQM après

7 adoption de la monographie :

- 8 • en cas d'utilisation d'un capillaire greffé, dénomination commerciale du capillaire qui
- 9 s'est avéré convenir lors des travaux d'élaboration de la monographie,
- 10 • pour les séparations chirales, dénomination commerciale du sélecteur chiral
- 11 (cyclodextrine ou autre) qui s'est avéré convenir lors des travaux d'élaboration de la
- 12 monographie.

13 Pour réduire le signal dû à l'écoulement électro-osmotique, il est souhaitable, chaque fois que

14 possible, d'utiliser de l'eau pour préparations injectables ou le tampon d'électrophorèse

15 comme solvant pour la préparation des solutions à examiner et les solutions témoins.

16 **2.4.9 Substances facilement carbonisables**

17 Cet essai non spécifique a beaucoup perdu de son intérêt du fait de l'introduction des essais

18 chromatographiques, qui fournissent davantage d'informations sur les impuretés organiques.

19 Son principal avantage réside dans sa sensibilité, souvent élevée. Néanmoins, la pratique a

20 montré que les impuretés qui produisent une coloration dans les conditions de l'essai donnent

21 souvent une réponse tout aussi satisfaisante lors d'un essai colorimétrique en simple solution

22 aqueuse ou alcoolique ; il convient dans ce cas d'éviter une inutile duplication.

23 S'il apparaît, lors de l'élaboration d'une monographie, que certaines impuretés susceptibles

24 d'être présentes ne sont pas contrôlées par les autres essais, il convient d'effectuer l'essai des

25 substances facilement carbonisables et de l'introduire dans la monographie s'il s'avère utile.

26 **2.4.10 Anions et/ou cations étrangers**

27 Les bases et acides inorganiques forts étant d'un usage courant en synthèse, la teneur d'une

28 substance en anions et/ou cations étrangers peut constituer un indicateur du niveau de

29 purification assuré. Elle peut également révéler une éventuelle contamination par des

30 substances étroitement apparentées. D'autre part, il est souvent possible d'éliminer les

31 impuretés ioniques des substances faiblement hydrosolubles (par traitement par l'eau) sans

32 pour autant éliminer les impuretés organiques. La recherche des anions et cations, sans

33 remplacer un essai des substances apparentées dans les substances organiques, peut en

34 revanche constituer un complément utile dans le cas de substances organiques hydrosolubles.

35 Pour les substances inorganiques, habituellement préparées à partir d'autres substances

36 inorganiques, une gamme plus étendue de recherches d'ions étrangers doit être envisagée.

37 Lorsque l'introduction d'une recherche d'anions étrangers dans des substances organiques est

38 envisagée, un seul essai (chlorures, sulfates, ou plus rarement nitrates) suffit généralement,

39 même lorsque plusieurs anions peuvent théoriquement être présents. Il convient alors

40 d'effectuer l'essai sur le plus abondant d'entre eux.

1 Certains cations doivent être strictement limités du fait de leur toxicité ou de leur activité
2 catalytique. Ils sont traités séparément ci-après, dans l'essai des métaux lourds. A moins
3 qu'existent des raisons particulières de limiter la présence des cations, individuellement ou
4 par petits groupes, dans les substances organiques, une détermination de la teneur en cendres
5 sulfuriques (voir plus loin) permet de contrôler de façon adéquate la majorité d'entre eux.

6 **2.4.11 Métaux lourds**

7 Les métaux lourds détectés par les différents essais décrits dans la méthode générale sont
8 ceux qui précipitent à pH 3,5 sous forme de sulfures colorés sous l'action d'ions sulfure ou de
9 réactifs capables de les produire : plomb, cuivre, argent, mercure, cadmium, bismuth,
10 ruthénium, or, platine, palladium, vanadium, arsenic, antimoine, étain et molybdène
11 (*Pharmeuropa*, Vol. 1, p. 249). L'agent de précipitation utilisé est le thioacétamide ; le sulfure
12 de sodium est autorisé comme option alternative, mais l'utilisateur doit en valider l'emploi
13 pour chaque substance au moyen de solutions de contrôle.

14 La comparaison est effectuée avec un témoin contenant une quantité connue de plomb. La
15 teneur totale en "métaux lourds" est donc exprimée en "plomb", bien que la sensibilité pour
16 les différents métaux ne soit pas la même.

17 La Pharmacopée propose sept essais différents.

- 18 • Les essais A et B reposent sur l'emploi direct d'une solution dans l'eau ou dans un
19 solvant organique. Ils sont donc applicables aux substances solubles dans ces
20 conditions. Si la solution est suffisamment limpide et peu colorée (intensité de
21 coloration inférieure au degré 6), l'essai peut être effectué par comparaison directe des
22 solutions ; dans le cas contraire, il convient de prescrire une filtration et de comparer
23 les membranes filtrantes. Ces essais ne sont applicables que si la substance n'interfère
24 pas dans la précipitation des sulfures par le réactif au thioacétamide ni ne masque les
25 métaux par chélation ; l'absence d'interférence doit être vérifiée au moyen
26 d'expériences de recouvrement lors de la validation de l'essai en vue de son
27 introduction dans la monographie. Les essais A et B ne nécessitent pas la préparation
28 de solutions de contrôle, sauf si l'agent de précipitation utilisé est le sulfure de
29 sodium, auquel cas il faut démontrer préalablement l'acceptabilité de l'essai en
30 préparant des solutions de contrôle comme indiqué dans la méthode générale.
- 31 • L'essai E possède une limite d'applicabilité plus basse (2 µg de plomb dans 30 ml de
32 solution). Il comporte une solution de contrôle.
- 33 • Les essais C, D, F et G font intervenir une minéralisation préalable. Ils sont utilisés
34 lorsque les essais A et B ne sont pas applicables à la substance (trop faible solubilité,
35 propriétés de chélation, interférence du réactif au thioacétamide dans la précipitation
36 des sulfures métalliques). Les essais C et D manquent de robustesse, car certains
37 métaux lourds (comme le mercure, le plomb ou l'arsenic) subissent lors de la
38 minéralisation divers degrés de déperdition par volatilisation. La préférence est
39 aujourd'hui donnée aux essais F et G, qui reposent sur une minéralisation par voie
40 humide. L'essai F est long à réaliser ; l'essai G, qui utilise une minéralisation assistée
41 par micro-onde, est plus rapide et plus pratique. Tous deux font appel à des solutions
42 de contrôle.

43 En routine, les essais A, B, C, D F et G ne sont pas appropriées pour établir des limites au-
44 dessous de 5 ppm, à moins qu'une filtration ne soit prescrite. Pour les limites inférieures à
45 cette valeur, l'essai E, qui permet de descendre jusqu'à 0,5 ppm, peut être appliqué. Pour les

- 1 limites inférieures à 0,5 ppm, il est nécessaire de recourir à des essais spécifiques pour
 2 chaque métal, utilisant souvent la spectrométrie d'absorption atomique.
- 3 Critères d'introduction d'un essai des métaux lourds :

Dose journalière > 0,5 g/jour, traitement < 30 jours	Essai des métaux lourds, limite 20 ppm
Dose journalière > 0,5 g/jour, traitement > 30 jours	Essai des métaux lourds, limite 10 ppm
Dose journalière < 0,5 g/jour, traitement > 30 jours	Essai des métaux lourds, limite 10 ppm si la substance est administrée par voie parentérale, 20 ppm dans le cas contraire
Dose journalière < 0,5 g/jour, traitement < 30 jours	Pas d'essai des métaux lourds

- 4 Des recherches de catalyseurs métalliques particuliers sont introduites lorsque l'on sait qu'ils
 5 interviennent dans la synthèse d'une substance active ou d'un excipient. Les limites dépendent
 6 de la toxicité, de la (des) voie(s) d'administration et du procédé de fabrication.

7 **2.4.12 Perte à la dessiccation**

8 En règle générale, une limite supérieure de perte à la dessiccation est spécifiée. Si la
 9 substance est un hydrate (ou un solvate), des limites inférieure et supérieure sont indiquées.
 10 La dessiccation est effectuée jusqu'à masse constante sauf si une durée de dessiccation est
 11 spécifiée dans la monographie, auquel cas il convient de fournir des données de validation
 12 adéquates. Lorsque la température de dessiccation est indiquée sous forme d'une valeur
 13 unique, une tolérance de ± 2 °C est sous-entendue. Pour les températures supérieures à
 14 105 °C, il convient si nécessaire d'indiquer une tolérance plus large dans la monographie.

15 Le chapitre général décrit cinq types de conditions opératoires standard, auxquelles il est fait
 16 référence dans les monographies au moyen d'expressions conventionnelles :

- 17 a) « dans un dessiccateur » (sur du P₂O₅ à la pression atmosphérique et à température
 18 ambiante),
- 19 b) « sous vide » (sur du P₂O₅ à 1,5-2,5 kPa et à température ambiante),
- 20 c) « sous vide, avec indication d'un intervalle de température » (sur du P₂O₅ à 1,5-
 21 2,5 kPa et dans l'intervalle de température spécifié dans la monographie),
- 22 d) « à l'étuve, avec indication d'un intervalle de température » (la température spécifiée
 23 est de préférence de 105 °C (pour harmonisation avec la JP et l'USP), avec une
 24 tolérance implicite de ± 2 °C),
- 25 e) « sous vide poussé » (sur du P₂O₅ à pression $\leq 0,1$ kPa et à la température prescrite
 26 dans la monographie).

27 Si d'autres conditions sont appliquées, elles sont intégralement décrites dans la monographie.

28 L'essai peut être effectué à l'échelle d'une semi-microdétermination ; l'exactitude de pesée de
 29 la prise d'essai doit alors être spécifiée en conséquence.

30 La méthode d) est à utiliser de préférence lorsque le produit est suffisamment stable à 105 °C.
 31 Si tel n'est pas le cas, on a habituellement recours à la méthode b) ou c). Il ne faut cependant
 32 pas oublier que les solvants organiques ne sont pas toujours faciles à éliminer (exemple :
 33 solvants organiques dans la colchicine).

1 Les limites inférieures à 10 pour cent sont exprimées avec 2 chiffres significatifs, celles
2 égales ou supérieures à 10 pour cent avec 3 chiffres significatifs. La prise d'essai est choisie
3 de façon à obtenir une différence entre les pesées avant et après dessiccation de 5-50 mg ; elle
4 est exprimée avec 4 chiffres significatifs.

5 **2.4.13 Thermogravimétrie (2.2.34)**

6 La perte à la dessiccation peut être déterminée par thermogravimétrie lorsqu'il faut opérer sur
7 des prises d'essai réduites, par exemple pour exposer le moins possible l'analyste ou lorsque
8 la substance est très onéreuse (exemples : sulfate de vincristine et sulfate de vinblastine).

9 **2.4.14 Semi-microdosage de l'eau (Karl Fischer – 2.5.12)**

10 Des réactifs du commerce sans pyridine sont aujourd'hui utilisés au lieu du *réactif*
11 *iodosulfureux R* ; il est nécessaire de vérifier la stœchiométrie et l'absence d'interférence (ces
12 données peuvent être fournies par le fournisseur du réactif pour la substance en question).

13 Le nom commercial du titrant utilisé pendant l'élaboration de la monographie est indiqué
14 dans une note de bas page et l'information est transférée à la base de données Knowledge
15 après publication de la monographie.

16 Les limites inférieures à 10 pour cent sont exprimées avec 2 chiffres significatifs, celles
17 égales ou supérieures à 10 pour cent avec 3 chiffres significatifs. Le semi-microdosage de
18 l'eau n'est pas recommandé pour des teneurs en eau inférieures à 0,5 pour cent. La prise
19 d'essai est choisie de façon à obtenir un volume de titrage d'au moins 1 ml et elle est
20 indiquée avec 3 chiffres significatifs.

21 **2.4.15 Microdosage de l'eau (2.5.32)**

22 La méthode générale ne fournit pas de description détaillée de la composition du réactif
23 électrolytique (anolyte et catolyte), car la plupart des laboratoires utilisent des réactifs du
24 commerce prêts à l'emploi.

25 Les limites sont exprimées avec 2 chiffres significatifs. La prise d'essai est choisie de façon à
26 obtenir une teneur en eau qui se situe entre 10 µg et 10 mg ; le titrage de quantités de l'ordre
27 de 10 µg n'est prescrit que si la teneur en eau est très faible ou si la prise d'essai est limitée
28 par le coût. La prise d'essai est exprimée avec 3 chiffres significatifs.

29 **2.4.16 Dosage de l'eau par chromatographie en phase gazeuse**

30 La teneur en eau peut également être déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

31 **2.4.17 Détermination de l'eau par entraînement (2.2.13)**

32 Cette méthode est principalement utilisée pour les drogues végétales. Elle est applicable à une
33 quantité de substance capable de libérer 2 ml à 3 ml d'eau.

34 **2.4.18 Cendres sulfuriques**

35 Cet essai est généralement destiné au dosage global des cations étrangers présents dans les
36 substances organiques, et dans les substances inorganiques se volatilisant dans les conditions
37 de l'essai. Pour la majorité des sels inorganiques de substances organiques, il présente donc
38 un intérêt limité en tant qu'essai de pureté, en raison de l'erreur résultante.

1 Sauf exception justifiée, la limite de l'essai des cendres sulfuriques est habituellement établie
2 à 0,1 pour cent. La quantité de substance à utiliser pour l'essai doit être telle qu'un résidu
3 correspondant à la limite pèse au moins 1,0 mg ; la masse de la prise d'essai est alors
4 spécifiée avec la précision requise (1,0 g).

5 **2.4.19 Résidu à l'évaporation**

6 La quantité de substance liquide prescrite pour l'essai doit être telle qu'un résidu
7 correspondant à la limite pèse au moins 1,0 mg. La masse ou le volume de la prise d'essai est
8 normalement de l'ordre de 10 g à 100 g (ou ml).

9 **2.4.20 Solvants résiduels**

10 Le contrôle des solvants résiduels est traité dans le chapitre général *5.4 Solvants résiduels* et
11 la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)*, lesquels mettent en
12 application le guideline ICH.

13 Un essai d'un solvant de classe 1 est inclus dans la monographie s'il est potentiellement
14 présent dans un produit approuvé.

15 Un essai pour les solvants de classe 2 n'est pas inclus dans la monographie puisque la limite
16 peut être fixée selon l'option 2 du chapitre 5.4, qui prend en compte tous les composants de la
17 préparation pharmaceutique.

18 Un essai d'un solvant de classe 3 est inclus dans la monographie s'il est potentiellement
19 présent dans un produit approuvé à un niveau supérieur à 0,5 pour cent.

20

21 **2.5 DOSAGE**

22 Toute les monographies comportent un dosage, sauf dans les cas où :

- 23 • toutes les impuretés prévisibles peuvent être détectées et limitées avec une fidélité
24 suffisante,
- 25 • certains essais quantitatifs assimilables à des dosages (pouvoir rotatoire spécifique,
26 absorbance spécifique, ...) sont effectués avec une fidélité suffisante,
- 27 • des profils de composition spécifiques sont établis, par exemple la composition de la
28 fraction acides gras (2.4.22) ou de la fraction stérol (2.4.23) pour les graisses et les
29 huiles grasses,
- 30 • les essais réalisés suffisent à établir la qualité de la substance, généralement au travers
31 d'un composant non actif tel que l'éthanol ou l'eau.

32 Dans certains cas, il peut être nécessaire de procéder à plusieurs dosages, lorsque :

- 33 • la substance à examiner se compose de 2 constituants qui ne sont pas obligatoirement
34 présents en proportions absolument fixes, de sorte que le dosage d'un seul d'entre eux
35 ne permet pas de doser correctement l'ensemble de la substance (exemple :
36 théophylline et éthylènediamine),
- 37 • le résultat des essais quantitatifs ne reflète pas totalement l'activité thérapeutique,
38 auquel cas un titrage biologique est introduit.

1 Dans le cas de sels bien définis, le dosage d'un seul des ions (de préférence le composant
2 pharmacologiquement actif) est généralement considéré comme suffisant. Il n'est que
3 rarement nécessaire de doser tous les ions et, dans tous les cas, il est superflu de doser l'un
4 des ions par deux méthodes, même fondées sur des principes différents.

5 Lorsque l'identification et les essais de pureté sont suffisamment caractéristiques et complets,
6 un titrage non spécifique mais fidèle peut remplacer un titrage spécifique mais moins fidèle.

7 Toute méthode de dosage proposée doit être validée selon les procédures décrites pour les
8 différentes techniques dans la section 3 du présent guide.

9 **2.5.1 Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible**

10 Les dosages spectrophotométriques peuvent être effectués soit directement, en lumière
11 ultraviolette ou visible, soit après une réaction colorée appropriée ; leur fidélité est toutefois
12 moindre dans ce dernier cas. La préférence est généralement donnée à d'autres méthodes.

2.5.1.1 Mesure directe

13 Elle est non spécifique, mais d'une fidélité acceptable, et est habituellement réalisée sans
14 substance de référence : l'absorbance de la solution est mesurée au maximum d'absorption
15 spécifié, puis la concentration de la substance à examiner est calculée sur la base de
16 l'absorbance spécifique indiquée dans la monographie.

17 La valeur de l'absorbance spécifique doit être vérifiée :

- 18 • pour une nouvelle substance, le fabricant doit fournir des données de validation
19 justifiant la valeur adoptée comme valeur « vraie ». Ces données concernent, par
20 exemple, la pureté de la substance utilisée pour établir cette valeur. Elle doit être
21 confirmée au moyen de différentes méthodes, dont des techniques séparatives, des
22 méthodes absolues, les facteurs de réponse des impuretés potentielles, etc.

23 Avec une substance de référence, la teneur en principe actif est calculée par comparaison de
24 l'absorbance de la solution à examiner avec celle d'une solution de la substance de référence.

25 Pour les détails expérimentaux et les résultats, voir le chapitre 2.2.25 *Spectrophotométrie*
26 *d'absorption dans l'ultraviolet et le visible*.

2.5.1.2 Mesure après réaction colorée

27 On opère par comparaison à une substance de référence. La fidélité de la méthode peut être
28 moindre en raison des manipulations effectuées.

29 **2.5.2 Analyse volumétrique**

30 La quantité de substance utilisée pour le dosage est telle que le volume de réactif titrant
31 consommé pour le titrage final soit inférieur à 10 ml (de préférence entre 7 ml et 8 ml), afin
32 de permettre l'emploi d'un équipement de titrage classique. Dans le cas d'un titrage en retour,
33 le volume fixé pour le premier réactif titrant ajouté doit en outre être suffisamment important
34 pour que le résultat du titrage ne soit pas fondé sur une trop faible différence de volumes.

35 Des essais à blanc doivent être prescrits chaque fois que nécessaire, à moins d'être déjà
36 stipulés dans la méthode générale appliquée.

37 La monographie peut spécifier une détermination du point de fin de titrage par potentiométrie
38 ou par observation visuelle du virage d'un indicateur coloré. La détermination du point de fin

1 de titrage par potentiométrie est applicable dans la plupart des cas, et est à utiliser de
2 préférence. Si elle est prescrite, la combinaison d'électrodes appropriée est si nécessaire
3 indiquée dans le texte. Le nombre de points d'inflexion à considérer est également précisé. A
4 titre exceptionnel, d'autres modes de détection tels que la méthode ampérométrique (2.2.19)
5 peuvent être spécifiés. Quelle que soit la méthode retenue, elle doit être suffisamment
6 reproductible et de préférence stœchiométriquement exacte. Lorsque l'emploi d'un indicateur
7 coloré est spécifié, le changement de coloration n'est précisé que s'il est différent de celui
8 décrit dans le chapitre REACTIFS de la Pharmacopée européenne.

9 Les sels halogénés des bases organiques et certaines substances à fonction ammonium
10 quaternaire sont traditionnellement dosés par titrage en milieu non aqueux avec, comme
11 réactif titrant, de l'acide perchlorique dans l'acide acétique glacial et, comme solvant, de
12 l'acide acétique glacial additionné d'acétate mercurique. Pour éviter l'emploi de sels de
13 mercure, il est recommandé d'utiliser d'autres méthodes chaque fois que possible. Les
14 méthodes recommandées sont les suivantes.

15 a. Titrage alcalimétrique en milieu alcoolique. Pour effectuer ce type de titrage, il est
16 recommandé d'ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M avant le titrage et de mesurer le
17 volume de réactif titrant utilisé entre les deux points d'inflexion.

18 b. Titrage par l'acide perchlorique avec dissolution de l'échantillon dans l'acide acétique
19 anhydre avant addition d'anhydride acétique ou d'un mélange d'anhydride acétique et
20 d'acide formique anhydre.

21 c. Argentimétrie.

22 Les méthodes b et c sont souvent appropriées pour les substances à fonction ammonium
23 quaternaire.

24 **2.5.3 Méthodes chromatographiques**

25 Dans la pharmacopée, les méthodes chromatographiques utilisées pour les dosages se limitent
26 normalement à la chromatographie liquide (CL) et à la chromatographie en phase gazeuse
27 (CPG). La plupart des indications fournies plus haut pour la CL et de la CPG à propos de
28 l'essai des substances apparentées sont également valables pour le développement des
29 dosages utilisant ces méthodes. L'emploi d'un étalon externe en CL et d'un étalon interne en
30 CPG est recommandé. Ces méthodes impliquent l'utilisation d'une substance chimique de
31 référence ayant une teneur assignée en substance à doser (voir section relative aux étalons de
32 référence).

33 Une fois la méthode développée et validée par l'auteur, il est nécessaire d'en évaluer la
34 reproductibilité (voir section 3 du présent Guide).

35 **2.5.4 Dosage de l'azote après minéralisation par l'acide sulfurique (semi- 36 microdosage)**

37 A toute substance dosée par cette méthode doit être assigné un temps de minéralisation, après
38 détermination de son profil de minéralisation.

39 Le profil de minéralisation peut être déterminé de la façon suivante : peser individuellement
40 plusieurs prises d'essai de la substance, correspondant à la quantité prescrite, et les soumettre
41 à l'essai conformément à la méthode générale, en faisant varier le temps d'ébullition du
42 mélange réactif (normalement jusqu'à 120 min) après clarification du mélange. En traçant le
43 graphe des teneurs en azote obtenues en fonction du temps d'ébullition, il est possible de

1 déterminer le temps minimal de minéralisation nécessaire pour obtenir une valeur constante.
2 Si le temps requis dépasse 30 min, il est spécifié dans la monographie.

3 **2.6 CONSERVATION**

4 Bien que les indications figurant sous ce titre dans les monographies ne constituent pas des
5 exigences de pharmacopée, il convient de fournir le cas échéant les informations utiles au
6 maintien de la qualité de la substance au cours de sa conservation.

7 Il faut alors utiliser la terminologie indiquée dans les chapitres 1. *Prescriptions Générales* et
8 3.2 *Récipients* de la Pharmacopée. Notons que l'expression « récipient bien fermé »
9 n'implique pas une protection contre les pertes/gains d'éléments via la phase gazeuse, qui
10 exige l'emploi d'un « récipient étanche ». Un « récipient scellé » est de fait « inviolable »,
11 alors que l'inverse n'est pas toujours vrai.

12 Il doit être demandé aux fabricants de fournir des données de stabilité. Pour établir les
13 indications qui figureront dans la monographie, sont à prendre en compte le comportement de
14 la substance lors de l'exposition à l'atmosphère, à divers taux d'humidité, à différentes
15 températures et à la lumière du jour.

16 A cet égard, il faut souligner que la méthode décrite pour l'hygroscopicité dans le chapitre
17 5.11 *Rubrique Caractères dans les monographies* n'a pas vocation à permettre de définir les
18 conditions de conservation. Elle constitue simplement un moyen rapide, pour l'analyste,
19 d'obtenir une indication sur l'hygroscopicité de la substance, qui l'aidera à prendre les
20 précautions nécessaires lors de l'examen de la substance dans les conditions du laboratoire.

21 **2.7 ÉTIQUETAGE**

22 L'étiquetage des produits pharmaceutiques fait l'objet d'accords internationaux et de
23 réglementations nationales et internationales ; de ce fait, les indications figurant dans la
24 rubrique ETIQUETAGE d'une monographie ne sont pas exhaustives : elles comprennent des
25 mentions à caractère obligatoire (nécessaires à l'application de la monographie) et d'autres
26 mentions qui constituent de simples recommandations. En règle générale, dans la
27 pharmacopée, les exigences d'étiquetage pour les substances (actives) en vrac se limitent aux
28 points essentiels à la bonne interprétation des autres exigences de la monographie. Lorsque,
29 par exemple, une matière première est tenue, pour certains usages, de satisfaire à des
30 exigences particulières (stérilité, etc.), l'étiquette doit indiquer que le contenu du récipient est
31 (dans les cas appropriés) conforme à ces exigences. Par ailleurs, lorsque l'ajout de certains
32 stabilisants ou autres additifs est autorisé par la monographie, leur présence doit en règle
33 générale être signalée sur l'étiquette.

34 **2.8 IMPURETÉS**

35 Les monographies de substances chimiques organiques doivent normalement comporter une
36 rubrique IMPURETES ; celle-ci définit les impuretés qui sont détectées par les essais de la
37 monographie et ont été prises en considération lors de la définition des critères d'acceptation
38 applicables aux substances apparentées. Ces impuretés y sont divisées en deux sous-
39 rubriques : « Impuretés spécifiées » et « Autres impuretés décelables ». Toutes les impuretés
40 spécifiées couvertes par la monographie sont citées dans la rubrique IMPURETES. Il peut
41 également être utile d'y faire figurer des informations sur les autres impuretés décelables

1 (impuretés détectées par les essais de la monographie, mais pour autant que l'on sache non
2 décelées à teneur supérieure au seuil d'identification dans les lots de production actuels.

3 La rubrique IMPURETES indique, pour chaque impureté citée, sa structure et sa nomenclature
4 chimiques (celles de l'acide/base le cas échéant). Les impuretés sont désignées par une lettre
5 capitale (A, B, C, D, etc.). Leur dénomination courante peut être indiquée entre parenthèses
6 dans les cas (rares) où il est jugé qu'elle apporte une information utile.

7 La rubrique IMPURETES peut également contenir des informations sur l'essai ou les essais
8 limitant une impureté donnée, par exemple lorsqu'il ne s'agit pas de l'essai des substances
9 apparentées ou lorsque la monographie comporte plusieurs essais des substances apparentées.

10 **2.9 CARACTERISTIQUES LIEES A LA FONCTIONNALITE**

11 Les monographies portant sur des excipients peuvent comporter une rubrique intitulée
12 CARACTERISTIQUES LIEES A LA FONCTIONNALITE (CLF). Ce titre est suivi d'un paragraphe
13 introductif standard précisant le caractère non obligatoire des essais décrits. Les usages de la
14 substance pour lesquels chaque CLF est pertinente sont également indiqués. Les CLF peuvent
15 être présentées :

- 16 • simplement par leur nom,
- 17 • par leur nom avec indication d'une méthode recommandée parmi les chapitres
18 généraux de la Ph. Eur.,
- 19 • par leur nom avec indication d'une méthode et de tolérances recommandées,
- 20 • par leur nom avec indication d'une méthode, de tolérances et de critères d'acceptation
21 recommandés.

3 VALIDATION ANALYTIQUE

22 Cette section du Guide technique décrit les procédures à appliquer pour valider les essais
23 prescrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne. Ces essais peuvent être des
24 identifications, des essais de pureté instrumentaux ou non instrumentaux ou des dosages, et
25 les exigences de validation varieront selon le type d'essai considéré et la technique utilisée.
26 Cette section du Guide reprend les textes relatifs à la validation analytique adoptés dans le
27 cadre ICH en 1994, l'extension du texte ICH *Validation of Analytical Procedures*, qui
28 contient des informations utiles sur les exigences de validation en rapport avec
29 l'enregistrement, et des indications spécifiques sur la validation de différentes techniques
30 analytiques mises en œuvre dans les méthodes pharmaceutiques.

31 **3.1 TERMES ET DEFINITIONS**

32 [Document ICH. Texte adopté et publié dans le cadre ICH (*International Conference on*
33 *Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for*
34 *Human use*) (1994)].

35 **3.1.1 Introduction**

36 Le présent document traite des paramètres à considérer pour la validation des procédures
37 analytiques figurant dans les dossiers d'enregistrement présentés dans l'UE, au Japon et aux
38 USA. Il ne couvre pas nécessairement les essais susceptibles d'être exigés pour

1 l'enregistrement dans d'autres régions du monde ou l'exportation vers ces régions, et n'a pas
2 non plus pour objet de fournir des indications sur la façon d'effectuer la validation ; il se
3 présente plutôt comme un ensemble de termes et définitions, établis dans l'objectif de
4 rapprocher les points de vue souvent divergents des pharmacopées et autorités réglementaires
5 de l'UE, du Japon et des USA.

6 La validation d'une procédure analytique a pour objectif de démontrer que cette procédure est
7 appropriée à l'usage qui en est prévu. Un résumé des paramètres pertinents selon que l'on
8 considère une identification, un essai de pureté ou un dosage est fourni plus loin sous forme
9 de tableau. Le présent document est susceptible d'être ultérieurement étendu à d'autres types
10 de procédures analytiques.

11 **3.1.2 Différents types de procédures analytiques**

12 Les quatre types les plus courants de procédures analytiques sont traités ici :

- 13 • identification,
- 14 • détermination quantitative de teneurs en impuretés,
- 15 • essais limites de contrôle d'impuretés,
- 16 • détermination quantitative, dans un échantillon d'une substance pharmaceutique ou
17 d'un médicament, de la teneur en principe actif ou en d'autres composant(s)
18 sélectionné(s) du produit.

19 Il existe certes beaucoup d'autres types de procédures analytiques, par exemple les essais de
20 dissolution pour les produits pharmaceutiques ou la détermination de la taille des particules
21 pour les substances pharmaceutiques, mais ils ne sont pas traités dans ce premier texte sur la
22 validation analytique. Leur validation est néanmoins tout aussi importante que celles des
23 types d'essais cités ici et pourra faire l'objet de documents à venir.

24 Les différents types d'essais considérés dans le présent document sont brièvement décrits ci-
25 dessous.

- 26 • Les identifications ont pour objet de confirmer l'identité d'une substance à analyser
27 dans un échantillon. Cette confirmation est généralement réalisée par comparaison de
28 l'échantillon et d'un matériel de référence pour une certaine propriété (spectre,
29 comportement chromatographique, réactivité chimique, etc.).
- 30 • Les essais de pureté peuvent être soit des essais quantitatifs soit des essais limites
31 portant sur les impuretés contenues dans un échantillon. Dans l'un et l'autre cas, l'essai
32 est censé refléter avec exactitude les caractéristiques de pureté de l'échantillon. Les
33 paramètres de validation à considérer pour un essai quantitatif et pour un essai limite
34 sont différents.
- 35 • Les dosages ont pour objet de mesurer la quantité de substance à analyser contenue
36 dans un échantillon donné. Dans le contexte du présent document, le dosage
37 représente une analyse quantitative du (des) composant(s) majeur(s) de la substance
38 pharmaceutique. Pour les produits pharmaceutiques, des paramètres de validation
39 semblables s'appliquent au dosage des principes actifs et d'autres composants
40 sélectionnés. Les mêmes paramètres de validation s'appliquent également aux dosages
41 associés à d'autres procédures analytiques (dissolution par exemple).

1 **3.1.3 Paramètres et exigences de validation**

2 Il est important de bien définir l'objectif de la procédure analytique considérée, car de cet
3 objectif dépendent les paramètres de validation qu'il conviendra d'évaluer. Les paramètres de
4 validation types à considérer sont les suivants :

- 5 • exactitude
- 6 • fidélité
 - 7 ○ répétabilité
 - 8 ○ fidélité intermédiaire
- 9 • spécificité
- 10 • limite de détection
- 11 • limite de quantification
- 12 • linéarité
- 13 • intervalle (de mesure).

14 Chacun de ces paramètres de validation est défini dans le glossaire figurant ci-après. Le
15 tableau donne la liste des paramètres considérés comme les plus importants pour la validation
16 des différents types de procédures analytiques. Cette liste est à interpréter comme une liste
17 type pour la catégorie de procédures considérée, mais autorise des exceptions à traiter au cas
18 par cas. Il est à noter que la robustesse n'est pas citée, mais elle doit néanmoins être prise en
19 compte à une étape appropriée du développement de la procédure analytique.

20 Par ailleurs, une revalidation peut être nécessaire dans les circonstances suivantes :

- 21 • modification de la voie de synthèse de la substance pharmaceutique,
- 22 • modification de la composition du produit fini,
- 23 • modification de la procédure analytique.

24 L'ampleur de la revalidation requise dépend de la nature des modifications intervenues.
25 Certaines autres modifications peuvent également nécessiter une revalidation.

	TYPE DE PROCÉDURE ANALYTIQUE			
	IDENTIFICATION	ESSAI DE PURETE		DOSAGE
		Quantitatif	Limite	Mesure de dissolution uniquement Teneur / activité
CARACTERISTIQUE				
Exactitude	-	+	-	+
Fidélité				
Répétabilité		+	-	+
Fidélité intermédiaire		+	-	+
Spécificité**	+	+	+	+
Limite de détection	-	-***	+	-
Limite de quantification	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Intervalle de mesure	-	+	-	+

- 1 - Signifie que cette caractéristique n'est normalement pas évaluée.
2 + Signifie que cette caractéristique est normalement évaluée.
3 * Si la reproductibilité (voir glossaire) a été évaluée, il n'est pas nécessaire d'évaluer la fidélité intermédiaire.
4 ** Le manque de spécificité d'une procédure analytique peut être compensé par le recours à une ou plusieurs
5 méthodes complémentaires.
6 *** Nécessaire dans certains cas.

7 3.1.4 Glossaire

8 **Procédure analytique.** La procédure analytique est le mode de réalisation d'une analyse. Elle
9 doit décrire dans le détail les différentes étapes nécessaires à la réalisation de l'analyse :
10 préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, utilisation de
11 l'appareillage, établissement de la courbe d'étalonnage, application des formules de calcul,
12 etc., cette liste n'étant pas restrictive.

13 **Spécificité.** La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation
14 univoque de la substance à analyser, en présence des autres composants susceptibles de
15 l'accompagner. Ceux-ci comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation,
16 la matrice, etc.

17 Le manque de spécificité d'une procédure analytique peut être compensé par le recours à une
18 ou plusieurs autres procédures complémentaires.

19 Cette définition se traduit de la façon suivante :

20 IDENTIFICATION	garantir l'identité de la substance à analyser
21 ESSAIS DE PURETE	garantir que l'ensemble des procédures analytiques appliquées
22	permettent une évaluation exacte de la teneur en impuretés
23	d'une substance (substances apparentées, métaux lourds,
24	solvants résiduels, etc.).
25 DOSAGE (teneur ou activité)	fournir un résultat exact permettant d'évaluer avec exactitude la
26	concentration ou l'activité de la substance à analyser dans un
27	échantillon.

1 **Exactitude.** L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la
2 valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la
3 valeur trouvée.

4 Elle est parfois appelée justesse.

5 **Fidélité.** La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la
6 dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant
7 d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites. Elle peut être considérée à
8 3 niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

9 La fidélité doit être évaluée au moyen d'échantillons homogènes authentiques. Cependant, s'il
10 n'est pas possible d'obtenir un échantillon homogène, elle peut être évaluée au moyen
11 d'échantillons préparés artificiellement ou d'une solution échantillon.

12 La fidélité d'une procédure analytique est en général exprimée en termes de variance, d'écart
13 type ou de coefficient de variation d'une série de résultats de mesure.

14 La **répétabilité** est la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques et dans un
15 court intervalle de temps. Elle est également appelée fidélité intra-essai.

16 La **fidélité intermédiaire** est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (mesures
17 effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec des équipements différents,
18 etc.).

19 La **reproductibilité** est l'expression de la variabilité inter-laboratoires (études collaboratives,
20 généralement conduites aux fins de standardisation de la méthode).

21 **Limite de détection.** La limite de détection d'une procédure analytique donnée est la plus
22 petite quantité de la substance considérée qui peut être détectée dans un échantillon, sans
23 forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

24 **Limite de quantification.** La limite de quantification d'une procédure analytique donnée est
25 la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée, dans un échantillon,
26 avec une exactitude et une fidélité appropriées. La limite de quantification est un paramètre
27 intervenant dans l'analyse quantitative des substances présentes à faible concentration dans
28 des matrices échantillons ; elle est notamment utilisée pour le dosage des impuretés et/ou des
29 produits de dégradation.

30 **Linéarité.** La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un
31 intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration
32 (quantité) de substance présente dans l'échantillon.

33 **Intervalle (de mesure).** L'intervalle (de mesure) d'une procédure analytique est l'intervalle
34 (limites inférieure et supérieure incluses) de concentration/quantité de la substance à analyser
35 (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une
36 exactitude et une linéarité appropriées.

37 **Robustesse.** La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas
38 être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés à la procédure ;
39 elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales
40 d'application.

3.2 METHODOLOGIE

[Document ICH. Texte adopté et publié dans le cadre ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human use*) (1998)].

3.2.1 Introduction

Ce document vient en complément du document ICH initial où sont présentés et discutés les paramètres à considérer pour la validation analytique. Son objectif est de fournir des indications et recommandations sur la façon de considérer les différents paramètres de validation pour chaque procédure analytique. Dans certains cas (par exemple la démonstration de la spécificité), il est possible d'étudier les performances globales de plusieurs procédures analytiques, mises en oeuvre concurremment pour s'assurer de la qualité de la substance ou du médicament. Le document contient également des indications sur les données à présenter dans le cadre de la demande d'AMM d'un nouveau médicament.

Toutes les données pertinentes recueillies en cours de validation et toutes les formules utilisées pour calculer les paramètres de validation sont à fournir, avec discussion le cas échéant.

D'autres approches que celles proposées dans ce document sont dans certains cas applicables et acceptables. Il relève de la responsabilité du demandeur de choisir la procédure analytique et le protocole de validation les mieux appropriés au produit considéré. Néanmoins, il est important de ne pas oublier que l'objectif principal de la validation d'une procédure analytique est de démontrer son adéquation pour l'usage qui en est prévu. Les procédures analytiques utilisées pour les produits biologiques et biotechnologiques, du fait de leur complexité, peuvent être validées selon des approches différentes de celles exposées dans ce document.

Lors des études de validation, il convient d'utiliser des substances de référence bien caractérisées, de pureté établie. Le degré de pureté requis dépend de l'usage prévu de ces substances.

Par souci de clarté et de cohérence avec le document initial, les différents paramètres de validation sont ici envisagés successivement. La séquence adoptée reflète le processus de développement et d'évaluation des procédures analytiques.

Dans la pratique, il est généralement possible d'organiser les travaux expérimentaux de façon à pouvoir considérer simultanément les différents paramètres de validation pertinents, afin de parvenir à une évaluation globale et cohérente de la procédure analytique considérée (par exemple : spécificité, linéarité, intervalle de mesure, exactitude et fidélité).

3.2.2 Spécificité

Une étude de la spécificité est nécessaire pour la validation des identifications, des essais de pureté et du dosage. Les procédures mises en oeuvre pour démontrer la spécificité dépendent du type d'application prévu de la procédure analytique.

Il est parfois impossible de démontrer la spécificité d'une procédure analytique pour une substance donnée (discrimination totale). Dans ce cas, la combinaison de plusieurs méthodes d'analyse est recommandée, pour parvenir au niveau de discrimination voulu.

3.2.2.1 Identification

1 Les identifications doivent permettre d'établir une discrimination entre substances de
2 structure apparentée susceptibles d'être présentes. L'un des moyens de confirmer le pouvoir
3 de discrimination d'une procédure analytique est de procéder parallèlement à une
4 identification positive (éventuellement par comparaison avec une substance de référence
5 connue) sur des échantillons contenant la substance à analyser, et à une identification
6 négative sur des échantillons ne contenant pas cette substance. On peut également appliquer
7 l'essai d'identification à des substances structurellement semblables ou étroitement
8 apparentées à la substance à analyser, pour confirmer la négativité de la réponse. Le choix de
9 ces substances constituant des facteurs d'interférence potentiels doit reposer sur des critères
10 scientifiquement fondés prenant en considération les interférences potentielles.

3.2.2.2 Dosage et essais de pureté

11 Dans le cas des méthodes chromatographiques, il convient pour démontrer la spécificité
12 d'utiliser des chromatogrammes représentatifs sur lesquels les différents composants sont
13 clairement identifiés. L'approche à suivre est similaire pour les autres techniques de
14 séparation.

15 Les séparations critiques, en chromatographie, doivent être étudiées au niveau approprié ; il
16 est possible de démontrer la spécificité sur la base de la résolution obtenue pour deux
17 composants élués à des positions très voisines.

18 Les dosages non spécifiques doivent être couplés à des méthodes d'analyse complémentaires
19 permettant d'assurer la spécificité globale. Par exemple, lorsque le dosage de la substance
20 active est effectué par titrimétrie, il peut être couplé à un essai de pureté approprié.

21 L'approche à suivre est similaire pour les dosages et les essais de pureté.

22 **Les impuretés sont disponibles**

23 • Pour démontrer la spécificité dans le cas d'un dosage, il faut établir la capacité de la
24 procédure analytique à permettre la discrimination de la substance à analyser en
25 présence des impuretés et/ou des excipients. Dans la pratique, il est possible
26 d'atteindre cet objectif en ajoutant à la substance ou produit pur des quantités
27 appropriées d'impuretés et/ou d'excipients, et en démontrant que le résultat du dosage
28 n'est pas affecté par la présence de ces substances ajoutées (par comparaison au
29 résultat obtenu avec des échantillons non « dopés »).

30 • Dans le cas des essais de pureté, on peut établir la discrimination en dopant la
31 substance ou le produit avec des quantités appropriées d'impuretés et en apportant la
32 preuve de la séparation de ces impuretés, entre elles et/ou par rapport à d'autres
33 composants de la matrice de l'échantillon. Une autre approche acceptable, pour les
34 procédures moins discriminantes, est de démontrer que ces impuretés peuvent encore
35 être dosées avec une exactitude et une fidélité appropriées.

36 **Les impuretés ne sont pas disponibles**

37 Si l'on ne dispose pas d'échantillons des impuretés ou des produits de dégradation, il est
38 possible de démontrer la spécificité en comparant les résultats obtenus avec des échantillons
39 contenant ces impuretés ou produits de dégradation et les résultats obtenus par une seconde
40 procédure, bien caractérisée, par exemple une méthode de pharmacopée ou une autre
41 procédure analytique validée (procédure indépendante). A cet effet, il convient le cas échéant

1 d'utiliser des échantillons ayant été exposés à des facteurs de dégradation appropriés (lumière,
2 chaleur, humidité, hydrolyse acide/basique, oxydation).

- 3 • Pour les dosages, la comparaison porte sur les deux résultats.
- 4 • Pour les essais de pureté, la comparaison porte sur les deux profils d'impuretés.

5 Une analyse de pureté des pics (exemple : barrette de diodes, spectrométrie de masse) peut
6 être utile pour établir que le pic attribué à la substance à analyser ne correspond pas à
7 plusieurs composants.

8 **3.2.3 Linéarité**

9 La linéarité doit être établie sur tout l'intervalle de mesure (voir 3.2.4) de la procédure
10 analytique considérée. Elle peut être démontrée en appliquant la procédure directement à la
11 substance (dilutions préparées à partir d'une solution mère), et/ou en l'appliquant à des
12 mélanges synthétiques, dosés séparément, des différents composants du produit. L'évaluation
13 de la linéarité peut être effectuée lors de l'étude de l'intervalle de mesure.

14 Pour établir la linéarité, il convient d'établir un graphique des réponses obtenues en fonction
15 de la concentration/teneur, et de procéder à une évaluation visuelle de ce graphique. Si la
16 relation est linéaire, il faut alors analyser les résultats par des méthodes statistiques
17 appropriées, par exemple en calculant la droite de régression par la méthode des moindres
18 carrés. Il peut être nécessaire dans certains cas, pour obtenir une relation linéaire entre
19 résultats de dosage et concentration, d'appliquer une transformation mathématique aux
20 résultats d'essai avant d'effectuer l'analyse de régression. Les informations fournies par la
21 droite de régression peuvent être utiles pour obtenir des estimations mathématiques du degré
22 de linéarité. Le coefficient de corrélation, l'ordonnée à l'origine, la pente de la droite de
23 régression et la somme des carrés résiduels doivent être indiqués. Une représentation
24 graphique des résultats doit également être fournie. Enfin, une analyse de l'écart entre les
25 résultats effectifs et la droite de régression peut également être utile pour évaluer la linéarité.

26 Pour certaines procédures analytiques, par exemple les immunodosages, il est impossible de
27 démontrer la linéarité même après transformation mathématique. Dans ce cas, il convient de
28 déterminer la fonction qui décrit de façon appropriée la relation entre les résultats d'analyse et
29 la concentration (quantité) de la substance dans un échantillon.

30 Pour établir la linéarité, il est recommandé d'utiliser au minimum 5 concentrations. Le
31 recours à d'autres approches doit être justifié.

32 **3.2.4 Intervalle (de mesure)**

33 L'intervalle de mesure spécifié découle normalement des études de linéarité, et dépend du
34 type d'application prévu de la procédure analytique. Pour l'établir, il faut confirmer que cette
35 procédure assure un degré acceptable de linéarité, d'exactitude et de fidélité lorsqu'elle est
36 appliquée à des échantillons contenant la substance à des concentrations comprises dans
37 l'intervalle (bornes comprises) correspondant à l'intervalle de mesure spécifié.

38 Les intervalles minimum à considérer, selon les cas, sont les suivants.

- 39 • Pour le dosage d'une substance ou d'un produit fini : de 80 pour cent à 120 pour cent
40 de la concentration d'essai.

- 1 • Pour le dosage d'une impureté : de 50 pour cent de la limite spécifiée pour chaque
2 impureté, ou de la limite de quantification (LQ) si elle est supérieure à cette valeur, à
3 120 pour cent de la limite spécifiée.
- 4 • Pour les impuretés dont on sait qu'elles possèdent une activité inhabituellement
5 élevée, ou exercent un effet toxique ou une action pharmacologique indésirable, la
6 limite de détection/quantification et la concentration limite tolérée doivent être du
7 même ordre.
- 8 Note : pour la validation des essais de pureté en cours de développement, il peut être
9 nécessaire de considérer l'intervalle encadrant une limite hypothétique (probable).
- 10 • Si le dosage et le contrôle de pureté sont effectués ensemble, sous la forme d'un essai
11 unique, et que l'on utilise seulement une solution non diluée, l'étude de linéarité doit
12 couvrir l'intervalle allant de 50 pour cent de la limite spécifiée pour chaque impureté,
13 ou de la limite de quantification (LQ) si elle est supérieure à cette valeur, à 120 pour
14 cent de la teneur spécifiée.
- 15 • Pour l'uniformité de teneur : au minimum 70 pour cent à 130 pour cent de la
16 concentration d'essai, sauf si l'emploi d'un intervalle plus large est justifié pour la
17 forme pharmaceutique considérée (exemple : inhalateurs à valve doseuse).
- 18 • Pour les essais de dissolution : ± 20 pour cent sur l'étendue spécifiée : par exemple,
19 dans le cas d'un médicament à libération contrôlée, si les taux de dissolution spécifiés
20 vont de 20 pour cent après 1 h à 90 pour cent après 24 h, l'intervalle de validation doit
21 être de 0-110 pour cent de la teneur indiquée sur l'étiquette.

22 **3.2.5 Exactitude**

23 L'exactitude doit être établie sur tout l'intervalle de mesure de la procédure analytique.

3.2.5.1 *Dosage*

24 **Substance pharmaceutique**

25 Il existe plusieurs approches possibles pour déterminer l'exactitude :

- 26 • application de la procédure analytique à un échantillon de pureté connue (par
27 exemple : substance de référence),
- 28 • comparaison des résultats respectivement obtenus par la procédure à valider et par une
29 seconde procédure, bien caractérisée, dont l'exactitude est indiquée et/ou définie
30 (procédure indépendante),
- 31 • détermination de l'exactitude lors de l'acquisition des données relatives à la fidélité, la
32 linéarité et la spécificité.

33 **Médicament**

34 Il existe plusieurs approches possibles pour déterminer l'exactitude :

- 35 • application de la procédure analytique à des mélanges de synthèse contenant les
36 différents composants du produit et auxquels sont ajoutées des quantités connues de la
37 substance à analyser,
- 38 • lorsqu'il est impossible d'obtenir des échantillons de tous les composants du produit, il
39 peut être acceptable de procéder soit en ajoutant au produit des quantités connues de
40 la substance, soit en effectuant une comparaison avec les résultats obtenus par une

- 1 seconde procédure, bien caractérisée, dont l'exactitude est indiquée et/ou définie
2 (procédure indépendante),
- 3 • détermination de l'exactitude lors de l'acquisition des données relatives à la fidélité, la
4 linéarité et la spécificité.

3.2.5.2 Impuretés (quantification)

5 L'exactitude doit être évaluée sur des échantillons (de la substance ou du produit) dopés avec
6 des quantités connues d'impuretés.

7 Lorsqu'il est impossible de disposer d'échantillons de certaines impuretés et/ou certains
8 produits de dégradation, il est acceptable d'effectuer une comparaison avec les résultats
9 obtenus par une procédure indépendante. Le facteur de réponse de la substance peut être
10 utilisé.

3.2.5.3 Recommandations sur les données à fournir

11 Il convient d'évaluer l'exactitude sur la base d'au moins 9 déterminations, avec au minimum
12 3 concentrations couvrant l'intervalle (de mesure) spécifié (exemple : 3 concentrations avec
13 3 répétitions pour chaque concentration).

14 L'exactitude doit être indiquée en termes de pourcentage de recouvrement d'une quantité
15 connue de substance ajoutée à l'échantillon, ou en termes de différence entre la moyenne
16 obtenue et la valeur conventionnellement vraie, avec les intervalles de confiance
17 correspondants.

3.2.6 Fidélité

18 La validation des analyses quantitatives (dosage de la substance ou des impuretés) comprend
19 une évaluation de la fidélité.
20

3.2.6.1 Répétabilité

21 La répétabilité doit être évaluée

- 22 • soit sur la base d'au moins 9 déterminations couvrant l'intervalle (de mesure) spécifié
23 (exemple : 3 concentrations avec 3 répétitions pour chaque concentration),
- 24 • soit sur la base d'au moins 6 déterminations à 100 pour cent de la concentration
25 d'essai.

3.2.6.2 Fidélité intermédiaire

26 L'ampleur des études à effectuer pour évaluer la fidélité intermédiaire dépend des
27 circonstances dans lesquelles il est prévu d'appliquer la procédure analytique. Le demandeur
28 doit établir l'effet de différents événements aléatoires sur la fidélité de la procédure. Les
29 facteurs de variation types à étudier comprennent les variations d'un jour à un autre, d'un
30 analyste à un autre, d'un équipement à un autre, etc. Il n'est pas nécessaire d'étudier
31 individuellement ces effets. L'emploi d'un plan d'expérience (matrice) est conseillé.

3.2.6.3 Reproductibilité

32 La reproductibilité est évaluée au moyen d'une étude inter-laboratoires. Elle est à considérer
33 dans le cas de la standardisation d'une procédure analytique (par exemple pour l'introduction

1 de nouvelles procédures dans les pharmacopées). Ces données ne font pas partie du dossier
2 de demande d'AMM.

3.2.6.4 *Recommandations sur les données à fournir*

3 Pour chaque type de fidélité étudié, il convient d'indiquer l'écart type, l'écart type relatif
4 (coefficient de variation) et l'intervalle de confiance.

5 **3.2.7 Limite de détection**

6 Plusieurs approches sont possibles pour déterminer la limite de détection, selon que la
7 méthode considérée est instrumentale ou non. D'autres approches que celles décrites ci-
8 dessous peuvent être acceptables.

3.2.7.1 *Évaluation visuelle*

9 Une évaluation visuelle peut être utilisée pour les méthodes non instrumentales, mais
10 également pour les méthodes instrumentales.

11 La limite de détection est déterminée par analyse d'échantillons contenant la substance à des
12 concentrations connues, puis détermination de la concentration minimale à laquelle une
13 détection fiable de la substance est possible.

3.2.7.2 *Rapport signal/bruit*

14 Cette approche n'est applicable qu'aux procédures analytiques caractérisées par l'existence
15 d'un bruit par rapport à la ligne de base. La détermination du rapport signal/bruit est effectuée
16 par comparaison des signaux respectivement mesurés avec des échantillons contenant la
17 substance à des concentrations (faibles) connues et avec des blancs, puis détermination de la
18 concentration minimale à laquelle une détection fiable de la substance est possible. Un
19 rapport signal/bruit de 3:1 à 2:1 est généralement acceptable.

3.2.7.3 *Écart type des réponses et pente*

20 La limite de détection (LD) peut être exprimée par la relation :

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

21 σ = écart type de la réponse,

22 S = pente de la courbe d'étalonnage.

23 La pente S peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la substance à
24 analyser. L'estimation de σ peut être effectuée par différentes méthodes, par exemple celles
25 décrites ci-dessous.

26 *Méthode de l'écart type du blanc*

27 On mesure la réponse correspondant au « bruit de fond » analytique en analysant un nombre
28 approprié d'échantillons à blanc et en calculant l'écart type des réponses obtenues.

29 *Méthode de la courbe d'étalonnage*

30 Une courbe d'étalonnage spécifique est établie avec des échantillons contenant la substance
31 dans des quantités de l'ordre de grandeur de la LD. On peut alors utiliser, comme écart type,
32 l'écart type résiduel d'une droite de régression ou l'écart type des ordonnées à l'origine des
33 droites de régression.

3.2.7.4 *Recommandations sur les données à fournir*

- 1 Il convient d'indiquer la limite de détection et la méthode utilisée pour la déterminer.
2 Lorsque l'estimation de la limite de détection est obtenue par le calcul ou par extrapolation,
3 cette estimation peut être validée par analyse indépendante d'un nombre approprié
4 d'échantillons de concentration égale à la limite de détection ou voisine de cette limite.

5 **3.2.8 Limite de quantification**

- 6 Plusieurs approches sont possibles pour déterminer la limite de quantification, selon que la
7 méthode considérée est instrumentale ou non instrumentale. D'autres approches que celles
8 décrites ci-dessous peuvent être acceptables.

3.2.8.1 *Évaluation visuelle*

- 9 Une évaluation visuelle peut être utilisée pour les méthodes non instrumentales, mais
10 également pour les méthodes instrumentales.
11 La limite de quantification est déterminée par analyse d'échantillons contenant la substance à
12 des concentrations connues, puis détermination de la concentration minimale à laquelle la
13 quantification de la substance est possible avec une exactitude et une fidélité acceptables.

3.2.8.2 *Rapport signal/bruit*

- 14 Cette approche n'est applicable qu'aux procédures analytiques caractérisées par l'existence
15 d'un bruit par rapport à la ligne de base. La détermination du rapport signal/bruit est effectuée
16 par comparaison des signaux respectivement mesurés avec des échantillons contenant la
17 substance à des concentrations (faibles) connues et avec des blancs, puis détermination de la
18 concentration minimale à laquelle une quantification fiable de la substance est possible. Le
19 rapport signal/bruit type est de 10:1.

3.2.8.3 *Écart type des réponses et pente*

- 20 La limite de quantification (LQ) peut être exprimée par la relation :

$$LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

- 21
22 σ = écart type de la réponse,
23 S = pente de la courbe d'étalonnage.

- 24 La pente S peut être estimée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la substance à
25 analyser. L'estimation de σ peut être effectuée par différentes méthodes, par exemple celles
26 indiquées ci-dessous.

27 *Méthode de l'écart type du blanc*

- 28 On mesure la réponse correspondant au « bruit de fond » analytique en analysant un nombre
29 approprié d'échantillons à blanc et en calculant l'écart type des réponses obtenues.

30 *Méthode de la courbe d'étalonnage*

- 31 Une courbe d'étalonnage spécifique est établie avec des échantillons contenant la substance
32 dans des quantités de l'ordre de grandeur de la LQ. On peut alors utiliser, comme écart type,
33 l'écart type résiduel d'une droite de régression ou l'écart type des ordonnées à l'origine des
34 droites de régression.

3.2.8.4 *Recommandations sur les données à fournir*

- 1 Il convient d'indiquer la limite de quantification et la méthode utilisée pour la déterminer.
2 L'estimation obtenue doit être validée par analyse d'un nombre approprié d'échantillons de
3 concentration égale à la limite de quantification ou voisine de cette limite.

4 **3.2.9 Robustesse**

5 Une évaluation de la robustesse est à envisager lors de la phase de développement de la
6 procédure analytique. Elle dépend du type de procédure considéré. Son objectif est de
7 démontrer la fiabilité d'une analyse lorsque l'on introduit des variations délibérées de
8 différents paramètres.

9 Si les mesures sont sensibles aux variations des conditions d'analyse, il convient de maintenir
10 ces conditions constantes ou d'introduire un avertissement dans la description de la
11 procédure. L'évaluation de la robustesse doit notamment conduire à l'établissement d'une
12 série de paramètres de conformité du système (par exemple test de résolution), et ainsi de
13 s'assurer que la validité de la procédure analytique est maintenue à chaque application.

14 Les variations types sont les suivantes :

- 15 • stabilité des solutions soumises à l'analyse,
- 16 • utilisation d'équipements différents,
- 17 • intervention d'analystes différents.

18 Dans le cas de la chromatographie liquide, les variations types sont les suivantes :

- 19 • influence des variations du pH de la phase mobile,
- 20 • influence des variations de la composition de la phase mobile,
- 21 • emploi de différentes colonnes (lots et/ou fournisseurs différents),
- 22 • température,
- 23 • débit.

24 Dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse, les variations types sont les suivantes :

- 25 • emploi de différentes colonnes (lots et/ou fournisseurs différents),
- 26 • température,
- 27 • débit.

28 **3.2.10 Vérification de la conformité du système**

29 La vérification de la conformité du système fait partie intégrante de nombreuses procédures
30 analytiques. Les tests effectués reposent sur l'idée que l'équipement, l'électronique, les
31 opérations analytiques et les échantillons à analyser constituent un système global pouvant
32 être évalué en tant que tel. Les paramètres de conformité du système à établir dépendent du
33 type de procédure analytique sur lequel porte la validation (pour plus ample information, voir
34 les pharmacopées).

3.3 APPLICATION SPECIFIQUE A DES METHODES UTILISEES DANS LA PHARMACOPEE

Cette section traite d'un certain nombre de points concernant la validation de méthodes s'appuyant sur des techniques analytiques spécifiques. Les indications qui y figurent viennent en complément des chapitres généraux de la Pharmacopée européenne et des exigences de validation précédemment décrites (documents ICH).

3.3.1 Pouvoir rotatoire (2.2.7)

3.3.1.1 Introduction

Le solvant choisi doit permettre d'obtenir un angle de rotation aussi élevé que possible. La stabilité de l'angle de rotation de la solution doit être vérifiée sur un intervalle de temps de 2 h au moins. Si besoin est, l'emploi d'une solution récemment préparée peut être spécifié. Dans certains cas exceptionnels, il peut être nécessaire prescrire une phase d'équilibrage avant la réalisation de l'essai.

Il convient, chaque fois que possible, de travailler à la longueur d'onde de la raie D du sodium.

3.3.1.2 Identification

Lorsque la substance examinée est un énantiomère, le pouvoir rotatoire spécifique est utilisé pour l'identification.

S'il sert uniquement à l'identification, sa valeur peut ne pas être calculée par rapport à la substance desséchée ou à la substance exempte de solvant. Les limites spécifiées doivent tenir compte des variations de teneur ou de pureté observées avec des échantillons de différentes origines satisfaisant à la monographie.

Si le pouvoir rotatoire spécifique est également utilisé pour contrôler la pureté des énantiomères, il peut être indiqué sous IDENTIFICATION que la substance satisfait à l'essai du pouvoir rotatoire spécifique.

3.3.1.3 Essai

Le pouvoir rotatoire spécifique peut être utilisé pour vérifier la pureté d'un énantiomère. Cette méthode est toutefois moins sensible que la chromatographie chirale. Lorsqu'il s'agit de limiter un seul énantiomère par mesure du pouvoir rotatoire spécifique, il doit être démontré que, dans les conditions de l'essai, cet énantiomère possède une activité optique suffisante pour pouvoir être détecté. Le résultat est calculé par rapport à la substance desséchée ou à la substance exempte de solvant. Il convient, si possible, de déterminer l'influence des impuretés potentielles. Les limites spécifiées pour le pouvoir rotatoire spécifique doivent tenir compte de la teneur admise en impuretés. En l'absence d'informations sur le pouvoir rotatoire des substances apparentées, et lorsque l'on ne dispose pas des substances apparentées en quantité suffisante, les limites sont souvent fixées, conventionnellement, à ± 5 pour cent autour de la valeur moyenne obtenue pour des échantillons satisfaisant à la monographie. Il convient, chaque fois que possible, d'examiner des échantillons de différentes origines. Il est également utile d'examiner des échantillons proches de la date de péremption, afin d'obtenir des informations sur l'effet du vieillissement naturel.

La mesure de l'angle de rotation peut servir à vérifier le caractère racémique d'une substance. Dans ce cas, l'usage est de prescrire des limites de $+ 0,10^\circ$ à $- 0,10^\circ$.

1 Il convient si possible de démontrer que, dans les conditions de l'essai, l'énantiomère possède
2 une activité optique suffisante pour pouvoir être détecté.

3 Dans des cas exceptionnels, on utilise l'angle de rotation pour vérifier la pureté d'un
4 énantiomère (exemple : cas de la méthylidopa où du chlorure d'aluminium est ajouté pour
5 augmenter l'angle de rotation par formation d'un complexe).

3.3.1.4 Dosage

6 Dans des cas exceptionnels, on utilise l'angle de rotation pour doser une substance (exemple :
7 chlorhydrate d'éthambutol). Ceci implique l'emploi d'une substance de référence de pureté
8 optique connue.

3.3.2 Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25)

11 Il est nécessaire, dans tous les cas, de vérifier que les conditions opératoires utilisées (nature
12 et qualité des solvants employés, pH de la solution, etc.) sont appropriées.

13 Sous sa forme classique, la spectrophotométrie UV est une méthode possédant un pouvoir de
14 discrimination limité, mais il est possible de l'améliorer en utilisant les techniques dites de
15 dérivée première et seconde.

3.3.2.1 Identification

16 La spectrophotométrie UV est rarement employée seule pour les identifications. Lorsqu'elle
17 est utilisée dans le cadre d'une série d'identifications, son pouvoir de discrimination doit être
18 démontré par comparaison du spectre de la substance à analyser et de celui de substances
19 similaires. Il est possible d'obtenir un meilleur pouvoir de discrimination en utilisant les
20 rapports d'absorbance plutôt que les valeurs directes de l'absorbance.

3.3.2.2 Essais limites

21 Lorsque la spectrophotométrie UV est utilisée pour un essai limite, il doit être démontré que,
22 à la longueur d'onde de mesure, la contribution à l'absorbance mesurée de la substance à
23 limiter est suffisante. L'absorbance correspondant à la concentration limite de la substance à
24 limiter doit être établie.

3.3.2.3 Dosage

25 Lorsque la spectrophotométrie UV est utilisée pour un dosage, il faut évaluer la contribution
26 à l'absorbance des impuretés connues. L'emploi dans les dosages de valeurs de l'absorbance
27 spécifique est déconseillé. Si des valeurs de l'absorbance spécifique sont indiquées, elles
28 doivent être validées au moyen d'une étude inter-laboratoires portant sur un lot de pureté
29 connue. La pureté doit être estimée par diverses techniques, dont des techniques séparatives
30 et des techniques absolues.

3.3.3 Essais limites non instrumentaux

3.3.3.1 Aspect de la solution (2.2.1 et 2.2.2)

32 Ces essais visuels simples consistent à comparer la coloration (ou l'opalescence) de la
33 solution à examiner à celle d'une série de solutions témoins. En général, la solution à
34 examiner doit être limpide et incolore. L'objectif de ces essais est une évaluation globale de la

1 pureté de la substance. Lorsqu'un certain degré de coloration (ou d'opalescence) est autorisé,
2 la nature des impuretés et la concentration à laquelle correspond ce degré de coloration ne
3 sont souvent pas connues. La validation repose alors sur l'examen de données de lots fournies
4 par le(s) fabricant(s). Par contre, si l'impureté qui est à l'origine de l'opalescence ou de la
5 coloration est connue, il est possible de valider l'essai visuel par comparaison à une technique
6 analytique plus sophistiquée.

3.3.3.2 Acidité / alcalinité

7 Cette méthode permet une évaluation globale de la pureté. Il s'agit d'un essai non spécifique
8 utilisé pour le contrôle des impuretés protéolytiques. Ses règles d'application sont décrites plus
9 haut dans le détail.

3.3.3.3 Essais limites des anions/cations (2.4...)

10 Il s'agit d'essais simples et rapides, mais dont il faut démontrer, par des études de
11 recouvrement et/ou par comparaison avec d'autres méthodes plus sophistiquées, qu'ils
12 donnent des résultats satisfaisants.

13 *Cendres sulfuriques (2.4.14)*. L'essai des cendres sulfuriques constitue une méthode de
14 dosage global des cations présents dans les substances organiques, mais qui n'est évidemment
15 pas applicable aux sels inorganiques de substances organiques acides. La limite spécifiée est
16 en général de 0,1 pour cent. Cette méthode gravimétrique sert à limiter la teneur en cations
17 étrangers à un niveau approprié, constituant une indication de la qualité de la production. Elle
18 peut être considérée comme suffisamment bien établie pour ne pas nécessiter de validation
19 complémentaire.

20 *Métaux lourds (2.4.8)*. Les éléments toxiques, dont beaucoup sont contrôlés par l'essai des
21 métaux lourds (ex. : plomb, cuivre, argent, mercure, cobalt, cadmium et palladium) doivent
22 faire l'objet de limites adéquates (basses).

23 L'essai repose sur la précipitation de ces métaux lourds sous forme de sulfures et la
24 comparaison visuelle avec un témoin préparé à partir d'une solution de plomb.

25 Cinq procédés différents sont décrits dans la méthode générale de la Pharmacopée (2.4.8) et
26 des explications les concernant figurent dans la section 2 du présent guide. Le plus souvent,
27 la limite est fixée à 10 ppm ou 20 ppm. Il est possible de spécifier une limite plus basse, mais
28 à condition d'utiliser le procédé E. Il est toutefois important de choisir le procédé le mieux
29 approprié à la substance à examiner, et de vérifier la réponse à la limite proposée.

30 Le procédé dont l'emploi est envisagé est appliqué à l'échantillon ainsi qu'à un échantillon
31 « dopé » avec du plomb à concurrence de la limite souhaitée. L'opalescence brune obtenue
32 avec l'échantillon doit être inférieure à celle du témoin, celle obtenue avec l'échantillon
33 « dopé » égale ou supérieure.

34 Il est à noter que, pour certains des procédés décrits, qui nécessitent une incinération, il peut y
35 avoir une perte en certains métaux lourds (par exemple le mercure et le plomb) en présence
36 de chlorures. Si ce risque existe, il convient de doser les métaux concernés par spectrométrie
37 d'absorption atomique ou une autre technique instrumentale appropriée.

38 Lorsque l'on sait qu'un catalyseur (palladium, nickel ou rhodium par exemple) a été employé
39 pour la synthèse, il est parfois plus approprié de le doser par une méthode colorimétrique ou
40 instrumentale spéciale (spectrométrie d'absorption atomique, fluorimétrie ICP, etc.).

1 *Réactions colorées ou réactions de précipitation.* Des essais limites sont également décrits
2 pour des cations et anions particuliers ; ils reposent sur la comparaison visuelle d'une
3 coloration ou d'une opalescence. Il est essentiel de démontrer les points suivants :

- 4 • la coloration ou opalescence est visible à la concentration cible (limite),
- 5 • le recouvrement de l'ion ajouté est le même dans la solution à examiner et dans les
6 solutions témoins (vérification par observation visuelle et si possible mesure
7 d'absorbance),
- 8 • la réponse est suffisamment discriminante sur l'intervalle encadrant la valeur cible
9 (50 pour cent, 100 pour cent et 150 pour cent de la valeur cible), ce qui peut être
10 vérifié par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde appropriée du spectre visible,
- 11 • une expérience de recouvrement à la concentration cible est effectuée 6 fois, et l'écart
12 type de répétabilité est calculé. Le recouvrement doit être supérieur à 80 pour cent et
13 l'ETR de répétabilité doit être inférieur à ± 20 pour cent.

14 Il est souhaitable, le cas échéant, de comparer les résultats respectivement obtenus à partir
15 d'une étude de recouvrement conduite au moyen de l'essai limite envisagé et à partir d'une
16 analyse quantitative réalisée par une méthode différente, par exemple la spectrométrie
17 d'absorption atomique pour les cations ou la chromatographie ionique pour les anions. Les
18 résultats obtenus dans les deux cas doivent être comparables.

19 **3.3.4 Spectrométrie d'absorption atomique (2.2.23)**

20 La spectrométrie d'absorption atomique est exclusivement utilisée dans des essais portant sur
21 le dosage d'éléments spécifiques, présents dans les substances en tant qu'impuretés. Les
22 paramètres de validation suivants sont à considérer.

23 **3.3.4.1 Spécificité**

24 Cette technique est en principe spécifique de l'élément à doser, si l'on opère avec une source
25 et à une longueur d'onde appropriées, puisque l'émission ou l'absorption du rayonnement par
26 l'atome s'effectue à des raies spectrales discrètes. Néanmoins, des interférences dues à des
27 facteurs optiques et/ou chimiques peuvent se produire. Avant de s'engager dans le programme
28 de validation, il est donc important d'identifier ces interférences et, si possible, de réduire
29 leurs effets par des méthodes appropriées.

30 Ces interférences peuvent entraîner une erreur systématique, si la méthode d'étalonnage
31 employée est directe, ou affecter la sensibilité de la procédure analytique. Les principales
32 sources d'erreur en spectrométrie atomique sont associées à l'étalonnage et à l'interférence de
33 la matrice (il faut veiller à éviter les effets mémoire).

34 **3.3.4.2 Étalonnage**

35 Des solutions de référence aqueuses à différentes concentrations, échelonnées sur l'intervalle
36 d'étalonnage, sont préparées et analysées.

37 Le nombre de concentrations à utiliser dépend du modèle d'étalonnage employé. Pour
38 démontrer l'applicabilité du modèle de régression linéaire, il convient de préparer des
39 solutions de référence à 4 concentrations au moins. L'emploi d'une courbe de régression
parabolique requiert également 4 concentrations au moins. Ces concentrations sont de
préférence réparties de façon uniforme sur l'intervalle d'étalonnage.

1 En règle générale, il est recommandé d'effectuer 5 mesures au moins pour chaque
2 concentration.

3 Les problèmes liés à l'étalonnage peuvent souvent être détectés visuellement. Néanmoins, les
4 représentations graphiques ne constituent pas une preuve suffisante de l'adéquation de la
5 procédure d'étalonnage.

6 a) Tracer un graphique des absorbances mesurées en fonction de la concentration, ainsi
7 qu'une courbe représentant la fonction d'étalonnage et les intervalles de confiance
8 correspondants. Cette courbe doit présenter un bon ajustement aux données.

9 b) Tracer un graphique des résidus, c'est à dire des écarts entre l'absorbance mesurée et
10 l'absorbance estimée, en fonction de la concentration. La procédure d'étalonnage utilisée
11 est satisfaisante si les résidus présentent une distribution aléatoire autour de l'axe des x.

12 Lorsque la variance du signal croît avec la concentration, ce qui est souvent le cas en
13 spectrométrie atomique et peut être détecté par la représentation graphique des résidus ou un
14 test t unilatéral, l'emploi d'un modèle pondéré permet une meilleure estimation. Pour trouver
15 le modèle le plus adéquat, on applique aux données des fonctions de pondération linéaire et
16 quadratique.

17 Pour appliquer un modèle pondéré, établir un graphique des résidus pondérés (résidu
18 multiplié par le coefficient de pondération) en fonction de la concentration :

19 a) tracer le graphe des absorbances mesurées comme fonction pondérée de la concentration,
20 ainsi que la courbe représentant la fonction d'étalonnage et les intervalles de confiance
21 correspondants,

22 b) tracer le graphe des résidus pondérés en fonction de la concentration.

23 Il faut démontrer que le modèle présente un bon ajustement aux données. L'application d'un
24 modèle de régression linéaire exige de vérifier la linéarité de la droite d'étalonnage.

3.3.4.3 Effets de matrice

25 Lorsque l'on utilise des solutions de référence aqueuses pour estimer la fonction d'étalonnage,
26 il convient de vérifier que les sensibilités respectivement obtenues dans la solution
27 échantillon et en milieu aqueux sont similaires. Si le modèle d'étalonnage appliqué est
28 linéaire, il est possible de détecter d'éventuelles différences de sensibilité en comparant la
29 pente obtenue avec un ajout dosé et avec la droite d'étalonnage en milieu aqueux. La fidélité
30 de l'estimation des pentes des deux droites de régression dépend du nombre et de la
31 distribution des points de mesure. Il est par conséquent recommandé d'établir les deux droites
32 de régression à partir d'un nombre suffisant de points de mesure (en général > 5), et de
33 concentrer principalement ces points aux bornes de l'intervalle d'étalonnage.

34 On compare les pentes respectives de la droite obtenue avec un ajout dosé et de la droite
35 d'étalonnage en milieu aqueux, en appliquant un test t , pour vérifier si ces deux pentes
36 présentent une différence significative. Il convient alors d'appliquer le Procédé II (ajouts
37 dosés) si cette différence est significative, ou le procédé I (étalonnage direct) si elle ne l'est
38 pas.

3.3.4.4 Limites de détection et de quantification (estimation fondée sur l'écart type du blanc)

39 Pour obtenir une estimation des limites de détection et de quantification, préparer et analyser
40 des blancs représentatifs. Utiliser de préférence des blancs-matrice, c'est à dire des blancs

1 contenant tous les composants de l'échantillon à l'exception de la substance à analyser.
2 Toutefois, si l'on ne dispose pas de blancs-matrice, il est possible d'utiliser des blancs-réactif,
3 c'est à dire des blancs qui contiennent tous les réactifs et sont préparés de la même manière
4 que la solution échantillon.

5 Les autres aspects du programme de validation sont traités plus haut.

6 **3.3.5 Techniques séparatives**

7 **Méthodes chromatographiques**

8 Les différentes techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince,
9 chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide) peuvent être mises en œuvre
10 dans les monographies, sous les rubriques IDENTIFICATION, ESSAI (pour la limitation des
11 substances apparentées) et DOSAGE (pour le dosage du principe actif). Elles doivent être
12 validées selon les principes généraux déjà décrits, mais il convient de tenir compte également
13 de certaines particularités propres à chacune d'elles.

3.3.5.1 Chromatographie sur couche mince (2.2.27)

14 Cette technique chromatographique est largement employée dans la Pharmacopée pour les
15 identifications (par comparaison à une substance de référence) et pour la limitation des
16 impuretés (avec ou sans substance de référence). Son application à l'analyse quantitative des
17 impuretés exige l'emploi d'instruments appropriés. Dans la plupart des cas, la silice est
18 utilisée comme phase stationnaire, mais on a aussi parfois recours à des phases inversées (gel
19 de silice silanisé par exemple) ou à base de cellulose. Les caractéristiques suivantes sont
20 néanmoins communes à l'ensemble des techniques de chromatographie sur couche mince,
21 qu'elles soient utilisées pour une identification ou un essai des substances apparentées.

- 22 • **Spécificité** — Il est admis que, pour les identifications, cette technique n'assure pas à
23 elle seule la spécificité, mais qu'on peut en revanche en attendre une bonne
24 discrimination — elle doit être complétée par d'autres techniques qui assurent
25 concurremment la spécificité. Celle-ci peut également être insuffisante pour certains
26 essais limites, auquel cas il convient de décrire un ou plusieurs autres essais
27 permettant de contrôler la (les) impureté(s) non séparée(s). Le pouvoir de
28 discrimination doit être établi. Pour les identifications, il est parfois possible de
29 l'améliorer en utilisant un réactif de pulvérisation qui permet de différencier des
30 substances similaires d'après leur coloration.
- 31 • **Phase stationnaire** — Il faut démontrer que l'essai est applicable avec des plaques de
32 même type, mais d'origine différente, et éviter si possible les séparations qui ne sont
33 réalisables qu'avec un type particulier de plaque.
- 34 • **Test de conformité du système** — Un test de ce type est généralement effectué pour
35 vérifier la séparation de deux substances ayant un temps de migration voisin, la
36 substance proprement dite et une substance proche (couple critique). Il faut démontrer
37 que la séparation de ces deux substances constitue une garantie de l'adéquation du
38 système chromatographique. Ce critère de conformité est essentiel dans le cas des
39 essais des substances apparentées.

1 D'autres aspects sont également à étudier lorsqu'une CCM est utilisée pour un essai des
2 substances apparentées.

- 3 • Détection — Dans les cas d'un essai des substances apparentées, l'emploi de réactifs
4 de pulvérisation spécifiques est à éviter, sauf si l'essai est destiné à limiter une
5 impureté désignée, au moyen d'une substance de référence.
- 6 • Limite de détection — Lors de l'emploi d'une technique instrumentale quantitative, il
7 convient d'appliquer l'une des méthodes décrites pour le calcul de la limite de
8 détection. Si l'on utilise une méthode visuelle, il doit être démontré que la quantité
9 correspondant à la limite spécifiée est détectable.
- 10 • Facteurs de réponse — Si les impuretés connues sont disponibles, il convient de
11 démontrer que leur facteur de réponse est du même ordre que celui de la substance
12 elle-même, dans les conditions de détection indiquées. Pour un essai limite, des
13 différences de réponse peuvent être mises en évidence par comparaison des limites de
14 détection visuelles.
- 15 • Limite de quantification, linéarité, intervalle (de mesure) et répétabilité — Des
16 données relatives à ces paramètres sont également nécessaires lorsqu'une technique de
17 CCM quantitative instrumentale est employée.

3.3.5.2 *Chromatographie liquide (2.2.29)*

18 La chromatographie liquide est généralement utilisée pour limiter la teneur en impuretés
19 d'une substance (on emploie dans ce cas un étalon externe, qui est en général une dilution
20 appropriée de la solution à examiner), pour doser une substance (en employant un étalon
21 externe) et parfois comme moyen d'identification, par renvoi à l'un des deux types d'essais
22 précédents. Un certain nombre d'aspects spécifiques de la chromatographie liquide appellent
23 une attention particulière.

3.3.5.2.1 *Identification*

- 25 • Spécificité — Il est admis que, pour les identifications, cette technique n'assure pas à
26 elle seule la spécificité, mais qu'on peut en revanche en attendre une bonne
27 discrimination — elle doit être complétée par d'autres techniques qui assurent
28 concurremment la spécificité. Le pouvoir de discrimination doit être établi au moyen
29 des temps de rétention, des rétentions relatives ou du coefficient de distribution
30 massique de la substance elle-même et de substances proches. Ces informations
31 doivent être fournies pour une gamme de phases stationnaires de même type.

3.3.5.2.2 *Essais limites*

- 33 ■ Spécificité
 - 34 • *Pouvoir discriminant de la séparation.* Il faut démontrer que le système permet une
35 séparation adéquate des impuretés connues et potentielles, par rapport à la
36 substance elle-même et, si possible, entre elles. On peut assurer la spécificité en
37 utilisant la spectrométrie de masse pour la détection. Si une ou plusieurs impuretés
38 ne sont pas séparées de la substance, elles doivent être contrôlées par une autre
39 méthode. Les temps de rétention, les rétentions relatives ou les coefficients de
40 distribution massique de la substance et des impuretés doivent être enregistrés. Ces
41 informations doivent être obtenues pour une gamme de phases stationnaires de
42 même type.

- 1 • *Pouvoir discriminant du système de détection.* Le choix du détecteur et des
2 conditions de détection employées doit être validé (par exemple en faisant varier la
3 longueur d'onde de détection pour l'UV) ; on peut assurer la spécificité en ayant
4 recours à la spectrométrie de masse pour la détection.
- 5 ■ *Facteurs de réponse* — Il est essentiel de démontrer que la substance et les impuretés
6 connues ont des facteurs de réponse du même ordre, pour la détection UV (à la
7 longueur d'onde de détection) mais également pour d'autres méthodes de détection
8 (indice de réfraction, conductimétrie, ...). Si une impureté connue possède un facteur
9 de réponse supérieur à 1,2 fois ou inférieur à 0,8 fois celui de la substance à examiner,
10 il peut être nécessaire d'appliquer des facteurs de correction ou d'utiliser une impureté
11 particulière comme étalon externe lorsque la limite proposée est égale ou supérieure à
12 0,1 pour cent.
- 13 ■ *Limites de détection et de quantification* — Ces limites doivent être déterminées pour
14 l'étalon externe, qui peut être une dilution de la substance à examiner ou une impureté
15 connue. Lorsqu'un pic correspondant à une impureté est élué à proximité de celui de
16 la substance, notamment si cette impureté est éluée après la substance, les limites de
17 détection et de quantification doivent être déterminées sur cette impureté. On utilise
18 l'une des méthodes de calcul de la limite de détection et de la limite de quantification.
- 19 ■ *Stabilité* — Des données de stabilité doivent être présentées pour établir la durée de
20 conservation des solutions témoins et des solutions à examiner.
- 21 ■ *Recouvrement* — Lorsqu'un procédé d'extraction est employé, une étude de
22 recouvrement doit être effectuée au moyen d'impuretés connues disponibles, dans des
23 conditions optimales, et les résultats doivent être enregistrés. Il doit être démontré que
24 le recouvrement présente une fidélité acceptable.
- 25 ■ *Dérivatisation* — Lorsqu'une dérivation pré- ou post-colonne est effectuée, il est
26 important d'établir les conditions optimales de réaction (temps et température), ainsi
27 que d'étudier la stabilité des produits dérivés dans les conditions normales d'emploi.
- 28 ■ *Test de conformité du système* — Voir plus haut la chromatographie sur couche
29 mince. L'emploi du rapport signal/bruit n'est nécessaire que lorsque la limite de
30 détection et la limite spécifiée sont voisines.

31 **3.3.5.2.3 Dosage**

- 32 • *Spécificité* — Cette caractéristique est souhaitable, mais non indispensable si
33 l'impureté interférente est présente à faible concentration et est contrôlée par un autre
34 essai.
- 35 • *Test de conformité du système* — Voir plus haut la chromatographie sur couche
36 mince.

37 Les essais limites et dosages doivent être validés selon les indications données plus haut pour
38 la linéarité, la répétabilité et la reproductibilité.

3.3.5.3 Chromatographie en phase gazeuse (2.2.28)

39 **3.3.5.3.1 Identification**

- 40 • *Spécificité* — Voir plus haut la chromatographie liquide.

3.3.5.3.2 *Essais limites*

- Spécificité — voir plus haut la chromatographie liquide.
- Facteurs de réponse (voir chromatographie liquide) — Il faut connaître les facteurs de réponse et les comparer à celui de la substance elle-même. Ceci est particulièrement important lorsque l'on utilise des techniques de détection sélectives (capture d'électrons, détection des composés azotés et phosphatés, etc.).
- Limites de détection et de quantification — Voir plus haut la chromatographie liquide.
- Stabilité — Voir plus haut la chromatographie liquide.
- Dérivatisation — Voir plus haut la chromatographie liquide.
- Étalon interne — Il doit être démontré que, dans les conditions chromatographiques utilisées, le pic dû à l'étalon interne n'interfère pas avec ceux des impuretés ou de la substance elle-même.
- Paramètres de recouvrement — Voir plus haut la chromatographie liquide.

3.3.5.3.3 *Test de conformité du système*

Il convient de fournir une description détaillée des critères auxquels doit satisfaire l'utilisateur pour réaliser l'essai de façon satisfaisante.

- Rapport signal/bruit : ce critère est généralement utilisé lorsque le signal est voisin de la limite de détection.
- Résolution entre les pics respectivement dus à la substance et à une impureté éluee à un temps voisin, ou entre les pics respectivement dus à la substance et à l'étalon interne. Il est également utile de préciser l'intervalle de valeurs acceptable pour le facteur de symétrie lorsqu'il diffère de celui spécifié dans la méthode générale (2.2.28), soit 0,8 à 1,2. Ce point est particulièrement important lorsque l'on emploie des colonnes remplies et que le pic d'une des impuretés à contrôler est élué immédiatement après le pic principal. La vérification des performances au moyen d'une colonne similaire, chaque fois que possible, est recommandée.
- Technique à espace de tête — Cette technique d'injection est utilisée pour les substances hautement volatiles. Il est important de démontrer que la température et le temps de préchauffage du flacon assurent la réalisation des conditions d'équilibre. Il faut également vérifier l'existence (ou l'absence) de tout effet dit « de matrice ». Un moyen possible de valider les conditions d'espace de tête consiste à effectuer des extractions multiples (l'espace de tête est évacué après chaque injection, et le flacon rééquilibré avant réinjection de la phase gazeuse). La condition préalable à l'obtention de bonnes conditions opératoires est l'existence d'une relation linéaire, avec un coefficient de régression de 1,0, entre les valeurs logarithmiques de la surface du pic de la substance à analyser et le nombre d'extractions. Le problème des effets de matrice peut être surmonté par la technique des ajouts dosés.

3.3.5.3.4 *Dosage*

- Spécificité — Voir plus haut la chromatographie liquide.

- 1 • Test de conformité du système — Voir plus haut la chromatographie sur couche
2 mince.

3 Les essais limites et dosages doivent être validés selon les indications de la section 3.2 pour
4 la linéarité, la répétabilité et la reproductibilité.

5 **3.3.5.3.5 Identification et contrôle des solvants résiduels (2.4.24)**

6 Le mode de préparation des échantillons et les systèmes de CPG utilisés doivent être validés
7 pour la substance à examiner selon les critères généraux applicables à la CPG, en portant une
8 attention particulière aux critères suivants :

- 9 • spécificité
10 • limites de détection et de quantification
11 • recouvrement
12 • répétabilité
13 • linéarité, pour les analyses quantitatives.

14 **3.3.6 Semi-microdosage de l'eau (2.5.12)**

15 Il existe dans le commerce divers réactifs de Karl Fischer ; il est donc important de s'assurer
16 de l'aptitude à l'emploi du réactif utilisé, par une procédure de validation faisant par exemple
17 appel à la méthode des ajouts dosés.

18 *Méthode des ajouts dosés*

19 Déterminez la teneur en eau m_{H_2O} de l'échantillon dans les conditions proposées. Ajoutez
20 ensuite à l'échantillon, dans des conditions étanches, un volume approprié d'une solution
21 titrée d'eau dans le méthanol *R* et déterminez la teneur en eau m_i , en milligrammes d'eau ;
22 répétez cette opération au moins 5 fois.

23 Calculez la droite de régression de la teneur en eau mesurée en fonction de la quantité d'eau
24 ajoutée (en valeurs cumulatives). Calculez la pente b , l'ordonnée à l'origine a et le point
25 d'intersection d de la droite extrapolée avec l'axe des abscisses.

26 La pente b est acceptable si elle est comprise entre 0,975 et 1,025 (écart admis $\pm 2,5$ %). Les
27 erreurs e_1 et e_2 sont inférieures à $\pm 2,5$ pour cent.

28
$$e_1 = \frac{a - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \times 100$$

29
$$e_2 = \frac{d - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \times 100$$

30 Calculez le recouvrement pour chacune des étapes d'addition d'eau. Le recouvrement moyen
31 est acceptable s'il est compris entre 97,5 pour cent et 102,5 pour cent.

32 **3.3.7 Titrages volumétriques (2.5.11 - 2.2.19 - 2.2.20)**

33 Lors du développement de nouvelles méthodes de dosage fondées sur un titrage
34 volumétrique, il est recommandé de titrer dans les conditions prescrites au moins 7 prises
35 d'essai de masse différente, dans un ordre randomisé, de façon à obtenir des volumes au point
36 final compris entre 20 pour cent et 90 pour cent du volume de la burette utilisée. Les résultats

1 obtenus font l'objet d'un traitement statistique et doivent satisfaire à un certain nombre de
2 critères pour que la procédure de titrage soit acceptée.

3 *L'erreur relative de lecture sur la masse pesée et sur le volume au point final doit être*
4 *inférieure à 0,5 pour cent des valeurs obtenues.*

5 Les résultats, exprimés en volume au point final V_i en fonction de la masse m_i , font l'objet
6 d'une analyse de régression linéaire. La droite de régression calculée est caractérisée par la
7 pente b_{obs} , l'ordonnée à l'origine (obtenue par extrapolation) a_{obs} et la fidélité exprimée par
8 l'écart type $sdv(V)$.

9 Critère 1 : erreur systématique (biais) proportionnelle

10 La pente calculée b_{obs} , qui prend en compte la concentration de la solution titrée utilisée, ne
11 s'écarte pas de plus de 0,3 pour cent (détermination potentiométrique) ou 0,5 pour cent
12 (détermination visuelle) de la valeur théorique b_{theor} donnée comme constante de titrage. On
13 calcule

$$14 \quad \left(\frac{b_{\text{obs}} - b_{\text{theor}}}{b_{\text{theor}}} \right) \times 100$$

$$15 \quad \text{où } b_{\text{theor}} = \frac{Z}{M_r C_r},$$

16 M_r étant la masse moléculaire relative, Z le facteur stœchiométrique de la réaction chimique
17 et C_r la concentration molaire du réactif titrant.

18 Critère 2 : erreur systématique (biais) additionnelle

19 L'ordonnée à l'origine a_{obs} obtenue par extrapolation est inférieure à 0,4 pour cent
20 (détermination potentiométrique) ou 0,6 pour cent (détermination visuelle) du volume de
21 titrage attendu ou volume de titrage cible. Il arrive que ce critère ne soit pas satisfait lorsque
22 le titrage a été effectué trop rapidement (détermination potentiométrique) ou que l'indicateur
23 utilisé n'était pas approprié (détermination visuelle). On calcule

$$24 \quad \left(\frac{a_{\text{obs}}}{V_T} \right) \times 100$$

25 où a_{obs} est l'ordonnée à l'origine de la droite de régression extrapolée et V_T le volume de
26 titrage attendu ou volume de titrage cible.

27 Critère 3 : fidélité (erreur statistique)

28 L'écart type estimé résiduel $sdv(V)$ est inférieur à 0,3 pour cent (déterminations
29 potentiométriques) ou 0,5 pour cent (déterminations visuelles) du volume moyen consommé
30 au point final lorsque l'on utilise la procédure de titrage à introduire dans la monographie. On
31 calcule

$$32 \quad \left(\frac{sdv(V)}{V_T} \right) \times 100$$

33 où $sdv(V)$ est l'écart type estimé

$$34 \quad sdv(V) = \sqrt{\frac{Sdd}{n-2}}$$

35 avec

1
$$Sdd = \sum (V_i - a_{\text{obs}} - b_{\text{obs}} m_i)^2$$

2 V_i étant le volume de titrage, m_i la masse de la prise d'essai et n le nombre de titrages
3 effectués.

4 Critère 4 : erreur relative pratique

5 Il peut arriver qu'une procédure de titrage ne satisfasse pas aux critères 1 et 2, mais présente
6 un biais faible, acceptable, au volume de titrage cible (8 ± 1 ml pour une burette de 10 ml).
7 Dans ce cas, les critères 1 et/ou 2 ci-dessus n'étant pas satisfaits, calculez l'exactitude relative
8 au volume de titrage cible.

$$\left(\frac{a_{\text{obs}}}{V_T} + \frac{b_{\text{obs}} - b_{\text{theor}}}{b_{\text{theor}}} \right) \times 100$$

9 Lorsque la procédure de titrage est bien établie, toutefois, il suffit de vérifier que la
10 répétabilité et l'exactitude du titrage (6 répétitions au minimum) ne sont pas supérieures aux
11 limites indiquées dans le tableau et dans l'arbre de décision ci-dessous.

12

TYPE DE TITRAGE	LIMITES DE TENEUR (POUR CENT)	REPETABILITE (ETR)	EXACTITUDE RELATIVE (POUR CENT)
Acido-basique	$\pm 1,0$	0,33	$\pm 0,67$
Milieu non aqueux	$\pm 1,0$	0,33	$\pm 0,67$
Acide conjugué de la base	$\pm 1,0$	0,33	$\pm 0,67$
Redox	$\pm 1,5$	0,5	$\pm 1,0$
Argentométrique	$\pm 1,5$	0,5	$\pm 1,0$
Complexométrique	$\pm 2,0$	0,67	$\pm 1,33$

13 Les valeurs indiquées dans le tableau sont données à titre de guide et il peut parfois être
14 démontré que des limites plus strictes sont applicables. L'emploi d'un titrage volumétrique
15 n'est envisageable que lorsqu'il a été démontré que la teneur en impuretés est faible ; dans le
16 cas contraire, il convient de recourir à d'autres méthodes de dosage.

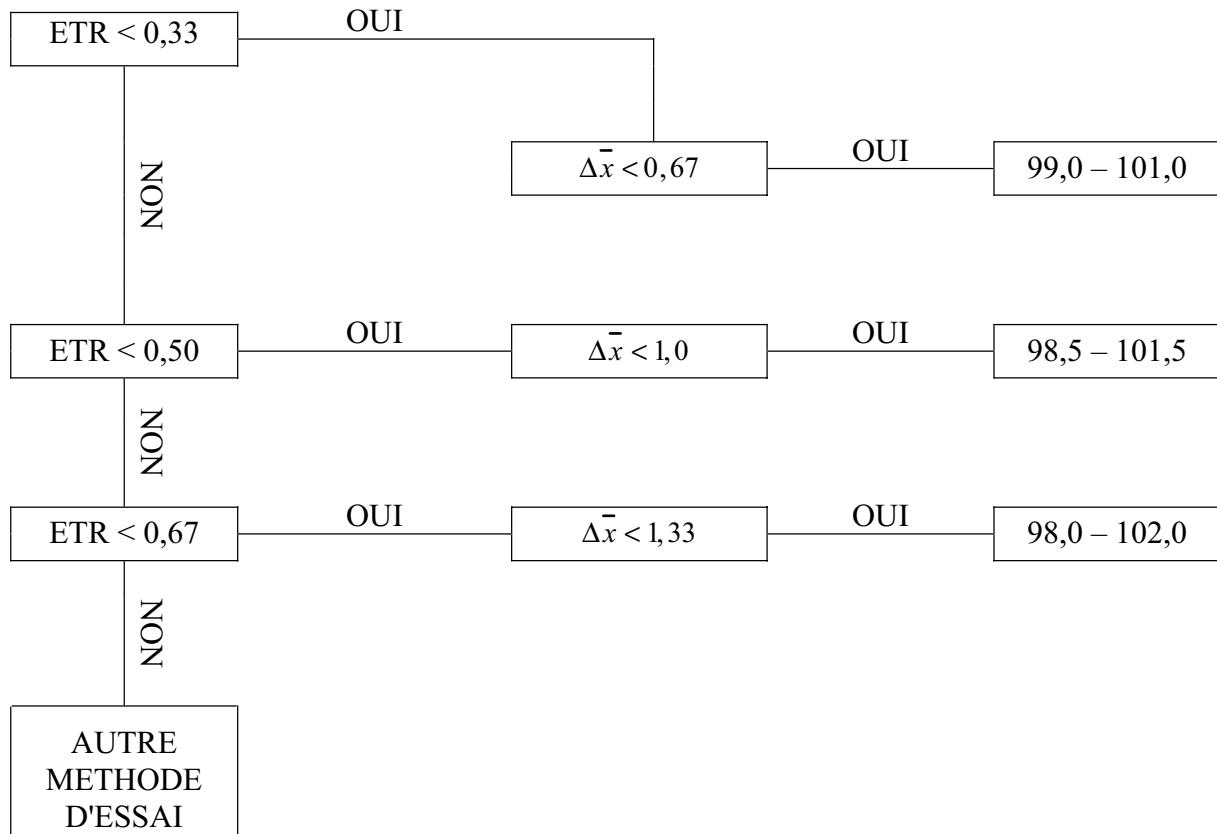
1 ARBRE DE DECISION POUR LA VALIDATION DES TITRAGES VOLUMETRIQUES

2 Répétabilité

ETR ($n = 6$)

3 Exactitude relative

$$\Delta\bar{x} = \frac{\bar{x} - x_{theor}}{x_{theor}}$$



4