



LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L'INDUSTRIE

TITRAGE DU FORMALDÉHYDE RÉSIDUEL

VICH GL 25

Date d'approbation par ACIA	2003/11/01
Date mise en vigueur	2003/11/01

Secrétariat de liaison du Canada de VICH
Direction des médicaments vétérinaires, DGPSA, Santé Canada
Ligne directrice

Avant-propos

La présente ligne de conduite a été élaborée par les groupes d'experts responsables de VICH. Le Comité directeur de VICH a appuyé cette ligne de conduite, et les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-unis l'ont déjà acceptée.

En adoptant cette ligne de conduite de VICH, le gouvernement du Canada appuie les principes et les pratiques ainsi décrits. Le présent document devrait être lu en même temps que les sections pertinentes des autres lignes de conduites applicables.

Les lignes de conduites visent à fournir une assistance à l'industrie et aux professionnels de la santé afin de les aider à se conformer aux politiques ainsi qu'aux lois et aux règlements en vigueur du gouvernement du Canada. Elles servent aussi à fournir une orientation relative à l'examen et à la conformité pour le personnel du gouvernement du Canada, assurant ainsi une mise en œuvre juste, constante et efficace des politiques et des lignes de conduites.

Les lignes de conduites constituent des outils administratifs qui n'ont pas force de loi et de cette façon une certaine souplesse face à l'approche est permise. Des approches de rechange aux principes et aux pratiques décrites dans les présents documents pourraient être acceptables pourvu qu'elles soient appuyées par une justification scientifique adéquate. Les approches de rechange devraient faire l'objet d'une discussion en avance afin d'éviter que l'on décide, au moyen d'évaluation, que les exigences prévues par la loi ou réglementaires n'ont pas été respectées.

Il est important de souligner que le gouvernement du Canada réserve le droit de faire la demande d'une information ou d'un matériel, ou de définir les conditions qui ne sont pas précisément décrites dans la présente ligne directrice, afin de permettre aux évaluateurs de déterminer l'innocuité, l'efficacité ou la qualité des médicaments vétérinaires. Le gouvernement du Canada s'est engagé à s'assurer que de pareilles demandes sont justifiables et que les décisions sont clairement documentées.

Introduction

1) Objectif de la directive

Un grand nombre de vaccins inactivés à usage vétérinaire, en particulier les bactérines, contiennent une quantité résiduelle de formaldéhyde. Il est important de déterminer le taux de formaldéhyde résiduel afin de:

- a) s'assurer de l'innocuité du produit;
- b) s'assurer que le produit n'inactivera pas d'autres produits utilisés en association;
- c) s'assurer que le produit demeure actif tout au long de sa durée de vie;
- d) s'assurer que les anatoxines produites par le genre *Clostridium* demeurent antigéniques et sécuritaires.

Ce document présente une directive sur les exigences générales quant au titrage du formaldéhyde résiduel. Cette directive offre la possibilité d'utiliser d'autres méthodes de titrage selon le contexte expérimental ou les caractéristiques du produit visé. Ces méthodes alternatives doivent être mentionnées dans la méthode de production du fabricant et inclure des données d'équivalence.

2) Portée de la directive

Cette directive s'applique à l'analyse des produits finaux de nouveaux vaccins à usage vétérinaire contenant tout formaldéhyde.

3) Contexte

Il existe un certain nombre d'épreuves permettant de déterminer le taux de formaldéhyde libre résiduel dans les vaccins inactivés. Parmi celles-ci, notons le titrage à l'acétylacétone, le titrage au chlorure ferrique et le test à la fuchsine basique. Le titrage au chlorure ferrique a été choisi car il est compatible avec les produits neutralisés au bisulfite de sodium.¹

Le taux de formaldéhyde résiduel sera exprimé en g/L; une table de conversion à cet effet est présentée à l'Annexe 1.

4) Principe de base

Le taux de formaldéhyde total est déterminé en fonction de la réaction du formaldéhyde avec le chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone (MBTH). La méthode permet a) la liaison du MBTH au formaldéhyde pour former un produit, b) l'oxydation du MBTH excédentaire pour former un autre produit et c) la combinaison de ces deux produits pour former un chromophore bleu qui peut être mesuré à une longueur d'onde de 628 nm.²

Méthode de titrage au chlorure ferrique

1. Réactifs

- 1.1 Réactif chlorure ferrique-acide sulfamique. Une solution contenant 10 g/L de chlorure ferrique et 16 g/L d'acide sulfamique.
- 1.2 Réactif chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone. (PM 233,7). [CAS 149022-15-1]. Chlorhydrate de 3-méthylbenzothiazol-2(3H)one-hydrazone monohydrate. Poudre cristalline jaunâtre ou presque blanche. PF: environ 270°C. Solution contenant 0,5 g/L. (ATTENTION: Cette solution n'est pas stable. Une solution fraîche doit être préparée la journée même du titrage.
- 1.3 Test de conformité pour la détermination des aldéhydes. À 2 mL de méthanol sans aldéhyde, ajouter 60 µl d'une solution de propionaldéhyde dans du méthanol sans aldéhyde (1 g/L) et 5 mL d'une solution de chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone (4 g/L). Mélanger et laisser reposer 30 min. Préparer un blanc en excluant la solution de propionaldéhyde. Ajouter 25,0 mL d'une solution de chlorure ferrique (2 g/L) à la solution inconnue et au blanc, diluer à 100,0 mL avec de l'acétone R et mélanger. Mesurer l'absorbance de la solution inconnue à l'aide d'un spectrophotomètre à 660 nm dans une cellule de 1 cm en utilisant le blanc comme liquide de compensation. L'absorbance de la solution inconnue doit être supérieure ou égale à 0,62 unité d'absorbance.
- 1.4 Solution de formaldéhyde, le taux de formaldéhyde (CH₂O) doit être supérieur à 34,5 % (p/v) et inférieur à 38,0 % (p/v).
- 1.5 tétradécanoate de propan-2-yle, de qualité analytique
- 1.6 acide chlorhydrique (1 M), de qualité analytique
- 1.7 chloroforme, de qualité analytique
- 1.8 chlorure de sodium (solutions aqueuses de 9 g/L et 100 g/L), de qualité analytique
- 1.3 polysorbate 20, de qualité analytique

2. Préparation des échantillons et des solutions étalons

- 2.1 Préparer les solutions étalons de formaldéhyde de 0,25, 0,50, 1,00 et 2,00 g/L en diluant la solution de formaldéhyde (1.3) avec de l'eau dans des fioles jaugées appropriées.
- 2.2 Si le vaccin à tester est une émulsion huileuse, l'émulsion doit être brisée par une méthode appropriée. Il faut mesurer le taux de formaldéhyde dans la phase aqueuse. Les techniques de séparation suivantes sont appropriées.

- a) Ajouter 1,00 mL du vaccin à 1,0 mL de *tétradécanoate de propan-2-yl* et mélanger. Au mélange, ajouter 1,3 mL d'*acide chlorhydrique* (1 M), 2,0 mL de *chloroforme* et 2,7 mL de la *solution de chlorure de sodium* 9 g/L. Mélanger à fond. Centrifuger à 15 000 g pendant 60 minutes. Transférer la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter le volume avec de l'eau. Utiliser la phase aqueuse diluée pour le titrage du formaldéhyde. Si cette procédure ne permet pas de séparer la phase aqueuse, ajouter du *polysorbate 20* à la solution de chlorure de sodium de façon à obtenir une concentration de 100 g/L et recommencer la procédure, mais centrifuger cette fois à 22 500 g.
- b) Ajouter 1,00 mL de vaccin à 1,0 mL d'une *solution de chlorure de sodium* 100 g/L et mélanger. Centrifuger à 1 000 g pendant 15 minutes. Transférer la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter le volume avec de l'eau. Utiliser la phase aqueuse pour le titrage du formaldéhyde.
- c) Ajouter 1,00 mL de vaccin à 2,0 mL d'une *solution de chlorure de sodium* 100 g/L ainsi que 3,0 mL de *chloroforme* et mélanger. Centrifuger à 1 000 g pendant 5 minutes. Transférer la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter le volume avec de l'eau. Utiliser la phase aqueuse diluée pour le titrage du formaldéhyde.

REMARQUE : Les volumes pour briser les émulsions sont utilisés des fins d'illustration. Il se peut que les volumes diffèrent, donnant lieu à un réajustement proportionnel des volumes des autres réactifs utilisés lors de la procédure d'extraction.

3. Méthode de titrage

- 3.1 À 0,50 mL d'une dilution 1:200 du vaccin à analyser (s'il y a émulsion, utiliser 0,50 mL d'une dilution 1:20 de la phase aqueuse diluée), et à 0,50 mL d'une dilution 1:200 de chacune des solutions étalons de *formaldéhyde*, ajouter 5,0 mL du réactif *chlorhydrate de méthylbenzothiazolone-hydrazone*. Boucher les tubes, agiter et laisser reposer pendant 60 minutes.
- 3.2 Ajouter 1 mL du *réactif chlorure ferrique-acide sulfamique* et laisser reposer pendant 15 minutes.
- 3.3 Mesurer l'absorbance des solutions contenant les vaccins et des solutions étalons à l'aide d'un spectrophotomètre à un maximum de 628 nm dans une cellule de 1 cm, en utilisant le blanc comme liquide de compensation.

4. Calculs et interprétation

Calculer le taux de formaldéhyde total (g/L) à partir de la courbe étalon en utilisant la régression linéaire (un coefficient de corrélation acceptable $[r]$ est égal ou plus grand que 0,97) .

Annexe 1

Table de conversion des taux de formaldéhyde

Formaldéhyde g/L	Formaldéhyde % p/v	Solution de Formaldéhyde* % v/v	Formaldéhyde ppm
2,0	0,2	0,5	2000
0,8	0,08	0,2	800
0,4	0,04	0,1	400
0,5	0,05	0,125	500
0,05	0,005	0,0125	50
0,04	0,004	0,01	40

* solution de formaldéhyde à 40%

Bibliographie

1. Chandler, M.D. & G.N. Frerichs, Journal of Biological Standardization (1980) 8,145-149
2. Knight, H, & Tennant R.W.G. Laboratory Practice, (1973) 22, 169-173

The logo for Canada, featuring the word "Canada" in a serif font with a small Canadian flag icon above the letter "a".