

d'eau R pendant 5 min, puis immergez-le pendant 1 min environ dans de la solution de développement R, jusqu'à obtention d'une coloration satisfaisante. Stoppez le développement par immersion pendant 15 min dans la solution d'arrêt R. Rincez avec de l'eau R.

SÉCHAGE DES GELS DE POLYACRYLAMIDE SDS COLORÉS

Le traitement des gels est légèrement différent selon la méthode de coloration utilisée. Dans le cas de la coloration au Coomassie, l'étape de décoloration est suivie d'une immersion du gel dans une solution de glycérol R à 100 g/L pendant 2 h au moins (ou toute une nuit). Dans le cas de la coloration par l'argent, le rinçage final est suivi d'une immersion dans une solution de glycérol R à 20 g/L pendant 5 min.

Immergez deux feuilles de cellulose poreuse dans de l'eau R pendant 5-10 min. Placez l'une d'elles sur un cadre de séchage. Soulevez délicatement le gel et déposez-le sur la feuille de cellulose. Éliminez éventuellement les bulles d'air emprisonnées et versez quelques millilitres d'eau R le long des bords du gel. Recouvrez avec la seconde feuille et éliminez éventuellement les bulles d'air emprisonnées. Terminez l'assemblage du cadre de séchage. Placez à l'étuve ou laissez sécher à température ambiante.

DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

La masse moléculaire des protéines est déterminée par comparaison de leur mobilité avec celle de plusieurs marqueurs protéiques de masse moléculaire connue. Il existe, pour l'étalonnage des gels, des mélanges de protéines de masse moléculaire précisément connue qui permettent d'obtenir une coloration uniforme. De tels mélanges sont disponibles pour différentes plages de masse moléculaire. Les solutions mères concentrées de protéines de masse moléculaire connue sont diluées dans le tampon pour échantillons approprié et déposées sur le même gel que l'échantillon protéique à examiner.

Immédiatement après l'électrophorèse, repérez la position du colorant de marquage (bleu de bromophénol) pour identifier le front de migration des ions. On peut à cet effet découper une encoche dans le bord du gel, ou enfoncer dans le gel, au niveau du front de migration du colorant, une aiguille trempée dans de l'encre de Chine. Après la coloration du gel, mesurez la distance de migration de chaque bande protéique (marqueurs et bandes inconnues) à partir du bord supérieur du gel de séparation, et divisez chacune de ces distances de migration par la distance parcourue par le colorant de marquage. Les distances de migration ainsi obtenues sont appelées mobilités relatives des protéines (par rapport au front de coloration) et conventionnellement notées R_F . Tracez un graphe du logarithme de la masse moléculaire relative M_r des étalons protéiques en fonction des R_F correspondants. Les graphes obtenus sont légèrement sigmoïdes. L'estimation des masses moléculaires inconnues peut être effectuée par régression linéaire ou par interpolation à partir de la courbe de variation de $\log(M_r)$ en fonction de R_F à condition que les valeurs obtenues pour les échantillons inconnus soient situées dans la partie linéaire du graphe.

VALIDATION DE L'ESSAI

L'essai n'est valable que si les protéines utilisées comme marqueurs de masse moléculaire sont distribuées sur 80 pour cent de la longueur du gel et si, sur l'intervalle de séparation requis (par exemple l'intervalle couvrant le produit et son dimère, ou le produit et ses impuretés apparentées), il existe pour les bandes protéiques à considérer une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la valeur de R_F . Des exigences de validation supplémentaires concernant la préparation à examiner peuvent être spécifiées dans les monographies particulières.

QUANTIFICATION DES IMPURETÉS

Lorsqu'une teneur limite en impureté(s) est spécifiée dans la monographie particulière, il convient de préparer une solution témoin correspondant à cette teneur, en diluant la solution

à examiner. Si, par exemple, cette limite est de 5 pour cent, la solution témoin sera une dilution au 1/20 de la solution à examiner. L'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner ne doit présenter aucune bande d'impureté (bande autre que la bande principale) qui soit plus intense que la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin.

Il est possible, sous réserve d'opérer dans des conditions validées, de quantifier les impuretés par normalisation par rapport à la bande principale, en utilisant un densitomètre intégrateur. Dans ce cas, la linéarité des réponses doit être vérifiée.

01/2008:20232

2.2.32. PERTE À LA DESSICCATION

La perte à la dessiccation est la perte de masse exprimée en pourcentage m/m .

Mode opératoire. Placez la quantité prescrite de la substance à examiner dans un flacon à tare, desséché lui-même au préalable dans les conditions précisées pour la substance à examiner. La dessiccation de la substance se fait jusqu'à masse constante ou pendant la durée prescrite à l'aide d'un des procédés décrits ci-après. Si la température de dessiccation est indiquée par une seule valeur plutôt qu'un intervalle, la dessiccation est effectuée à la température prescrite $\pm 2^\circ\text{C}$.

- « dans un dessiccateur » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, à la pression atmosphérique, à température ambiante ;
- « sous vide » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, sous une pression comprise entre 1,5 kPa et 2,5 kPa, à température ambiante ;
- « sous vide avec indication d'un intervalle de température » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R*, sous une pression comprise entre 1,5 kPa et 2,5 kPa et dans l'intervalle de température prescrit dans la monographie ;
- « à l'étuve avec indication d'un intervalle de température » : la dessiccation est effectuée à l'étuve dans l'intervalle de température prescrit dans la monographie ;
- « sous vide poussé » : la dessiccation est effectuée en présence de *pentoxyde de diphosphore R* sous une pression inférieure à 0,1 kPa, à la température prescrite dans la monographie.

Si d'autres conditions sont prescrites, le procédé à utiliser est intégralement décrit dans la monographie.

01/2009:20233

2.2.33. SPECTROMÉTRIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

INTRODUCTION

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse qui permet, en particulier, d'élucider la structure chimique des molécules organiques par interprétation des spectres RMN obtenus, par exemple, pour ^1H ou les noyaux X de type ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P . Les spectres peuvent être utilisés à des fins d'analyse qualitative ou quantitative.

Dans des conditions expérimentales appropriées, l'intensité des signaux RMN (obtenue par intégration) est directement proportionnelle au nombre de spins nucléaires que compte le groupe structurel responsable du signal. Ces intégrales peuvent servir à l'analyse quantitative.