UNIVERSITÉ DU BURUNDI
GRENIER DU SAVOIR DU BURUNDI
Dépôt institutionnel officiel
https://repository.ub.edu.bi

# Analyse du chloramphenicol vendu à Bujumbura

**Mbonicura, Liévin; Sous la direction de MM. Guido VANERMAN et Joseph KATIHABWA**

**1987**

UB, Faculté des sciences

https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/1107

Document téléchargé depuis le **Grenier du Savoir du Burundi** — https://repository.ub.edu.bi

UNIVERSITE DU BURUNDI

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

# ANALYSE DU CHLORAMPHENICOL VENDU A BUJUMBURA

*Sous la direction de*

*MM. Guido VANERMAN*

*et Joseph KATIHABWA*

*Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Chimiques*

*par*

*Liévin MBONICURA*

*BUJUMBURA, septembre 1987*

A ma famille,

A ma tante, qu'elle se rappelle
de l'année passée en commun à GI'EGA

je dédie ce mémoire.

# AVANT - PROPOS

Ce modeste ouvrage n'aurait pas vu le jour sans le concours de plusieurs personnes qui ont contribué à son élaboration.

Nous ne pourrons jamais assez remercier Monsieur Guido VANERMAN et Monsieur Joseph KATIHABWA qui ont dirigé ce mémoire pour les conseils et les encouragements qu'ils nous ont prodigués à cette occasion.

Nous exprimons notre gratitude à tous les professeurs de la Faculté des Sciences, en particulier ceux du Département de Chimie qui nous ont fait profiter de leurs expériences durant toute notre formation universitaire.

Nos remerciements s'adressent également aux Messieurs D. NEERINCK, T. MALFAIT et J.P.CHAPEAUX et au personnel de l'ONAPHA pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée.

Que les familles Pie BARIBWEGURE et Joseph GAHAMA, et tous ceux qui, moralement ou matériellement, nous ont soutenu à réaliser ce travail, trouvent ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Enfin, notre ami Alois HABONIMANA voudra bien trouver dans ce travail l'expression de notre profonde sympathie.

Liévin MBONICURA.-

TABLE DES MATIERES


Page

RESUME ..... 1

INTRODUCTION ..... 2

CHAPITRE 1. GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES ..... 4

1.1. Historique ..... 4

1.2. Définition des antibiotiques ..... 4

1.3. Notions générales sur l'activité des antibiotiques ..... 5

1.4. Associations d'antibiotiques ..... 5

1.5. Principe d'un traitement antibiotique ..... 6

1.6. Incidents et accidents de l'antibiotique ..... 7

CHAPITRE 2. GENERALITES SUR LE CHLORAMPHENICOL ..... 7

2.1. Historique ..... 7

2.2. La formule et la structure chimique ..... 8

2.3. Synthèses ..... 8

2.4. Propriétés physicochimiques ..... 13

2.5. Mécanisme d'action ..... 13

2.6. Spectre antibiotique ..... 14

2.7. Mode d'administration et posologie ..... 14

2.8. Actions sur la détermination de certaines constantes biologiques ..... 15

2.9. Accidents hématologiques et de lyse bactérienne ..... 15

2.10. Interférences médicamenteuses ..... 16

CHAPITRE 3. PARTIE EXPERIMENTALE ..... 17

3.1. Méthodes d'analyse ..... 17

3.2. Les résultats expérimentaux ..... 25

3.3. Discussions des résultats ..... 36

CONCLUSION ..... 43

BIBLIOGRAPHIE ..... 44

# R E S U M E

Dans ce travail, nous avons fait une analyse de la pureté du chloramphénicol vendu à Bujumbura, en déterminant ses constantes physiques, en effectuant des mesures en chromatographie sur couche mince et en phase liquide à haute performance et par spectroscopie U.V. Les spectres obtenus par H.P.L.C. indiquent que cette méthode peut être utilisée pour le contrôle rapide et régulier du chloramphénicol

# INTRODUCTION

## Intérêt du sujet

L'importance des antibiotiques dans la thérapeutique n'est plus à établir. Jusque vers 1935, la thérapeutique anti-infectieuse était réduite à quelques sérums : antidiphtérique, antitétanique, antiméningococcique et produits antiparasitaires, notamment ceux antisyphilitiques à base d'arseno-benzènes, de mercure ou de bismuth (1).

La découverte et l'utilisation du chloramphénicol furent une révélation (2), et son intérêt, tant actuel (3), a été vite limité par ses indications propres, la puissance restreinte de son action et le développement de résistance à son égard de certains germes.

Dans ce travail, nous nous proposons de faire une analyse du chloramphénicol vendu à Bujumbura, car que les médicaments soient aussi des poisons est un fait établi depuis les temps les plus reculés. De nombreuses substances très dangereuses pour l'organisme humain sont été utilisées empiriquement pendant des siècles dans un but thérapeutique, et ont entraîné de nombreux accidents (3).

L'étude expérimentale (2) de leurs effets physiologiques n'a commencé qu'au début du XIXème siècle (4) et François MAGENDIE est considéré à juste titre, comme un pionnier de la pharmacologie pour avoir décrit en 1809 l'action vomitive et convulsivante, et pour avoir publié en 1821 le premier ouvrage où se trouvent décrites des activités pharmacologiques classiques (5).

Les préoccupations officielles relatives aux dangers des médicaments - naturelles ou artificielles - ne vinrent toutefois que beaucoup plus tard (3). Il est admis qu'il n'existe pas de médicament totalement inoffensif et que les dangers éventuels de toute substance utilisée dans un but thérapeutique doivent être connue de ceux qui, ont une responsabilité dans le traitement des maladies.

Dans ce travail, nous nous proposons de faire l'analyse de la pureté du chloramphénicol et la recherche d'une méthode analytique pouvant aider à faire un contrôle rapide en routine de ce médicament.

La conservation inadéquate des médicaments peut être à l'origine de leur dénaturation (3). Pour quelques médicaments, une conservation dans de mauvaises conditions est dangereuse, car elle conduit à leur transformation en dérivés toxiques (3). C'est le cas de certains médicaments maintenus dans les lieux illumineux, chauds et humides. Dans d'autres cas, une conservation trop prolongée, aboutit à une inefficacité qui peut être dangereuse. C'est pourquoi la date de péremption des médicaments doit être respectée.
Notre but est donc de montrer qu'il faut faire un contrôle régulier de la qualité des médicaments en recourant aux méthodes d'analyse chimique.

Notre travail comprend quatre parties.
Dans la première partie, nous évoquerons quelques généralités sur les antibiotiques. La deuxième partie sera consacrée à l'étude théorique du chloramphénicol. La troisième partie donnera les résultats expérimentaux de l'analyse du chloramphénicol vendu à Bujumbura. Enfin, le quatrième partie porte sur la conclusion des analyses effectuées et propose des mesures de contrôle pendant toute la durée de l'exploitation du chloramphénicol.

# CHAPITRE 1 - GENERALITES SUR LES ANTIBIOTIQUES.

## 1.1. Historique.

L'antagonisme entre moisissures et microbes fut observé en 1877 par Pasteur et Joubert, et en 1897 par Tyndall (5). En 1928, Flemming (3) note l'inhibition de la croissance d'une colonie de staphylocoques dorés en présence d'une cellule de pénicillium, mais sa publication passe inaperçue. Dans la ligne de recherche menée en 1905 par Ehrich (5) sur les propriétés des colorants, qui valent à son auteur d'être considéré comme le fondateur de la chimiothérapie anti-infectieuse, Domagk en Allemagne en 1935, propose du prontosil (colorant rouge) pour traiter des affections streptococciques (5).

A l'Institut Pasteur de Paris, J. et M.T. Trefouël (5) montrent que le véritable agent in vivo est un métabolite, le sulfanilamide. Alors commence l'ère des sulfamides qui, pendant plus de quinze ans, seront l'arme principale de la thérapeutique anti-infectieuse.

Il faut attendre en effet 1941 pour que la penicilline soit utilisée chez l'homme à la suite des travaux de Florey et Chain en Grande-Bretagne (5).

Actuellement, il existe, dans le commerce, des antibiotiques efficaces vis-à-vis de tous les agents infectieux, à l'exception de virus. Cependant, desnouveaux problèmes sont apparus, qui exigent de poursuivre les recherches car de nombreux germes sont devenus résistants aux antibiotiques usuels.

## 1.2. Définition des antibiotiques.

Les antibiotiques sont des substances capables d'inhiber le développement des bactéries, de diminuer leur vitalité et éventuellement de les détruire. Leur action est bactériostatique lorsqu'ils inhibent les bactéries de leur développement, sans les tuer et bactéricides lorsqu'ils les tuent.
Notons en passant, qu'un seul antibiotique peut jouer les deux rôles, mais à des concentrations plus faibles pour la première que pour la seconde.

## 1.3. Notions générales sur l'activité des antibiotiques.

### 1.3.1. Spectre antibiotique.

On appelle spectre antibiotique des agents infectieux sensibles à l'action d'un antibiotique donné. Ce spectre est déterminé expérimentalement in vivo et in vitro.

### 1.3.2. Mécanismes d'action des antibiotiques.

Les antibiotiques agissent par l'un des mécanismes suivants :
- interférence avec le métabolisme de la bactérie.
- action sur la paroi bactérienne.
- action sur la structure de la membrane cytoplasmique.
- action sur l'A.D.N. nucléaire.

## 1.4. Associations d'antibiotiques.

Il est possible de relentir l'apparition d'une résistance microbienne en administrant simultanément deux antibiotiques, bien que cette résistance puisse apparaître aussi vite vis-à-vis de chacun de deux antibiotiques pris isolement.

Les motifs qui incitent à utiliser de telles associations ne sont pas toujours justifiés et les indications doivent en être très précises (3).
Les surinfections ne sont pas obligatoirement empêchées en administrant d'emblée un second médicament théoriquement actif sur l'agent dont on redoute la pullulation.

Il est vain d'espérer atteindre le germe dans la cellule à l'aide d'une association d'antibiotique dont aucun n'est capable d'y pénétrer. S'il s'agit d'attaquer une infection à germe inconnu, l'association est justifiée si la gravité de la maladie empêche d'atteindre le résultat de l'antibiogramme.

Pour limiter les effets indésirables, il peut être logique d'associer les antibiotiques, car cela permet de diminuer les doses de chacun et donc les risques d'accidents; il faut se souvenir que malgré tout, plus on utilise des médicaments, plus grande peut être la probabilité des réactions qu'ils peuvent provoquer (6).

Les associations peuvent aussi aboutir à un antagonisme, c'est à dire à un effet inférieur à l'action de chaque antibiotique pris isolement. L'exemple le plus courant est représenté par l'association d'un antibiotique agissant sur les germes en période de multiplication (pénicilline) et d'un antibiotique ralentissant cette multiplication (tétracycline, chloramphénicol) (6).

En fait cet antagonisme n'a pas de répercussion clinique si le germe est facile à atteindre; il est plus à craindre si le germe est localisé aux méninges, aux valves aortiques ou aux os, car il est fondamental d'agir avec le maximum d'efficacité.

Les associations commerciales toutes faites, dont les proportions fixes ne permettent pas de faire varier la posologie de l'un ou de l'autre de leurs constituants, sont pour la plupart à rejeter (7).

## 1.5. Principe d'un traitement antibiotique.

L'agent anti-infectieux efficace est celui qui aura des chances d'atteindre au site du foyer infectieux une concentration suffisante, supérieure à la concentration minimale inhibitrice (C M I) de la souche infectante.

Un traitement antibiotique pendant une durée trop brève est à proscrire. La prescription d'un antibiotique d'une façon inadéquate, tant en quantité qu'en durée, risque de favoriser le développement d'une résistance (7). L'effet de l'absorption digestive est souvent imprévisible; aussi est-il préférable dans les infections graves d'avoir recours à la voie parentale. La voie orale est employée dans les infections bénignes et comme relais d'une thérapeutique parentale dans les infections sévères. L'antibiotique doit être pris une heure avant ou trois heures après un repas.

L'indication de tout traitement antibiotique doit être fondée sur des bases suffisamment rationnelles. Les arguments doivent être tirés de l'examen clinique et si nécessaire, des examens bactériologiques. On doit choisir l'antibiotique le moins toxique, le plus commodément administrable, enfin le moins onéreux.
En cas d'infection sévère, l'étude du pouvoir bactéricide des antibiotiques isolés et en association est indispensable.

1.6. Incidents et accidents de l'antibiotique.

Les antibiotiques, comme les autres médicaments, peuvent provoquer des effets secondaires de gravité variable dûs à des effets toxiques directs, ou à des manifestations allergiques consécutifs au traitement. Les accidents pouvant se produire après un traitement (6) peuvent s'observer dans les cas suivants :

1) avec les antibiotiques à large spectre d'action (tétracycline, chloramphénicol, aminosides) qui détruisent une partie de la microflore intestinale, provoquant des diarrhées.

2) au cours du traitement des affections dues à certains germes (gram négatif en général) contenant des endotoxines qui peuvent être liberées lors de la lyse de ces microorganismes par des doses massives d'antibiotiques bactéricides, d'où le risque de choc ou de collapsus.

De tels accidents peuvent s'observer notamment lors du traitement de la syphilis par la pénicilline ou lors du traitement de la fièvre typhoïde par le chloramphénicol. Les effets toxiques directs résultent d'un surdosage absolu ou relatif qui peut survenir si la vitesse de perfusion n'est pas bien contrôlée ou en cas de mauvaise métabolisation (chloramphénicol chez les nouveaux-nés) (6).

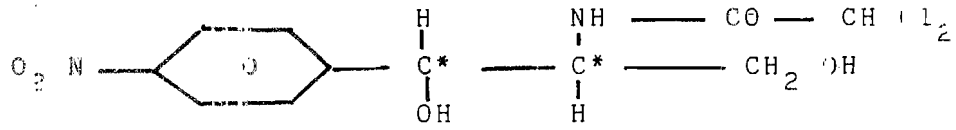
Suivant les organes cibles, les effets toxiques directs portent sur : la moëlle, les éléments figurés du sang, le rein, l'oreille interne, le foie, les nerfs.

CHAPITRE 2 - GENERALITES SUR LE CHLORAMPHENICOL.

2.1. Historique.

Le chloramphénicol fut le premier antibiotique à large spectre isolé à partir d'une cellule de streptomyces Venezuelae par Ehrlich et Coll. en 1947 (2). Lorsque sa structure chimique fut précisée, il a été préparé par synthèse (8). La dénomination chloromycétine résulte de la contraction du radical dichloro-acétique présent dans la molécule avec la nature du microorganisme producteur.

## 2.2. La formule et la structure chimique.



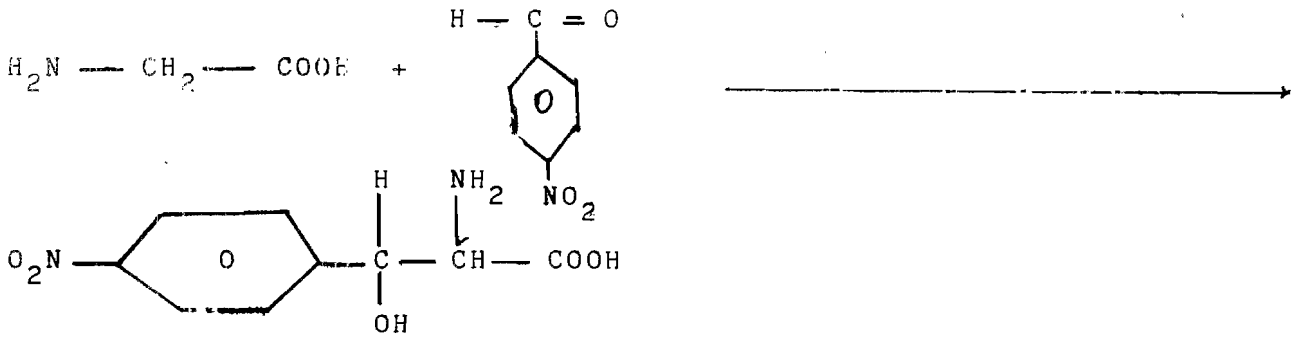
La formule est relativement simple. Sa formule comporte deux atomes de carbone asymétriques, ce qui rend compte de l'existence de quatre stéréo-isomères. Seul l'isomère D (-)thréo, qui correspond à l'antibiotique naturel, possède une activité antibactérienne. Le chloramphénicol est utilisé tel quel ou sous forme d'esters qui sont hydrolysés dans l'organisme libérant le chloramphénicol actif; l'un d'eux, le succinate de chloramphénicol est soluble et permet ainsi l'administration parentale

## 2.3. Synthèse :

On peut synthétiser le chloramphénicol à partir de plusieurs produits de départ selon les trois méthodes suivantes

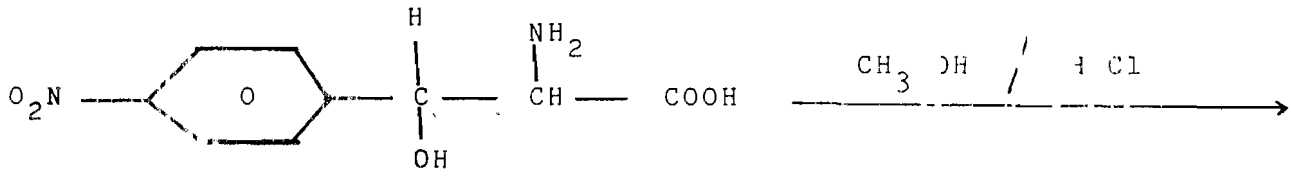
### A : 1ère Méthode (8)

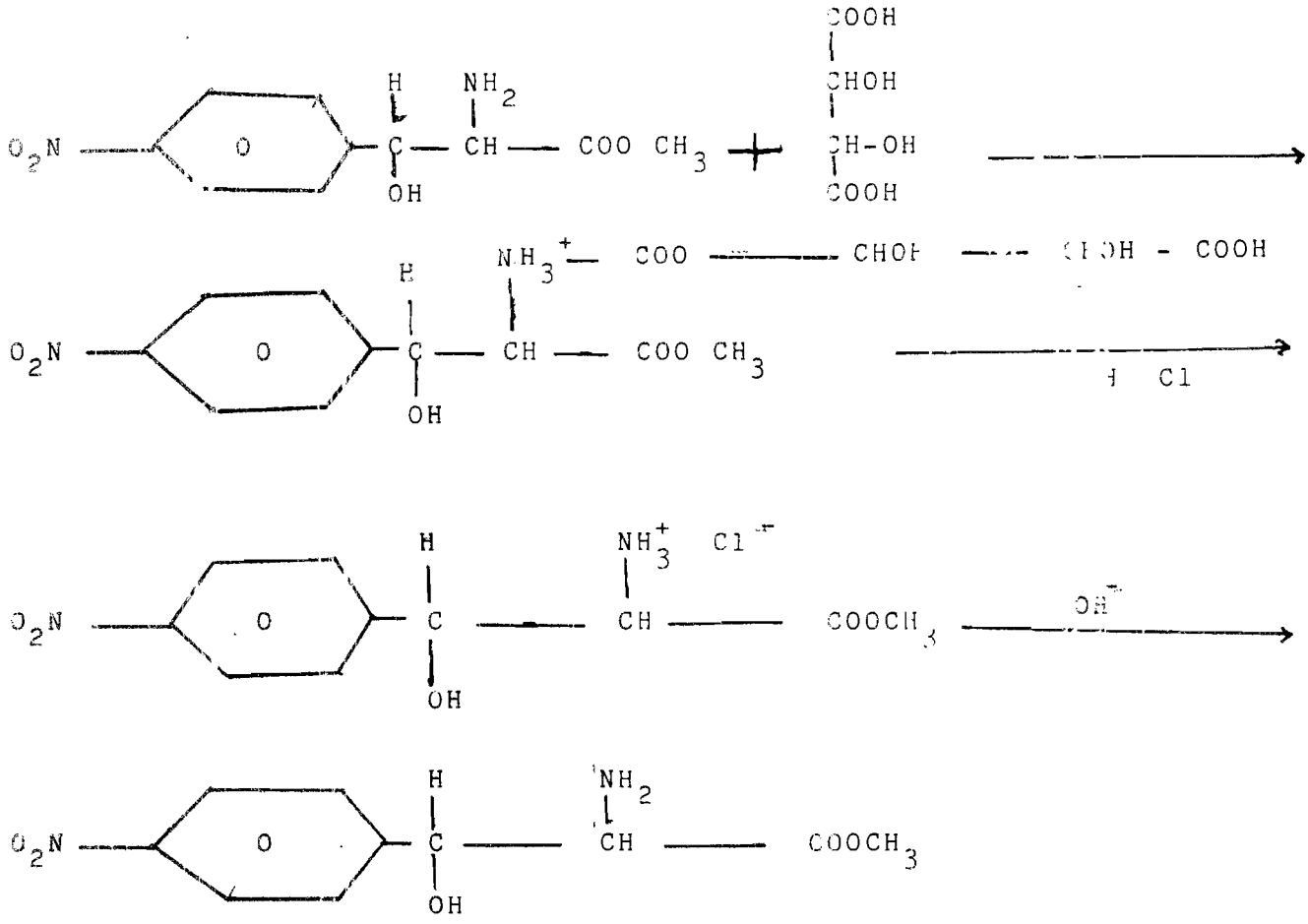
### A.1. Condensation de glycine, p. nitrobenzaldéhyde.



D.L - thréo - β - p. nitrophényl - sérine.

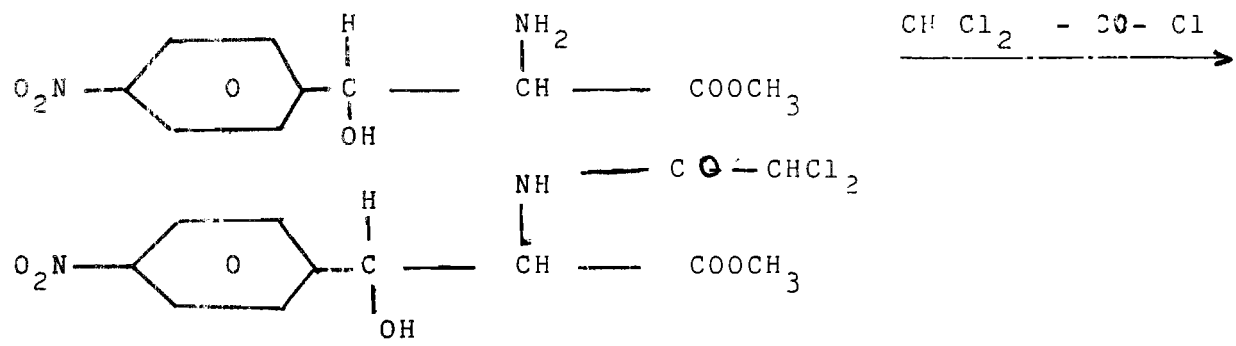
### A.2. Résolution du mélange racémique.



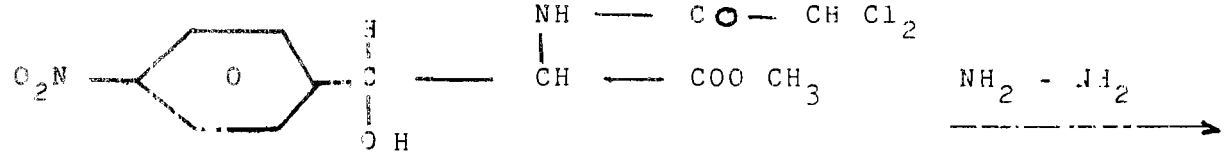


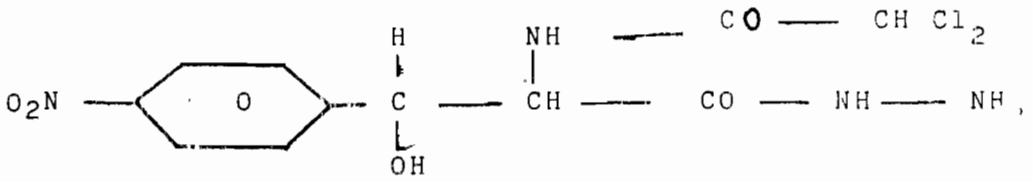
L (+) thréo - p. nitrophényl sérinemethyl ester.

A.3. Transformation en L (+) - thréo - N - dichloroacéthyl - p. nitrophényl sérine methyl ester.

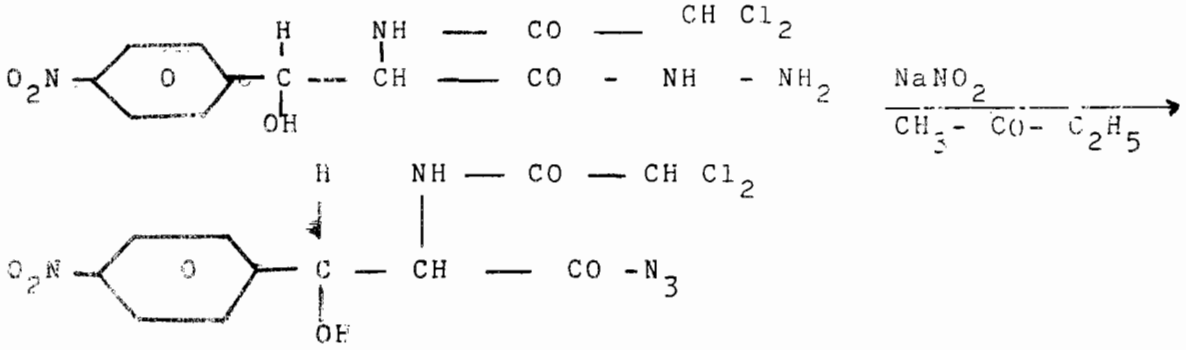


A.4. Formation de l'hydrazide correspondant

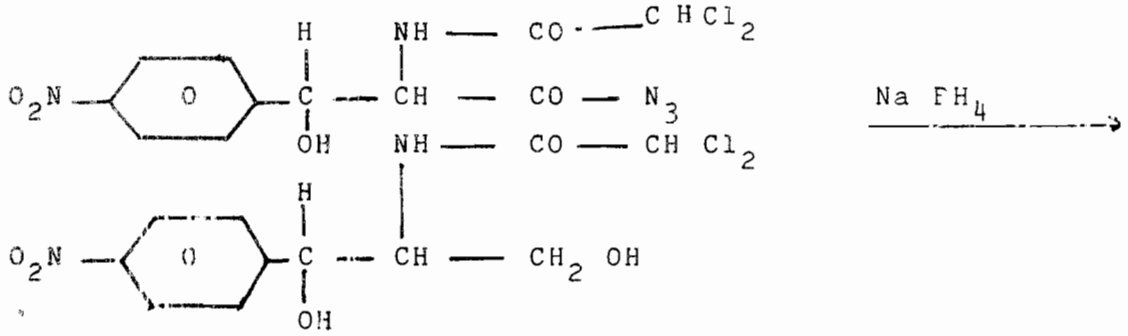




A.5. Transformation en azide correspondant .

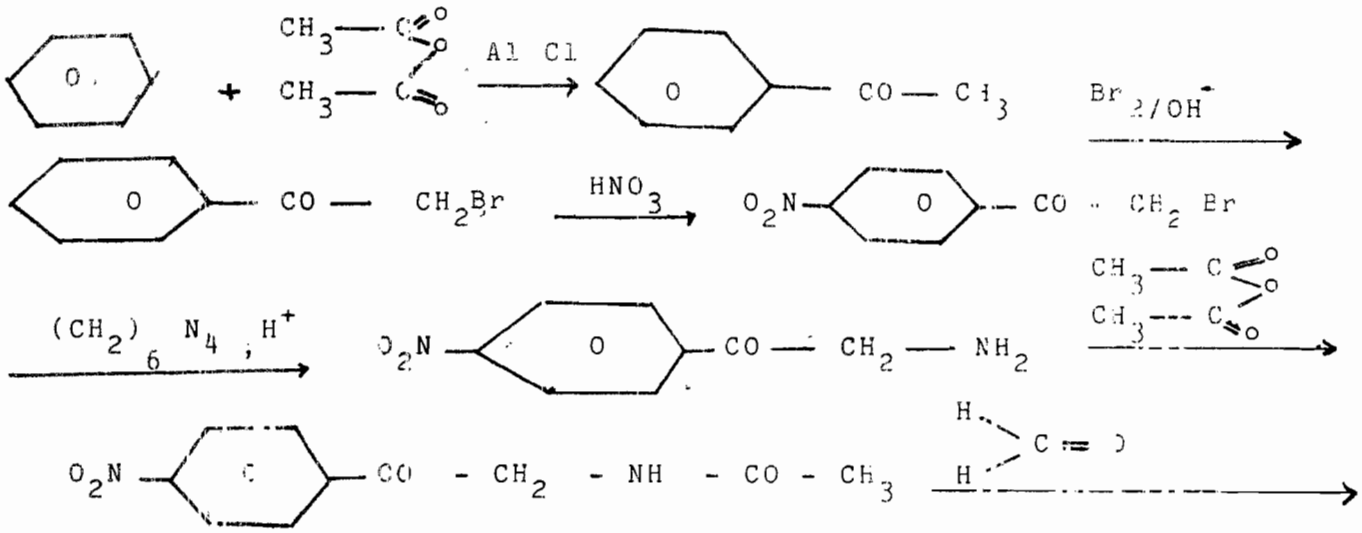


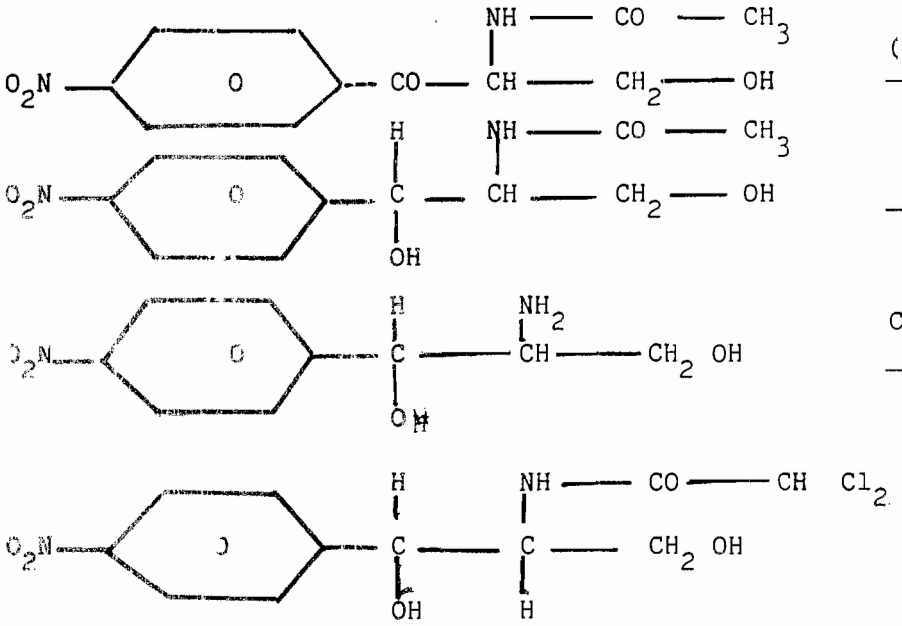
A.6. Réduction de l'azide en chloramphénicol.



D (-) thréo - 1 p. nitrophényl - 2 dichloroacétaminopropanediol 1,3.

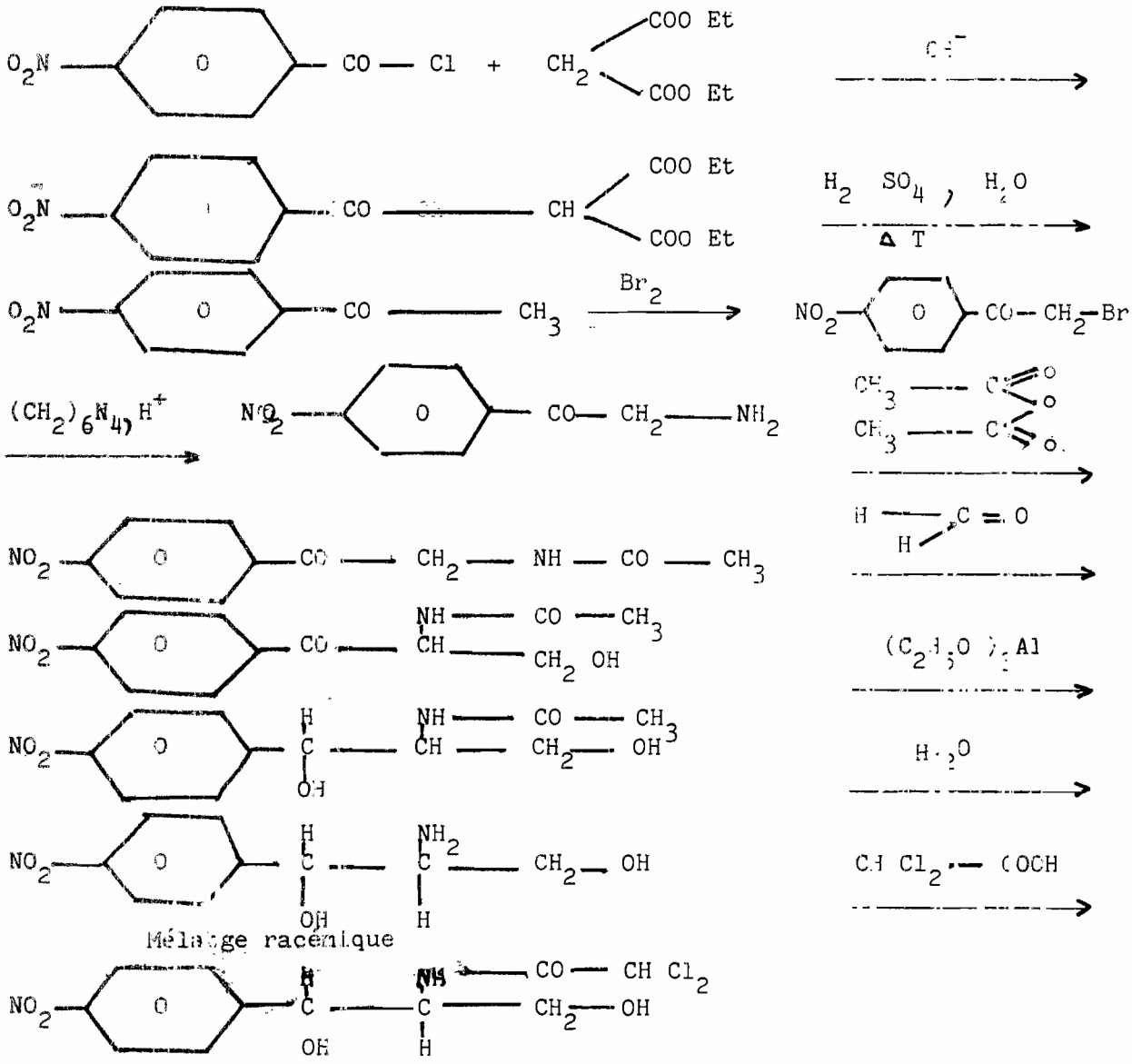
B. 2ème méthode (9)





C. 3ème méthode de synthèse.

On part du chlorure de l'acide para nitro benzoïque sur lequel on fait agir du malonate d'éthyl en milieu alcalin.



## 2.4. Propriétés physico-chimiques.

Le chloramphénicol se caractérise par la présence d'un groupement - $NO_2$ en position para sur le cycle benzénique d'une chaîne à 3 atomes de carbone dont la configuration stéréochimique permet de rendre compte de l'activité antibiotique. L'estérification du chloramphénicol par des acides gras, donne des esters vendus dans le commerce : palmitate de chloramphénicol, succinate de chloramphénicol, etc...

La synthèse du chloramphénicol palmitate s'effectue en estérifiant le chloramphénicol par le chlorure d'acide palmitique en présence de pyridine et d'un excès d'acide sulfurique dilué comme catalyseur.

Le chloramphénicol se présente sous la forme d'une poudre blanche, très amère, très peu soluble dans l'eau (2,5 mg/ml à 25° c). Il est stable aux températures ordinaires entre pH 2 et 10. Il est soluble dans les solvants organiques. On peut le donner per os, sans craindre qu'il soit altéré dans le tube digestif (6). Le poids moléculaire est de 323.14. L'analyse élémentaire du chloramphénicol donne :

C : 40,88% ; H : 3,74% ; Cl : 21,95%

N : 8, 67% ; O : 24,76% (2)

$[\alpha]_D^{27}$ : + 18,6° ( C = 4,86 dans l'éthanol)

$E_{1\ cm}^{1\%}$ : 298 à 278 nm

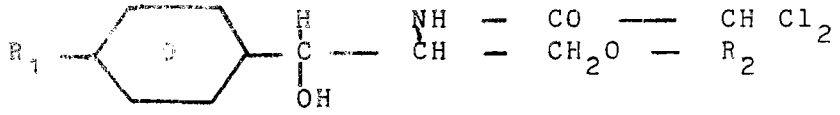
Le palmitate de chloramphénicol commercial est inactif in vitro; les estérases et les lipases de l'organisme libéreront le chloramphénicol. Le poids moléculaire du chloramphénicol palmitate est de 561.14.
Son analyse élémentaire indique la composition suivante :

C : 57,75% ; H : 7,54% ; Cl : 12,63%
N : 4,95% ; O : 17,10% (11).

$[\alpha]_D^{26}$ : + 24.6° (C = 5 dans l'éthanol).
L'absorption maximale est 271 nm.

$E^{1\%}_{1cm}$ : 179 dans l'éthanol (11).

Il est moins soluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (10). La formule générale du chloramphénicol et ses dérivés est la suivante :



Le tableau N°1 précise la nature des radicaux $R_1$ et $R_2$ du chloramphénicol et ses dénominations communes internationales (D C I) et commerciales.

Chloramphénicol et ses esters (6)

| | | | Nature chimique | |
|---|---|---|---|---|
| D C I | Dérivés | Dénominations | $R_1$ | $R_2$ |
| Chloramphénicol ou Chloromycetin | - | Tifomycéteine | $NO_2$ , | H |
| | Succinate | Solnicole Erée | $NO_2$ , | $CO-(CH_2)_2-COOH$ |
| | palmitate | Tifomycetine | $NO_2$, | $CO-(CH_2)_{14}-COOH$ |

Le chloramphénicol palmitate ne présente pas l'amertume du chloramphénicol, ce qui permet son utilisation en sirop chez l'enfant.

Le succinate du chloramphénicol en raison de son caractère hydrosoluble pourra être administré par voie parentale (intraveineuse, intramusculaire, intrarachidien).

2.5. Mécanisme d'action.

Le chloramphénicol est bactériostatique (12). Il agit par inhibition des synthèsesprotéiques au niveau du ribosome. Lorsqu'on ajoute une concentration inhibitrice du chloramphénicol à une culture bactérienne, les synthèses protéiques s'arrêtent; des preuves directes en ont été obtenues par analyse biochimiques (12). Des expériences en système cellulaire l'ont confirmé (12).

On n'a pu démontrer que le chloramphénicol se fixe sur la fraction 50S de s ribosomes bactériens. On admet ainsi que le site d'action du chloramphénicol se trouve sur le ribosome, et plus vraisemblablement au niveau de la partie 50S, mais sa nature exacte reste inconnue. On admet également que le chloramphénicol empêche l'ARN-m de se fixer sur les ribosomes et surtout inhibe la transférase qui permet aux acides aminés codés de se combiner en polypeptides (2);

2.6. Spectre antibiotique.

Il est très large ( C.M.I : 1 à 4 mg/ml). Le chloramphénicol est essentiellement bactériostatique, son pouvoir bactéricide ne s'exerce qu'à très fortes doses et sur certains germes seulement. Mais son spectre bactériostatique est très large puisqu'il englobe les bacilles gram négatifs, les COCCI (y compris les méningocoques et les gonocoques),les germes du groupe coli - thyphique , les rickettsies et certains virus.

2.7. Mode d'administration et posologie.

Le chloramphénicol est utilisé contre les infections pulmonaires, intestinales à Solmonella (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes), shingellas, staphylocoques rickettsies, en cas de choléra, coqueluche, diphtérie, blénnoragie, méningite purulente

La diffusion vers les tissus est bonne en général mais le chloramphénicol se concentre fortement dans le lymphe où le taux dépasse celui du sang. C'est à cette propriété qu'il doit sa supériorité sur les autres antibiotiques dans le traitement de la typhoïde car il peut ainsi exercer son activité optimale dans les repaires adenoïdiens mesentériques.

L'élimination se fait essentiellement par le rein (80 à 90 pour cent), le reste est éliminé par la bile, mais sous forme d'un dérivé nitré inactif.

Le chloramphénicol se distribue dans de nombreux territoires de l'organisme : cerveau, liquide pleural, d'ascites, synovial, le lymphe, le sang placentaire, le lait (6).

La voie buccale est de loin la plus utilisée. Chez l'adulte la dose est habituellement per os de 6 à 8 gellules de 250 mg par jour. Chez l'enfant, la dose est de 0,05 g à 0,100 g par kg et par 24 heures; il peut être ici commode de prescrire la poudre aromatisée (palmitate de chloramphénicol) dont quatre mesures correspondent à 0,25 g de chloramphénicol. De toutes façons, le chloramphénicol doit être réservé au traitement des infections contre lesquelles il est spécifiquement nécessaire (typhoïde, certains méningites pirulentes).

2.8. Accidents sur la détermination de certaines constantes biologiques.

Le chloramphénicol et ses esters sont biotransformés par glucuroconjugaison au niveau du foie. On sait que de nombreuses substances sont métabolisées dans le foie et que les deux principaux types de réactions responsables de processus de détoxication sont représentées par des réactions dites de conjugaison (3).

Chez l'organisme adulte, la majeure partie du chloramphénicol (C A P) administré est inactivé dans le foie par glucuroconjugaison: C A P + Acide U.D.P-glucuronique $\xrightarrow{\text{glucuronyl transférase}}$ C A P - glucuroconjugué + U.D.P..

La conjugaison à l'acide glucuronique fournit des composés organiques acides de pKa variant de 3 à 5, donc ionisés au p H physiologique et très hydrosolubles. Ces composés qui, de plus, ont généralement perdu toute action pharmacologique sont éliminés par l'urine, la bile ou simultanément par les deux voies.

2.9. Accidents hématologiques et de lyse bactérienne.

A fortes doses, le chloramphénicol entraîne une anémie sévère avec reticulocytopénie, erythropénie aiguë et vacuolisation des erythroblastes jeunes.

Ces anomalies semblent directement proportionnelles aux taux sanguins obtenus, elles peuvent être favorisées par une insuffisance rénale: elles relèveraient d'un mécanisme identique à celui de l'effet antibiotique (6).

Le danger réel du chloramphénicol est de déclencher un pancytopénie par aplasie de la moelle osseuse. Il s'agit d'un accident très grave avec un taux de mortalité de 50 à 80%.

Des accidents du collapsus vasculaire fréquemment fatals ont été observés en début du traitement de typhoïde pour des doses excessives du chloramphénicol (7).

Les malades mouraient des endotoxines libérées, contre lesquelles l'antibiotique est inactif. Chez le nouveau-né, surtout prématuré, on a observé des accidents toxiques mortels : syndrome gris (toxicité néonatale). Cet accident mortel est lié à une accumulation sérique du chloramphénicol à une posologie trop élevée et à l'immaturité hépatique et rénale.

Après quelques jours de traitement, les principaux signes sont les vomissements, le refus alimentaire, les selles verdâtres, l'hypotonie, l'hyperthermie. Cet accident s'observe encore lors d'un traitement par le chloramphénicol chez la mère en fin de grossesse.

Le chloramphénicol, employé de façon prolongée (plusieurs mois) est responsable de nevrite optique.Le fond d'oeil peut montrer des modifications de la pupille, la regression survient après suspension du médicament.

2.10. Interférences médicamenteuses.

Compte tenu de la toxicité propre du chloramphénicol qui en limite l'emploi, l'existence d'interactions avec certains médicaments rend souhaitable autant qu'il est possible le choix d'un autre antibiotique.

Le chloramphénicol diminue la production de vitamine K par les bactéries intestinales. De plus, il inhibe directement le métabolisme des anticoagulants coumariniques en inhibant les enzymes microsomales hépatiques. Il en résulte une potentialisation marquée des anticoagulants (6).

Le chloramphénicol peut interférer avec la maturation des erythrocytes chez un grand nombre de sujets traités par ce médicament.

En cas d'anémie pernicieuse la réponse au traitement par la vitamine $B_{12}$ est insuffisante si le chloramphénicol est administré.

Les antibiotiques bactéricides et bactériostatiques ne doivent pas normalement être associés. Un antibiotique bactériostatique comme le chloramphénicol peut inhiber l'action bactéricide de la pénicilline. Si cette association est absolument nécessaire, il faut d'une part être certain que les doses adéquates de chacun de ces médicaments sont données, d'autre part, administrer si possible la pénicilline quelques heures avant le chloramphénicol.

## CHAPITRE 3 -PARTIE EXPERIMENTALE.

### 3.1. Méthodes d'analyses.

L'analyse élémentaire d'une substance de nature complexe consiste à identifier ses constituants puis établir les proportions en pourcentage de chacun des éléments constitutifs pour en établir la formule.

Sa pureté est établie en déterminant ses constantes physico-chimiques : densité, température de fusion, d'ébullition, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, constante dielectrique, spectre I R, UV, etc...

Nous avons commencé dans notre travail à faire une microanalyse du chloramphénicol en utilisant des quantités faibles de substances solides ou liquides. Nous avons employé des réactions de grande sensibilité permettant de faire une identification du produit chloramphénicol.

Durant l'analyse, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince et la chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C), une technique bien connue dans l'analyse chimique moderne.

#### 3.1.1. Réaction de détection des ions chlorures.

Dans une creuset de porcelaine, introduire 50 mg de chloramphénicol et 0,5 g de carbonate de sodium anhydre. Chauffer dans la flamme pendant 10 minutes, puis laisser refroidir, ensuite le résidu est mis en solution avec 5 ml d'acide nitrique dilué.

A un ml de filtrat obtenu précedemment, ajouter un ml d'eau et 0,4 ml de solution de nitrate d'argent. Il se forme un précipité blanc caillebotté; celui-ci est mis en suspension dans 2 ml d'eau et 1,5 ml d'ammoniaque(13).

1.2. Mesure de la température de fusion.

La température de fusion a été mesurée en utilisant la méthode du tube capillaire puis un microscope Reichert Thermovar - [illegible] chauffant Kofler de marque REICHERT-JUNG (Ostern - [illegible] Deutches Pat 815.706). L'étalonnage du système Kofler a été efectué avec les substances suivantes dont les points de fusion sont indiqués ci-après :

| | |
|---|---|
| Ozobenzène | 68° C |
| Benzile | 95° C |
| Acétanilide | 114,5° C |
| Phénacétine | 134,5° C |

La détermination du point de fusion du chloramphénicol provenant de l'ONAPHA a été effectuée immédiatement. Les échantillons dechloramphénicol provenant de différentes pharmacies contiennent des excipients. Dans des gellules, on trouve le talc et la lactose.

Le palmitate vendu sous forme de sirop contient comme excipients le propylèneglycol, carboxymethyl cellulose sodique, le cyclamate du sodium qui est cancérigène, l'essence de groseille. Pour extraire la poudre des sirops, nous avons mis 20 ml de sirop dans 1000 ml d'eau. Après avoir filtré la solution, nous avons séché le précipité à l'air libre.

1.3. Détermination du p H.

Pour déterminer le pH, le chloramphénicol est mis en solution. On ajoute 50 mg de chloramphénicol avec 10 ml d'eau fraichement bouillie et refroidie. Pour le chloramphénicol palmitate vendu sous forme de sirop, on prend 20 ml de sirop avec 10 ml d'eau. Le pH a été mesuré avec un pH - mètre C G 818 T SCOTT Geräte étalonné avec deux tampons pH = 4 et 7.

1.4. Perte à la dessication.

La perte de masse par dessication est la perte de masse exprimée en pourcentage m/m. Déterminée à l'étuve à 130° C, pour 1,00 g de chloramphénicol, la perte à la dessication n'était pas supérieure à 0,5 pour cent. Pour le chloramphénicol palmitate, l'étuve était mise à 45° C car à 103° C, la palmitate se décompose en se fondant.

1.5. Le pouvoir rotatoire spécifique.

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présentent certaines substances de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée. Pour déterminer le pouvoir rotatoire spécifique du chloramphénicol, on dissout 1,5 g du chloramphénicol dans 25 ml d'éthanol absolu. Pour trouver une solution claire provenant des sirops on ajoute 25 ml de sirop dans 100 ml d'éthanol. On laisse reposer, puis les mesures sont effectuées sur la solution obtenue.

1.6. Le chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince constitue une méthode d'analyse chimique devenue, indispensable pour l organicien, le pharmacien et le biochimiste.

Elle est utilisée pour l'analyse des médicaments et des drogues. Grâce à sa rapidité d'exécution; elle constitue une méthode idéale qui permet souvent de sauver des vies lorsqu'on supçonne un empoisonnement. Elle rend de précieux services au pharmacien dans le contrôle de pureté et dans l'analyse rapide des médicaments.

Elle est utilisée pour l'analyse qualitative pour déterminer le nombre des constituantsdans un mélange inconnu. On l'emploie également pour l'analyse quantitative pour déterminer les proportions exactes de chacun des constituants du mélange.

Pour l'analyse du chloramphénicol, nous avons dissous 0,1 g dans l'acétone et pour l'analyse du palmitate, nous avons mélangé 5 ml de sirop avec 100 ml d'acétone. Nous avons opéré par chromatographie sur couche mince en utilisant une plaque préparée de gel de silice 60 $F_{254}$ (marque Merck). Nous avons déposé les solutions par taches circulaires de 2 mm à 6 mm de diamètre à 1,5 cm de bord inférieur de la plaque à l'aide d'une micropipette.

Après l'évaporation complète du solvant, les plaques ont été placées dans une cuve de développement contenant un mélange de 90 ml de chloroforme, de 10 ml de méthanol et 1 ml d'eau.

L'atmosphère à l'intérieur de la cuve est préalablement saturée de solvant. Les parois de la chambre sont tapissés avec du papier filtre humecté avec la phase mobile. Après quelques temps, celle-ci monte et dépasse la ligne de départ.

Quand le front du solvant a parcouru une distance de 15 cm à partir de la ligne de départ, la plaque est retirée et mise à sécher. Les taches sont observées à l'aide d'une lampe U.V, puis marquées à leurs centres. La distance entre ces derniers et la ligne de départ est mesurée. Pour chaque composant, on mesure la vitesse de migration dans un système de solvant donné à l'aide de $R_F$ défini par la formule suivante pour une température donnée (14.)

$$R_F = \frac{\text{Distance parcourue par la substance.}}{\text{Distance parcourue par le front.}}$$

Une seule tache a été obtenue pour les deux formes de chloramphénicol.

1.7. La chromatographie en phase liquide à haute performance.

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique de choix pour le contrôle automatique de la composition quantitative des mélanges à séparer et l'analyse des traces et des impuretés.

L'échantillon est injecté à l'aide d'une micro-seringue dans une valve d'injection où il rencontre la phase mobile.

Durant l'analyse, la phase mobile évolue dans la colonne tout en entraînant la substance à séparer. En quittant la colonne, les composants entrent dans le détecteur qui donne un signal pour chaque composant. Le signal est amplifié, puis enregistré sur papier avec un enregistreur X - Y en fonction du temps (voir figure N°1).

Lorsque tous les facteurs déterminant l'analyse sont maintenus constants, le composé est identifié en utilisant le temps de retention; c'est à dire le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic donné.

La surface sous un pic, mesurée avec un planimètre est proportionnelle à la quantité de substance éluée. La comparaison du temps de retention et l'aire d'un pic d'un composé présent dans l'échantillon avec ceux d'un standard injecté à une concentration connue permet d'estimer la quantité présente dans l'échantillon.

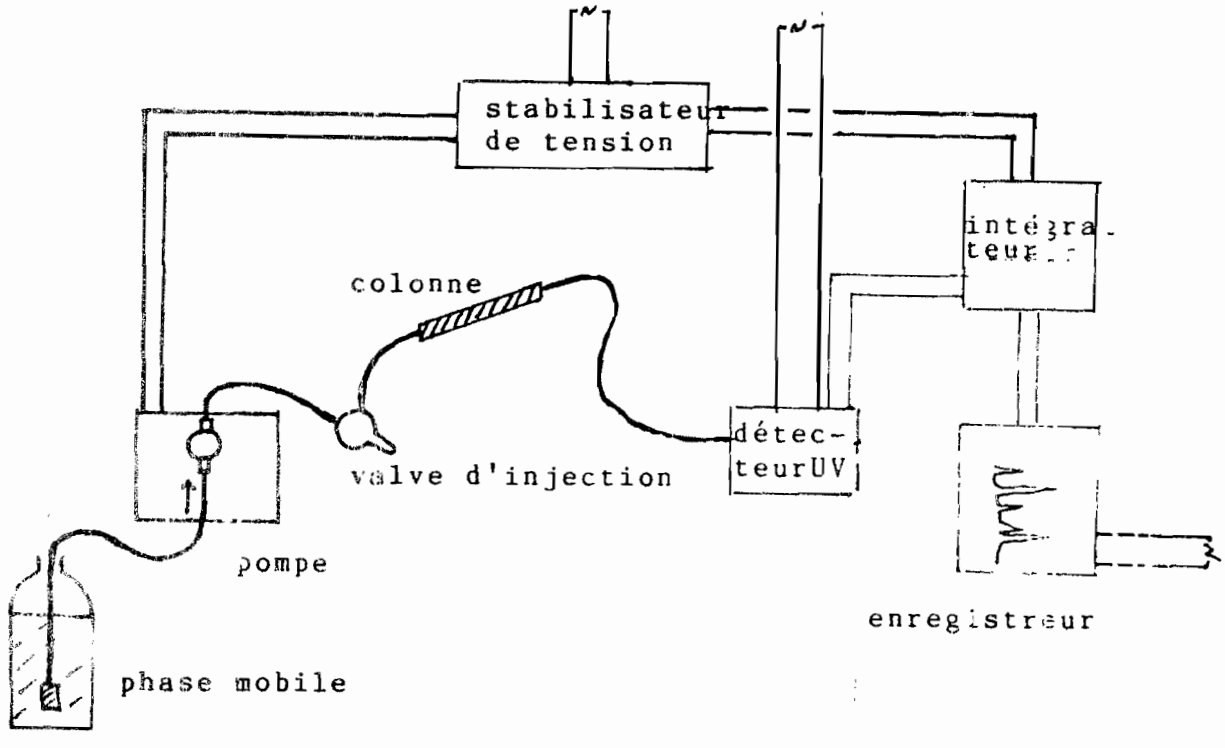
La pureté du chloramphénicol a été déterminée par la chromatographie en phase liquide à haute performance avec une colonne $C_{18}$ Ubandopak et un éluant composé du méthanol et d'eau dont la proportion était de 60/40. Le volume injecté était de 20 ml avec une vitesse d'élution de 0.7 ml/min. La concentration était de 25.10 mg/ml. Pour le chloramphénicol palmitate provenant de différentes pharmacies, il a été ajouté 1 ml de sirop (2.5%) dans 1.000 ml d'acétone. Avant l'injection, l'échantillon a été filtré.

1.8. Spectres U.V.

Le chloramphénicol a été également analysé par spectrophotométrie (U.V.) à l'aide d'un spectrophotomètre Bausch et Lomb spectronic 21. U.V.D. Une recherche de la longueur d'onde maximale à laquelle se fait l'absorption a été effectuée avant de passer à l'analyse par HPLC. Nous avons pris une concentration de 31, 25 $10^{-4}$ mg/ml de chloramphénicol.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

FIGURE N° 1 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UN H P L C



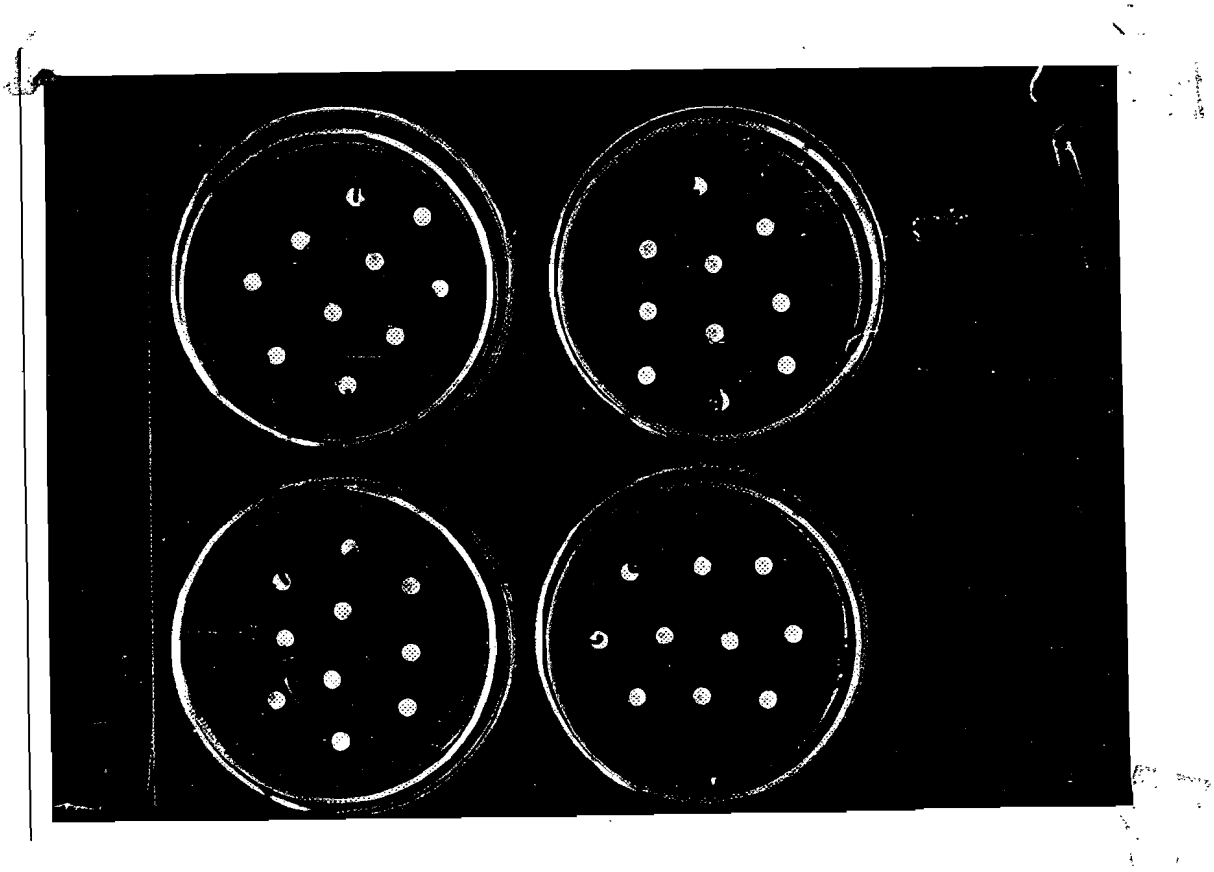
1.9. Détermination de l'activité du chloramphénicol.

Le test dont il est question ici est un test appliqué à une espèce de bactéries du genre Bacillus mégaterium.

La méthode emploie la technique de mesure du diamètre d'inhibition utilisée pour l'étude de la résitance aux antibiotiques : des petits disques de papiers buvard d'un diamètre de 6.0 mm sont imprégnés de différents antibiotiques jusqu'à l'évaporation complète du solvant. Les disques sont alors placés sur un milieu de culture (P.C.A.) ensemencé auparavant avec une suspension très dense de la bactérie. Les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24 heures.

Les diamètres d'inhibition sont fonction de la quantité d'antibiotique présente par disque (Fig. N°2). Figure N°2

Schéma de principe pour la détermination de l'activité de l'antibiotique.



Mode opératoire

Préparer les solutions du chloramphénicol 0.125 g/l; 0.06250 g/l; 0.03125 g/l dans l'acétone. Mise en évaporation de 1 ml avec 20 papiers buvards.

Mettre dans une boîte de Pétri 15 ml, d'une solution de peptone de caséine 5,0 g, un extrait de levure 2,5 g, D-glucose 1,0 g, 14,0 g d'agar, 1000,0 ml d'eau distillée (P C A) avec 0,4 ml d'une solution contenant le Bacillus mégaterium.

Mettre au frigo les boîtes de Pétri pendant 3 heures, puis 24 heures dans l'étuve à 37° C.

Mesurer la zone d'inhibition.

## 2. Les résultats expérimentaux.

### 2.1. Températures de fusion.

Le tableau N°2 donne les températures de fusion mesurées avec le microscope Reichert Thermovar.

| Essais | Chloramphénicol poudre fourni par l'ONAPHA | Palmitate poudre fourni par l'ONAPHA | Gellules provenant des pharmacies | Sirop provenant des pharmacies |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 149° C | 86° C | 148° C | 85° C |
| 2 | 152° C | 88° C | 146° C | 86° C |
| 3 | 150 C | 86° C | 149° C | 85° C |
| 4 | 149° C | 86° C | 150° C | 88° C |
| 5 | 151° C | 85° C | 150° C | 86° C |
| Valeur la plus probable | 151 ± 1° C | 86 ± 1° C | 149 ± 1° C | 86 ± 1° C |

Les résultats obtenus avec le banc chauffant KOFLER.

Chloramphénicol fourni par l'ONAPHA : 150° C ± 1° C.
Chloramphénicol (gellules) vendu à BUJUMBURA : 150° C ± 1° C
Chloramphénicol palmitate fourni par l'ONAPHA : 88° C ± 1° C
Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA : 88° C ± 1° C.

### 2.2. Détermination du pH à 28,4° C

Les valeurs du pH déterminées sont les suivantes (à 28,4° C) :
Chloramphénicol fourni par l'ONAPHA : 6,10 ± 0,01
Chloramphénicol (gellules) vendu à BUJUMBURA : 6,15 ± 0,01
Chloramphénicol palmitate fourni par ONAPHA : 7,21 ± 0,01
Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA : 7,28 ± 0,01

U.B

2.3. Perte à la dessication

Le tableau N°3 donne la perte à la dessication.

| Essai | Chloramphénicol en poudre fourni par l'ONAPHA | Chloramphénicol palmitate en poudre fourni par ONAPHA | Gellules de différentes pharmacies | Poudre de sirop de différentes pharmacies |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.41 | 0.36 | 0.47 | 0.38 |
| 2 | 0.40 | 0.38 | 0.49 | 0.34 |
| 3 | 0.39 | 0.35 | 0.50 | 0.33 |
| 4 | 0.43 | 0.37 | 0.48 | 0.36 |
| 5 | 0.48 | 0.38 | 0.46 | 0.38 |
| Moyenne | 0.42 | 0.36 | 0.48 | 0.35 |

2.4. Le pouvoir rotatoire spécifique :

Les valeurs suivantes ont été relevées :

Chloramphénicol fourni par l'ONAPHA : $[\alpha]_D^{27}$ : + 18,5°

Chloramphénicol vendu à BUJUMBURA : $[\alpha]_D^{27}$ : + 19.0°

Chloramphénicol palmitate fourni par ONAPHA : $[\alpha]_D^{27}$ : + 25.0°

Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA $[\alpha]_D^{27}$ : + 25.5°

2.5. La chromatographie sur couche mince.

Le tableau N°4 donne les valeurs de $R_F$ de la chromatographie sur couche mince.

| Produits | Essais | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Moyenne |
| Chloramphénicol en poudre provenant de l'ONAPHA | 0.46 | 0.45 | 0.46 | 0.43 | 0.44 | 0.44 |
| Chloramphénicol (gellules)de différentes pharmacies | 0.40 | 0.41 | 0.40 | 0.42 | Q43 | 0.41 |
| Chloramphénicol palmitate en poudre provenant de l'ONAPHA | 0.76 | 0.75 | 0.78 | 0.80 | 0.77 | 0.77 |
| Chloramphénicol palmitate de différentes pharmacies (sirop) | 0.71 | 0.73 | 0.72 | 0.70 | 0.77 | 0.72 |

2.6. Spectre U.V.

La figure N°3 donne le spectre U.V. relevé pour le chloramphénicol. La figure N°4 donne celui du palmitate.

2.7. Chromatogramme HPLC

Les figures N° 5, 6 et 7 donnent les chromatogrammes HPLC obtenus pour les dérivés du chloramphénicol.
La figure N°10 compare ces chromatogrammes.

2.8. Détermination de l'activité du chloramphénicol.

Les figures N°8 et 9 sont des courbes donnant le diamètre de la zone d'inhibition en fonction du logarithme de la dose du chloramphénicol par disque. Les courbes sont obtenues avec une culture de Bacillus mégaterium.

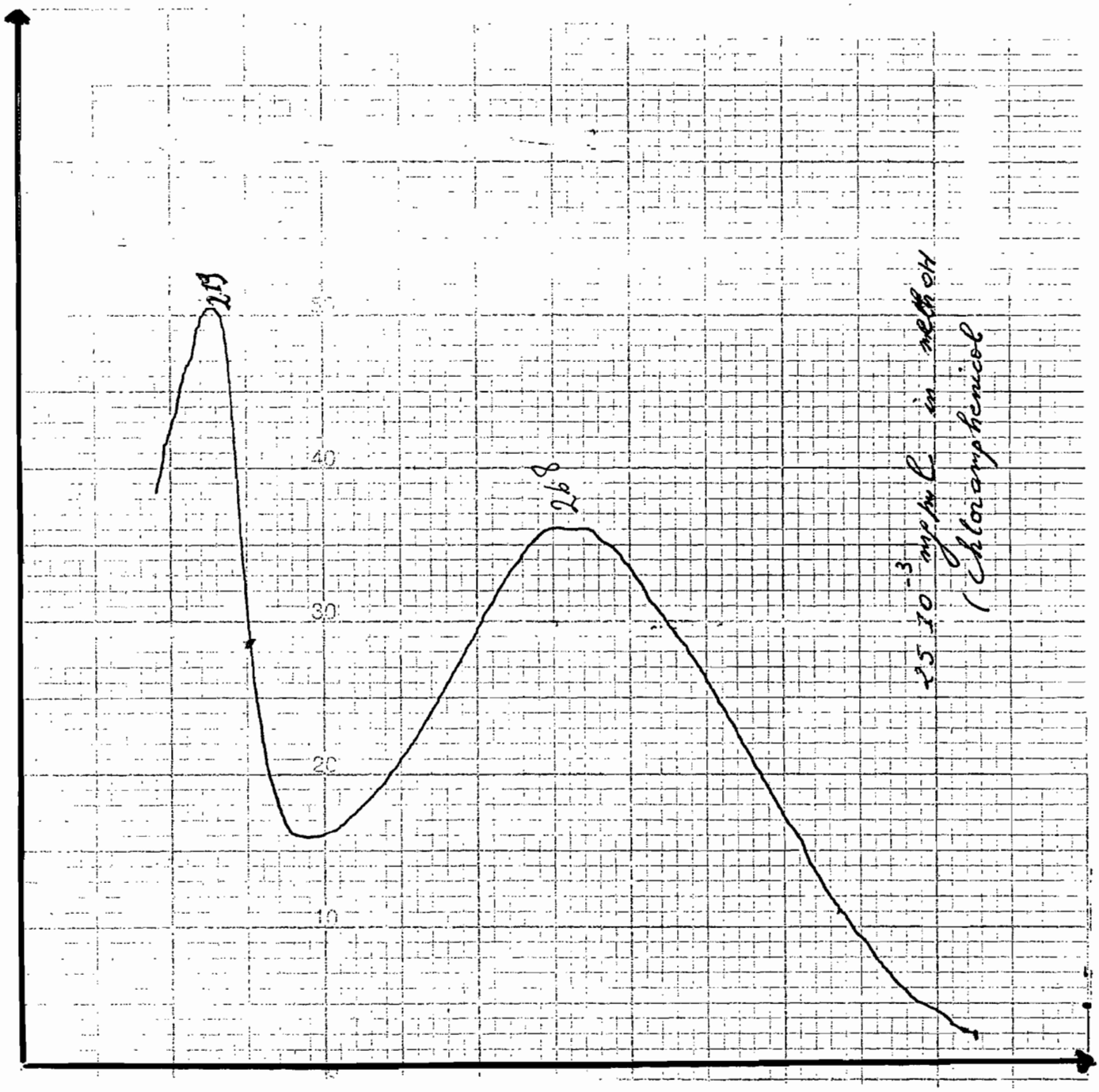



Fig. 3 - Spectre U.V. du Chloramphénicol

Longueur d'ondes (nm)

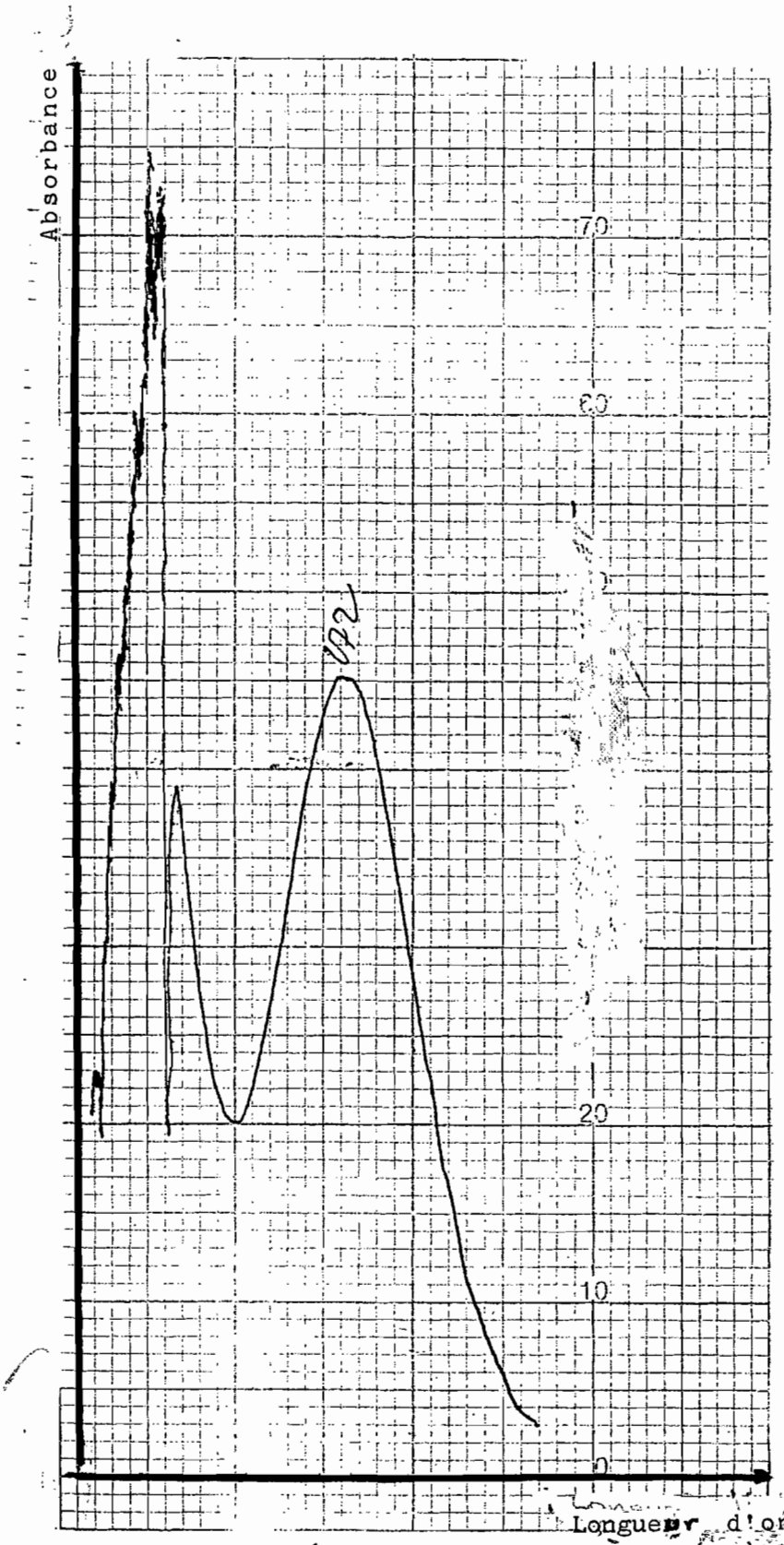



Fig. 4 - Spectre du Chloramphénicol palmitate

Fig. 5 - Chromatogramme H P L C du Chloramphénicol palmitate sans excpient

Colonne : $C_{18}$ Mbondapak

Vitesse : 0.7 ml/mm

Eluant : $H_2O/CH_3OH$ 60/40

Volume injecté : 20 ml

Concentration : $25 \cdot 10^3$ mg/ml

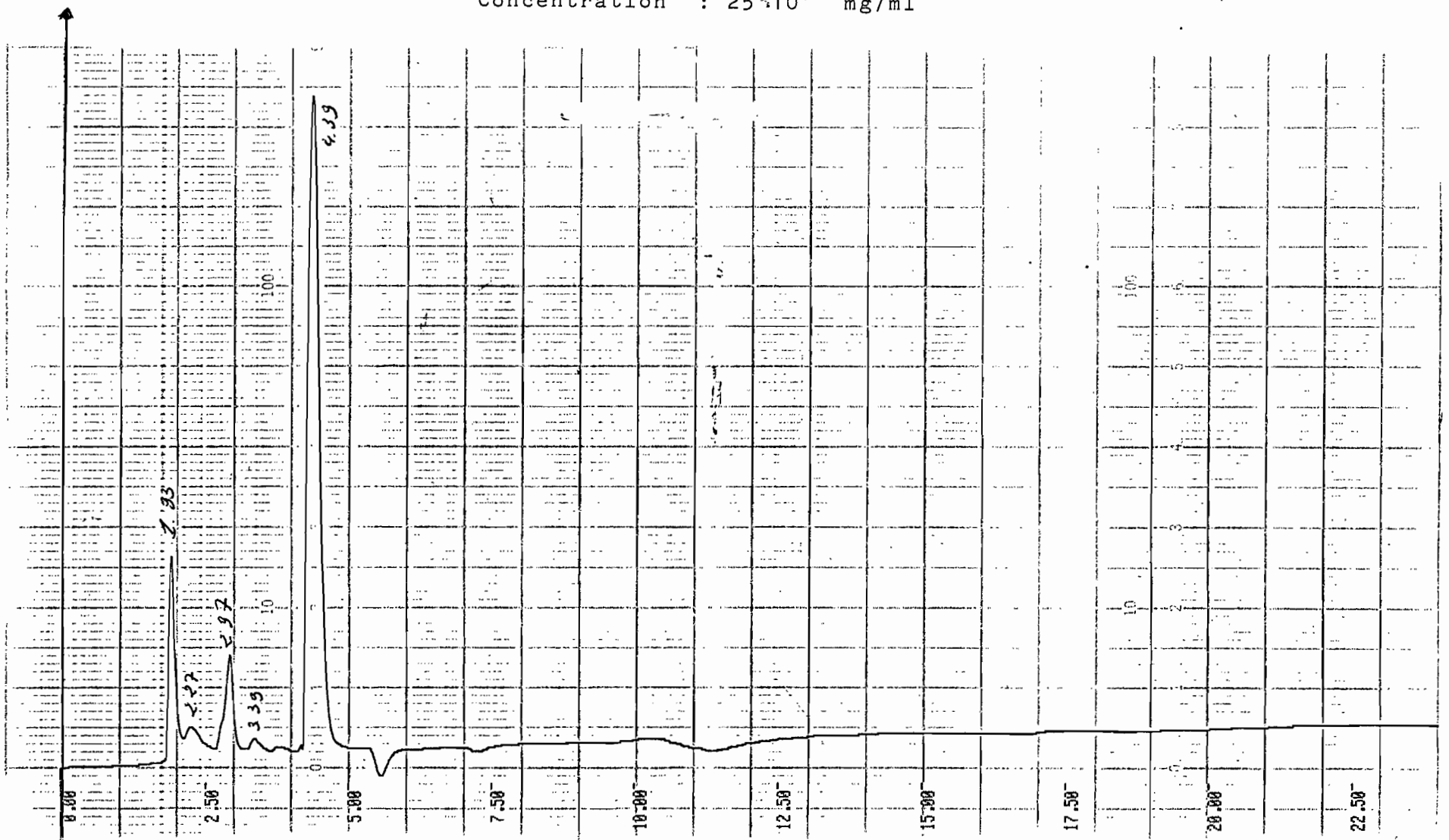
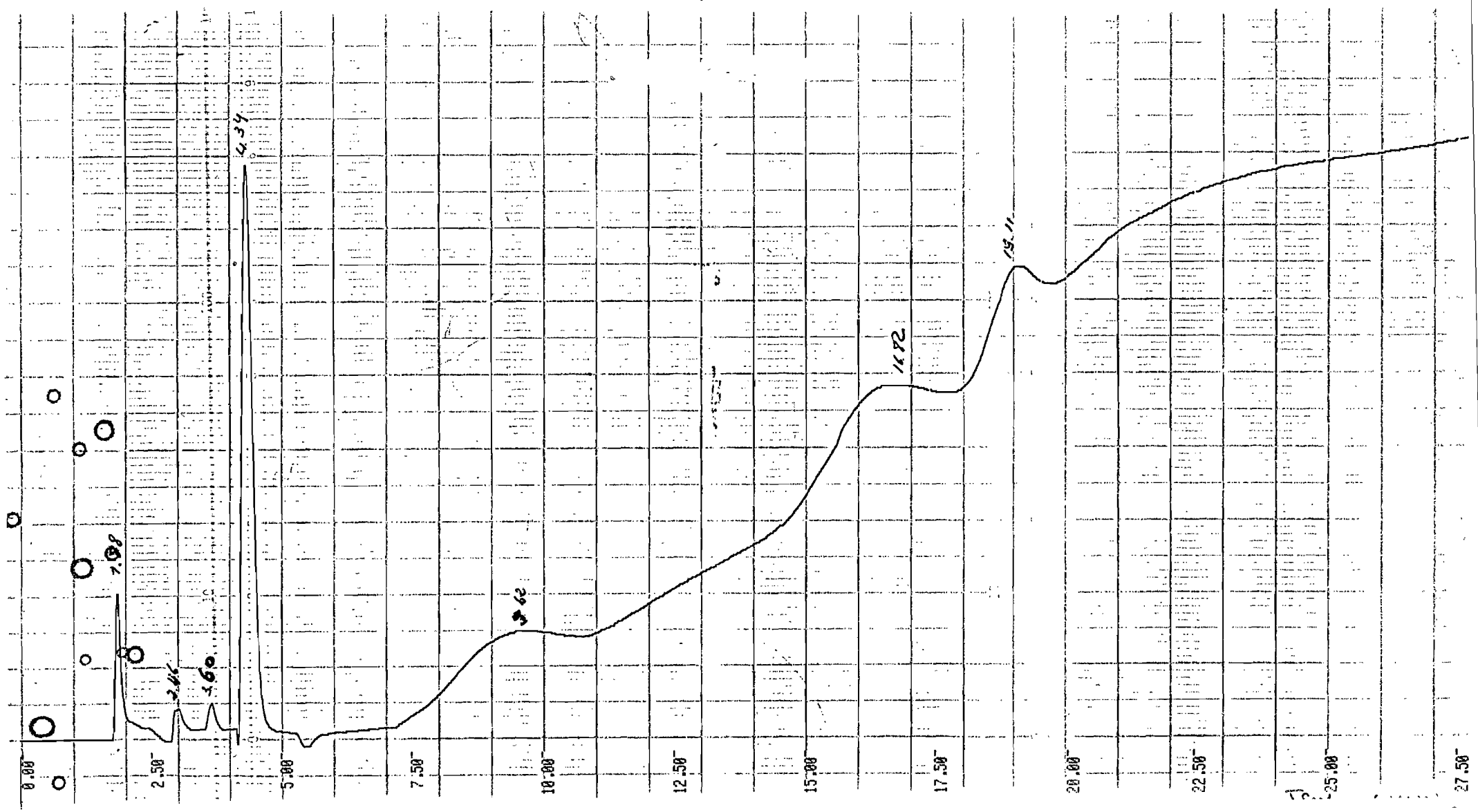


Fig. 6 - Chromatogramme H P L C du Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA.



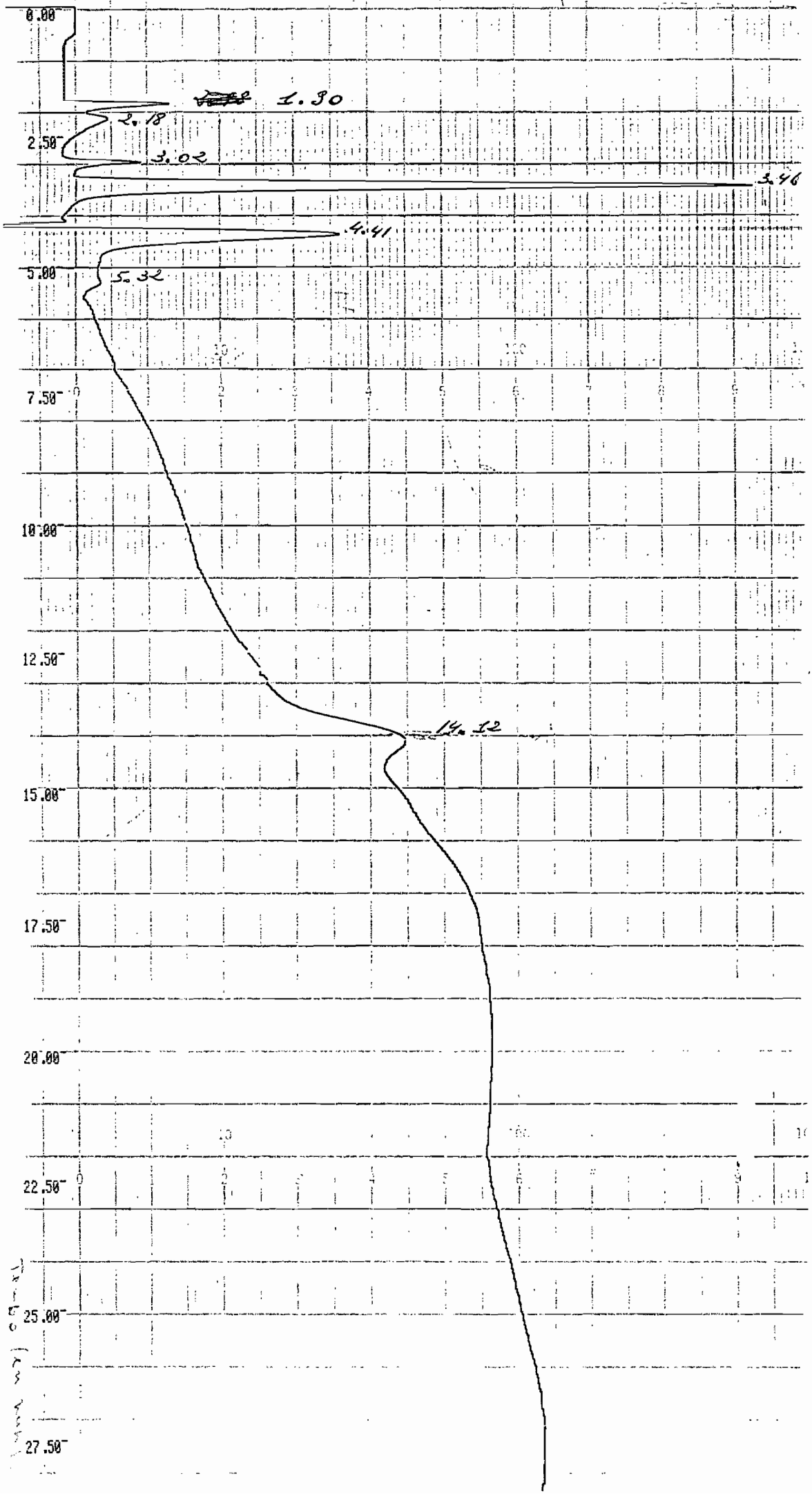



Fig. 7 - Chromatogramme H P L C du Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA.

| Type d'analyse | Date | Dose | Ø zone | dose calc | % act. | s | d1 | d2 | d3 | d4 | d5 | d6 | d7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Chloramphenicol base | 18. 8.87 | ,03125 | 6,14 | ,03072 | 1,01 | ,45 | 20,0 | 19,5 | 15,5 | 16,0 | 18,0 | 18,0 | 19,0 |
| Chloramphenicol base | 18. 8.87 | ,06250 | 7,97 | ,06746 | | 1,43 | 21,0 | 20,0 | 21,5 | 20,0 | 23,5 | 23,5 | 22,0 |
| Chloramphenicol base | 18. 8.87 | ,12500 | 9,17 | ,12196 | | 1,21 | 25,0 | 24,0 | 23,0 | 21,5 | 25,0 | 24,0 | 25,5 |
| C.A.P vendu à Buja | 18. 8.87 | ,03125 | 5,89 | ,02726 | ,88 | 1,59 | 20,0 | 17,0 | 20,0 | 18,0 | 18,0 | 20,0 | 20,0 |
| C.A.P vendu à Buja | 18. 8.87 | ,06250 | 7,48 | ,05642 | | 1,05 | 21,5 | 21,5 | 21,5 | 20,0 | 20,0 | 22,0 | 21,5 |
| C.A.P vendu à Buja | 18. 8.87 | ,12500 | 8,65 | ,09624 | | 1,64 | 24,0 | 25,0 | 26,5 | 24,5 | 22,5 | 23,5 | 23,0 |
| Palmétate ONAPHA | 18. 8.87 | ,03125 | 5,76 | ,02590 | ,78 | 1,09 | 18,5 | 19,0 | 18,5 | 15,5 | 16,0 | 18,0 | 17,5 |
| Palmétate ONAPHA | 18. 8.87 | ,06250 | 7,19 | ,04950 | | 1,81 | 20,5 | 20,5 | 20,5 | 20,5 | 19,0 | 23,0 | 23,0 |
| Palmétate ONAPHA | 18. 8.87 | ,12500 | 8,53 | ,09092 | | 1,47 | 24,0 | 23,5 | 22,0 | 24,0 | 23,0 | 24,0 | 25,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,03125 | 5,97 | ,02851 | ,91 | 1,00 | 18,0 | 16,0 | 16,5 | 19,0 | 19,0 | 18,0 | 19,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,06250 | 7,38 | ,05391 | | 1,13 | 20,5 | 20,0 | 21,0 | 20,0 | 21,0 | 20,0 | 22,5 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,12500 | 8,28 | ,08116 | | 1,56 | 21,5 | 23,0 | 24,0 | 20,0 | 24,0 | 22,0 | 23,5 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,03125 | 5,84 | ,02680 | ,20 | ,95 | 16,0 | 17,5 | 16,5 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,06250 | 7,75 | ,06393 | | 6,78 | 16,5 | 18,0 | 20,5 | 21,5 | 24,5 | 49,5 | 20,5 |
| Palmétate vendu à Buja | 18. 8.87 | ,12500 | 7,75 | ,06393 | | 4,44 | 15,5 | 18,0 | 19,5 | 19,5 | 19,0 | 25,5 | 25,0 |

| Type d'analyse | d8 | d9 | d10 | d11 | d12 | d13 | d14 | d15 | d16 | d17 | d18 | d19 | d20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Chloramphenicol base | 20,0 | 20,5 | 16,5 | 18,5 | 17,0 | 20,0 | 18,0 | 18,5 | 17,0 | 17,5 | 17,5 | 19,5 | 20,0 |
| Chloramphenicol base | 20,0 | 21,0 | 22,0 | 24,5 | 21,5 | 21,5 | 22,5 | 19,0 | 23,0 | 23,0 | 22,5 | 21,0 | |
| Chloramphenicol base | 25,5 | 23,5 | 25,0 | 25,0 | 26,0 | 25,0 | 25,5 | 25,0 | 23,0 | 25,0 | 22,5 | 23,5 | |
| C.A.P vendu à Buja | 20,0 | 16,0 | 18,0 | 18,0 | 16,5 | 18,0 | 17,5 | 18,0 | 16,0 | 15,0 | 16,0 | 16,0 | 17,0 |
| C.A.P vendu à Buja | 21,0 | 20,0 | 21,0 | 20,0 | 21,5 | 22,0 | 20,5 | 24,0 | 20,0 | 21,0 | 19,5 | 20,0 | 20,5 |
| C.A.P vendu à Buja | 24,5 | 26,5 | 22,5 | 23,0 | 23,5 | 23,5 | 20,0 | 24,0 | 23,0 | 21,5 | 22,0 | 21,5 | 21,5 |
| Palmétate ONAPHA | 19,5 | 16,0 | 17,5 | 18,0 | 16,5 | 17,5 | 18,0 | 17,0 | 17,0 | 16,0 | 18,0 | 19,0 | 18,5 |
| Palmétate ONAPHA | 23,0 | 20,5 | 20,0 | 21,0 | 23,0 | 22,0 | 19,5 | 18,5 | 18,0 | 16,5 | 20,5 | 18,5 | 19,5 |
| Palmétate ONAPHA | 23,0 | 21,5 | 21,5 | 24,0 | 25,0 | 24,0 | 25,0 | 24,0 | 21,0 | 22,5 | 23,0 | 21,0 | 20,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 19,5 | 18,0 | 17,0 | 17,5 | 18,0 | 19,0 | 18,0 | 16,5 | 17,0 | 19,0 | 18,0 | 18,0 | |
| Palmétate vendu à Buja | 22,5 | 19,5 | 20,5 | 20,0 | 20,5 | 21,5 | 22,5 | 19,0 | 19,0 | 21,0 | 21,5 | 22,5 | 20,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 25,0 | 26,0 | 20,0 | 21,0 | 23,0 | 21,0 | 22,0 | 23,0 | 23,0 | 23,0 | 23,5 | 22,0 | 23,5 |
| Palmétate vendu à Buja | 18,5 | 16,0 | 16,5 | 18,5 | 18,0 | 20,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 17,0 | 17,0 | 18,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 19,5 | 19,5 | 20,5 | 20,5 | 20,5 | 19,5 | 20,0 | 21,0 | 18,0 | 19,0 | 20,0 | 21,0 | 20,0 |
| Palmétate vendu à Buja | 22,5 | 21,5 | 19,5 | 23,5 | 24,5 | 25,0 | 24,5 | 24,0 | 23,0 | 24,5 | 25,0 | 23,5 | 7,0 |

Tableau N°5 - Résultats des mesures de diamètre d'inhibition d'écart type, de l'activité en fonction de la dose.

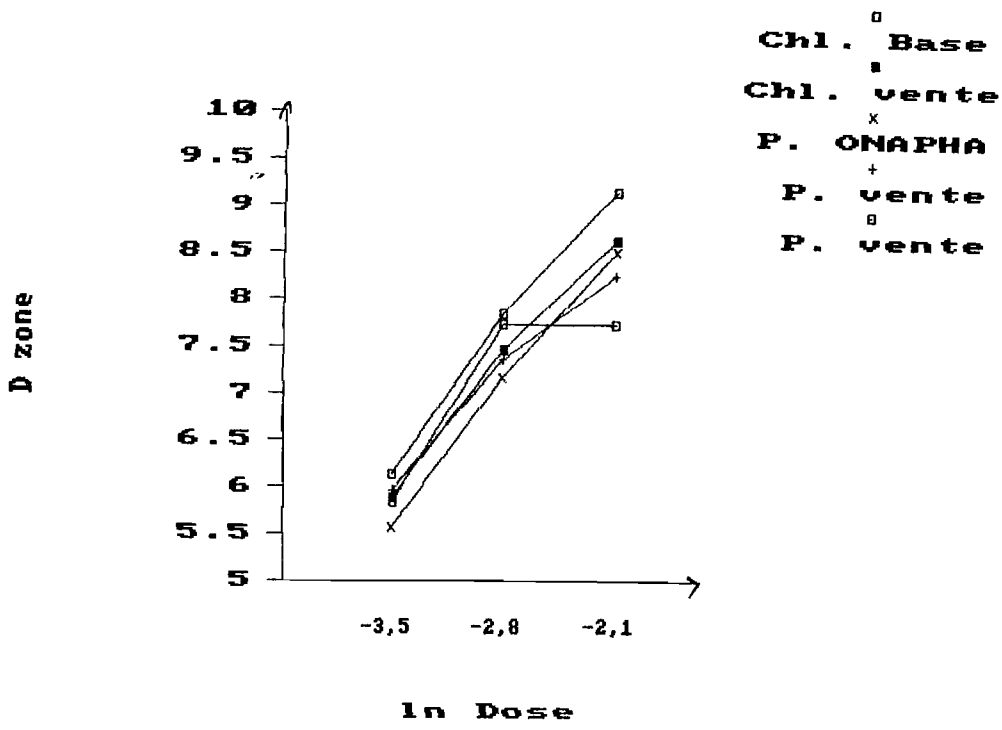



Fig. 8 - Courbes donnant le diamètre de la zone d'inhibition en fonction du logarithme de la dose du chloramphénicol et droite de régression.

Légende :

| | | |
|---|---|---|
| Chl. | : | Chloramphénicol |
| Chl.vente | : | Chloramphénicol (gellules) |
| P.vente | : | Chloramphénicol palmitate vendu à Bujumbura. |
| P. ONAPHA | : | Chloramphénicol " (en poudre fourni par l'ONAPHA. |
| Chl.base | : | Chloramphénicol en poudre fourni par l'ONAPHA. |

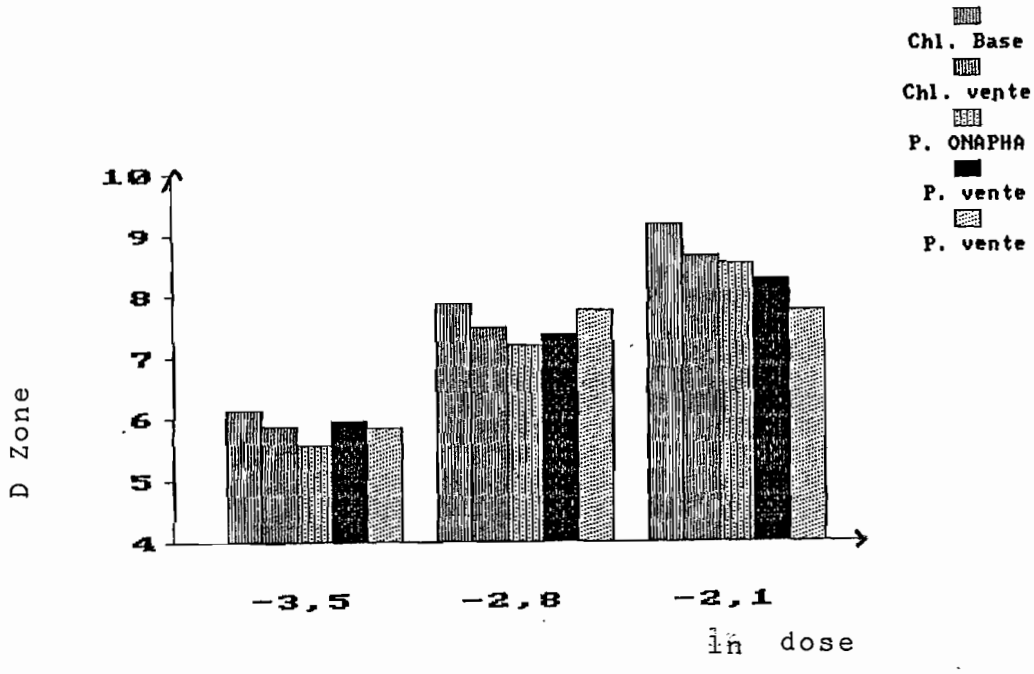



Fig. 9 - Courbes donnant le diamètre de la zone d'inhibition en fonction du logarithme de la dose du chloramphénicol.

## 3. Discussion des résultats

Le but de notre travail était de mettre au point une méthode rapide, sensible et pratique pour l'analyse du chloramphénicol vendu par l'ONAPHA et les différentes pharmacies. Nous avons eu recours à la détermination des constantes physiques, à la chromatographie sur couche mince, à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et à la détermination de l'activité.

### 3.1. Mesure de la température de fusion.

Nous avons commencé à déterminer la température de fusion du chloramphénicol avec la méthode du tube capillaire et le microscope Reichert. Les valeurs trouvées (tableau N°2) sont peu précises car cet appareil (microscope) n'était pas calibré.

Avec le système de banc de Köfler, nous avons trouvé une température de 150°C ± 1°C pour le chloramphénicol et de 88°C ± 1°C pour le chloramphénicol palmitate sur tous les dix essais effectués.

Une comparaison de notre valeur (150°C) avec celle de QUENTIN R.BARTZ (149.7 - 150.7°C) (2) montre que le chloramphénicol vendu à BUJUMBURA convient parfaitement pour les prescriptions médicales.

### 3.2. Détermination du pH

Nous avons mesuré les pH pour vérifier l'activité du chloramphénicol. Celui-ci perd son activité à un pH supérieur à 10.
La stabilité du chloramphénicol à différents pH à 25°C est connue (2).

| pH de la solution | activité en pourcentage |
|---|---|
| 0.40 | 100 |
| 2.15 | 100 |
| 7.00 | 100 |
| 9.56 | 100 |
| 10.82 | < 13 |

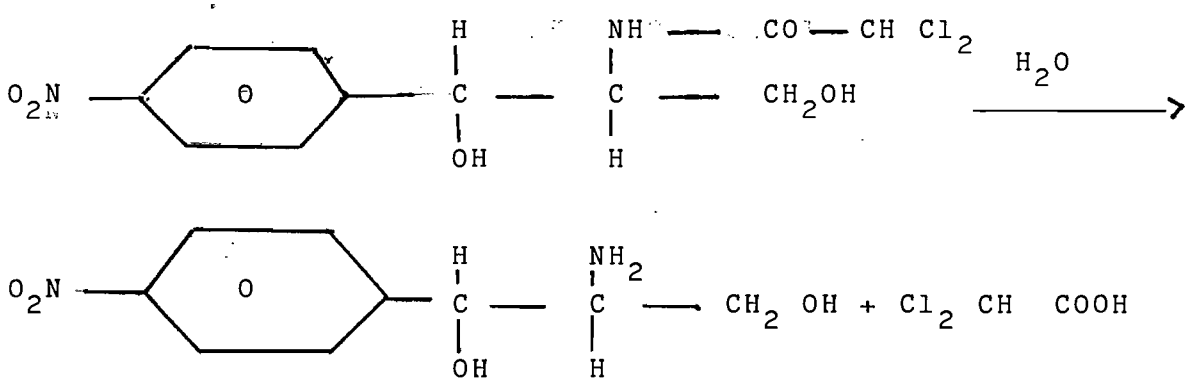
Le chloramphénicol devient inactif à 87 pour cent à un pH 10,82 en 24 heures à 25°C. Nous avons mesuré le pH à 27°C. Nous avons constaté que si nous faisons une correspondance entre le pH de la solution du chloramphénicol mesuré ( 6.10; 6.15; 7.21; 7.28) et l'activité en pourcentage, l'activité du chloramphénicol vendu à BUJUMBURA est autour de 100 pour cent.

Le chloramphénicol perd également son activité après un mois lorsqu'il est conservé à une température de 37°C. La température ambiante de BUJUMBURA contribue de façon négligeable à la dégradation du chloramphénicol car elle n'atteint jamais 37°C.

3.3. La perte à la dessication.

La perte à la dessication du chloramphénicol et du chloramphénicol palmitate n'était pas supérieure à 0.5 pour cent (13) et 0.38 pour cent (tableau N°3).

La perte à la dessication doit être faible car l'humidité du produit influence beaucoup sa stabilité. Si la teneur en eau est élevée, le chloramphénicol peut être décomposé et devenir instable (16).



4. Le pouvoir rotatoire spécifique.

La valeur du pouvoir rotatoire mesuré nous a permis également de confirmer la pureté du chloramphénicol.

Nos valeurs résumées dans le tableau suivant sont en bon accord avec celles de QUINTIN R. BARTZ (2).

| | Chloramphénicol fourni par l'ONAPHA (poudre) | Chloramphénicol vendu à BUJUMBURA (gellules) | La valeur du chloramphénicol déterminée par Q.R.BARTZ (2) |
|---|---|---|---|
| $[\alpha]_D^{27}$ | + 18.5° | + 19.0 | + 18.6° |

| | Chloramphénicol palmitate (poudre) fourni par L'ONAPHA | Chloramphénicol palmitate vendu à BUJUMBURA | Valeur trouvée par Q. R.BARTZ (2) |
|---|---|---|---|
| $[\alpha]_D^{27}$ | + 25.0° | + 25.5° | $[\alpha]_D^{26}$ + 24.6° |

3.5. La chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince avec des plaques de silice 60 $F_{254}$ donne une tache avec $R_F$ : 0.44; 0.41; 0.77; 07.2. Nous avons utilisé le système éluant (chloroforme, méthanol, eau) car c'est celui qui est conseillé par les pharmacopées (13).

Les valeurs de $R_F$ sont peu reproductibles car elles varient avec la température et le degré de saturation de la cuve de la chromatographie.

3.6. La chromatographie en phase liquide à haute performance.

Lorsque nous comparons les trois chromatogrammes obtenus (Fig. N° 5,6,7), nous remarquons chaque fois une série de 5 pics semblables avec un temps de retention inférieur à 5 minutes.
Le pic avec un temps de retention proche de 4 minutes correspond probablement au chloramphénicol.
Le pic avec un temps de retention proche de 2 minutes est commun à tous les chromatogrammes. Les figures N°6,7 présentent d'autres pics après 5.00 minutes. Ces pics ne sont pas semblables car les excipients peuvent varier d'un sirop à l'autre. Les trois chromatogrammes présentent d'autres pics semblables Ce sont ceux qui apparaissent à 1,93; 1,08; 1,90 (mm); 2,27; 3,46; 2,18 (mm); 3,39; 3,00; 3,02 (mm). Ces trois pics peuvent être ceux des solvants utilisés.

La figure N°7 présente des pics très longs à 4,46; à 5,32 (mm) qui semblent correspondre à des impuretés.

Si nous comparons les hauteurs des pics qui sont proprtionnelles à la quantité du corps correspondant présente dans l'échantillon injecté, nous constatons que les hauteurs des pics du chloramphénicol (qui apparaissent à 4,58 mm; 4,34 mm; 3.46 mm) sont inégales.

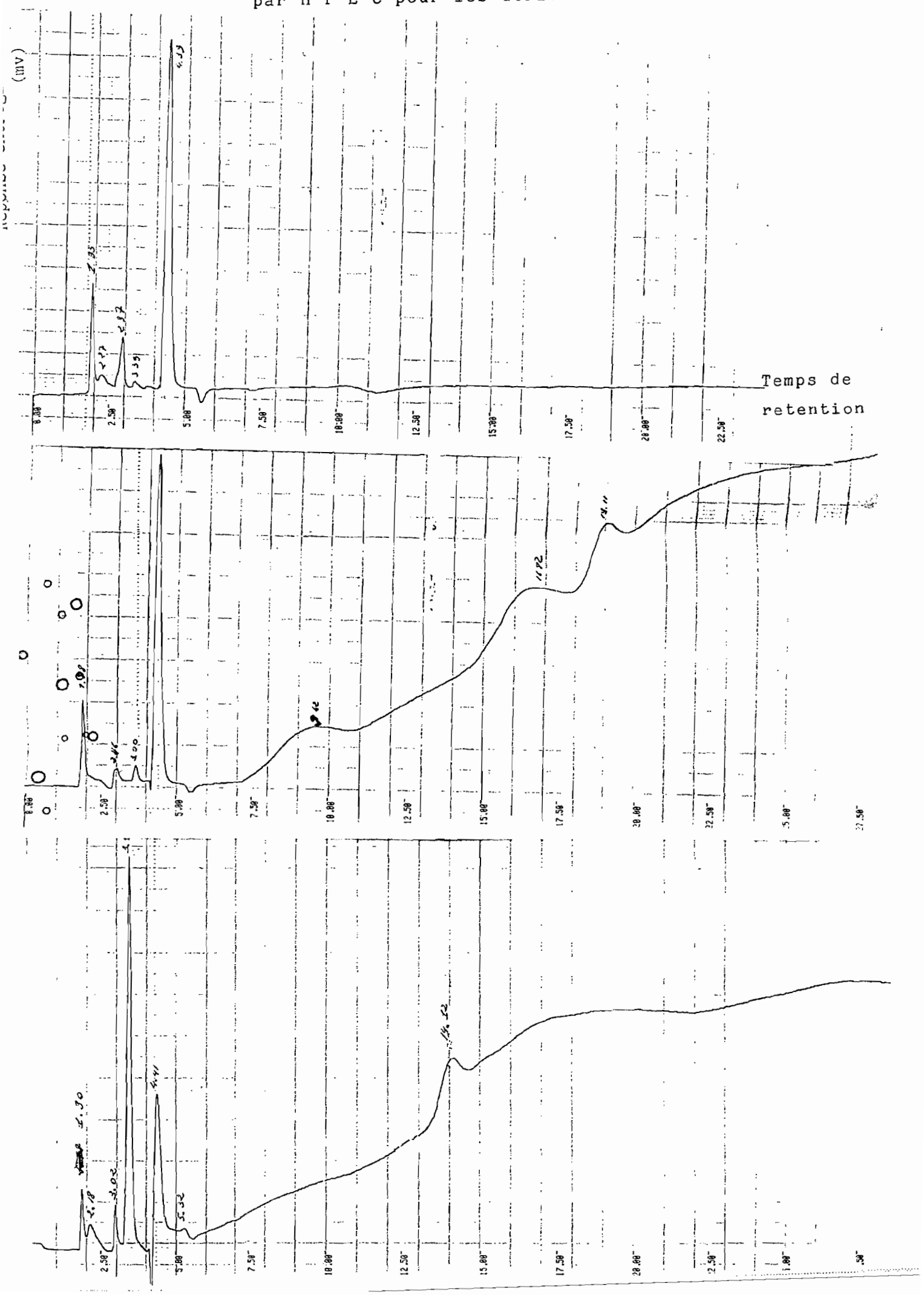
La 7ème figure montre que le sirop contient moins de chloramphénicol que les autres.

Nous n'avons pas pu déterminer la teneur du chloramphénicol qui doit être de 98 à 100 pour cent (13) à partir des dimensions des pics obtenus.

Il fallait avoir un étalon, à l'état de grande pureté et bien séparé de tous les constituants du mélange; la courbe de variation du rapport des aires des pics de l'étalon et du chloramphénicol vendu à BUJUMBURA avec la concentration de cet antibiotique dans le mélange.

D'une manière générale, on peut donc affirmer que le chloramphénicol vendu à BUJUMBURA est assez pur.

Fig. 10 - Comparaison des chromatogrammes N°5,6,7 obtenus par H P L C pour les dérivés du chloramphénicol.



3.7. L'activité du chloramphénicol.

Nous avons mesuré le diamètre d'inhibition à l'oeil nu à l'aide d'une latte graduée en millimètres. Deux mesures de diamètres perpendiculaires sont prises.

La mesure de la zone d'inhibition prise en compte pour chaque disque est la moyenne de deux mesures de diamètres perpendiculaires moins le diamètre du disque (6 mm) divisé par deux, soit(17) :

$$Di = \frac{\frac{(di_1 + di_2) - 6}{2}}{2}$$

L'activité du chloramphénicol vendu à BUJUMBURA a été déterminée à partir du chloramphénicol base. Celui-ci est le chloramphénicol (en poudre) sans excipient qui nous a été fourni par l'ONAPHA.

L'équation de la droite de régression pour ce dernier est donné par :

$d_{zone} = 2.2 \ln \text{dose} + 13.8$

coefficient de corrélation $r^2 = 0.99$.

Les équations des droites de regression, les coefficient de corrélation, la zone d'inhibition, l'écart type (5), le pourcentage d'activité, les courbes expérimentales donnant le diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la dose du chloramphénicol, ont été calculés et tracés par l'ordinateur I B M AT de la Faculté des Sciences Agronomiques, au laboratoire de microbiologie en utilisant le programme Framework II.

Les doses du chloramphénicol vendu à BUJUMBURA sont aussi calculées par rapport à celles du chloramphénicol base :

$$\text{dose calc \% Chl. base} = e^{\frac{(d_{\text{zone observée}} - 13.8)}{2}}$$

Les valeurs trouvées sont comparées aux doses de base 0.03125 g/l, 0.06250 g/l, 0.12500 g/l et exprimées en pourcentage.

La moyenne des trois donne le pourcentage d'activité (tableau N°5).

Les valeurs de 81%, 80% se rapportent respectivement aux chloramphénicols palmitates vendus à BUJUMBURA et analysés par le HPLC (fig. 6,7).

Ce test biologique a été utilisé pour confirmer les résultats des analyses chimiques.

Nous avons constaté que la mesure du pH ne donne pas une valeur exacte de l'activité. Il conviendrait donc d'utiliser les boîtes de Pétri pour déterminer le pourcentage d'activité de chaque antibiotique.

# CONCLUSION

Nous venons de présenter une étude d'une analyse du chloramphénicol vendu à BUJUMBURA.

La détermination des constantes physiques, la spectrophotométrie U.V, la chromatographie sur couche mince, la détermination du pourcentage d'activité et surtout la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) constituent des méthodes d'analyse rapide pour contrôler la pureté du produit.

Le HPLC permet de détecter les substances étrangères au produit. Le spectromètre de masse aurait permis de déterminer la structure des produits séparés par HPLC et en particulier les impuretés non identifiés.

Des analyses devraient être poursuivies dans ce sens.

# BIBLIOGRAPHIE


1. Jean FABRE : Thérapeutique moderne
Flammarion Médecine - Sciences
75006, Paris, 1969.

2. QUENTIN R. BARTZ : Isolation and characterisation of chloromycetin . J.Biol chem. 172 445 - 450 (1948).

3. C.HEUSGHEM et P. LECHAT : Les effets indésirables des médicaments. Masson, Paris, 1973.

4. HENRI SCHMITT : Eléments de Pharmacologie, 6ème édition, Flammarion, Médecine - Sciences, Paris VI, 1976.

5. P. LECHAT, G.LAGIER, B.ROUVERAUX: Pharmacologie médicale. 4ème édition, Masson, Paris, 1982.

6. J. DUVAL, C.J., SOUSSY : Abregé de l'antibiotique, 2ème édition, Masson, Paris, 1980.

7. M. FERRAULT et C.LAPLANCHE : Eléments de la thérapeutique p. 246 - 293., 8ème édition. Flammarion Médecine - Sciences, Paris VI, 1977.

8. G. EHRHART, W. SIEDAL, H. NAHM : Alternate technical synthesis. Chem. Ber. 90, 2088 (1957).

9. WILLEMART & R. CHAUX : Les grandes fonctions de la chimie organique p. 832, DUNOD, Paris, 1958.

10. Paul G. STECHER, N.J. FINKEL, O.H. SIENGMUND, B.M. SZAFRANSKI : The merck Index, seventh edition. Published by Merck & C O INC. USA 1960.

11. WILLIAM H. EDGERTON, V. HAROLD MADDOX AND JOHN CONTROLIS : The structure of chloramphenicol Palmitate. J.Am. chem Soc. 77, 27 (1955).

12. M. KLAT et S. KABA : De la pharmacologie à la thérapeutique. Edition La Sève KINSHASA (ZAIRE),1984.

13. Pharmacopée belge, Sixième édition, Sous la direction de l'inspection générale de la pharmacie, Ministère de la Santé Publique et de la Famille, Bruxelles ,1982.

14. KURT RANDERATH : Chromatographie sur couches minces. Gauthier - Villars. Editeur, Paris, 1971.

15. DOUGLAS A. SKOO G : Principles of Instrumental analysis. Third Edition, Japan, 1985.

16. ARTHUR OSOL, JOHN E. HOUVER : Remington's Pharmaceutical Sciences. Fourtheenth Edition, Mack Publishing Company. New York, 1970.

17. J.P. CHAPEAUX, C.MUNIMBAZI, HENNEBERT G.L : Projet MIDIBU. Rapports semestriels, décembre 1986 et juin 1987. Faculté des Sciences Agronomiques, Bujumbura.