



MÉTHODE OFFICIELLE

Oestrogènes conjugués

Publication autorisée par le
ministre de la Santé

Date	1981/10/15
Date changements de nature administrative	2003/11/17

Direction générale des produits de santé et des aliments

I. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la préparation de la solution A diluée (dilute assay preparation A), des solutions A et B (assay preparations A and B) du réactif de l'équiline et à l'analyse des oestrogènes conjugués, des oestrogènes conjugués pour injection, des comprimés d'oestrogènes conjugués, conformément aux articles C.06.002, C.06.003 et C.06.004 du *Règlement sur les aliments et drogues*.

II. MODE OPÉRATOIRE

Il faut effectuer le test conformément aux instructions suivantes.

A. Oestrogènes conjugués

1. Solution A (Assay Preparation A)

- (1) Mélanger une quantité d'oestrogènes conjugués, exactement pesée et équivalente à environ 10 mg d'oestrogènes conjugués, à 8 g de silice chromatographique;
- (2) ajouter, en mélangeant, 3 mL d'eau;
- (3) introduire 3 g de silice chromatographie dans une colonne chromatographie de 25 x 175 mm, équipée d'un robinet à sa base et contenant un petit tampon de laine de verre; transférer le mélange en deux portions approximativement égales, en tassant chacune modérément à l'aide d'un foulon jusqu'à obtention, d'une hauteur de 8 cm environ;
- (4) rincer le contenant vide avec 2 g de silice chromatographie; transférer ensuite dans la colonne chromatographique, tasser. Essuyer le contenant et tous les accessoires avec un tampon de laine de verre; introduire le tampon au haut de la colonne en essuyant les parois et enfoncer légèrement le tampon jusqu'au sommet de la colonne;
- (5) à l'aide du vide, laver la colonne avec 100 mL de benzène et rejeter les liquides de lavage (vitesse d'élution: 3 à 5 mL par minute; éluer seulement jusqu'au haut de la colonne);
- (6) éluer la colonne avec 150 mL d'une solution d'acétate de dicyclohexylamine "T.S." (Remarque 1), en maintenant la vitesse d'élution entre 3 et 5 mL par minute;

- (7) recueillir l'éluat sous pression réduite dans un ballon à fond rond de 250 mL;
- (8) évaporer l'éluat avec précaution à l'aide d'un évaporateur rotatif, jusqu'à ce que le résidu soit presque sec;
- (9) ajouter environ 10 mL de méthanol, et évaporer à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif;
- (10) dissoudre le résidu dans 20 mL de méthanol;
- (11) ajouter quelques granules régulateurs d'ébullition;
- (12) ajouter 6.0 mL d'acide chlorhydrique dilué (1 dans 20); adapter un réfrigérant au goulot du flacon et placer ce dernier sur un bain de vapeur pendant 12.0 minutes, de façon que seul le liquide soit immergé puis refroidir dans un bain de glace;
- (13) transvaser le liquide dans une ampoule à décanter de 250 mL à l'aide de 60 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium "T.S." (solution à 6.5 % p/v) et agiter;
- (14) laver la solution avec 2 x 60 mL de tétrachlorure de carbone, et réunir les liquides de lavage;
- (15) extraire le tétrachlorure de carbone à l'aide de 40 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium "T.S.", ajouter l'extrait à la solution alcaline lavée et rejeter le tétrachlorure de carbone;
- (16) ajouter suffisamment d'acide sulfurique (1 dans 3) pour obtenir un pH voisin de 1;
- (17) extraire immédiatement avec 20 mL puis 15 mL de benzène, en agitant énergiquement chaque fois pendant une minute;
- (18) rejeter la phase aqueuse;
- (19) réunir les extraits benzéniques;

- (20) laver les extraits benzéniques successivement avec 10 mL d'eau, et plusieurs fois avec 15 mL d'une solution de carbonate de sodium (1 dans 50) jusqu'à ce que la dernière soit incolore, et finalement avec 10 mL d'eau;
- (21) laver les liquides de lavage réunis avec 10 mL de benzène et rejeter les produits de lavage;
- (22) laver ce dernier extrait benzénique avec 5 mL d'eau et rejeter l'eau de lavage;
- (23) transférer les extraits benzéniques dans un flacon volumétrique de 100 mL, en les faisant passer sur un filtre constitué d'un tampon de laine de verre sur lequel on a préalablement placé 3 à 4 g de sulfate de sodium anhydre;
- (24) rincer plusieurs fois avec du benzène;
- (25) ajouter du benzène pour remplir jusqu'au trait de jauge; étiqueter cette solution: "*solution A*" (*assay préparation A*);
- (26) diluer 20.0 mL de la solution A (*assay preparation A*) avec du benzène de façon à obtenir 25.0 mL de solution; étiqueter cette dernière: "*solution A diluée*" (*dilute assay preparation A*).

Solution B (Assay Preparation B)

- (1) Introduire 60.0 mL de la *solution A* (*assay préparation A*) en quatre fractions de 15.0 mL dans une fiole conique de 25 mL, en évaporant avec soin chaque fois jusqu'à siccité, à l'aide d'un courant d'azote et en chauffant légèrement de façon à ce que tout le résidu se dépose au fond du flacon; rincer le flacon avec 1 à 2 mL de benzène frais et évaporer;
- (2) ajouter 100 mg de chlorure de triméthylacéthylhydrazide ammonium (réactif T de Girard) et 0.5 mL d'acide acétique glacial;
- (3) couvrir la fiole avec un petit verre de montre et chauffer à une température de 80 à 100°C pendant 5 minutes, en agitant de temps en temps;

- (4) refroidir la solution et à l'aide de 50 mL d'eau glacée, transvaser à une ampoule à décanter de 125 mL contenant 10 mL d'une solution d'acétate de sodium (1 dans 20);
- (5) laver la solution immédiatement avec 4 x 10 mL de chloroforme, et réunir les liquides de lavage dans une autre ampoule;
- (6) laver le chloroforme avec 5 mL d'eau et rejeter le chloroforme;
- (7) réunir les phases aqueuses;
- (8) ajouter 7 mL d'acide sulfurique dilué (1 dans 3), enlever immédiatement tout le chloroforme qui pourrait se séparer et agiter lentement;
- (9) laisser reposer la solution pendant exactement 30 minutes;
- (10) procéder à l'extraction avec, une première fois, 20 mL de benzène et, une deuxième fois, 15 mL de benzène, en agitant énergiquement chaque fois pendant 1 minute; rejeter la phase aqueuse;
- (11) réunir les extraits benzéniques;
- (12) laver successivement les extraits benzéniques avec 10 mL d'eau, puis avec 2 portions de 15 mL d'une solution de carbonate de sodium (1 dans 50) et finalement avec 10 mL d'eau;
- (13) laver les solutions de lavage réunies avec 5 mL de benzène; rejeter la phase aqueuse;
- (14) laver ce dernier extraits benzénique avec 5 mL d'eau et rejeter l'eau de lavage;
- (15) transférer les extraits benzéniques dans un ballon volumétrique de 50 ml, en filtrant sur un tampon de laine de verre disposé dans le fond d'un entonnoir, sur lequel on a placé préalablement 3 à 4 g de sulfate de sodium anhydre;
- (16) rincer plusieurs fois avec du benzène;
- (17) ajouter du benzène jusqu'au trait de jauge; étiqueter cette solution: "*solution B*" (*assay preparation B*).

2. Réaction d'identité pour les oestrogènes conjugués

- (1) Transférer 1 mL de la solution A diluée dans une éprouvette de dimensions 18 x 150 mm;
- (2) évaporer le solvant, en chauffant légèrement et avec l'aide d'un courant d'azote;
- (3) ajouter 0.5 mL d'alcool à l'éprouvette contenant l'échantillon et aussi à une seconde éprouvette servant de témoin;
- (4) placer les éprouvettes dans un bain d'eau froide à environ 10°C, ajouter 5.0 mL de réactif de l'équiline à chacune, et mélanger;
- (5) placer les éprouvettes dans un bain d'eau bouillante, agiter les collectivement après environ 3 minutes et continuer de chauffer jus qu'à un total de 9 minutes;
- (6) transférer rapidement les éprouvettes dans le bain d'eau froide, lorsque refroidies, enlever les éprouvettes et laisser les prendre la température de la pièce;
- (7) mesurer le spectre d'absorption de l'échantillon par rapport au témoin entre 350 et 800 nm avec un spectromètre-enregistreur approprié;
- (8) le spectre présente des maxima seulement à 468 ± 2 , 528 ± 2 , et 634 ± 4 nm, et des minima à environ 493 et 555 nm;
- (9) mesurer la densité optique maximale à environ 468 nm et la densité optique minimale à environ 493 nm; le rapport de la densité optique au maximum à la densité optique au minimum doit être supérieur à 1.3.

3. Préparation étalon d'équiline

Préparer une solution benzénique d'équiline USP dont la concentration sera d'environ 20 µg par mL.

4. Réactif de l'équiline

- (1) A 145 g de phénol purifié (Remarque 2) et refroidi, ajouter avec précaution 90 mL d'acide sulfurique et agiter jusqu'à ce que le phénol soit liquéfié; continuer à mélanger avec précaution jusqu'à ce que le mélange soit bien homogène et laisser reposer dans l'obscurité pendant une nuit;
- (2) ajouter 105 mL du mélange à 350 mL d'acide sulfurique dilué (50 % v/v);
- (3) ajouter, à ce nouveau mélange, une solution, préparée séparément et composée de 7.0 mL d'acide chlorhydrique, de 3.0 mL d'une solution de nitrate de cobalt (1 dans 1000) et de 25 mL d'eau distillée;
- (4) chauffer pendant 30 minutes au bain-marie bouillant après que le mélange ait atteint une température de 95°C; refroidir jusqu'à la température ambiante et conserver dans un récipient de verre à faible pouvoir actinique;
- (5) à ce mélange, ajouter 3.0 mL de solution d'hypochlorite de sodium à 5%;
- (6) bien mélanger et laisser reposer pendant au moins 40 heures;
- (7) le spectre d'absorption de 1 mL de préparation-étalon d'équiline, déterminé avec ce réactif selon la méthode indiquée à "Reaction d'identité pour les oestrogènes conjugués" présente un maximum seulement à environ 634 nm \pm 4 nm et ne présente ni épaulement ni maximum entre 600 nm et 450 nm.

B. Oestrogènes conjugués pour injection

1. Solution A (Assay Preparation A)

- (1) Dissoudre le contenu d'un flacon d'oestrogènes conjugués pour injection dans 10.0 mL d'eau;
- (2) pipetter 4 mL de cette solution dans un flacon à fond rond contenant quelques morceaux de carbure de silicium servant de régulateur d'ébullition;
- (3) ajouter 20 mL d'alcool méthylique et 2 mL d'acide chlorhydrique dilué (3 dans 20);

- (4) adapter un réfrigérant à eau au goulot du ballon, placer le ballon sur un bain de vapeur pendant 12.0 minutes, de telle façon que seul le liquide soit immergé; refroidir dans un bain de glace;
- (5) ajouter 60 mL d'eau et transvaser dans une ampoule à décanter de 250 mL;
- (6) procéder à l'extraction immédiatement, une première fois avec 20 mL et une seconde fois avec 15 mL de benzène, en agitant énergiquement chaque fois pendant une minute;
- (7) continuer selon la méthode indiquée à "Solution A" (Assay Preparation A) sous la rubrique "Oestrogènes conjugués", en commençant par le numéro 18.

2. *Réaction d'identité pour les oestrogènes conjugués pour injection*

- (1) La réaction d'identité pour les oestrogènes conjugués pour injection est la même que celle qui est décrite pour les oestrogènes conjugués.

C. Comprimés d'oestrogènes conjugués

1. *Solution A (Assay Preparation A)*

- (1) Mélanger une certaine quantité de comprimés d'oestrogènes conjugués finement pulvérisés, exactement pesée, et équivalente à environ 10 mg d'oestrogènes conjugués, avec 8 g de silice chromatographie;
- (2) continuer selon la méthode indiquée à "Solution A" (Assay Preparation A) sous la rubrique "Oestrogènes conjugués", en commençant par le numéro 2.

2. *Réaction d'identité pour les comprimés d'oestrogènes conjugués*

- (1) La réaction d'identité pour les comprimés d'oestrogènes conjugués est la même que celle qui est décrite pour les oestrogènes conjugués.

III. REMARQUES

1. *Il faut préparer l'acétate de dicyclohexylamine "T.S." selon les instructions suivantes.*

- (1) Dissoudre 50 g de dicyclohexylamine dans 150 mL d'acétone, refroidir dans un bain de glace et ajouter, en agitant, une solution de 18 mL d'acide acétique glacial dans 150 mL d'acétone;

- (2) recristalliser le précipité qui s'est formé, en chauffant le mélange jusqu'au point d'ébullition et en le refroidissant dans un bain de glace. Recueillir les cristaux sur un entonnoir à filtre en verre fritté les rincer avec un peu d'acétone et les laisser sécher à l'air.
- (3) dissoudre 300 mg de l'acétate de dicyclohexylamine ainsi obtenu dans 200 mL d'un mélange de 6 volumes de chloroforme et de 4 volumes d'éther saturé d'eau;
- (4) utiliser immédiatement.

2. *Il faut purifier le phénol selon les instructions suivantes.*

- (1) À une quantité de phénol fondu, ajouter 4% de son poids de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), finement pulvérisé;
- (2) chauffer le mélange sous reflux pendant au moins 3 jours;
- (3) séparer le phénol par distillation;
- (4) ajouter de l'hydroxyde de sodium (en pastilles - 1 % p/p); distiller et redistiller;
- (5) aucune coloration ne devrait apparaître lorsque le phénol ainsi purifié est mis en présence d'acide sulfurique.

IV. RÉFÉRENCE

The Pharmacopeia of the United States of America, dix-huitième révision, 1970, Mack Printing Company, Easton, PA. 18042, É.-U.

La méthode décrite ci-dessus, laquelle comprend 8 pages de texte et porte le nom de la méthode officielle DO-29 - ESTROGÈNES CONJUGUÉS et est datée du 15 octobre 1981, est, par les présentes, désignée la "méthode officielle" mentionnée aux articles C.06.002, C.06.003 et C.06.004 du *Règlement sur les aliments et drogues*.