

CHROM. 6878

Note

Détection de la kanamycine B dans la kanamycine par chromatographie sur couche mince

M. DUBOST, C. PASCAL, B. TERLAIN et J.-P. THOMAS

Laboratoires de Recherches Analytiques de la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc, 22, Avenue Montaigne, Paris 8ème (France)

(Reçu le 2 avril 1973)

Différentes méthodes ont été décrites pour rechercher et évaluer le taux de kanamycine B dans la kanamycine¹⁻⁶.

Le principe de la méthode adoptée par la FDA¹, et de celle qui est décrite par Wakazawa *et al.*², repose sur l'hydrolyse chlorhydrique à chaud de l'échantillon, ce qui provoque la dégradation totale de la kanamycine A, tandis que l'activité antibiotique de la kanamycine B persiste dans une proportion de 20.5% dans les mêmes conditions. Des résultats assez reproductibles sont obtenus avec cette méthode, à la condition d'utiliser le mode de calcul décrit par Wakazawa *et al.* Cependant, il semble que l'introduction dans le calcul d'un facteur d'une telle importance, établi d'ailleurs pour des mélanges synthétiques de kanamycine A et B, peut présenter certains risques.

La chromatographie, en revanche, ne présente pas cet inconvénient. Parmi les méthodes décrites, la chromatographie descendante sur papier suivie d'une révélation microbiologique³ donne des résultats satisfaisants mais nécessite une longue période de migration et de révélation qui ne convient pas à l'analyse en série. Des techniques de chromatographie sur colonne ont également été décrites⁴⁻⁶, mais il nous a semblé que la chromatographie sur couche mince, facile à mettre en oeuvre, pourrait mieux convenir encore au contrôle de routine des lots de kanamycine. Les essais portant sur cette dernière technique nous ont conduits à mettre au point deux méthodes que nous décrivons dans la présente note.

La première préconise l'emploi de plaques préfabriquées, de marque déposée, que l'on trouve dans tout laboratoire spécialisé.

La seconde a été mise au point pour permettre à un opérateur d'effectuer la recherche de la kanamycine B avec des plaques classiques de kieselgel préparées par lui-même.

MISE AU POINT DES MÉTHODES

Il y a plusieurs années déjà, nous avons cherché à déceler par chromatographie sur couche mince (CCM), la présence éventuelle des différentes substances, sucres en particulier, contenues dans les antibiotiques du groupe des aminoglycosides (streptomycine, dihydrostreptomycine, kanamycine, néomycine etc.): nous avons

ainsi été amenés à utiliser des plaques prêtes à l'emploi, capables de supporter des conditions de révélation très énergiques.

Nous avons alors constaté que l'on pouvait facilement faire migrer sur plaques de silice préfabriquées F₂₅₄* des produits aussi polaires que ces antibiotiques, et avec un bon pouvoir séparateur, en utilisant comme phase mobile divers tampons phosphates et en ajustant la polarité avec différents alcools.

La séparation des kanamycines A et B a donc pu être réalisée selon ce principe avec une solution de phosphate monopotassique à 15%, dans des conditions de chromatographie qui permettent en outre la différenciation de la kanamycine des autres principaux antibiotiques du groupe.

Nous avons ensuite cherché à utiliser les plaques classiques de gel de silice G telles qu'elles sont décrites dans les prescriptions générales de la Pharmacopée Européenne⁷ et pour cela nous avons été amenés à choisir un autre système d'éluant.

C'est ainsi que la polarité de l'éluant aqueux indiqué pour la méthode précédente a été diminuée par addition d'acétate d'éthyle et d'acétone. Pour des proportions convenables de ces solvants, une migration différente des deux kanamycines a été obtenue.

Cependant les migrations restaient diffuses et le R_F de la kanamycine B seule était différent de celui de la kanamycine B contenue dans le mélange. Le remplacement de l'acétone par le méthanol, puis celui du phosphate monopotassique par le phosphate monosodique ont permis d'améliorer la netteté des taches et d'obtenir pour la kanamycine B des R_F identiques en présence ou non de kanamycine A.

Le choix de l'éluant ainsi fixé, différents paramètres intervenant dans la qualité du chromatogramme ont été étudiés: (1) la saturation des cuves en vapeurs de solvant joue un rôle important; pour obtenir de bons résultats, il est indispensable de maintenir soigneusement la saturation pendant tout le temps de la migration, par la méthode classique consistant à tapisser l'intérieur de la cuve avec du papier filtre trempant dans l'éluant; (2) le temps de développement doit largement dépasser le temps nécessaire pour que le solvant atteigne la partie supérieure de la plaque; des résultats satisfaisants ont été obtenus en 4 h.

En ce qui concerne la révélation colorée, le réactif alcalin à la ninhydrine préconisé par Majumdar *et al.*⁸ pour révéler la néomycine a permis de déceler jusqu'à 0.1 μg de kanamycine.

TECHNIQUES

Méthode A

Réactiver des plaques de gel de silice prêtes à l'emploi F₂₅₄ à 110° pendant 1 h. Déposer 50 et 100 μg de l'échantillon à examiner et 1 à 5 μg de kanamycine B de référence. Développer le chromatogramme à l'aide d'une solution de phosphate monopotassique à 15% pendant 3 à 5 h. Révéler par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0.25% dans l'acétone suivie d'un chauffage à 110° pendant 15 min.

Méthode B

Préparer une plaque de gel de silice G de 0.5 mm d'épaisseur. Activer la plaque

* D. C. Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ Art. 5715/0025 de Merck, Darmstadt, R.F.A.

à 110° pendant 1 h. Déposer 5 et 10 μg de l'échantillon à examiner et 0.1 à 0.5 μg de kanamycine B de référence.

Saturer une cuve de chromatographie, tapissée intérieurement de papier filtre, avec les vapeurs de l'éluant de composition suivante: solution de phosphate monosodique·2 H₂O à 10% dans l'eau distillée-méthanol-acétate d'éthyle (8:7:3). Introduire la plaque dans la cuve et laisser développer pendant 4 h à la température du laboratoire.

Sécher le chromatogramme sous courant d'air chaud et pulvériser le réactif suivant: 0.25 g de ninhydrine, 10 ml de méthanol, 47 ml de *n*-butanol, 50 ml de pyridine, et 3 ml d'eau distillée. Chauffer pendant 15 min à 110° jusqu'à coloration satisfaisante.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

La méthode A a donné une excellente séparation de la kanamycine B dans la kanamycine, permettant d'en déceler une proportion aussi faible que 1% (Fig. 1).

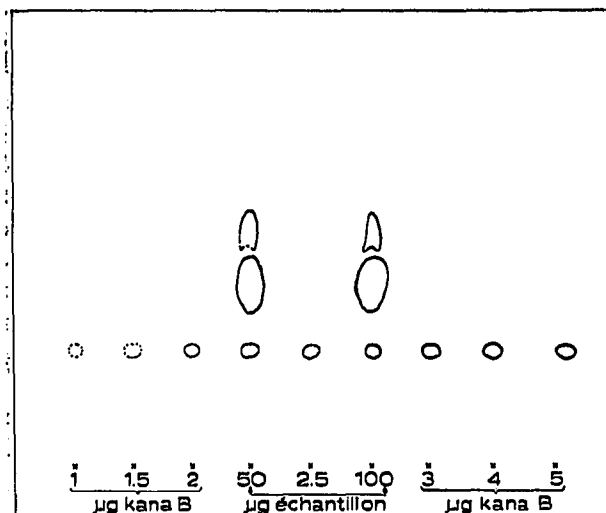


Fig. 1. Détection de la kanamycine B (kana B) dans la kanamycine par CCM selon la méthode A.

Cependant le système d'éluant préconisé ne peut être appliqué qu'avec les plaques préfabriquées de marque déposée dans la fabrication desquelles l'opérateur n'a aucun moyen de contrôle. La séparation observée est probablement due à la présence d'un liant polycarboxylique utilisé dans la fabrication des plaques⁹. Comme l'a démontré Vanderhaeghe¹⁰, et ainsi que nous l'avons confirmé, si l'on ajoute à du gel de silice H une résine polycarboxylique, également de marque déposée*, on obtient là encore une bonne séparation des deux kanamycines; au contraire, en l'absence de ce liant, les antibiotiques migrent ensemble au front du chromatogramme.

* Carbolpol de Goodrich Chemical Company, 3135 Euclid Avenue, Cleveland 15, Ohio, États-Unis.

La méthode B, en revanche, ne présente plus cet inconvénient et l'opérateur a la maîtrise de la préparation des plaques.

Les R_F obtenus sont plus faibles que ceux de la méthode A, mais les taches sont encore bien différenciées et permettent de déceler jusqu'à 1% de kanamycine B dans la kanamycine (Fig. 2), aussi facilement qu'avec la méthode A.

L'expérimentation de ces deux méthodes a permis en outre de montrer qu'elles pouvaient être utilisées pour l'identification de la kanamycine en présence d'autres aminoglycosides (néomycine, streptomycine, dihydrostreptomycine). Dans ce dernier cas, les antibiotiques sont révélés par pulvérisation d'un mélange à parties égales

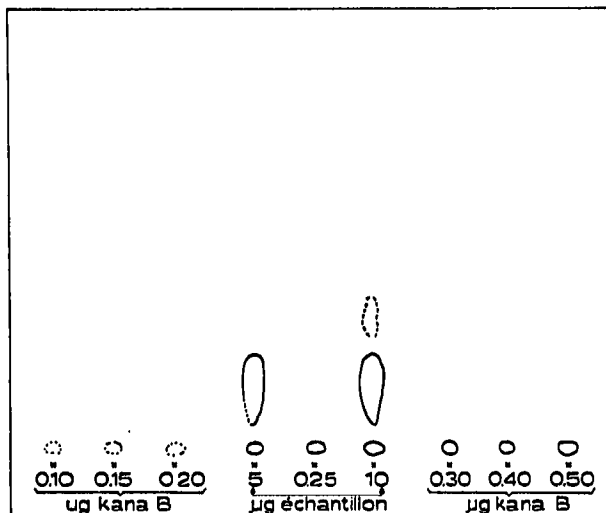


Fig. 2. Détection de la kanamycine B dans la kanamycine par CCM selon la méthode B.

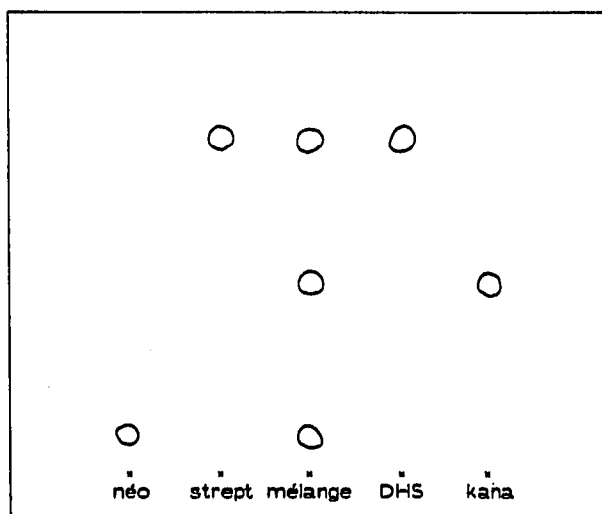


Fig. 3. Identification de la kanamycine par CCM selon la méthode A. Néo= néomycine; strept= streptomycine; DHS= dihydrostreptomycine; kana= kanamycine.

d'une solution de dihydroxy-1,3 naphthalène (ou de phloroglucinol) à 0.2% dans l'alcool éthylique et d'une solution d'acide sulfurique 9 N, suivie d'un chauffage à 150° pendant 5 à 10 min (Fig. 3 et 4).

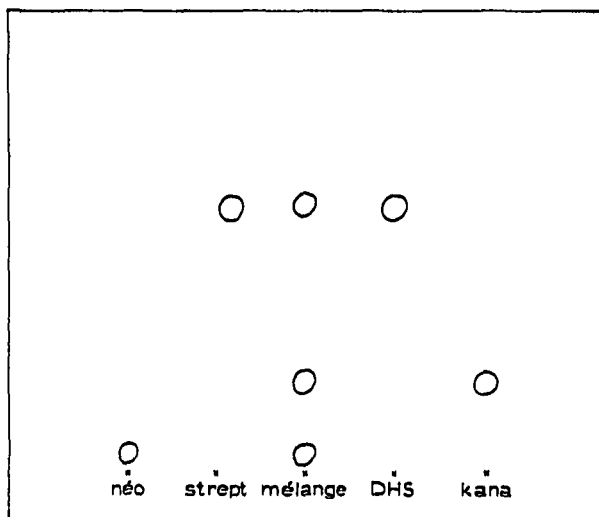


Fig. 4. Identification de la kanamycine par CCM selon la méthode B. Abréviations, voir légende de la Fig. 3.

CONCLUSIONS

Nous proposons deux méthodes de chromatographie sur couche mince permettant, l'une comme l'autre, d'une part de déceler et d'évaluer quantitativement jusqu'à 1% de kanamycine B dans la kanamycine, et d'autre part de caractériser cet antibiotique parmi d'autres aminoglycosides.

La méthode A, utilisant des plaques préfabriquées de marque déposée, donne une excellente séparation des kanamycines.

La méthode B permet d'obtenir des résultats aussi satisfaisants malgré des R_F moins élevés. Elle utilise des plaques préparées par l'expérimentateur lui-même et, pour cette raison, elle pourrait être préconisée dans le protocole de contrôle de la kanamycine d'une pharmacopée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Code of Federal Regulations, Title 21, Ch. 1, 148 h, 1.
- 2 T. Wakazawa, M. Abe, Y. Sugano et S. Kawaji, *J. Antibiot., Ser. A*, 14 (1961) 187.
- 3 D. H. Peterson et L. M. Reinecke, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3598.
- 4 J. W. Rothrock, R. T. Goegelman et F. J. Wolf, *Antibiot. Ann.*, (1958/1959) 796.
- 5 Y. Ito, M. Nambra, N. Nagahama, T. Yamaguchi et T. Okuda, *J. Antibiot., Ser. A*, 17 (1964) 218.
- 6 H. Maehr et C. P. Schaffner, *J. Chromatogr.*, 30 (1967) 572.
- 7 *Pharmacopée Européenne*, Vol. I, Maisonneuve, St. Ruffine, France, 1971, p. 88.
- 8 M. K. Majumdar et S. K. Majumdar, *Appl. Microbiol.*, 17 (1969) 763.
- 9 Merck, A. G., *Dutch Pat., Appl.*, 6.608 384, 1966.
- 10 H. Vanderhaeghe, Communication personnelle.