

### 178. Vitamine D<sub>2</sub>.

#### Etude de la purification et du dosage de la vitamine D<sub>2</sub> dans les préparations pharmaceutiques et de quelques esters de calciférol

par H. Péneau et G. Hagemann.

(26 V 46)

La vitamine D<sub>2</sub> cristallisée, employée couramment depuis dix ans environ pour les besoins pharmaceutiques, sous forme de solutions huileuses ou de solutés alcooliques, n'était utilisée, jusqu'à présent, qu'à des doses relativement faibles, de 15 à 30 mgr. par mois, dans la cure ou la prévention du rachitisme, ou mieux, pour assurer les équilibres phosphocalciques de l'organisme, en période de carence alimentaire. Au cours des toutes dernières années, la posologie de la vitamine D<sub>2</sub> a été progressivement étendue, et il n'est pas rare, par exemple, pour certaines formes de tuberculose, de voir administrer au malade, par voie gastrique ou parentérale, jusqu'à 0,20 gr. de calciférol par mois.

Pour ces récentes conditions d'application, il nous a paru intéressant, d'une part, de serrer les normes du calciférol chimiquement pur, et d'autre part, d'étudier la préparation d'esters purs de calciférol pouvant présenter des effets physiologiques plus ou moins différents de ceux de la vitamine D<sub>2</sub> libre. Pour suivre, au cours du temps, la stabilité des préparations pharmaceutiques à base de vitamine D<sub>2</sub>, et constater en particulier si ces préparations ne subissent pas, au cours de leur vieillissement, une dégradation partielle avec formation de dérivés inactifs ou toxiques, nous avons mis au point une méthode de dosage, que nous décrivons plus loin.

#### 1<sup>o</sup> Vitamine D<sub>2</sub> purifiée, pour solutions injectables à fortes doses.

Il est indispensable, pour obtenir toutes les garanties possibles concernant la parfaite innocuité et la bonne conservation de la vitamine D<sub>2</sub>, d'éliminer les substances qui prennent naissance au cours de l'irradiation: toxiques (suprastérois, toxistérois), instables (lumistérol, tachystérois), ou inactives (ex.: ergostérois non transformés). A cet effet, il nous a paru utile de soumettre à une purification le calciférol officinal pour lequel, dans les différentes pharmacopées, un certain battement est prévu dans les normes physico-chimiques. Les purifications du produit de saponification du dinitrobenzoate de calciférol chimiquement pur, par recristallisations répétées dans le méthanol, permettent d'obtenir la vitamine D<sub>2</sub> pure, de caractéristiques physiques constantes:

aspect micro et macro cristallographique homogène,

point de fusion:  $F_i$  121°,

pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5461} = +121$  à 122°,  $c = 1\%$  éthanol absolu,

coefficient d'absorption:  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 485-490$  pour  $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ,

pas de précipitation avec la digitonine,

solubilités dans 100 cm<sup>3</sup> de solvant, à 26° C:

éthanol absolu 28 gr.

acétone anhydre 25 gr.

éther iso 25 gr.

acétate éthyle 31 gr.

Les solutions de vitamine D<sub>2</sub> pure dans l'huile d'olive ou dans l'éthanol sont stables, en ampoules scellées conservées à l'obscurité. La stérilisation des solutions «injectables» n'entraîne aucune perte d'activité.

### 2° Esters de calciférol.

Pour la préparation des esters de calciférol, nous avons essayé d'utiliser, soit les anhydrides d'acides, soit les chlorures d'acides dans différents milieux, soit les acides eux-mêmes (par exemple pour l'acide chaulmoogrique, en présence de lipase du ricin). Seuls les chlorures d'acides purs nous ont donné des résultats satisfaisants par la méthode classique d'estérification en présence de pyridine. Nous avons ainsi préparé quelques esters en précisant les conditions opératoires, puis étudié les caractéristiques physiques des produits obtenus.

A) *Benzoate de calciférol.* — Il est nécessaire d'effectuer la benzylation à basse température pour obtenir un ester cristallisable, avec un rendement satisfaisant:

Une solution de 10 gr. de vitamine D<sub>2</sub> cristallisée dans 40 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre est additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de pyridine pure anhydre (E. 114°—117°). Après refroidissement à 0°, le mélange est additionné peu à peu d'une solution de 10 cm<sup>3</sup> de chlorure de benzoyle pur rectifié (E. 189—190°) dans 30 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. Après 10 minutes d'agitation, toujours à 0°, le mélange est laissé au repos 45 minutes à la température de 20°. La solution est ensuite versée lentement dans une ampoule à décantation contenant 250 cm<sup>3</sup> de solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium; après plusieurs agitations, la phase aqueuse est épuisée trois fois avec du benzène; les extraits benzéniques réunis sont lavés avec de l'acide chlorhydrique dilué (environ N/1) jusqu'à élimination complète de la pyridine, puis avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, et enfin avec de l'eau distillée.

La solution benzénique finale est déshydratée sur du sulfate de sodium anhydre et distillée à sec sous pression réduite.

Le résidu est dissous dans 25 cm<sup>3</sup> d'acétone anhydre et la solution obtenue est additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de méthanol pur. Par cristallisation à 0°, on obtient un premier jet de benzoate de calciférol très blanc, et un deuxième jet par addition de méthanol à 0°. Par recristallisation dans le mélange acétone-méthanol, on obtient, avec un rendement de 94%, un benzoate pur dont les caractéristiques ne varient plus par une deuxième recristallisation.

#### *Caractéristiques du benzoate de calciférol:*

Point de fusion:  $F_i$  92°.

Pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5790} = +100^\circ$  ( $c = 1\%$  acétone).

Insoluble dans l'eau, très peu soluble dans le méthanol.

Très soluble dans l'acétone, le benzène, le toluène.

Le benzoate de calciférol cristallisé, pulvérisé finement, se dissout directement dans l'huile d'olive, sans solvant intermédiaire, par simple chauffage à 40°. La solution huileuse à la concentration de 6% ne précipite pas, même à +2°.

La courbe d'absorption du benzoate de calciférol, dans l'ultra-violet, est différente de celle de la vitamine D<sub>2</sub> non estérifiée: le maximum caractéristique correspondant à la longueur d'onde de 2650 Å ne se présente plus et se trouve déplacé vers l'ultra-violet plus poussé ( $\lambda = 2550 \text{ \AA}$ ).

B) *Acétate de calciférol.* — L'acétylation de la vitamine D<sub>2</sub> s'effectue correctement dans les conditions suivantes:

Une solution de 10 gr. de vitamine D<sub>2</sub> cristallisée, dans 40 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre, est additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de pyridine pure anhydre, puis, après refroidissement à 0°, d'une solution de 10 cm<sup>3</sup> de chlorure d'acétyle rectifié (E. 137°) dans 30 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. Après agitation du mélange pendant 10 minutes à 0°, on laisse la réaction se terminer pendant 1 heure à 20°. On effectue ensuite les mêmes traitements que pour le benzoate de calciférol. La première cristallisation, effectuée dans le mélange acétone-méthanol, est suivie d'une recristallisation dans l'acétone pur.

*Caractéristiques de l'acétate de calciférol:*

Point de fusion: F<sub>1</sub> 86°.

Pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5790} = +38^\circ$  (c = 1% acétone).

Très soluble dans l'acétone. Peu soluble dans le méthanol (à 70° C: 50 parties).

L'acétate de calciférol pulvérisé finement se dissout directement dans l'huile d'olive, sans solvant intermédiaire, par simple chauffage à 40°. La solution huileuse à 4% est stable, et reste limpide même à +2° C.

La courbe d'absorption de l'acétate de calciférol, dans l'ultra-violet, diffère relativement peu de celle de la vitamine D<sub>2</sub> non estérifiée; le maximum est légèrement décalé vers les courtes longueurs d'ondes ( $\lambda = 2620 \text{ \AA}$ ).

C) *Propionate de calciférol.* — La propionylation de la vitamine D<sub>2</sub> s'effectue, avec de bons rendements, dans les conditions suivantes:

Une solution de 10 gr. de vitamine D<sub>2</sub> cristallisée dans 40 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre est additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de pyridine pure anhydre, puis, après refroidissement à 0°, d'une solution de 10 cm<sup>3</sup> de chlorure de propionyle rectifié (E. 78°) dans 30 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. Après 10 minutes d'agitation à 0°, la réaction est poursuivie pendant une heure à 20° C. On effectue ensuite les mêmes traitements que pour le benzoate de calciférol. Par deux cristallisations successives dans l'acétone pure, on obtient le propionate pur, en cristaux prismatiques blancs.

*Caractéristiques du propionate de calciférol:*

Point de fusion: 77°.

Pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5790} = +37,6^\circ$  (c = 1% acétone).

Très soluble dans l'acétone.

La solution huileuse à 4% est stable et reste limpide, même à +2° C.

La courbe d'absorption dans l'ultra-violet présente presque le même aspect que la courbe de la vitamine D<sub>2</sub> non estérifiée; cependant le coefficient d'absorption correspondant au maximum, légèrement décalé vers les courtes longueurs d'ondes ( $\lambda = 2640 \text{ \AA}$ ) est plus faible:  $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 420$  (au lieu de 485 pour la vitamine D<sub>2</sub>).

D) *Oléate de calciférol.* — L'oléate de calciférol, liquide à la température ordinaire, ne cristallise qu'à la température de -20° C en solution acétonique. L'estérification s'effectue dans les conditions suivantes: 10 gr. de vitamine D<sub>2</sub> cristallisée sont dissous dans 60 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre et additionnés de 20 cm<sup>3</sup> de pyridine pure anhydre.

Le mélange, refroidi à 0°, est additionné d'une solution de 15 gr. de chlorure d'oléyle rectifié (E. 160° sous 1 mm) dans 15 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. On laisse réagir le mélange pendant 2 heures ½ à 0°, en présence d'un léger courant d'azote. Après réaction, on effectue les mêmes traitements que pour le benzoate de calciférol.

La solution benzénique finale, déshydratée, est distillée à sec sous vide: on obtient ainsi l'oléate de calciférol huileux à température ordinaire.

*Caractéristiques de l'oléate de calciférol:*

Pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5790} = +18,7^{\circ}$  (c = 1% chloroforme).

La courbe d'absorption dans l'ultra-violet est sensiblement la même que celle de la vitamine D<sub>2</sub> non estérifiée; la branche de courbe descendante, vers les courtes longueurs d'ondes, est un peu redressée.

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 420 \quad (\lambda = 2650 \text{ \AA}).$$

E) *Chaulmoograte de calciférol.* — La préparation de cet ester est assez délicate, et nécessite une préparation préliminaire d'acide chaulmoogrique pur, puis de chlorure de chaulmoogryle pur, rectifié sous vide poussé. Les conditions opératoires les plus satisfaisantes sont les suivantes:

Une solution de 10 gr. de vitamine D<sub>2</sub> cristallisée, dans 60 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre et 20 cm<sup>3</sup> de pyridine pure anhydre, est refroidie à 0° en présence d'azote; on ajoute ensuite une solution de 13 gr. de chlorure de chaulmoogryle pur fraîchement rectifié (E. 140—160° sous 0,1 mm), dans 13 cm<sup>3</sup> de benzène anhydre. On laisse réagir pendant 2 heures ½ à 0°, avec un lent barbotage d'azote. On procède ensuite à des lavages pour élimination de l'excès des réactifs, comme pour le benzoate de calciférol. Le chaulmoograte de calciférol brut est soumis à deux cristallisations successives dans l'acétone anhydre à 0° C., et séché sous vide phosphorique.

*Caractéristiques du chaulmoograte de calciférol:*

Cristaux blancs.

Point de fusion: F<sub>i</sub> 53°.

Pouvoir rotatoire:  $[\alpha]_{5790} = +52$  à  $52,8^{\circ}$  (c = 1% chloroforme anesthésique).

Titre en insaponifiable (calciférol): 57%.

La courbe d'absorption est presque identique à celle du calciférol non estérifié, le coefficient d'absorption étant plus faible et donnant un titre apparent spectrographique de 37% en vitamine D<sub>2</sub>.

Le dosage spectrographique effectué sur l'insaponifiable de l'ester cristallisé fournit une courbe de vitamine D<sub>2</sub> caractéristique, avec un taux conforme à la formule théorique du chaulmoograte de calciférol pur (teneur en vitamine D<sub>2</sub> alcool: 57%). Le chaulmoograte de calciférol est aisément soluble dans l'huile d'olive (la solution à 2% est stable).

### 3° Dosage de la vitamine D<sub>2</sub> dans les préparations pharmaceutiques.

A) Le problème le plus simple est le dosage de la vitamine D<sub>2</sub> dans une *solution alcoolique*; dans ce cas, d'après la courbe d'absorption dans l'ultra-violet, on peut déduire directement:

a) Si la vitamine D<sub>2</sub> est bien conservée (c'est-à-dire si la courbe d'absorption présente la forme caractéristique, avec un maximum pour  $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ). Toute modification de la courbe (déplacement du maximum, dissymétrie accentuée de la courbe, etc.) indique la présence d'impuretés (stérols par exemple) ou de produits de dégradation du calciférol.

b) Si le titre en calciférol est correct, par le calcul du coefficient d'absorption.

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  ( $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ) connaissant le coefficient fourni par la vitamine D<sub>2</sub> pure:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} (\lambda = 2650 \text{ \AA}) = 485-490.$$

Les solutions alcooliques (alcool à 90<sup>o</sup> ou alcool absolu) de vitamine D<sub>2</sub> pure cristallisée sont stables, en ampoules scellées et à l'abri de la lumière. Elles conservent toute leur activité après plusieurs années.

B) Lorsqu'il s'agit de doser la vitamine D<sub>2</sub> dans des solutions huileuses, il est nécessaire d'éliminer la cause d'erreur due à l'absorption propre de l'huile, qui pourrait modifier la courbe due à la vitamine D<sub>2</sub>, ou tout au moins le coefficient d'absorption correspondant au maximum. Pour tourner cette difficulté, nous opérons de la façon suivante:

a) Si l'on dispose d'un échantillon de l'huile ayant été utilisée pour la préparation de la solution vitaminée, le dosage spectrophotométrique peut s'effectuer directement: une quantité exactement pesée de solution huileuse (environ: 1,5 gr.) est diluée dans du chloroforme anesthésique pur, à un volume exactement connu (fiole jaugée de 25 cm<sup>3</sup>). On prélève exactement, à la pipette, un volume connu de cette solution, on amène à 100 cm<sup>3</sup> en fiole jaugée, par addition d'alcool éthylique absolu; le volume de solution chloroformée à diluer est calculé, d'après le titre annoncé en vitamine D<sub>2</sub>, pour que la solution finale dans l'alcool soit théoriquement au titre de 0,0015% en vitamine D<sub>2</sub>. On effectue, d'autre part, les mêmes dilutions exactement (chloroforme, puis alcool), avec l'huile-témoin ne contenant pas de vitamine. On trace ensuite la courbe d'absorption ultraviolette, en utilisant, dans la cuve de référence du spectrographe, la seconde solution. De cette manière, on élimine les erreurs dues à l'absorption propre de l'huile, et l'on obtient (si la vitamine D<sub>2</sub> est correcte et non altérée) une courbe d'absorption caractéristique de la vitamine D<sub>2</sub> pure; la détermination du coefficient d'absorption correspondant au maximum ( $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ) permet de déterminer le titre de la solution huileuse, comme pour le cas des solutions alcooliques.

Les dosages, effectués dans ces conditions, permettent d'affirmer que la vitamine D<sub>2</sub> pure cristallisée, est stable en solution huileuse à 1%, en ampoules scellées. La stérilisation par chauffage d'une heure à 100<sup>o</sup> n'altère en aucune façon les qualités de la substance, ni son comportement au cours du temps.

b) Si l'échantillon à doser n'est pas accompagné d'une ampoule de l'huile ayant servi à préparer la solution vitaminée (si, par exemple, il s'agit de procéder à des «coups de sonde» sur des stocks de préparations pharmaceutiques ayant une certaine ancienneté), ou s'il s'agit de formes estérifiées de la vitamine D<sub>2</sub>, il est nécessaire d'effectuer le dosage spectrophotométrique sur l'insaponifiable, la perte de vitamine D<sub>2</sub> au cours de la saponification étant déterminée une fois pour toutes, sur une solution huileuse à 1% exactement titrée, dans des conditions opératoires bien déterminées (perte: 7,5% de vitamine D<sub>2</sub>).

L'insaponifiable propre des huiles végétales utilisées pour la préparation des solutions vitaminées peut évidemment intervenir dans le dosage; mais nous avons constaté que le coefficient d'absorption  $E_{1 \text{ cm}}^{1\%}$  pour la longueur d'ondes correspondant au maximum de la courbe de vitamine D<sub>2</sub> ( $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ) est faible et ne risque pas d'intervenir pour plus de 5 à 6% dans le résultat. Ainsi, par exemple, on trouve:  $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 27$  pour  $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ , pour l'insaponifiable d'une huile d'olive non vitaminée. Pour une solution à 1% de vitamine D<sub>2</sub> dans cette huile, il serait donc théoriquement nécessaire de retrancher cette valeur du coefficient d'absorption  $E_{1 \text{ cm}}^{1\%}$  ( $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ) trouvé pour l'insaponifiable du total huile + vitamine; mais, en fait, la correction serait de 4,8% du titre trouvé, et l'on peut pratiquement la négliger, la méthode de dosage spectrophotométrique ne donnant pas une meilleure précision.

Nous précisons ci-dessous le mode opératoire:

Une quantité de solution huileuse exactement pesée (voisine de 1 gr.) est saponifiée au bain-marie, au reflux, en présence d'azote, dans un ballon rodé muni d'un réfrigérant, par 15 cm<sup>3</sup> de potasse alcoolique N/2, pendant 10 minutes. Le mélange est aussitôt refroidi,

additionné de 25 cm<sup>3</sup> d'eau distillée bouillie, et épuisé 3 fois avec 25 cm<sup>3</sup> d'éther-oxyde d'éthyle officinal exempt de peroxydes. Les solutions étherées réunies sont lavées, d'abord avec 10 cm<sup>3</sup> de potasse aqueuse N/2, puis avec de l'eau (3 × 10 cm<sup>3</sup>). Après déshydratation sur un peu de sulfate de sodium, filtration et lavages du sel à l'éther, la solution est amenée à sec sous courant d'azote, puis sous vide, dans un petit ballon taré.

Le résidu pesé (insaponifiable total) est dissous dans l'alcool à 95°, et l'on prépare à l'aide de cette solution-mère, d'après le titre annoncé dans la solution huileuse initiale, une solution alcoolique titrant théoriquement 0,0015% de vitamine D; on dose ensuite au spectrographe comme d'ordinaire, en plaçant dans la cuve de référence de l'alcool à 95° seul. D'après le coefficient d'absorption  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  trouvé pour le maximum de la courbe ( $\lambda = 2650 \text{ \AA}$ ), on déduit le titre en vitamine D<sub>2</sub>, en ajoutant une correction de 7,5% pour la perte à la saponification.

Divers dosages effectués, dans ces conditions, sur des échantillons de solutions huileuses de vitamine D<sub>2</sub> pure (Stérogyl 15 injectable ou buvable) prélevés au hasard dans des pharmacies de détail permettent d'affirmer que la conservation est excellente.

### RÉSUMÉ.

Dans cette note, il nous a paru intéressant de préciser les caractères physiques du calciférol chimiquement pur qui doit être employé en thérapeutique pour les doses massives utilisées par les cliniciens dans les diverses formes de tuberculose.

L'étude de quelques esters de calciférol, dont l'ester chaulmoogrique, a paru retenir l'attention des cliniciens français dans certaines formes de tuberculose. On sait, en effet, les rapports d'acido-résistance qui unissent le bacille de *Hansen* et le bacille de *Koch* et la spécificité accordée aux huiles des Flacourtiacées, dans le traitement de la lèpre.

Des essais encourageants sont en cours actuellement dans le traitement de la lèpre et de la tuberculose.

Enfin, étant données la lenteur des essais physiologiques de vitamine D<sub>2</sub> et la nécessité de la mise en œuvre d'un grand nombre d'animaux (rats) pour obtenir une précision suffisante, il nous a paru intéressant de donner une méthode relativement précise (à  $\pm 10\%$ ) de dosage du calciférol, dans les préparations pharmaceutiques simples les plus courantes.

Romainville, Laboratoires *Roussel*,  
Département des Recherches biologiques. *H. Péneau*.

---