

CENTRE COLLABORATEUR OMS POUR LES SUBSTANCES CHIMIQUES DE REFERENCE

14166

Rapport d'activités pour 1985

par M. Abrahamsson

Table des matières

	<u>Pages</u>
Distribution des substances de référence en 1985 .....	2
Etablissement de substances de référence en 1985 .....	2
Travaux effectués en 1985 sur de nouvelles substances de référence .....	2
Essais de stabilité .....	2
Travaux en cours et travaux futurs .....	3
Questions administratives et financières .....	3
Remerciements .....	4
Appendice 1. Distribution des substances chimiques de référence en 1985 .....	5
Appendice 2. Liste des substances chimiques internationales de référence établies en 1985 .....	6
Appendice 3. Liste des substances chimiques internationales de référence disponibles .....	7
Appendice 4. Essais de stabilité - Rapport d'analyse .....	10
Appendice 5. Substances chimiques internationales de référence - Liste prévisionnelle pour 1986 .....	17
Appendice 6. Tartrate d'ergotamine, N° de contrôle 385013 .....	19
Appendice 7. Isoniazide, N° de contrôle 185124 .....	23
Appendice 8. Acétate de noréthistérone, N° de contrôle 185123 .....	27
Appendice 9. Chlorhydrate de papavérine, N° de contrôle 185127 .....	32
Appendice 10. Propylthio-uracile, N° de contrôle 185126 .....	36
Appendice 11. Triméthadione, N° de contrôle 185125 .....	40

\* Pour des raisons techniques, les appendices 6 à 11 n'ont été établis qu'en anglais.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted, quoted or translated without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation ou traduction sans l'autorisation de l'Organisation mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

Distribution des substances de référence en 1985

En 1985, le Centre a distribué à des laboratoires de contrôle pharmaceutique de 46 pays 2210 échantillons de substances chimiques internationales de référence et 22 séries de substances de référence pour la détermination du point de fusion. Ces chiffres représentent une diminution de 16 % par rapport à ceux de l'année précédente. Les cinq substances les plus fréquemment demandées en 1985 ont été, dans l'ordre, l'acide folique, l'ampicilline, la digoxine, la benzylpénicilline sodique et le tartrate d'ergotamine. On trouvera à l'appendice 1 des détails sur la distribution des diverses substances de référence.

Etablissement de substances de référence en 1985

Conformément à la procédure recommandée par le Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques dans son vingt-cinquième rapport (Série de Rapports techniques, N° 567), le Centre a établi, en 1985, 4 substances chimiques internationales de référence, dont on trouvera la liste à l'appendice 2. Parmi ces substances, la digoxine est un lot de remplacement pour une substance chimique internationale de référence déjà existante dont les réserves se sont épuisées.

On trouvera à l'appendice 3 une liste complète de toutes les substances chimiques internationales de référence détenues par le Centre en janvier 1986, avec indication de la quantité de substance contenue dans chaque unité de conditionnement et du numéro de contrôle des lots actuels. Cette liste comprend également six substances mentionnées ci-dessous, dont on peut prévoir qu'elles seront officiellement adoptées au cours du premier semestre de 1986. Le rose Bengale sodique n'est plus disponible et a été par conséquent rayé de la liste. Conformément à une recommandation formulée par le Comité d'experts lors de sa trentième réunion, cette substance ainsi que d'autres qui ne sont plus utilisées dans la troisième édition de la Pharmacopée internationale ne seront pas remplacées, du moins pour l'instant.

Travaux effectués en 1985 sur de nouvelles substances de référence

Le Centre a poursuivi ses travaux en vue de fournir les nouvelles substances de référence qui seront nécessaires pour accompagner les spécifications de la troisième édition de la Pharmacopée internationale. En 1985, l'analyse des nouvelles substances de référence suivantes a été réalisée : isoniazide, acétate de noréthistérone, chlorhydrate de papavérine, propylthiouracile et triméthadione. Les rapports d'analyse pour ces substances figurent aux appendices 7, 8, 9, 10 et 11 respectivement. Ces cinq substances ont été jugées satisfaisantes pour l'usage auquel elles sont destinées et il est par conséquent proposé de les adopter comme substances chimiques internationales de référence.

Les réserves de tartrate d'ergotamine de référence (N° de contrôle 276013) étant épuisées, il a été décidé d'examiner un nouveau lot qui s'est révélé satisfaisant comme lot de remplacement. Il est proposé que la substance portant le N° de contrôle 385013 soit adoptée comme substance chimique internationale de référence. Les résultats d'analyse de ce lot figurent à l'appendice 6 du présent rapport.

Essais de stabilité

Chaque année, un certain nombre de substances chimiques internationales de référence détenues par le Centre sont réexaminées afin de contrôler leur stabilité pendant le stockage. En 1985, le réexamen a porté sur 20 substances, notamment sur les tétracyclines.

Le choix des méthodes d'analyse à utiliser pour la surveillance de la stabilité exige une mûre réflexion. Il dépend bien entendu de la nature de la substance concernée mais, d'une façon générale, le principe est d'utiliser des méthodes hautement reproductibles et de s'en tenir le plus possible aux mêmes méthodes et dans les mêmes conditions expérimentales pour le réexamen

d'une substance de référence que lors de l'analyse initiale. L'influence des erreurs analytiques sera ainsi limitée et on pourra déceler précocement le début d'une éventuelle dégradation de la substance. Il est toutefois judicieux d'examiner de temps à autre les progrès de la chimie analytique et d'introduire de nouvelles méthodes si on les juge plus informatives ou plus commodes.

On trouvera à l'appendice 4 les résultats obtenus lors du réexamen d'une substance ainsi que les résultats de certains travaux antérieurs. On peut obtenir auprès du Centre des détails concernant les méthodes utilisées.

Les substances examinées se sont en général révélées stables lorsqu'elles étaient stockées à +15°C. La seule exception est le chlorhydrate d'épi-4 anhydrotétracycline (N° de contrôle 180097), pour lequel la teneur en anhydrotétracycline est passée de 1,7 à 7 pour cent en cinq ans. Toutefois, la substance en question n'étant utilisée que comme impureté de référence en chromatographie en couche mince, cette dégradation peut être considérée comme acceptable. Un nouveau lot sera de toute façon préparé prochainement, car les stocks vont bientôt être épuisés.

#### Travaux en cours et travaux futurs

Le Centre poursuit l'établissement des substances chimiques de référence nécessaires pour la troisième édition de la Pharmacopée internationale. Il manque encore 6 substances pour le volume 2, mais pour la plupart d'entre elles les travaux d'analyse sont presque achevés. Pour accompagner les spécifications figurant dans le volume 3, il faut encore 46 nouvelles substances de référence. De plus, au moins 4 substances chimiques internationales de référence actuelles devront être remplacées par de nouveaux lots au cours de l'année à venir. Compte tenu du travail que cela représente et des ressources dont le Centre dispose, on peut raisonnablement prévoir qu'il faudra au moins cinq ans pour venir à bout du programme actuel de travail. Par suite de cette situation peu satisfaisante, il pourrait aussi être nécessaire, au moins dans l'immédiat, de s'abstenir de remplacer les substances chimiques internationales de référence dont les réserves se sont épuisées, s'il s'agit de substances qui ne sont pas jugées indispensables pour la troisième édition de la Pharmacopée internationale. On trouvera à l'appendice 5 une liste des substances de référence que le Centre devra établir, avec indication des substances déjà à l'étude. Toute aide que le Centre pourrait recevoir, que se soit par la fourniture et/ou l'examen des substances restantes, sera bienvenue. Il serait également d'un grand intérêt pour le Centre de recevoir des indications sur l'ordre de priorité des substances de l'appendice 5. Le Centre a noté avec satisfaction l'avancement du projet visant à établir une collection OMS de spectres infrarouges de référence pour les substances pharmaceutiques. Une fois réalisé, ce projet réduira considérablement le nombre de substances chimiques internationales de référence nécessaires et allégera ainsi la charge de travail du Centre. Confiant dans la réussite de l'opération, le Centre a déjà supprimé de sa liste de travail (appendice 5) les substances de référence qui ne sont nécessaires que pour une identification par spectrophotométrie infrarouge.

#### Questions administratives et financières

La situation financière du Centre reste mauvaise. Le coût de fonctionnement total du Centre en 1985 a été estimé à US \$198 000. Le revenu provenant des ventes de substances de référence aux laboratoires industriels a été d'environ US \$13 000 et la contribution du Siège de l'OMS de US \$19 000, ce qui laisse un déficit de US \$166 000. Après examen de la question, le Conseil d'administration de l'Association nationale des Pharmacies suédoises a convenu de maintenir au même niveau sa contribution au fonctionnement du Centre, mais a instamment demandé que tout soit mis en oeuvre pour diminuer le déficit. Les options qui se présentent actuellement au Centre pour améliorer sa situation financière sont essentiellement les suivantes :

- 1) Augmenter les ventes de substances de référence aux laboratoires industriels par des efforts de marketing intenses.

- 2) Augmenter le prix des substances.
- 3) Instaurer un tarif pour les substances livrées aux laboratoires publics de contrôle.

En accord avec la première de ces mesures, la collection des substances chimiques de référence internationales a été présentée lors d'une exposition organisée en juin 1985 à Lund, Suède, à l'occasion d'une conférence de chimie analytique et a suscité un intérêt considérable parmi les chimistes analytiques présents.

En 1985, le prix des substances est resté fixé à US \$25 par paquet, mais pour l'année à venir une augmentation semble possible et justifiée, surtout si le taux de change du dollar continue à baisser.

La proposition selon laquelle les laboratoires publics devraient également payer pour les substances a été renouvelée et sa mise en œuvre est actuellement sérieusement à l'étude. Comme le signale un rapport antérieur du Centre (WHO/PHARM/84.513), certains laboratoires publics dont le budget et/ou les crédits en devises convertibles sont limités risquent d'avoir de la difficulté à obtenir le matériel de référence dont ils ont besoin. Le Centre a informé les Bureaux régionaux de l'OMS de sa proposition et poursuivra l'examen de la question avec eux de façon à obtenir un soutien financier de l'OMS pour les laboratoires qui autrement seraient privés des substances de référence nécessaires à leurs activités de contrôle des médicaments.

La construction d'un nouveau bâtiment pour le laboratoire central d'Apoteksholaget et pour le Centre se poursuit comme prévu. L'emménagement dans les nouveaux locaux, à 12 km au sud-ouest du centre de Stockholm, est prévu pour la fin mai 1986. Après une nécessaire période d'adaptation de 3 à 4 mois, le Centre pourra de nouveau offrir un cadre de formation aux boursiers de l'OMS intéressés par l'établissement des substances de référence. La nouvelle adresse postale du Centre figure dans l'appendice 3.

#### Remerciements

Comme les années précédentes, le Centre souhaite exprimer ses plus sincères remerciements au Dr C. A. Johnson, Directeur scientifique et Secrétaire de la Commission de la Pharmacopée britannique et membre du tableau consultatif d'experts de la Pharmacopée internationale et des Préparations pharmaceutiques, pour l'intérêt indéfectible qu'il a manifesté pour notre travail et pour l'aide extrêmement précieuse qu'il a apportée au Centre en le conseillant sur diverses questions concernant l'établissement de nouvelles substances de référence. Le Centre voudrait également exprimer sa plus vive gratitude à toutes les firmes pharmaceutiques qui l'ont aidé en lui fournissant des substances de référence et en participant aux travaux d'analyse. Cette année, nos remerciements vont en particulier à Bayer AG, Leverkusen, à Schering AG, Berlin, et à Diamalt AG, Raubling, toutes situées en République fédérale d'Allemagne, à Abbott, Chicago-nord, Etats-Unis d'Amérique, à Recordati, Milan, Italie, et à Sandoz, Bâle, Suisse.

Enfin il nous reste à exprimer nos remerciements les plus chaleureux à Mlle Eivor Andersson qui a pris sa retraite à la fin de 1985 après avoir passé 30 ans au Centre, où elle a accompli un travail remarquable comme analyste principale. Mlle Andersson possède une maîtrise peu commune de toutes les techniques analytiques nécessaires à l'évaluation des substances chimiques de référence. Ses collègues et les nombreux boursiers qu'elle a initiés avec gentillesse et compétence à l'analyse de solubilité par phases et à d'autres méthodes complexes, garderont d'elle un souvenir reconnaissant. Nous tenons également à souhaiter la bienvenue à Mlle Lise-Lotte Larsson qui remplace Mlle Andersson depuis novembre 1985.

DISTRIBUTION DE SUBSTANCES CHIMIQUES DE REFERENCE EN 1985

Acéclidine, salicylate d'	4 échantillons	Fluphénazine, chlorhydrate de	10 échantillons
p-Acétamidobenzalazine	7 échantillons	Fluphénazine, décanoate de (dichlorhydrate)	12 "
Allopurinol	21 "	Fluphénazine, énantate de (dichlorhydrate)	9 "
Amino-3 pyrazole carboxamide-4, hémisulfate d'	15 "	Folique, acide	81 "
Amitryptiline, chlorhydrate d'	26 "	Furoséide	18 "
Ampicilline	69 "	Griséofulvine	21 "
Ampicilline sodique	30 "	Halopéridol	23 "
Ampicilline, trihydrate d'	44 "	Hydrochlorothiazide	16 "
Anhydrotétracycline, chlorhydrate d'	39 "	Hydrocortisone	25 "
Atropine, sulfate d'	20 "	Hydrocortisone, acétate d'	42 "
Azathioprine	7 "	(-)-(Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-3 méthyl-2 alanine	7 "
Benzadol, chlorhydrate de	3 "	Ibuprofène	16 "
Benzobarbital	15 "	Imipramine, chlorhydrate d'	12 "
Benzylamine, sulfate de	5 "	Indométacine	23 "
Benzylpénicilline potassique	18 "	o-Iodohippurique, acide	3 "
Benzylpénicilline sodique	52 "	Lanatoside C	27 "
Béphénium, hydroxynaphtoate de	11 "	Lévodopa	9 "
Bétaméthasone	22 "	Lidocaïne	26 "
Bétanidine, sulfate de	4 "	Lidocaïne, chlorhydrate de	19 "
NN'-bis(xylyl 2,3) anthranilamide	4 "	Méfénamique, acide	4 "
Bupivacaïne, chlorhydrate de	11 "	Métazide	3 "
Caféine	21 "	Méthaquealone	5 "
Carbénicilline monosodique	24 "	Méthylidopa	17 "
Chloramphénicol	12 "	Méthyltestostérone	13 "
Chloramphénicol, palmitate de	19 "	Méticilline sodique	13 "
Chloramphénicol, palmitate de (forme A)	17 "	Métronidazole	19 "
Chloro-5 méthylamino-2 benzophénone	20 "	Nafcilline sodique	6 "
(Chloro-4 sulfamoyl-3 benzoyl)-2 benzoïque, acide	4 "	Nicotinamide	27 "
Chlorphénamine, hydrogénomaléate de	21 "	Nicotinique, acide	16 "
Chlorpromazine, chlorhydrate de	26 "	Ouabaïne	17 "
Chlortalidone	13 "	Oxacilline sodique	33 "
Cloxacilline sodique	15 "	Phénéticilline potassique	9 "
Cortisone, acétate de	26 "	Phénoxyéthylpénicilline	11 "
Dapsone	11 "	Phénoxyéthylpénicilline calcique	7 "
Désoxycortone, acétate de	16 "	Phénoxyéthylpénicilline potassique	20 "
Dexaméthasone	37 "	Phénytoïne	13 "
Dexaméthasone, acétate de	15 "	Prednisolone	31 "
Diazépam	24 "	Prednisolone, acétate de	23 "
Diazoxide	8 "	Prednisone	30 "
Dicloxacilline sodique	20 "	Prednisone, acétate de	12 "
Dicolinium, iodure de	5 "	Procaïne, chlorhydrate de	14 "
Dicoumarol	10 "	Progesterone	18 "
Diéthylcarbamazine, dihydro- génocitrate de	12 "	Propicilline potassique	3 "
Digitoxine	30 "	Pyridostigmine, bromure de	10 "
Digoxine	59 "	Riboflavine	25 "
Epi-4 anhydrotétracycline, chlorhydrate d'	46 "	Rose Bengale sodique	1 "
Epi-4 tétracycline, sel d'ammonium de l'	35 "	Sulfaméthoxazole	30 "
Ergométrine, hydrogénomaléate d'	17 "	Sulfaméthoxyypyridazine	18 "
Ergotamine, tartrate d'	48 "	Sulfanilamide	17 "
Estradiol, benzoate d'	18 "	Testostérone, propionate de	18 "
Estrone	12 "	Tétracycline, chlorhydrate de	33 "
Etacrynique, acide	13 "	Thioacétazone	7 "
Ethambutol, chlorhydrate d'	19 "	Thiodianiline-4,4'	5 "
Ethinylestradiol	17 "	Tolbutamide	21 "
Ethistérone	15 "	Tolnaftate	13 "
Ethosuximide	11 "	Triméthoprime	30 "
Etocarlid	3 "	Triméthylguanidine, sulfate de	5 "
		Tubocurarine, chlorure de	12 "
		Vitamine A, acétate de (soluté)	42 "
		Warfarine	14 "

2 232 échantillons

Substances de référence pour le point de fusion : 22 séries de 13 substances.

## LISTE DES SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE ETABLIES EN 1985

Substance de référence	N° de contrôle	Rapport d'analyse	Remarques
Digoxine	377011	WHO/PHARM/85.517 Appendice 6	Remplace le N° 478011
Flucytosine	184121	WHO/PHARM/85.517 Appendice 7	---
Fluoro-uracile	184122	WHO/PHARM/85.517 Appendice 8	---
Procarbazine, chlorhydrate de	184120	WHO/PHARM/85.517 Appendice 9	---

## LISTE DES SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE DISPONIBLES

1986

## Informations générales

Les substances chimiques internationales de référence sont établies conformément à l'avis du Comité d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques. Elles sont fournies principalement pour être utilisées dans des épreuves physiques et chimiques ainsi que dans des dosages décrits dans les spécifications pour le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques publiées dans la Pharmacopée internationale ou proposées sous forme de projets de monographies.

Les substances chimiques internationales de référence peuvent être utilisées également dans des épreuves et des dosages qui ne sont pas décrits dans la Pharmacopée internationale. Cependant, dans ce cas, il incombe à l'utilisateur ou à la Commission de la Pharmacopée, ou à toute autre autorité qui a prescrit l'utilisation de ces substances, de vérifier qu'elles conviennent à l'usage qui en est fait.

Le mode d'emploi et les données analytiques pour l'usage auquel elles sont destinées dans la spécification correspondante de la Pharmacopée internationale sont fournis dans les certificats joints aux substances distribuées. Des comptes rendus analytiques plus détaillés sur ces substances peuvent être obtenus sur demande auprès du Centre collaborateur de l'OMS pour les substances chimiques de référence.

Il est en général recommandé de conserver les substances à l'abri de la lumière et de l'humidité et de préférence à une température voisine de +5°C. Lorsque des conditions spéciales de stockage sont nécessaires, l'indication en est portée sur l'étiquette ou figure dans la notice jointe aux substances.

La stabilité des substances chimiques internationales de référence conservées au Centre est surveillée par des examens réguliers et, lorsque cela est nécessaire, les substances détériorées sont remplacées par de nouveaux lots. Des listes indiquant les numéros de contrôle des lots en cours sont publiées dans les rapports annuels du Centre et peuvent être obtenues sur demande.

## Commandes de substances

Les commandes de substances chimiques internationales de référence doivent être envoyées à :

Centre collaborateur OMS pour les substances chimiques de référence  
APOTEKSBOLAGET AB, Centrallaboratoriet  
S-105 14 STOCKHOLM  
SUEDE

(Télex : 115 53 APOBOL S)

Les substances chimiques internationales de référence sont exclusivement fournies par paquets standards contenant la quantité indiquée sur la liste ci-après.

Substances de référence	Conditionnement	Numéro de contrôle du lot actuel
Acéclidine, salicylate d'	100 mg	172048
p-Acétamidobenzalazine	100 mg	171042
Allopurinol	100 mg	172049
Amino-3 pyrazole carboxamide-4, hémisulfate d'	100 mg	172050
Amitryptiline, chlorhydrate d'	100 mg	181101
Ampicilline	200 mg	274001
Ampicilline sodique	200 mg	274002
Ampicilline, trihydrate d'	200 mg	274003
Anhydrotétracycline, chlorhydrate d'	25 mg	180096
Atropine, sulfate d'	100 mg	183111
Azathioprine	100 mg	172060
Benzazol, chlorhydrate de	100 mg	173066
Benzobarbital	100 mg	172051
Benzylamine, sulfate de	100 mg	172052
Benzylpénicilline potassique	200 mg	180099
Benzylpénicilline sodique	200 mg	280047
Béphénium, hydroxynaphtoate de	100 mg	183112
Bétaméthasone	100 mg	183113
Bétanidine, sulfate de	100 mg	172053
NN'-bis (xylyl-2,3) anthranilamide	50 mg	173067
Bupivacaïne, chlorhydrate de	100 mg	172054
Caféine	100 mg	181102
Carbénicilline monosodique	200 mg	383043
Chloramphénicol	200 mg	379004
Chloramphénicol, palmitate de	1 g	175072
Chloramphénicol, palmitate de (forme A)	200 mg	175073
Chloro-5 méthylamino-2 benzophénone	100 mg	172061
(Chloro-4 sulfamoyl-3 benzoyl)-2 benzoïque, acide	50 mg	181106
Chlorphénamine, hydrogénomaléate de	100 mg	182109
Chlorpromazine, chlorhydrate de	100 mg	178080
Chlortalidone	100 mg	183114
Cloxacilline sodique	200 mg	274005
Cortisone, acétate de	100 mg	167006
Dapsone	100 mg	183115
Désoxycortone, acétate de	100 mg	167007
Dexaméthasone	100 mg	279008
Dexaméthasone, acétate de	100 mg	168009
Diazépam	100 mg	172062
Diazoxide	100 mg	181103
Dicloxacilline sodique	200 mg	174071
Dicolinium, iodure de	100 mg	172055
Dicoumarol	100 mg	178077
Diéthylcarbamazine, dihydrogénocitrate de	100 mg	181100
Digitoxine	100 mg	277010
Digoxine	100 mg	377011
Epi-4 anhydrotétracycline, chlorhydrate d'	25 mg	180097
Epi-4 tétracycline, sel d'ammonium de l'	25 mg	180098
Ergométrine, hydrogénomaléate d'	50 mg	277012
Ergotamine, tartrate d'	50 mg	385013
Estradiol, benzoate d'	100 mg	167014
Estrone	100 mg	279015
Étacrynique, acide	100 mg	281056
Ethambutol, chlorhydrate d'	100 mg	179081
Ethinylestradiol	100 mg	167016
Ethistérone	100 mg	167017
Ethosuximide	100 mg	179088
Etocarlide	100 mg	172057
Flucytosine	100 mg	184121
Fluoro-uracile	100 mg	184122
Fluphénazine, chlorhydrate de	100 mg	176076
Fluphénazine, décamoate de (dichlorhydrate)	100 mg	182107
Fluphénazine, énantiote de (dichlorhydrate)	100 mg	182108
Folique, acide	100 mg	277019
Furosémide	100 mg	171044
Griséofulvine	200 mg	280040
Halopéridol	100 mg	172063
Hydrochlorothiazide	100 mg	179087
Hydrocortisone	100 mg	283020
Hydrocortisone, acétate d'	100 mg	280021
(-)-(Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-3 méthyl-2 alanine	25 mg	179085
Ibuprofène	100 mg	183117

Substances de référence	Conditionnement	Numéro de contrôle du lot actuel
Imipramine, chlorhydrate d'	100 mg	172064
Indométacine	100 mg	178078
o-Iodohippurique, acide	100 mg	171045
Isoniazide	100 mg	185124
Lanatoside C	100 mg	281022
Lévodopa	100 mg	172065
Lidocaïne	100 mg	181104
Lidocaïne, chlorhydrate de	100 mg	181105
Méfénamique, acide	100 mg	173068
Métazide	100 mg	172058
Méthacqualone	100 mg	173069
Méthylidopa	100 mg	179084
Méthyltestostérone	100 mg	167023
Méticilline sodique	200 mg	274024
Métronidazole	100 mg	183118
Nafcilline sodique	200 mg	272025
Nicotinamide	100 mg	179090
Nicotinique, acide	100 mg	179091
Norethisterone, acétate de	100 mg	185123
Ouabaïne	100 mg	283026
Oxacilline sodique	200 mg	382027
Papavérine, chlorhydrate de	100 mg	185127
Phénéticilline potassique	200 mg	167028
Phénoxyéthylpénicilline	200 mg	179082
Phénoxyéthylpénicilline calcique	200 mg	179083
Phénoxyéthylpénicilline potassique	200 mg	176075
Phénytoïne	100 mg	179089
Prednisolone	100 mg	283029
Prednisolone, acétate de	100 mg	167030
Prednisone	100 mg	167031
Prednisone, acétate de	100 mg	169032
Procaïne, chlorhydrate de	100 mg	183119
Procarbazine, chlorhydrate de	100 mg	184120
Progestérone	100 mg	167033
Propicilline potassique	200 mg	274034
Propylthio-uracile	100 mg	185126
Pyridostigmine, bromure de	100 mg	182110
Riboflavine	250 mg	382035
Substances de référence pour le point de fusion (série de 13 substances dont la température de fusion va de +69°C à +263°C)	13 x 4 g	
Sulfaméthoxazole	100 mg	179092
Sulfaméthoxypyridazine	100 mg	178079
Sulfanilamide	100 mg	179094
Testostérone, propionate de	100 mg	167036
Tétracycline, chlorhydrate de	200 mg	180095
Thioacétazone	100 mg	171046
Thiodianiline-4,4'	50 mg	183116
Tolbutamide	100 mg	179086
Tolnaftate	100 mg	176074
Triméthadione	200 mg	185125
Triméthoprime	100 mg	179093
Triméthylguanidine, sulfate de	100 mg	172059
Tubocurarine, chlorure de	100 mg	170037
Vitamine A, acétate de (soluté)	5 caps.*	581038
Warfarine	100 mg	168041

\* Par capsule, environ 9 mg dans 250 mg d'huile.

## ESSAIS DE STABILITE

La stabilité des substances chimiques internationales de référence pendant leur stockage est surveillée par un réexamen périodique des substances détenues par le Centre. Les résultats obtenus pour les substances réexaminées en 1985 sont résumés ci-dessous. A titre comparatif on a aussi indiqué les résultats obtenus lors des réexamens précédents. Les substances ont été conservées à +5°C. Dans les tableaux, on a adopté les abréviations suivantes :

DTA	Analyse thermique différentielle
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
TLC	Chromatographie en couche mince
PSA	Analyse de solubilité par phases
KF	Méthode de Karl Fischer pour la détermination pour la teneur en eau
IR	Spectrophotométrie infrarouge

La valeur estimée des impuretés solides totales, obtenue par HPLC et TLC est exprimée en aire pour cent sauf indication contraire; lorsqu'elle est obtenue par DTA, elle est exprimée en mole pour cent, et par PSA en poids pour cent. Les valeurs obtenues par titrage sont calculées par rapport à la substance desséchée ou anhydre.

Pour plus de détails sur les méthodes d'analyse utilisées, on peut s'adresser au Centre.

Allopurinol, N° de contrôle 172049

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/72.471, appendice 9

Année d'examen :	1972	1974	1979	1985
Absorption UV à 250 nm	0,57	0,57	0,57	-
TLC	Pas de tache secondaire	Pas de tache secondaire	Pas de tache secondaire	Pas de tache secondaire
Perte à la dessiccation, %	0,1	0,0	0,04	-
Titrage	99,6	99,95	99,98	-

Ami-no-3 pyrazole carboxamide-4 (hémisulfate), N° de contrôle 172050

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/72.471, appendice 10

Année d'examen :	1972	1975	1981	1985
IR	Conforme	-	-	Conforme
Température de fusion	225°C	-	-	-
TLC	Pas de tache secondaire	-	-	2 légères taches secondaires (250 µg)
Eau (KF), %	13,7	11,2	10,8	10,4* } 5,2**
Titrage (potentiométrique)	99,8	99,6	99,5	} 100,3

\* Anciens flacons.

\*\* Produit en vrac, préparé en 1985.

Amitriptyline (chlorhydrate), N° de contrôle 181101

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/82.509, appendice 6

Année d'examen :	1982	1985
IR	Conforme	Conforme
TLC, %	< 0,1	< 0,1
HPLC, %	< 0,1	< 0,1
Perte à la dessiccation, %	0,1	0,1
DTA, %	0,3	0,4
Eau (KF), %	-	0,1
Titrage (potentiométrique)	100,3	100,3
PSA, %	0,3	-

Anhydrotétracycline (chlorhydrate), N° de contrôle 180096

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 5

Année d'examen :	1980	1985
Perte à la dessiccation, %	1,2	-
Eau (KF), %	-	2,4
HPLC, poids % d'épi-4 anhydrotétracycline	1,4	1,5

Chloro-5 méthylamino-2 benzophénone, N° de contrôle 172061

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/73.475, appendice 4

Année d'examen :	1972	1985
Intervalle de fusion	94,9-95,2	94,7-95,3
Absorption UV à 236 nm	0,54	-
TLC	Pas de tache secondaire	Pas de tache secondaire
DTA, %	0,4	0,5

Diazépam, N° de contrôle 172062

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/73.475, appendice 5

Année d'examen :	1973	1977	1982	1985
Intervalle de fusion	132-133	131-132,5	-	-
Absorption UV à 241 nm	0,82	0,80	0,80	-
TLC	Une tache secondaire	Une tache secondaire	Une tache secondaire	Une tache secondaire
DTA, %	0,05	-	0,04	0,02
Perte à la dessiccation, %	0,0	0,0	-	-
Titrage	100,0	99,8	100,0	-

Digoxine, N° de contrôle 377011

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/78.494, appendice 8

Année d'examen :	1977	1985
TLC	5 légères taches secondaires	5 légères taches secondaires
HPLC, %	0,4	0,4-0,5
Perte à la dessiccation, %	0,2	-
Eau (KF), %	-	0,1
Titrage (colorimétrique)	99,2	99,6
PSA, %	Environ 1	-

Epi-4 anhydrotétracycline (chlorydrate), N° de contrôle 180097

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 8

Année d'examen :	1980	1985
HPLC, poids % d'anhydro- tétracycline	1,7	Environ 7
Perte à la dessiccation, %	3,1	-
Eau (KF), %	-	3,9

Epi-4 tétracycline (sel d'ammonium), N° de contrôle 180098

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 9

Année d'examen :	1980	1985
HPLC, poids % de tétracycline	0,4	0,3
d'épi-4 anhydrotétracycline	0,1	0,1
d'anhydrotétracycline	Traces	-
Perte à la dessiccation, %	0	-
Eau (KF), %	-	3,9

Ergotamine (tartrate), N° de contrôle 276013

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/77.491, appendice 4

Année d'examen :	1976	1982	1985
Aspect	-	-	Légèrement coloré
Absorption UV à 318 nm	0,59	0,58	
TLC, %	2 taches secondaires	2 taches secondaires	2 taches secondaires et 4 traces (0,4-0,5)
HPLC, % total	-	0,4	0,5
Ergotaminine, en poids %	0,1	-	0,4
Perte à la dessiccation, %	4,4	-	-
Eau (KF), %	-	-	3,0
Titrage (potentiométrique)	99,6	-	100,1

Ethambutol (chlorhydrate), N° de contrôle 179081

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/79.499, appendice 7

Année d'examen :	1979	1985
TLC	Pas de taches secondaires	Pas de taches secondaires
Perte à la dessiccation, %	0,1	0,3
DTA, %	0,3	0,4
Titrage	100,1	-

Folique (acide), N° de contrôle 277019

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/78.494, appendice 6

Année d'examen :	1977	1985
HPLC, %	0,3	0,4
Eau (KF), %	8	8
TLC	3 légères taches secondaires	-

Furosémide, N° de contrôle 171044

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/71.464, appendice 5

Année d'examen :	1971	1976	1985
Point de fusion, °C	209	-	-
Absorption UV à :			
228 nm	110	108	-
271 nm	60	59	-
334 nm	13,5	13	-
TLC	Pas de taches secondaires	1 tache secondaire (traces)	Pas de taches secondaires
Perte à la dessiccation, %	0,1	0,06	0,2
Titrage	99,4	100,1	-
PSA, %	<0,5	-	-

Indométacine, N° de contrôle 178078

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/79.499, appendice 8

Année d'examen :	1978	1985
TLC	6 taches secondaires (traces)	6 taches secondaires (traces)
Perte à la dessiccation, %	0,2	0
DTA, %	0,2	0,3
Titrage (potentiométrique)	99,9	-
PSA, %	0	-

Phénytoïne, N° de contrôle 179089

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/80.504, appendice 13

Année d'examen :	1979	1985
Perte à la dessiccation, %	0	0,2
DTA, %	0,2	0,3
HPLC, poids % de benzophénone	0,02	-
Titrage	100,1	-

Sulfaméthoxazole, N° de contrôle 179092

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/80.504, appendice 14

Année d'examen :	1980	1985
TLC	4 taches secondaires (traces)	2 taches secondaires
DTA, %	0,15	0,16
Perte à la dessiccation, %	0,0	0,0
HPLC, %	0,1	-
Titrage (potentiométrique)	100,1	-

Sulfanilamide, N° de contrôle 179094

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/80.504, appendice 15

Année d'examen :	1980	1985
TLC	Pas de taches secondaires	Pas de taches secondaires
DTA, %	0,05	0,06
Perte à la dessiccation, %	0,0	0,0
Titrage (potentiométrique)	100,0	-

Tétracycline (chlorhydrate), N° de contrôle 180095

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/81.508, appendice 12

Année d'examen :	1980	1985
HPLC, poids %		
d'épi-4 tétracycline	1,3	0,7
d'anhydrotétracycline	0,1	0,1
d'épi-4 anhydrotétracycline	< 0,05	0,05
impureté non identifiée, aire %	~0,05	0,1
Perte à la dessiccation, %	0,25	-
Eau (KF), %	0,4	0,3
TLC	Une tache secondaire	-
Titration (potentiométrique)	99,6	-

Triméthoprime, N° de contrôle 179093

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/80.504, appendice 17

Année d'examen :	1980	1985
DVA, %	0,03	0,0
TLC, %	6 taches secondaires peu intenses < 0,1	6 taches secondaires peu intenses < 0,1
Perte à la dessiccation, %	0,0	-
Eau (KF), %	-	< 0,05

Vitamine A (acétate), N° de contrôle 581038

Premier rapport d'analyse : WHO/PHARM/82.509, appendice 15

Année d'examen :	1981	1985
Titration (spectrophotométrique) Vitamine A (acétate), mg/g	38,8	32,7

SUBSTANCES CHIMIQUES INTERNATIONALES DE REFERENCE

LISTE PREVISIONNELLE POUR 1986

Les substances chimiques internationales de référence ci-après sont nécessaires pour accompagner les spécifications qui figurent dans la troisième édition de la Pharmacopée internationale :

Volume 2

Acétazolamide (*)	Noréthistérone (*)
Chlortétracycline, chlorhydrate de (*)	Propranolol, chlorhydrate de
Colécalciférol	Résérpine (*)

Volume 3

Amino-2 nitro-5 thiazole (*) (impureté du niridazole)	Liothyronine (impureté de la lévothyroxine sodique)
Amodiaquine, chlorhydrate d'	Lopéramide, chlorhydrate de
Amphotéricine B	Méthotrexate
Bacitracine Zinc	Néamine (impureté du sulfate de néomycine)
Béclométasone, dipropionate de	Néostigmine, méthilsulfate de (*)
Bétaméthasone, valérate de	Nifurtimox
Calcium, folinate de	Niridazole
Carbamazépine (*)	Niridazole-chloréthylcarboxamide (*) (impureté du niridazole)
Cimétidine	Noroxymorphone, chlorhydrate de (impureté du chlorhydrate de naloxone)
Clomifène, citrate de, isomère Z (impureté du citrate de clomifène)	Nystatine
Dexaméthasone sodique, phosphate de	Oxytétracycline, dihydrate d'
Dopamine, chlorhydrate de	Oxytétracycline, chlorhydrate d'
Doxorubicine, chlorhydrate de	Paromomycine, sulfate de
Emétine, chlorhydrate d' (*)	Praziquantel
Ergocalciférol	Prednisolone sodique, phosphate de
Fludrocortisone, acétate de	Probenécide
Formyl-3 rifamycine SV (impureté de la rifamycine)	Pyrantel, embonate de
Framycétine (sulfate de néomycine B) (impureté du sulfate de néomycine)	Rifampicine-quinone (impureté de la rifampicine)
Gentamicine, sulfate de	Salazosulfapyridine
Hydrocortisone sodique, succinate d'	Sodium, cromoglicate de
(-)-(Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-3 hydrazino-2 méthyl-2 alanine (impureté du carbidopa)	Spectinomycine, chlorhydrate de
Lévonorgestrel	Testostérone, énantate de
Lévothyroxine sodique	Vincristine, sulfate de

Remplacements

Les substances chimiques internationales ci-dessous devront être remplacées par de nouveaux lots en 1986 :

Allopurinol	Chloramphénicol, palmitate de (*)
Chloramphénicol (*)	Vitamine A, acétate de

(\*) Indique que des travaux sont en cours au Centre sur cette substance.



ERGOTAMINE TARTRATE

Control No 385013

Analytical Report

The stock of the current batch of the International Chemical Reference Substance for ergotamine tartrate, Control No 276013 is depleted and has to be replaced. The monograph for ergotamine tartrate in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol 2 requires a reference substance to be used in the test for identity by thin-layer chromatography.

MATERIAL

A sample of ergotamine tartrate was obtained from Sandoz Ltd, Basle. About 50 g of the sample (lot no 81001) were received at the WHO Centre in June 1985. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: Almost white, crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 385013). The spectrum is concordant with the spectra obtained from the ICRS 276013 and EPCRS (Batch no 2).

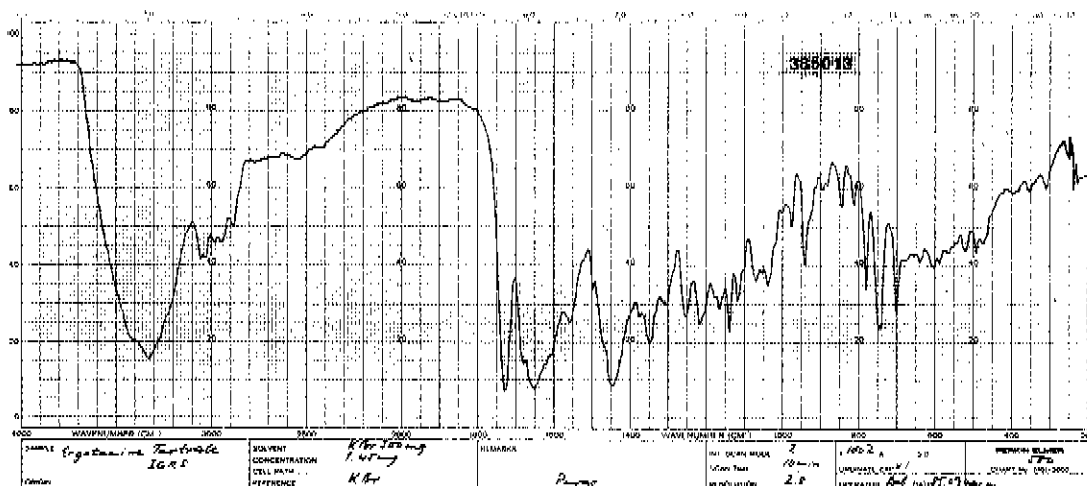


Figure 1. IR-spectrum of ergotamine tartrate No 385013. 1.45 mg in 300 mg KBr, recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580

Ultra-violet absorption: The ultra-violet absorption spectrum in the range 240 nm to 350 nm of a 0.005% solution in a 1% tartaric acid solution, exhibits a maximum at 318 nm and a minimum at 271 nm; the absorbance of a 1-cm layer at the maximum wavelength is 0.59.

Specific optical rotation of ergotamine base

$[\alpha]_D^{20} = -156.3^{\circ}$  (n = 3) in ethanol-free chloroform.

The determination was performed according to Ph. Int. Ed. III, Vol 2, but modified according to the monograph in Ph. Eur. 2nd Ed. The determination of ergotamine base was performed by a non-aqueous titration instead of the gravimetric determination prescribed in Ph. Int.

ASSAY

99.2% (n = 7) determined by titration with acetous perchloric acid and potentiometric determination of the end-point. The calculations were performed with reference to the loss on drying reported below.

Loss on drying

24 mg/g (2.4%) when dried for 6 hours to constant weight in vacuo at 95° C.  
Desiccant: Silica gel.

Water

1.6% determined by Karl Fischer titration.

Methanol

0.87% determined by gas chromatography.

Column: 1.5 meter long packed with Tenax GC, 60/80, 156 maintained at 80° C.  
Oven temperature: 80 - 100 - 200 - 200° C  
time: 0 - 4 - 6 - 15 minutes  
Detector: Flame ionization detector

PURITY

Clarity and colour of solution: According to Ph. Int. Ed. III, Vol 2. Complies.

Thin-layer chromatography

The following TLC systems were used.

I. Thin-layer: Silica gel 60 (Merck)  
Eluent: Chloroform/Methanol 90 + 10  
Sample: 50 µg of ergotamine tartrate was applied.  
Visualization: UV-light at 366 nm.

$R_f$  (ergotamine tartrate) = 0.3

The detection limit for ergotamine tartrate was less than 0.1 µg (0.2%).

Result: Two secondary spots were observed with  $R_f = 0.55$  (ergotamine) and  $R_f = 0.37$  (unknown). They were estimated to 0.3% when compared to low loadings of ergotamine tartrate. The chromatograms were evaluated using a Zeiss KM3 Chromatogram Spectrophotometer operated in the reflectance mode at 318 nm.

II. Thin-layer: Silica gel 60 (Merck)  
Eluent: Chloroform/Methanol 90 + 10  
Sample: 50 µg of ergotamine tartrate applied in each spot. After application the spots were exposed to ammonia vapour for 20 sec and cold air for 20 sec. before developing. It is not advisable to put ammonia in the chromatographic chamber as prescribed in Ph. Int. Ed. III, Vol 2. This resulted in further degradation on the plate (0.74% impurities).

Visualization: Spraying with 2%, 4-dimethylaminobenzaldehyde in ethanol/ hydrochloric acid (50/50) and examination in daylight.

The detection limit for ergotamine tartrate was estimated to less than 0.25  $\mu\text{g}$  (0.5%).

Result: One faint secondary spot corresponding to ergotaminine was observed, it was estimated to less than 0.25  $\mu\text{g}$  (0.5%).

High performance liquid chromatography

The total amount of impurities was estimated by peak area measurements to about 0.18% at 210 nm. A chromatogram is shown in Figure 2.

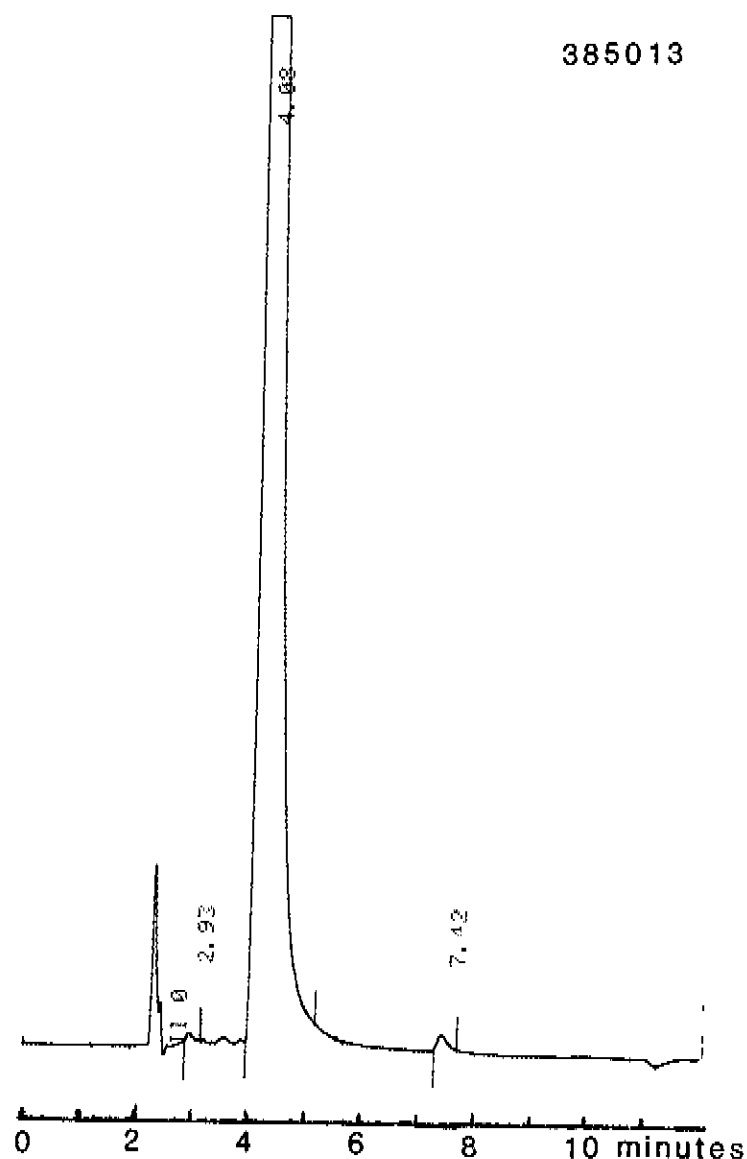


Figure 2. A chromatogram of ergotamine tartrate No 385013.

Two impurities were observed; ergotaminine (7.42 min) estimated to 0.12% when compared to a reference of ergotaminine, and one unknown (2.93 min). 318 nm was also used as detection wavelength but found to be less sensitive than 210 nm.

It is advisable to prepare fresh solutions as epimerization of ergotamine tartrate takes place. After 30 min about 0.3% of ergotaminine was found (solvent: acetonitrile/water 50/50).

The system is also capable of separating ergocryptine and ergocristine. See Figure 3.

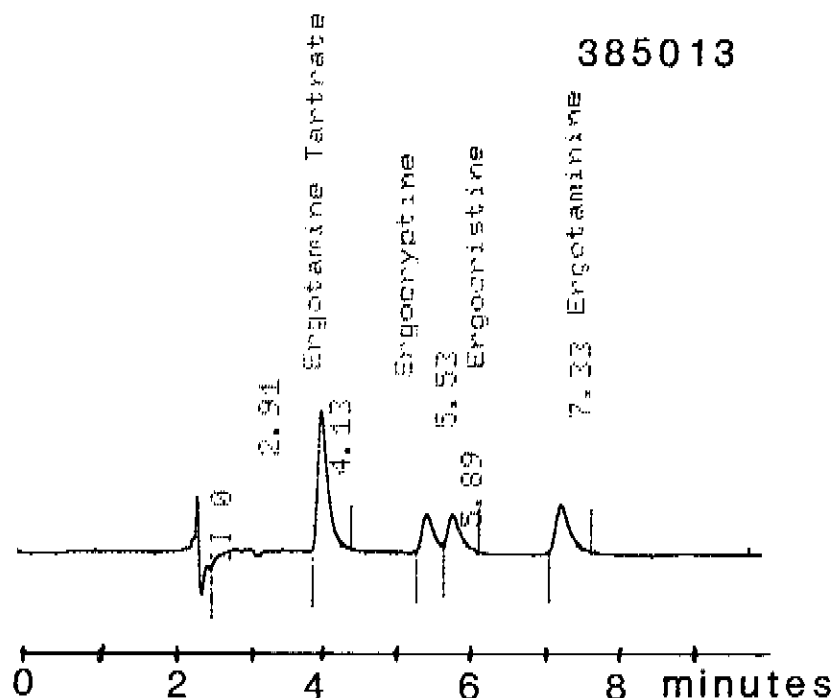


Figure 3. Chromatogram of ergotamine tartrate, ergocryptine, ergocristine and ergotaminine.

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile/Ammoniumcarbonate (0.02 M in water) (50:50)  
Column: Vydac 218 TP54 (250 mm x 4.5)  
Detector: Varian UV 200 operated at 210 nm and 318 nm.  
Pump: Varian 5560 operated at a flowrate of 1 ml/min  
Integrator: Varian 4270 Attenuation: 1  
Sample: 1 mg/ml dissolved in acetonitrile/water (50/50).  
10 µl corresponding to 10 µg was injected.

#### DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Appearance	complies
Odour	complies
Identity	positive
Impurities	complies
Reaction	pH value 4.6
Loss on drying	3.1%
Assay	99.0%

#### CONCLUSION

Ergotamine tartrate Control No 385013 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 7

ISONIAZID

Control No 185124

Analytical Report

The monograph for isoniazid in the International Pharmacopoeia, Ed. III, Vol 2 requires a reference substance to be used in the infrared spectrophotometric identity test.

MATERIAL

A sample of isoniazid was generously offered by Bayer AG, Leverkusen. About 100 g of the sample (lot no 915618) were received at the WHO Centre in December 1984. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: A white, crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 185124). The spectrum is concordant with the spectrum obtained from the USP Ref. stand. Lot F.

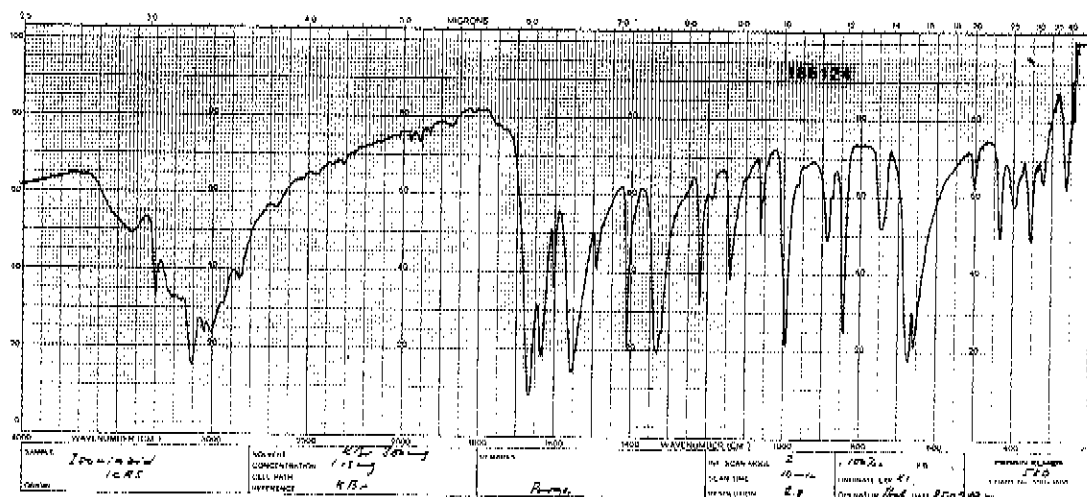


Figure 1. IR-spectrum of 1.1 mg of isoniazid in 300 mg KBr recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580.

Elemental analysis

	C (%)	H (%)	N (%)
Theoretical	52.5	5.1	30.6
Found	52.7	5.2	30.6

The analysis was performed at Mikro Kemi AB, Uppsala.

UV-spectrum

$\lambda_{\text{max}}$  in 0.01 N HCl = 267 nm and 214 nm  
 E (1%, 1cm) = 416 (n= 3) at 267 nm  
 = 434 (n= 3) at 214 nm

For USP Ref. Stand Lot F E(1%, 1 cm) was found to be 415 (267 nm) and 431 (214 nm).

A UV-spectrum in 0.01 N HCl is given in Figure 2.

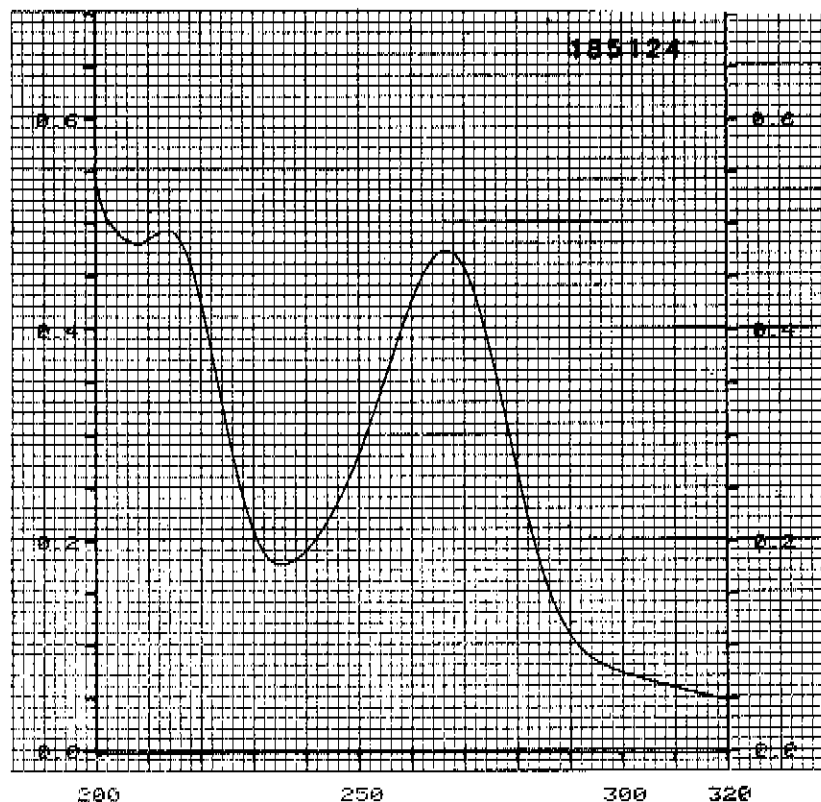


Figure 2. UV-spectrum of isoniazid 11.5 µg/ml in 0.01 N HCl.

ASSAY

Potentiometric titration with 0.1 N perchloric acid. 80 mg was dissolved in 20 ml glacial acetic acid + 10 ml acetic acid anhydride.

Result: 100.0% w/w (n= 4)

Loss on drying

0.0% (105<sup>0</sup> C)

PURITYpH value

pH= 7.3 of a 0.05 g/ml solution

Melting temperature: 172.4<sup>0</sup> C, determined by the capillary method of Ph. Int. III.

Total solid impurities

1) Differential thermal analysis (DTA): The substance shows a tendency to melt under decomposition so it is not possible to estimate the purity by this method. Melting temperature = 170.2° C.

Thin-layer chromatography

Two thin-layer chromatographic systems were used.

System 1 (according to Ph. Int. Ed. III, Vol 2.)

Thin-layer: Silica Gel G (Merck)  
Eluent: Acetone/Water (98 + 2)  
Sample: 1000 µg of isoniazid was applied. As reference 0.1 µg and 0.2 µg of hydrazine hydrate was applied.  
Visualization: Spraying with 4-dimethylamino-benzaldehyde and examination in daylight.  
Result: One extremely weak spot corresponding to hydrazine was estimated to less than 0.005%.

System 2

Thin-layer: Silica Gel 60, F-254 (Merck)  
Eluent: Ethylacetate / Acetone / Methanol / Water (50 + 20 + 20)  
Sample: 1000 µg of isoniazid was applied. As reference 0.1 µg of hydrazine hydrate and 0.2 µg of isonicotinic acid were applied.  
Visualization: UV-light of 254 nm

<u>Substance</u>	<u>R<sub>f</sub></u>
Isoniazid	0.4
Hydrazine hydrate	0.6
Isonicotinic acid	0.3

Result: Less than 0.01% impurities was observed in UV-light of 254 nm. They were not identical to any of the references applied.

High performance liquid chromatography

No impurities were found. A chromatogram is shown in Figure 3.

The system was evaluated at 210, 254 and 267 nm but no impurities were found at any of these wavelengths. The same result was obtained with USP Lot F. Isonicotinic acid elutes after 6.9 minutes.

The following conditions were used:

Eluent: Acetonitrile / Acetate buffer pH 3.5 (93 + 7)  
Column: LiChrosorb D10L (250 mm x 4) (Merck)  
Detector: Varian UV 200 operated at 210, 254 and 267 nm.  
Pump: Varian 5560 operated at a flow rate of 1.0 ml/min.  
Integrator: Varian 4270 Attenuation: 0.5  
Sample: 1 mg/ml dissolved in the eluent. 10 µl corresponding to 10 µg was injected.

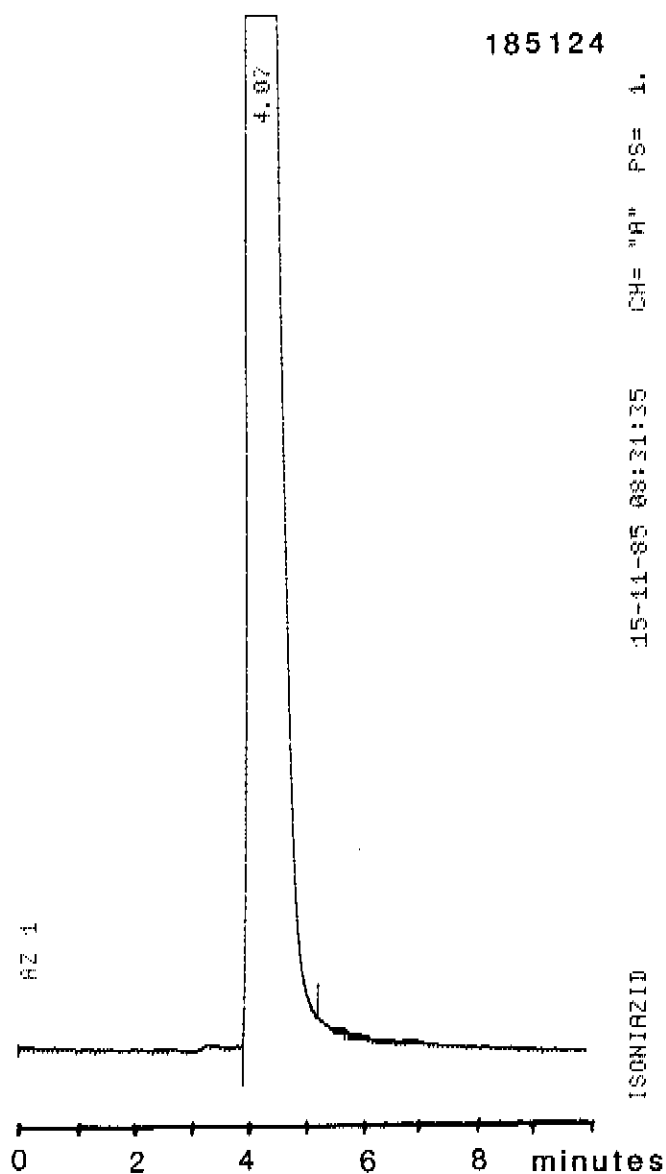


Figure 3. A chromatogram of isoniazid No 185124

#### STABILITY

Isoniazid was exposed to air of different relative humidity at room temperature (about 20° C) for a period of eleven weeks as described in WHO/PHARM/ 82.509. All samples were unchanged at visual inspection and no weight changes were noted. No signs of degradation were observed when the samples were analyzed by the thin-layer chromatographic system according to Ph. Int.

#### DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Melting point	172° C	Sulfate ash	<0.1%
pH in solution	7.4	Loss on drying	0.12%
Sulfate	<0.01%	Hydrazine	complies
Chloride	<0.002%	Assay	99.8%
Heavy metals	<0.001%		

#### CONCLUSION

Isoniazid No 185124 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

APPENDIX 8

N O R E T H I S T E R O N E   A C E T A T E

Control No 185123

Analytical Report

The monograph for norethisterone acetate in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol 2 requires a reference substance to be used in an infrared spectrophotometric test for identity, in a thin-layer chromatographic test for related substances and in a spectrophotometric assay.

MATERIAL

A sample of norethisterone acetate was generously offered by Schering AG, Berlin. About 100 g of the sample (lot no 24035009) were received at the WHO Centre in November 1984. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: A white, crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 185123). The spectrum is concordant with the spectrum obtained from the USP Ref. stand. Lot F1.

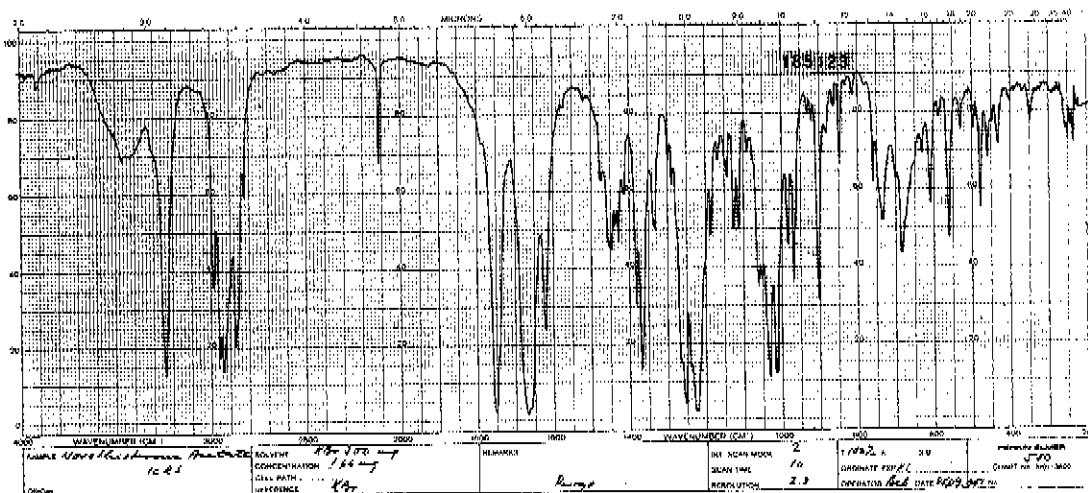


Figure 1. IR-spectrum of 1.7 mg of norethisterone acetate in 300 mg KBr recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580.

Elemental analysis

	C (%)	H (%)	N (%)
Theoretical	77.6	8.2	-
Found	77.6	8.0	-

The analysis was performed at Mikro Kemi AB, Uppsala.

Nuclear magnetic resonance spectra (NMR)

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum was recorded.

Result: Conforms

The amount of impurities were roughly estimated to less than 1 per cent.

UV-spectrum

A UV-spectrum in ethanol is given in Figure 2.

$\lambda_{\text{max}}$  in ethanol = 240.7 nm  
E (1%, 1cm) = 516 (n= 4)

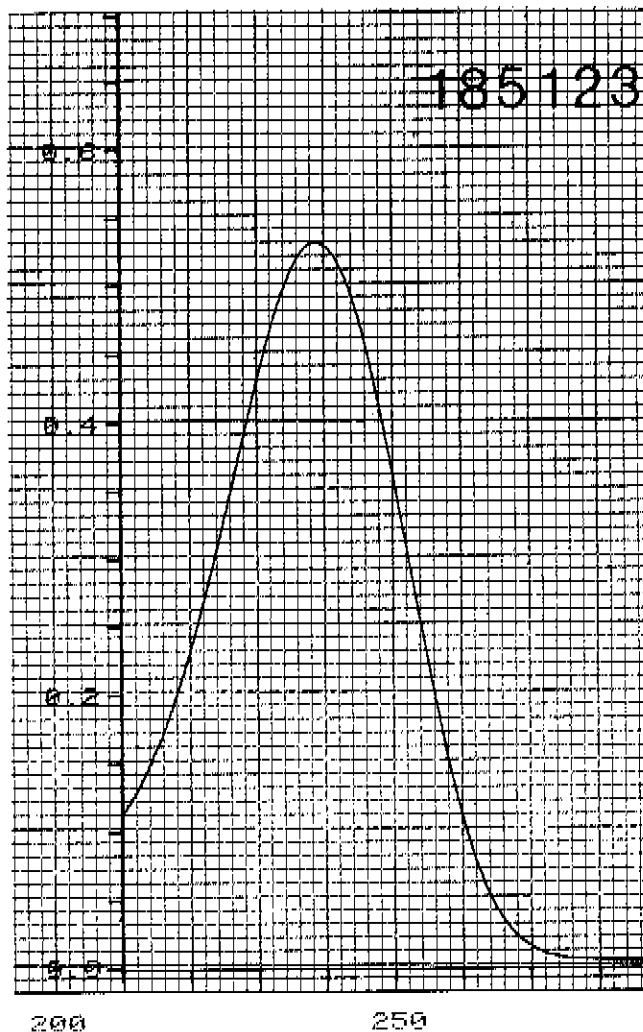


Figure 2.  
UV-spectrum of norethisterone  
acetate 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in ethanol

Test for acetate

According to Ph. Int. Ed. III, Vol 2, identity test C.

Result: Conforms

ASSAY

The spectrophotometric assay described in the Ph. Int. Ed. III, Vol 2 was used. USP Reference Standard Lot F-1 was used as standard and regarded as 100 per cent.

Result: 100% (n= 4)

Loss on drying

0.05% (105 $^{\circ}$  C)

PURITY

Total solid impurities

1) Differential thermal analysis (DTA): The substance shows a tendency to melt under decomposition and the purity value decreases with decreasing heating rate.  
Melting temperature: 163.4<sup>o</sup> C (Mettler TA 2000)

Thin-layer chromatography

The following TLC systems were used.

Thin-layer: Silica gel 60, F-254 (Merck) and HPTLC, silica gel 60, F-254 (Merck)  
Eluent: Toluene: Ethylacetate (1 + 1)  
Sample: 100-200 µg of norethisterone acetate was applied.  
Visualization: UV-light of 254 nm and spraying with sulfuric acid/ethanol followed by heating to 105<sup>o</sup> C and examination in daylight. R<sub>f</sub> (norethisterone acetate) = 0.47  
The detection limit for norethisterone acetate was less than 0.1 µg (0.1%)

Result: The total amount of impurities was estimated to about 0.4%. Two impurities were observed with R<sub>f</sub> = 0.38 (UV 254) and a weak spot at R<sub>f</sub> = 0.60 which appears after spraying with sulfuric acid. The chromatogram was evaluated using a Zeiss KM3 Chromatogram Spectrophotometer operated in the reflectance mode at 240 nm. The dominating peak at R<sub>f</sub> = 0.38 was estimated to 0.2% (n = 3).

None of the two spots were identical to ethisterone or norethisterone. USP Reference Standard Lot F-1 had a different purity profile with 6 weak spots all with R<sub>f</sub> < 0.47.

The TLC system described above was also applied to a HPTLC plate and the plate was scanned at 240 nm (CAMAG TLC scanner). Two impurities were observed with R<sub>f</sub> = 0.56 and 0.82 respectively. Their total amount was estimated to about 0.4%. The spots were more distinct on the HPTLC plate where both could be detected in UV-light.

High performance liquid chromatography

The total amount of impurities was estimated by peak area measurement to about 0.3%. A chromatogram is shown in Figure 3. Norethisterone elutes after 4.2 minutes and was not detected in the chromatogram.

The following conditions were used.

Eluent: Acetonitrile/Water (70:30)  
Column: Spheri S5 ODS 1 (250 mm x 4.5) (Phase Sep)  
Detector: Varian UV 200 operated at 240 nm  
Pump: Varian 5560 operated at a flow rate of 1.0 ml/min  
Integrator: Varian 4270 Attenuation: 16  
Sample: 1 mg/ml dissolved in the eluent.  
10 µl corresponding to 10 µg was injected.

The chromatogram was also evaluated with a diode array detector (HP 1040 A). The UV maximum was found at 241 nm for the main impurity (5.8 min) as well as for the main peak (6.4 min).

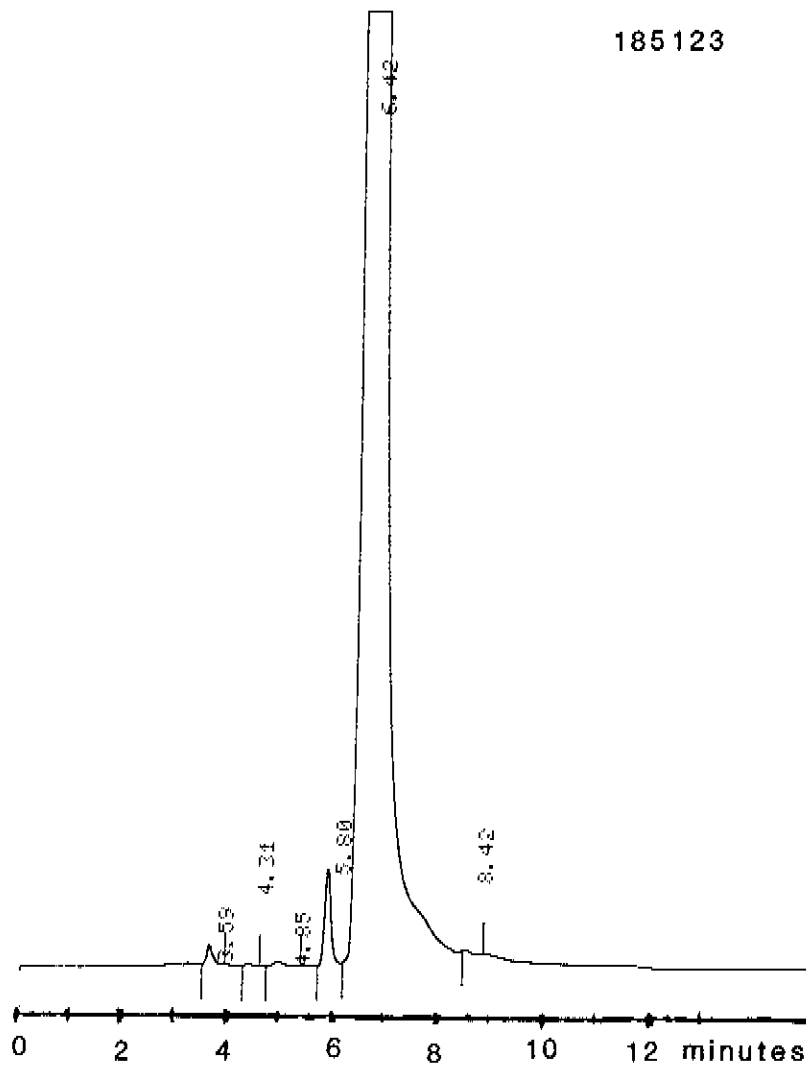


Figure 3. Chromatogram of norethisterone acetate No 185123.

#### STABILITY

Norethisterone acetate was exposed to air of different relative humidity at room temperature (about 20<sup>o</sup> C) for a period of 5 weeks as described in WHO/PHARM/82.509. All samples were unchanged at visual inspection and no weight changes were noted. No signs of degradation were observed when the samples were analyzed by the liquid chromatographic method described above.

DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Description: White to creamy white, odorless, crystalline powder.  
Identity: IR-, UV-spectrum and ethyl acetate; conforms  
Melting temp: 162,5<sup>o</sup> - 163,5<sup>o</sup> C  
Spec. rotation: -34,3<sup>o</sup>  
Spec. extinction: 513  
Content: 99.8%  
Solution: Clear  
Loss on drying: 0.0%  
Sulfated ash: 0.02%  
TLC test  
    byspots 3  
    single spot max 1%, conforms  
Estrogens: threshold value 0.3 - 1.0 mg

Calculated on the dried basis.

CONCLUSION

Norethisterone acetate No 185123 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose. On the basis of the results obtained the content of norethisterone acetate when used in the spectrophotometric assay is taken to be 100 per cent calculated with reference to the anhydrous substance.

PAPAVERINE HYDROCHLORIDE

Control No 185127

Analytical Report

The monograph for papaverine hydrochloride in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol. 2 requires a reference substance to be used in the infrared spectrophotometric identity test.

MATERIAL

A sample of papaverine hydrochloride was generously offered by Recordati, Milano. About 100 g of the sample (lot no 8414/1011) were received at the WHO Centre in December 1984. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: A white, crystalline powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 185127). The spectrum is concordant with the spectrum obtained from the USP Ref. stand. Lot F1.

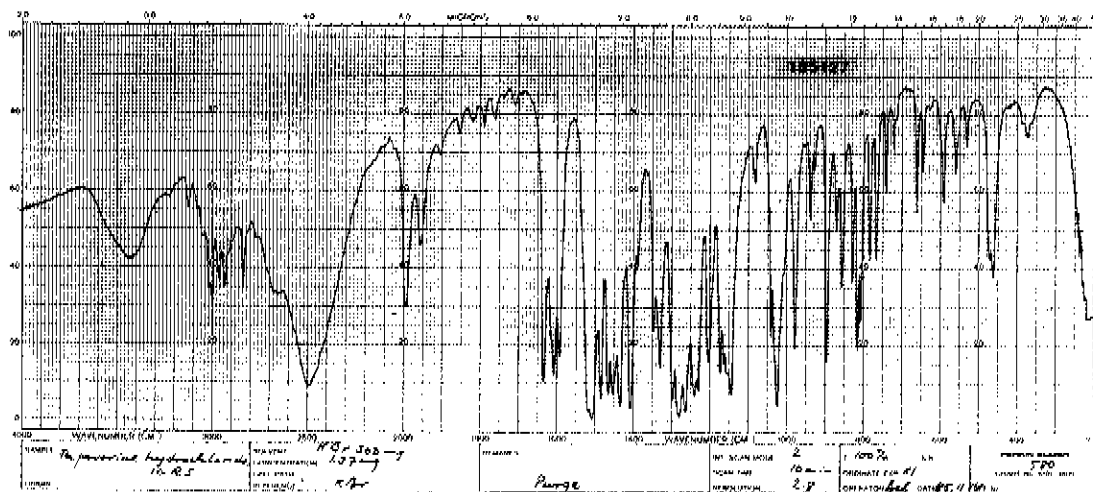


Figure 1. IR-spectrum of 1.4 mg of papaverine hydrochloride in 300 mg of KBr recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580.

Elemental analysis

	C (%)	H (%)	N (%)
Theoretical	63.9	5.90	3.73
Found	64.0	6.0	3.8

The analysis was performed at Mikro Kemi AB, Uppsala.

Identity for chloride: According to Ph. Int. Ed. III, Vol 2. Conforms.

UV-spectrum

A UV-spectrum in 0.01 N HCl is given in Figure 2.

$\lambda_{\text{max}}$  in 0.01N HCl = 250.4 nm  
E (1%, 1cm) = 1660 (n= 3)

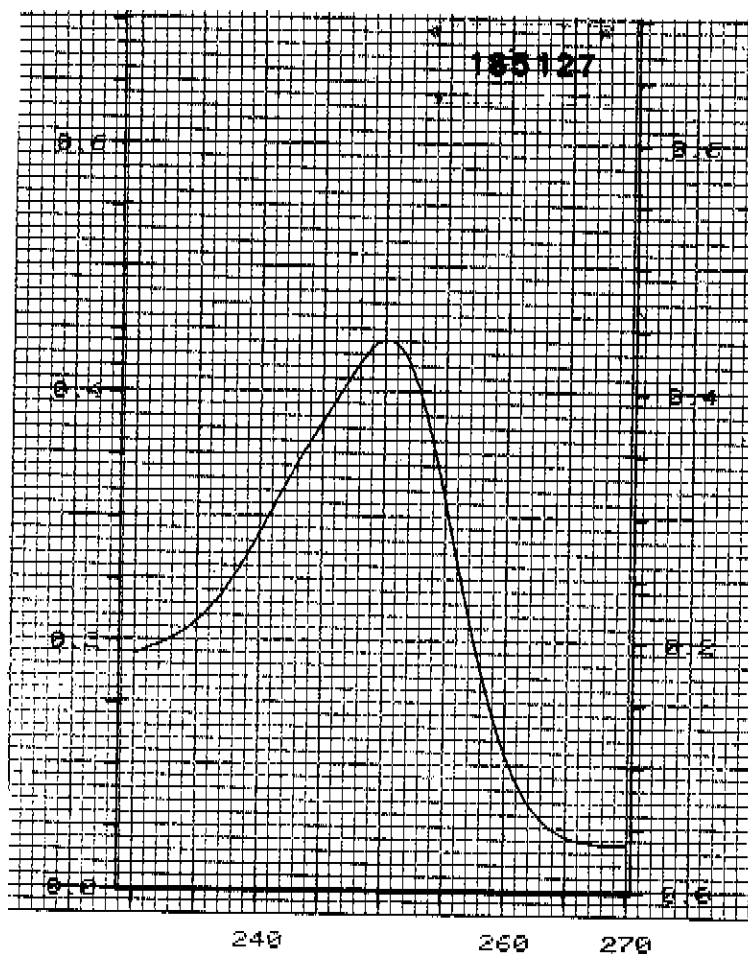


Figure 2. UV-spectrum of papaverine hydrochloride 2.7  $\mu\text{g/ml}$  in 0.01 N HCl.

ASSAY

100.0% (n= 5). Determined by potentiometric titration with 0.1N perchloric acid according to Ph. Int. Ed. III, Vol 2.

Loss on drying

0% (105<sup>0</sup> C)

PURITY

Total solid impurities

1) Differential thermal analysis (DTA): It was not possible to estimate the purity by this method as the substance melts under decomposition.

pH value: 3.25 in a 2% aqueous solution.

Clarity and colour of solution: According to Ph. Int. Ed. III, Vol 2. Conforms.

Thin-layer chromatography

The system described under related substances in Ph. Int. was used.

Thin-layer: Silica gel 60, F-254 (Merck)  
Eluent: Toluene: ethyl acetate: diethylamine (70 + 20 + 10)  
Sample: 500 µg of papaverine hydrochloride was applied  
Visualization: UV-light of 254 nm.  
 $R_f$  (papaverine hydrochloride) = 0.4,  $R_f$  (codeine) = 0.2

Result: The total amount of impurities was estimated to less than 0.02% (det. limit). One very weak spot with  $R_f$  = 0.5 was observed. The chromatogram was evaluated using a Zeiss KM3 Chromatogram Spectrophotometer operated in the reflectance mode at 250 nm.

High performance liquid chromatography

No impurities were found. A chromatogram is shown in Figure 3.

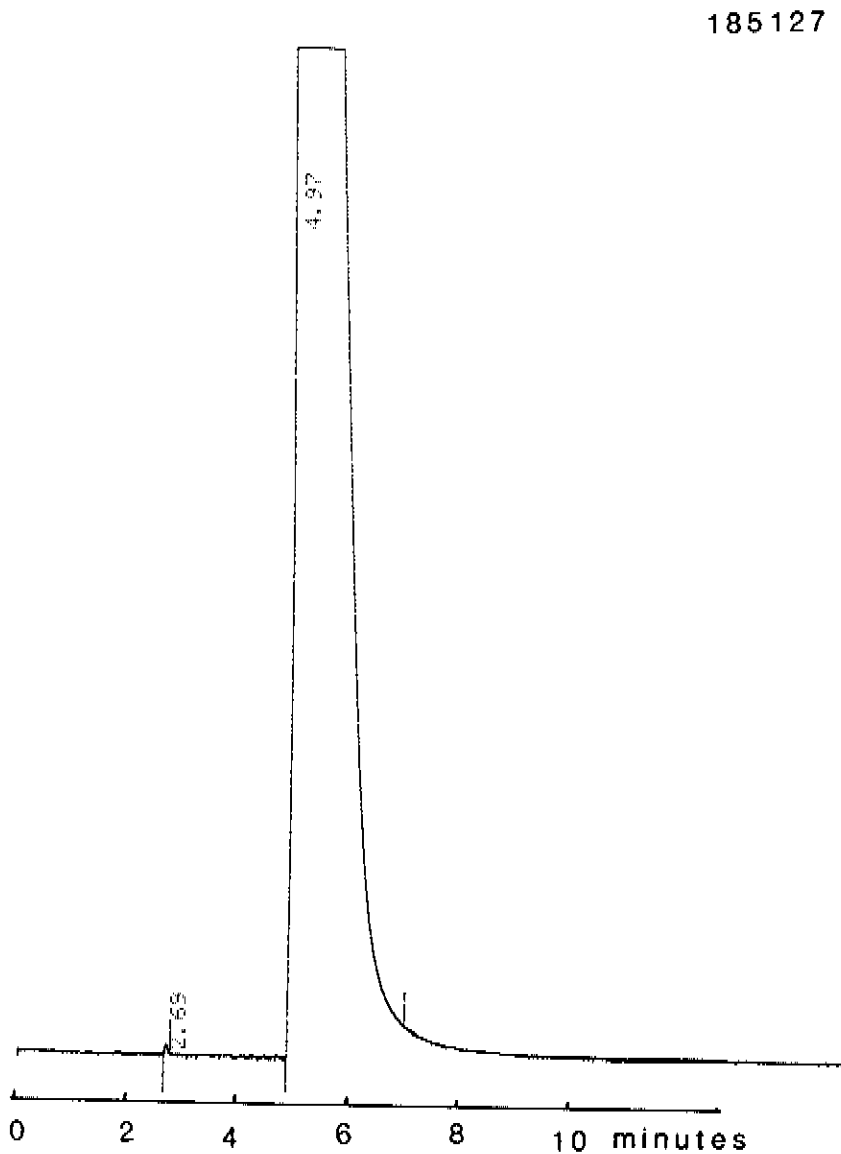


Figure 3. A chromatogram of papaverine hydrochloride No 185127.

The following conditions were used:

Eluent: Phosphate buffer pH 4.5/Acetonitrile (30/70)  
Column: RP-18, Spheri-5 (Brownlee)  
Detector: Varian UV 200 operated at 238 nm  
Pump: Varian 5560 operated at a flow rate of 1 ml/min  
Integrator: Varian 4270 Attenuation:1  
Sample: 1 mg/ml dissolved in acetonitrile/water (50/50). 10 µl corresponding to 10 µg was injected

The same result was obtained for USP standard Lot F-1.

#### STABILITY

Papaverine hydrochloride was exposed to air of different relative humidity at room temperature (about 20° C) for a period of 5 weeks as described in WHO/ PHARM/82.509. All samples were unchanged at visual inspection and no weight changes were noted. No signs of degradation were observed when selected samples were analyzed by the liquid chromatographic method described above.

#### DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Description: White, crystalline powder, odourless  
Identification: IR spectrum, UV-spectrum, test for chlorides  
Assay: 100.11%  
pH: 3.24  
Loss on drying: 0.053%  
Residue on  
Ignition: 0.02%

Cryptopine, thebaine or other organic impurities: Passes test  
Completeness of solution: Passes test

#### CONCLUSION

Papaverine hydrochloride No 185127 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

PROPYLTHIOURACIL

Control No 185126

Analytical Report

The monograph for propylthiouracil in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol 2 requires a reference substance to be used in the infrared spectrophotometric identity test.

MATERIAL

A sample of propylthiouracil was generously offered by Diamalt AG, Raubling. About 100 g of the sample (lot no 1194) were received at the WHO Centre in October 1984. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: Colourless crystalline, powder.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 185126). The spectrum is concordant with the spectrum obtained from the USP Ref. stand. Lot 1074-F.

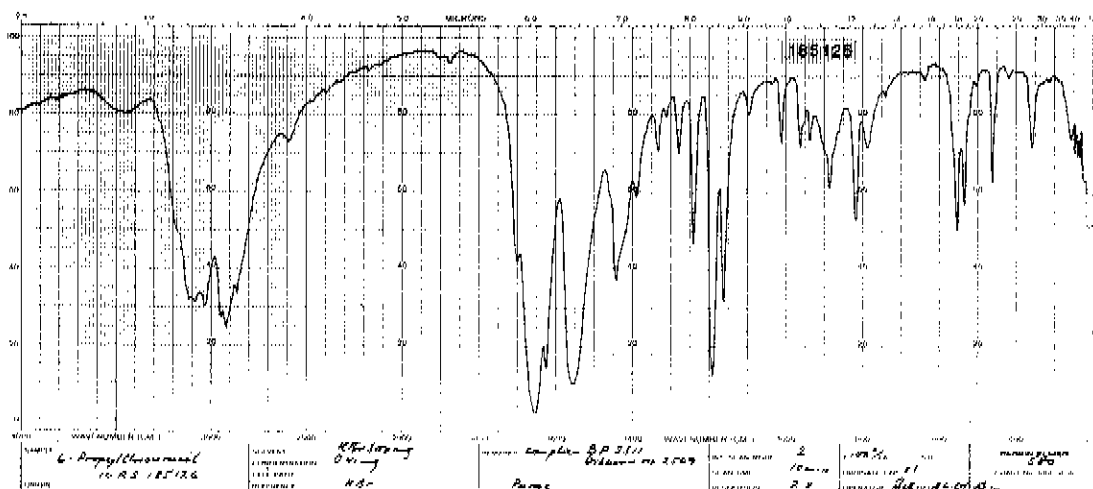


Figure 1. IR-spectrum of 0.41 mg propylthiouracil in 300 mg KBr recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580.

Elemental analysis

	C (%)	H (%)	N (%)
Theoretical	49.4	5.9	16.5
Found	49.3	6.0	16.3

The analysis was performed at Mikro Kemi AB, Uppsala.

Identity test B According to Ph. Int. Ed. III, Vol 2. Conforms. The method was modified by dissolving the substance in ethanol instead of boiling water.

Melting temperature: 219.5<sup>0</sup> C, determined by the capillary method of Ph. Int. Ed. III.

UV-spectrum

A UV-spectrum in methanol is given in Figure 2.

$\lambda_{\text{max}}$  in methanol = 274.7 nm and 213.8 nm  
E (1%, 1cm) 274.7 nm = 950 (n= 8) Relative standard deviation= 0.3%

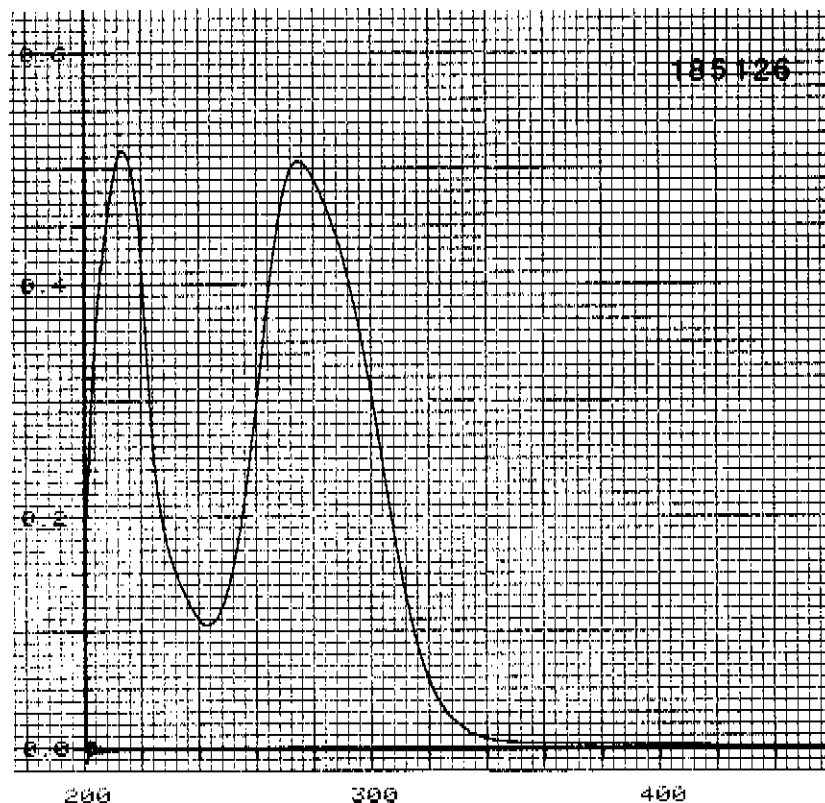


Figure 2. UV-spectrum of propylthiouracil 5.3 µg/ml in methanol

ASSAY

100.0 (n= 5) determined by titration with 0.1 N NaOH according to Ph. Int. Ed. III, Vol 2. 99.9% (n= 5) Determined by titration as above but with potentiometric determination of end-point (according to USP XXI).

Loss on drying

0% (105<sup>0</sup> C)

PURITY

Total solid impurities

1) Differential thermal analysis (DTA): About 0.2 mole per cent (n= 7). The determination was carried out on 2 mg using a heating rate of 2<sup>0</sup> C per minute.

Melting temperature: 218.3° C

Instrument: Mettler TA 2000 system, operated on-line with a Hewlett-Packard calculator 9815 A.

Calculation: By the Mettler standard computer program for purity analysis.

Thin-layer chromatography

The following thin-layer chromatographic system was used.

Thin-layer: Silica gel 60 F-254 (Merck)

Eluent: Chloroform/Methanol (1 + 1)

Sample: 200 µg of propylthiouracil was applied

Visualization: UV-light of 254 nm and spraying with sodium nitroprusside reagent.

R<sub>f</sub> (propylthiouracil) = 0.75

The detection limit for propylthiouracil was less than 0.2 µg (0.1%).

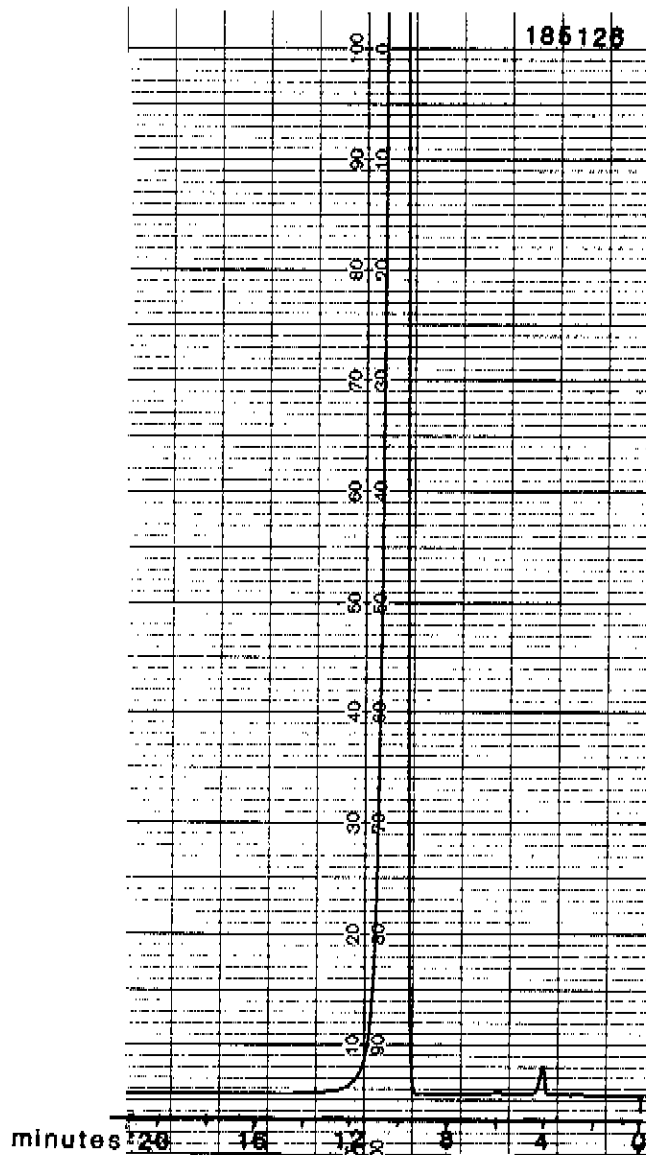
Thiourea was applied as reference (R<sub>f</sub> = 0.6)

Result: No extra spots were detected.

High performance liquid chromatography

The total amount of impurities was estimated by peak area measurement to about 0.35%. A chromatogram is shown in Figure 3.

Figure 3. Chromatogram of propylthiouracil No 185126.



Two minor impurities were observed eluting after 4 minutes and 5.8 minutes respectively. None of them is identical to thiourea which elutes after 2.6 minutes. Thiourea was not detected, the detection limit is less than 0.05%. In USP reference standard lot 1074-F none of these impurities were found.

The following conditions were used:

Eluent: Phosphate buffer pH 3.5 / Acetonitrile (95 + 5)  
Column:  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> from Waters (250 mm x 4.5)  
Detector: Shimadzu SPD-2A operated at 215 nm. Sensitivity: 0.08 AUFS  
Pump: Waters, M-6000 operated at a flow rate of 1.5 ml/min.  
Integrator: Hewlett Packard 3390 A Attenuation: 2 + 3  
Sample: 1 mg/ml dissolved in the eluent. 20  $\mu$ l corresponding to 20  $\mu$ g was injected.

#### STABILITY

Propylthiouracil was exposed to air of different relative humidity at room temperature (about 20° C) for a period of 8 weeks as described in WHO/PHARM/ 82.509. All samples were unchanged at visual inspection and no weight changes were noted. No signs of degradation were observed when selected samples were analyzed by the liquid chromatographic method described above.

#### DATA GIVEN BY THE MANUFACTURER

Identification: IR spectrum corresponds to reference standard  
Description: Colourless crystalline powder  
Melting point: 220.5 - 221.5° C  
Water: 0.01% (Karl Fischer)  
Ash: 0.1%  
Content: 99.4%  
Heavy metals: < 20 ppm

#### CONCLUSION

Propylthiouracil No 185126 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose.

TRIMETHADIONE

Control No 185125

Analytical Report

The monograph for trimethadione in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol. 2. requires a reference substance to be used in the infrared spectrophotometric test for identity as well as in a gas chromatographic assay.

MATERIAL

A sample of trimethadione was generously offered by Abbott, North Chicago, USA. About 200 g of the sample (lot no 22-593-AC) were received at the WHO Centre in October 1984. The material is being stored protected from light in tightly closed containers at +5 °C.

ANALYTICAL DATA

Description: Colourless crystals with slightly camphoraceous odour.

EVIDENCE OF CHEMICAL STRUCTURE

Infrared spectrum

An infrared spectrum is given in Figure 1 (no 185125). The spectrum is concordant with the spectrum obtained from the USP Ref. stand. Lot G.

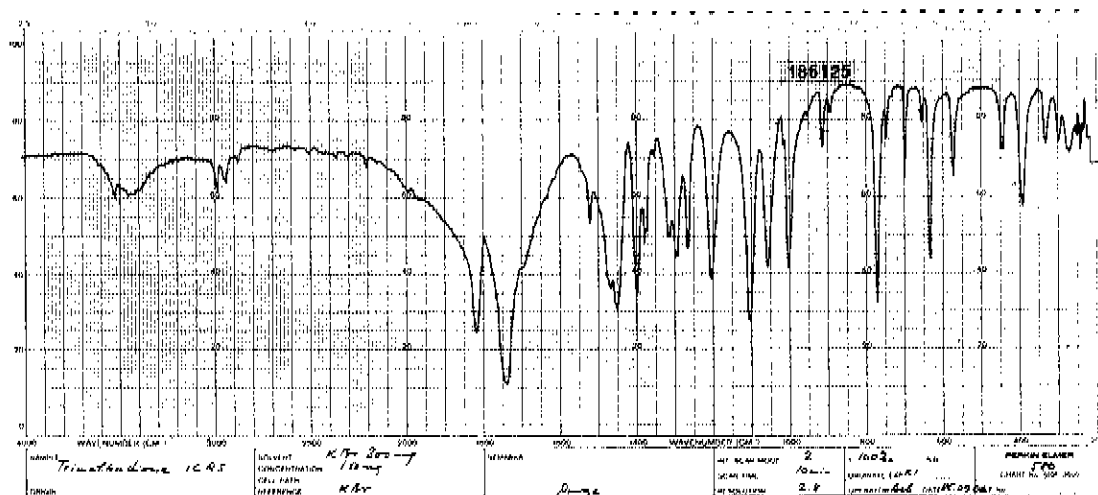


Figure 1. IR-spectrum of 1.50 mg of trimethadione in 300 mg KBr recorded against a KBr reference disc. Instrument: Perkin Elmer 580.

Elemental analysis

	C (%)	H (%)	N (%)
Theoretical	50.3	6.3	9.8
Found	50.6	6.4	9.6

The analysis was performed at Mikro Kemi AB, Uppsala.

Nuclear magnetic resonance spectra (NMR)

$^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded.

Result: Conforms. The amount of impurities were roughly estimated to less than 1%.

UV-spectrum

A UV-spectrum in water is given in Figure 2.

$\lambda_{\text{max}}$  in water = 223 nm

$E$  (1%, 1cm) = 11 (n= 3)

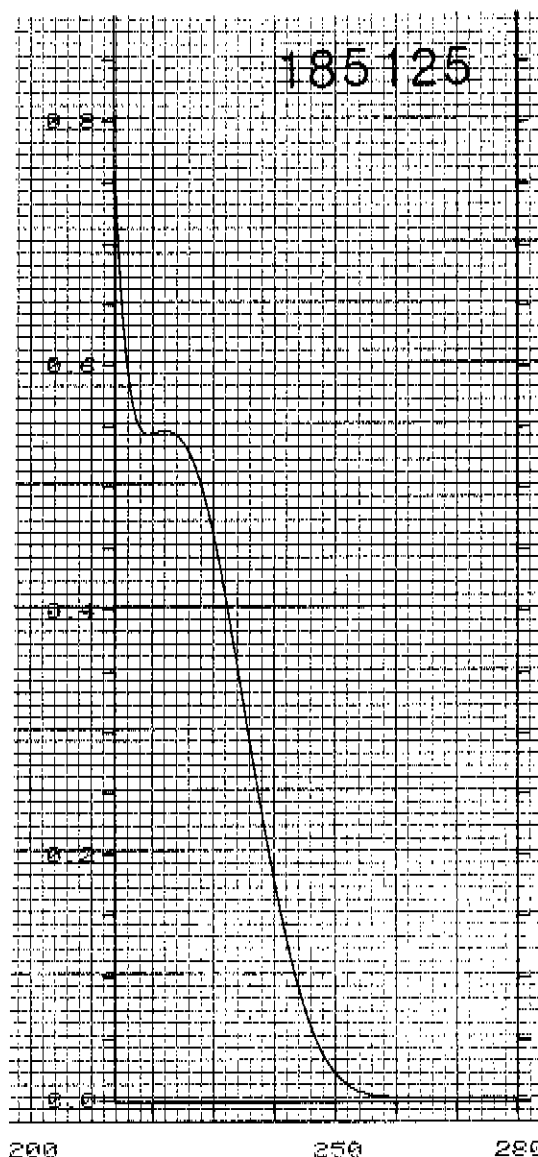


Figure 2. UV-spectrum of trimethadione  
499 ug/ml in water.

Melting range: 45.5 - 46.7<sup>o</sup> C, determined with the Mettler FP 800 Thermosystem (capillary method).

ASSAY

99.8% (n= 8)

The gas chromatographic method described in the International Pharmacopoeia Ed. III, Vol. 2 was used USP Ref. stand. (Lot F-1) was used as reference standard and regarded as 100%. A chromatogram is shown in Figure 3.

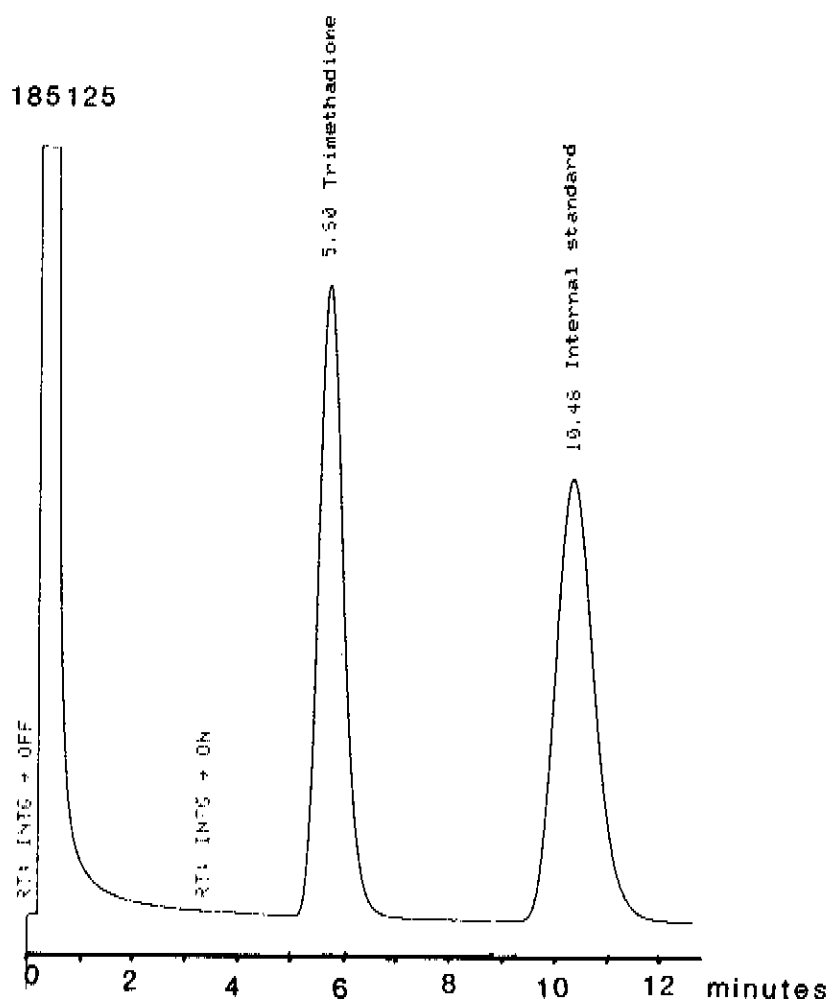


Figure 3. Chromatogram of trimethadione No 185125 and internal standard.

Sample solution: 4 mg/ml  
Column: Homepacked Chromosorb W coated with diethylene glycol succinate.  
Carrier gas: Nitrogen  
Oven temperature: 115<sup>o</sup> C  
Injection port: 150<sup>o</sup> C  
Detector: 150<sup>o</sup> C  
Injection volume: 1 µl  
Attenuation: 2 + 7  
Gas chromatograph: Hewlett Packard 5880

No contaminants were noted when chromatograms with only trimethadione and internal standard respectively were run.

Loss on drying

As the substance is volatile loss on drying is not a suitable method for this substance. The loss of weight with time is shown in Table 1.

Table 1

<u>Time</u> <u>(hours)</u>	<u>Loss in weight</u> <u>(%)</u>
1.5-2	0.3
3.5	0.42
5.0	0.49
6.5	0.66
8.0	0.84
10.0	1.03
12.0	1.23

The experiment was performed at ambient temperature over silica gel.

#### Water

0.6 mg/g (0.06%) determined by Karl Fischer titration.

#### PURITY

##### Total solid impurities

1) Differential thermal analysis (DTA):

About 0.1 mole per cent ( $n=5$ )

Melting temperature: 45.5° C

Instrument: Mettler TA 2000 system, operated on-line with a Hewlett Packard calculator (9815A)

Heating rate: 2° C per minute

Sample: About 2 mg

Calculation: By the Mettler standard computer program for purity analysis.

The same purity was obtained for USP Reference standard Lot F-1.

2) Phase solubility analysis (PSA):

It was not possible to perform PSA as the substance is volatile, a fact that disturbs the gravimetric measurements.

##### High performance liquid chromatography

The total amount of impurities was estimated by peak area measurement to about 0.1%. Chromatograms are shown in Figure 4 a and b.

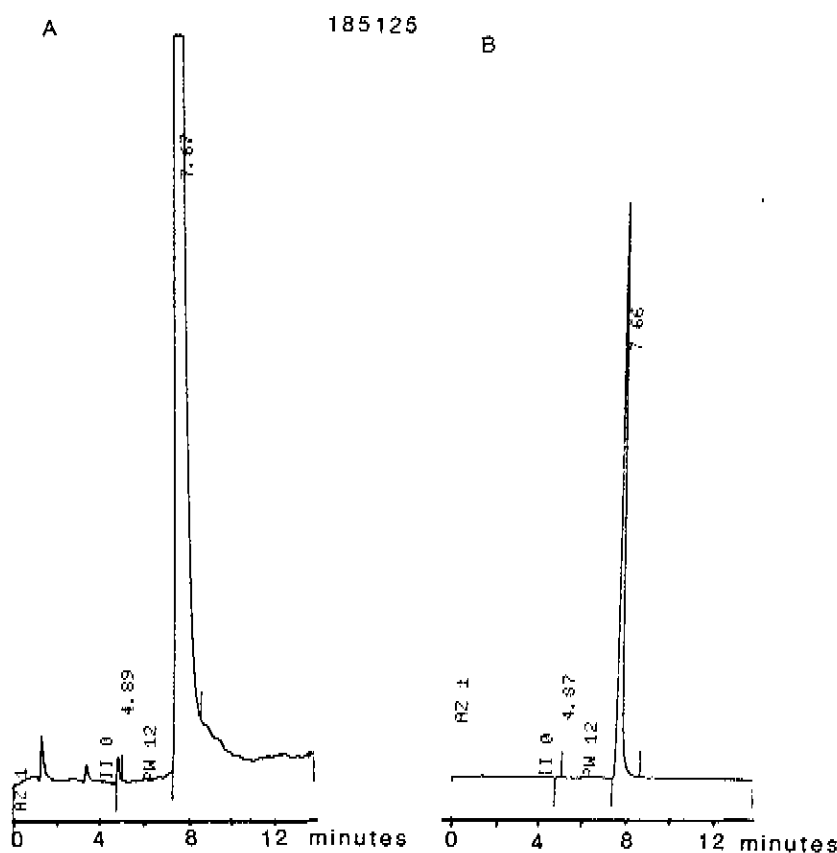


Figure 4. Chromatograms of trimethadione 185125 A) Att: 128, B) Att: 4

The following conditions were used:  
Gradient elution: A= Acetonitrile  
B= Water

Time (min)	%A	%B
0	15	85
8	15	85
20	90	10

Column: Spheri S 5 ODS 1 (250 mm x 4.5)  
Detector: Varian UV 200 operated at 210 nm  
Pump: Varian 5560 Flow rate: 1.0 ml/min  
Integrator: Varian 4270 Att: 128 and 4  
Sample: 1 mg/ml dissolved in water  
10  $\mu$ l corresponding to 10  $\mu$ g was injected

#### STABILITY

Trimethadione was exposed to air of different relative humidity at room temperature (about 20<sup>o</sup> C) for a period of 5 weeks as described in WHO/PHARM/ 82.509. Throughout a loss in weight was observed, after five weeks as high as 60 - 80%. The samples were analyzed with the HPLC method described above but no signs of degradation were observed. The substance is volatile.

## CONCLUSION

Trimethadione No 185125 can be considered suitable as International Chemical Reference Substance for the intended purpose. On the basis of the results obtained the content of trimethadione when used in the gas-chromatographic method is taken to be 99.9 per cent, calculated with reference to the anhydrous substance.

## Storage

In a tightly closed container at a cool place. Due to the low melting point it should not be transported at temperatures exceeding 35° C.

\* \* \*

