

DE L'ALTÉRATION SPONTANÉE DES DÉRIVÉS CHAULMOOGRIQUES; FORMATION DE PEROXYDES

PROF. PIERRE BARANGER

*Laboratoire de l'École Polytechnique, Paris
et Finedon-Northants, Angleterre*

INTRODUCTION

L'avènement des sulfones dans la chimiothérapie de la lèpre incite beaucoup de léprologues à préciser la valeur des anciens remèdes "chaulmoogriques" vis à vis des nouvelles préparations. Il paraîtrait en effet surprenant que les dérivés du chaulmoogra, connus et employés depuis des siècles sur tous les continents, ne dussent [?] ce succès à une réelle activité spécifique dans le traitement de la lèpre. D'autre part, l'examen de la littérature relative à ces dérivés révèle des divergences troublantes eu égard à l'activité thérapeutique des remèdes chaulmoogriques modernes, c'est-à-dire des préparations diverses données comme chimiquement définies, qui ont depuis une cinquantaine d'années remplacé les huiles extraites, plus ou moins sommairement, des graines de flacourtiacées.

La question de savoir quel est le produit réellement spécifique de l'action antilépreuse n'a jamais été définitivement résolue, bien qu'une probabilité raisonnable soit acquise en faveur d'une relation entre cette spécificité et la présence des acides cyclopenténo-alkylcarboniques. Toutefois, nombre de praticiens ne rejettent pas l'hypothèse selon laquelle la spécificité serait due à des "impuretés" entraînées par l'huile. Il a même été suggéré (3) que les différentes opérations de raffinage de l'huile font disparaître l'activité thérapeutique. Nous avons nous même observé que les émulsions de chaulmoograte de diéthylamino-ethanol et de cholestérol semblaient perdre leur activité par suite de la stérilisation à 100°C., ou par suite du vieillissement. C'est ainsi que nous avons été amené à rechercher quelles "impuretés" pouvaient le plus probablement exister ou apparaître dans les diverses préparations chaulmoogriques.

Le présent mémoire rend compte des premiers résultats obtenus dans cette étude et concernent l'action de l'air ou de l'oxygène sur les huiles de chaulmoogra ou sur les éthers méthyliques et éthyliques préparés à partir de ces huiles. Bien que l'étude des altérations spontanées de ces dérivés au contact de l'air ne soit pas terminée, nous croyons utile de signaler dès main-

tenant aux médecins qui utilisent le chaulmoogra l'importance de ces altérations, ainsi que les conditions dans lesquelles elles prennent naissance et se développent, de telle sorte qu'ils puissent éventuellement relier telle variation inattendue de l'activité thérapeutique à des altérations survenues à leur insu, dans les remèdes utilisés.

Nos expériences montrent que les esters chaulmoogriques sont rapidement et profondément altérés au contact de l'oxygène de l'air. L'oxygène est d'abord fixé par la molécule chaulmoogrique avec formation de peroxyde. Cette formation s'accompagne, à partir d'une certaine concentration en peroxyde, d'une auto-oxydation profonde détruisant l'édifice moléculaire. Ces réactions sont favorisées par la chaleur, et par la présence d'acides libres dans les esters chaulmoogriques. Les peroxydes sont détruits rapidement par la chaleur: (100°C.) avec auto-oxydation de la molécule. Quelques mois ou quelques heures suffisent pour transformer complètement et profondément les esters chaulmoogriques qui restent en contact avec l'air même dans un flacon bouché.

Les produits stérilisés à 100°C. et conservés en ampoules scellées ne contiennent plus de peroxydes et ne varient pas, à condition toutefois que le produit mis en ampoule n'ait pas été peroxydé antérieurement. Par contre les anciennes préparations, faites grossièrement—huiles non raffinées contenant des acides libres, esters éthyliques non rectifiés et conservés dans les flacons ordinaires—contiennent des proportions importantes de peroxyde ou bien sont profondément modifiées. Enfin la présence de catalyseurs ou d'inhibiteurs de peroxydation, dans les multiples préparations chaulmoogriques existantes, influent largement pour régler l'apparition des peroxydes et leur stabilisation.

Il résulte de ces brèves indications, qu'il peut être pratiquement impossible par exemple, de rendre compte du succès ou de l'insuccès du traitement par la description du remède.

Nous décrivons seulement, dans le présent mémoire, l'action de l'oxygène sur les esters méthyliques de *Taraktogenos kurzii*, sur les esters éthyliques d'*Hydnocarpus anthelmintica*, et sur les huiles elles-mêmes. La constitution des peroxydes ou des produits d'auto-oxydation ainsi que le comportement des différentes préparations chaulmoogriques créosotées, iodées ou autres, fera l'objet de publications ultérieures. Les méthodes de préparation et de dosage des esters peroxydés seront décrites. Signalons enfin qu'il est possible de mettre les mélanges peroxydés en émulsions

aqueuses stables injectables par voie intraveineuse. La méthode de mise en émulsion sera également décrite.

L'étude de l'activité thérapeutique des peroxydes chaulmoogriques est poursuivie d'autre part en collaboration avec le docteur Chaussinand.

PARTIE EXPERIMENTALE

Indice de peroxyde et méthode de dosage.—Il existe plusieurs méthodes de dosage des peroxydes. Celle décrite ci-dessous à été choisie eu égard à sa simplicité bien qu'elle ne soit pas très rigoureuse. Le peroxyde est en effet déterminé par son action sur l'iodure de sodium en solution acétonique, et l'iode libérée peut secondairement se fixer sur la molécule chaulmoogrique qui est éthylénique, ou sur l'acétone.

Cependant l'expérience montre que si on reste dans certaines limites de dilution de l'iode libérée, cette action secondaire se trouve réduite au minimum et la méthode proposée peut donner des indications suffisantes pour les besoins pratiques, en utilisant des réactifs courants, existant dans un laboratoire médical par exemple. L'action des peroxydes sur l'iodure de sodium se traduit par la libération de deux atomes d'iode par atome d'oxygène actif.

Il faut remarquer que l'oxygène dosable ainsi défini, n'est pas nécessairement équivalent à l'oxygène fixé. On connaît même des peroxydes qui n'agissent pas sur les iodures alcalins. Dans les cas des peroxydes chaulmoogriques le rapport de l'oxygène dosable à l'oxygène absorbé n'est pas égal à l'unité. Il y a toujours plus d'oxygène absorbé que d'oxygène dosable. Le rapport de premier au second est toujours égal ou supérieur à 2. Ce point sera discuté ultérieurement à propos de la constitution des peroxydes chaulmoogriques.¹

¹ Le présent travail était terminé lorsque nous avons eu connaissance de la nouvelle méthode de dosage de peroxyde publiée par Kenzie Nozaki⁽²⁾, méthode qui utilise, comme solvant de l'iodure de sodium et de la substance organique, l'anhydride acétique au lieu de l'acétone. Le changement de solvant conduit avec les peroxydes chaulmoogriques à des teneurs en oxygène dosable plus élevés que celles déterminées en solution acétonique. Les expériences décrites ici, ayant demandé plusieurs années, il n'était pas possible de les refaire; mais le lecteur voudra bien tenir compte de la comparaison qui vent d'être faite entre les deux méthodes.

En général, pour des peroxydations moyennes, l'indice de peroxyde mesuré par la méthode de Nozaki est supérieur d'environ 50 à celui déterminé par la méthode à l'acétone. L'allure qualitative et quantitative des phénomènes n'est pas modifiée par application de la nouvelle méthode de dosage, mais les indications concernant la teneur en oxygène actif seront

Indice des peroxydes.—Par définition nous dirons qu'un indice de 100 correspond à un demi atome d'oxygène dosable par 1000 grammes de produit.

Dosage: Faire une prise d'essai ne dépassant pas 0 gr. 150, ajouter 5 cc. d'une solution acétonique d'iodure de sodium à 10 pour cent, ajouter 3 gouttes d'acide acétique qui catalyse le transport d'oxygène actif sur l'iodure de sodium. Attendre 5 minutes et titrer l'iode libérée par l'hyposulfite de sodium N/100. Il n'est pas nécessaire d'employer d'empois d'amidon comme indicateur.

Si le dosage conduit à un volume d'hyposulfite supérieur à 20 cc., recommencer le dosage avec un volume de 10 cc. d'iodure de sodium acétonique au lieu de 5 cc. La solution acétonique contient souvent un peu d'iode libre et doit faire l'objet d'un dosage témoin afin de corriger en conséquence le volume final d'hyposulfite N/100 correspondant à 1/20, à 1000 gr. de produit.

Action de l'oxygène sur les esters méthyliques de T. kurzii.—Les esters méthyliques sont préparés par alcoolise. Ils sont rectifiés deux fois sous haut vide et ne contiennent pas d'acide libre. On a affaire aux esters totaux.

Il faut noter que l'huile de *T. kurzii* contient, d'après Cole et Cardoso (1), 22% d'acide gorlique—c'est-à-dire d'un acide éthylénique—dans la chaîne hydrocarbonée, tandis que *H. anthelmintica* employé plus loin ne contient que 1,4% du même acide. L'un et l'autre contiendrait à peu près la même proportion, 12 à 14%, d'un autre acide éthylénique, l'acide oléique. Ces compositions variables des huiles influent certainement sur le cours de la peroxydation et la composition des peroxydes.

On opère par barbotage d'oxygène finement divisé dans l'esters méthyliques. Le graphique (Fig. 1) rassemble les résultats obtenus.

importantes pour déterminer la constitution des peroxydes (communication ultérieure).

Description de la méthode de Nozaki: "... L'échantillon de peroxyde est placé dans un Erlenmeyer, bouché à l'émeri. On ajoute 5 à 10 cc. d'anhydride acétique et 1 gr. d'iodure de sodium pulvérisé. Après agitation pour dissoudre l'iodure de sodium, on abandonne 5 à 10 minutes. On ajoute 50 à 75 cc. d'eau et on agite vigoureusement pendant environ une demie minute, puis on titre l'iode libérée par une solution standard d'hyposulfite de soude en présence d'empois d'amidon si nécessaire..."

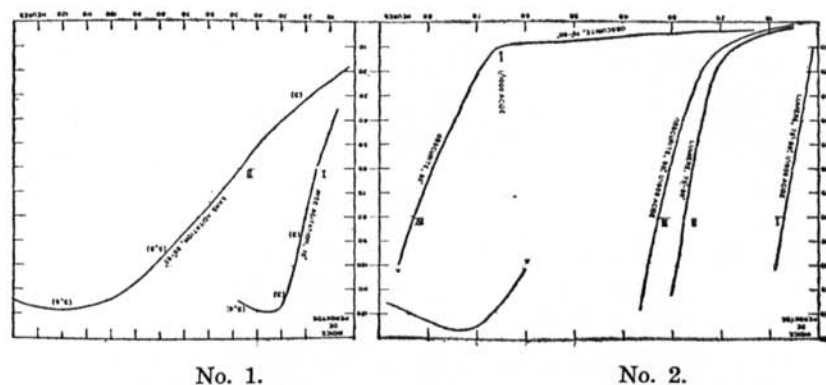


FIG. 1. Action d l'oxygène sur le chaulmoograte de methyle (*Tarakogenos kurzii*). Courbe I: Lumière, température 75-80°C., 1/1000 acide. Courbe II: Lumière, 75-80°C. Courbe III: Obscurité, 80°C., 1/1000 acide. Courbe IV: Obscurité, 70-80° et 85°C. [Note á, continuation of the IV line from a.]

FIG. 2. Action de l'oxygène sur le chaulmoograte d'ethyle (*Hydnocarpus anthelmintica*). A chaud, à l'obscurité. Courbe I: Avec agitation, température 70°C. II: Sans agitation, 60-65°C.

Courbe I: Opération à la lumière, température de 75 à 80°C., sur un mélange d'esters auquel on a ajouté 1/1000 d'acide chaulmoogrique. L'indice de peroxyde croit rapidement en 9 heures jusqu'à 100.

Courbe II: Mêmes conditions opératoires, mais avec des esters purs sans acide libre. On observe une période d'induction de 20 heures environ, ensuite accroissement rapide de l'indice jusqu'à 100. On peut attribuer la période d'induction au délai nécessaire à la formation de traces d'acides libres par auto-oxydation.

Courbe III: Mêmes conditions que dans Courbe I mais à l'obscurité.

Courbe IV: On opère dans l'obscurité à 75-85°C. Dans la première partie de la courbe l'ester méthylique est pur et pendant 65 heures l'indice de peroxyde ne varie presque pas. On ajoute des traces d'acides. Immédiatement, dans la deuxième partie de la courbe, l'indice monte jusqu'à 130, puis décroît par suite de l'auto-oxydation qui prend naissance à partir d'une certaine concentration critique en peroxyde. (Peut-être pourrait-on aussi invoquer un réarrangement de la molécule peroxydée, tel que celui observé dans les peroxydes transannulaires?)

L'indice 100 est obtenu en moins de 10 heures à la température de 75-80°C. Avec l'ester éthylique de *H. anthelmintica*

il faudra 25 heures dans des conditions à peu près analogues. Il n'est pas improbable que cette différence ne soit due à la présence d'acide gorlique.

Action de l'oxygène sur les esters éthyliques de H. anthelmintica.—Les esters sont préparés par alcoololyse et rectifiés deux fois sous haut vide. On obtient les esters totaux purs. On étudie sur ces esters: (a) l'action de l'oxygène à chaud, en présence de 1/1000 d'acide libre; (b) l'action de l'air à 15° à 37 et à 70°, avec ou sans acide libre; (c) l'action de l'eau oxygénée.

On opère sur un mélange d'esters additionné de 1/1000 d'acide libre. Le produit est placé dans un ballon à large fond plat, dans lequel on fait au préalable le vide avant d'introduire l'oxygène, sous une légère pression d'une dizaine de centimètres d'eau. L'appareil est maintenu dans l'obscurité.

La Courbe I donne les teneurs en peroxyde obtenues avec agitation à 70°C., et la Courbe II sans agitation à 60-65°. On voit que la teneur en peroxyde atteint son maximum en 25 heures dans le premier cas, et en 140 heures dans le second. Ce maximum correspond dans les deux cas, à un indice de peroxyde de 120 environ. Ensuite on observe une baisse de l'oxygène actif dosable.

L'absorption totale de l'oxygène est mesurée par pesées, et le rapport de l'augmentation totale de poids au poids de l'oxygène dosable est indiqué par un nombre entre parenthèses, placé le long de la courbe. On voit que ce rapport varie entre 3 et 5.

Dès que la teneur en peroxyde atteint un certain niveau, d'environ 100, le rapport augmente, tandis que la teneur en oxygène dosable tend vers un maximum ou diminue. Ce phénomène est général.

Action de l'air sur les esters éthyliques de chaulmoogra.—(a) Action à chaud: La peroxydation porte sur des esters additionnés de 1/1000 d'acide libre. Elle s'opère sans agitation dans de larges capsules à fond plat, sur une épaisseur inférieure à un centimètre. Les capsules sont maintenues à l'obscurité et à l'étuve, soit à 37°C. (Fig. 3, Courbe I), soit à 70°C. (Courbe II).

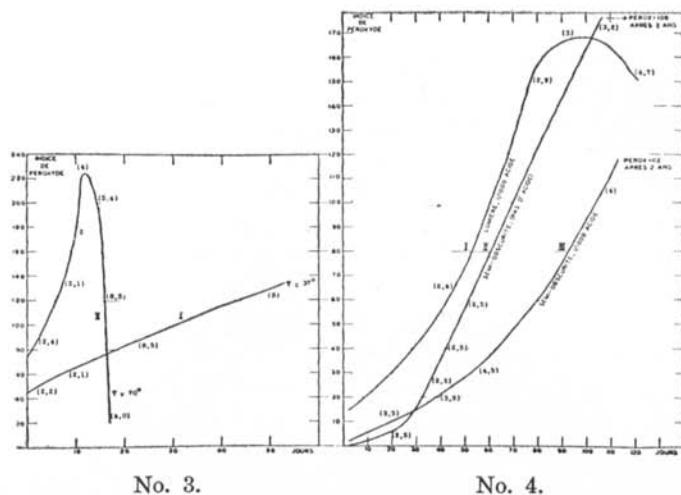


FIG. 3. Action de l'oxygène sur le chaulmoograte d'éthyle. A chaud, à la obscurité, sans agitation. Courbe I: température 37°. Courbe II: 70°C.

FIG. 4. Action de l'air sur le chaulmoograte d'éthyle. Température 15°C. Courbe I: 1/1000 de acide libre, à la lumière. Courbe II: Pas d'acide libre, semi-obscurité. Courbe III: 1/1000 d'acide libre, semi-obscurité.

Dans le deuxième cas (Courbe II, 70°), la teneur en peroxyde monte lentement et atteint 120 en 50 jours, mais le 15e jour le rapport oxygène total/oxygène dosable augmente rapidement et atteint 7.

Dans le Deuxième cas (Courbe II, 70°), la teneur en peroxyde atteint le maximum très élevé de 200 en 11 jours, mais décroît très rapidement dans les jours qui suivent. Il y a auto-oxydation profonde, et le rapport oxygène total/oxygène dosable, qui se maintient aux environs de 2 dans les premiers jours, augmente rapidement pour atteindre 40 le 17e jour.

(b) Action à 15°C.: Les expériences suivantes poursuivies pendant deux ans renseignent sur les transformations qui peuvent affecter les préparations chaulmoogriques dans les conditions ordinaires de conservation, dans les dispensaires de brousse par exemple.

Les esters éthyliques, avec ou sans acide libre, sont abandonnés dans des récipients ouverts à large fond, sous des épaisseurs de 1 à 2 cm. La graphique (Fig. 4) rassemble les résultats obtenus.

Dans les courbes on voit que dans tous les cas la teneur en peroxyde monte régulièrement et atteint plus ou moins vite une valeur élevée de 160 et plus après 2 ou 3 mois. La lumière

semble favoriser la peroxydation. La préparation sans acide libre, présente une période d'induction de 30 jours environ. Une fois le maximum atteint le phénomène déjà observé d'auto-oxydation se développe, et après deux ans l'indice de peroxyde est descendu aux environs de 100. Après quatre ans les esters sont complètement transformés en produits d'oxydation solides. Le rapport oxygène absorbé/oxygène dosable reste longtemps aux environs de 2,5 mais augmente avec le temps et la teneur en peroxyde.

Il résulte encore de ces expériences qu'il est possible de préparer facilement des esters peroxydés, sans appareillage spécial par simple exposition à l'air pendant quelques mois, dans de larges cuves placées à la lumière. Une agitation imprimée de temps à autre favorise la régularité de la transformation et évite que les teneurs locales élevées en peroxyde n'amorcent la phase destructive d'auto-oxydation. On peut, si on dispose d'une trompe à l'eau, provoquer la peroxydation par barbotage d'air finement divisé dans les mélanges à la température ordinaire, ce qui augmente la vitesse de peroxydation. On remarque que la peroxydation à l'air et à la température ambiante, permet d'atteindre des teneurs plus élevées en peroxyde que les opérations conduites à chaud et en présence d'oxygène.

Si on veut disposer d'une préparation qui reste assez constante pendant quelques mois, en vue d'un usage thérapeutique, nous suggérons d'utiliser des mélanges ayant atteint un indice de 100 en peroxyde, par exposition à l'air, à la température ambiante, pendant environ deux mois. Nous verrons plus loin que ces mélanges possèdent d'autre part la propriété de se mettre facilement en émulsions aqueuses.

Action de l'eau oxygénée sur les esters d'H. anthelmintica.— On opère avec des esters totaux rectifiés trois fois et additionnés de 1/1000 d'acide libre. On agite avec de l'eau oxygénée à 100 volumes, en grand excès, après avoir ajusté le pH à 7,5.

Divers essais ont montré que l'indice de peroxyde atteint rapidement 40 en 4 heures environ, mais qu'une action même prolongée ne permet pas de dépasser 45. Le mécanisme de peroxydation par l'eau oxygénée semble donc différent de celui par l'oxygène libre. Cette action de H_2O_2 n'a pas été étudié plus à fond.

Action de l'oxygène sur l'huile de chaulmoogra.—A chaud (70-80°C.), par barbotage d'oxygène, l'huile de *T. kurzii* subit une augmentation lente de l'indice de peroxyde, qui ne dépasse pas 30 à 35. Il y a rapidement auto-oxydation, même pour de faibles teneurs en peroxyde. Cette auto-oxydation s'accompagne

d'un épaissement notable de l'huile. Ce phénomène peut trouver une explication dans la proximité des trois chaînes hydrocarbonnées qui existent dans la molécule de glycérides, proximité favorisant l'action de l'oxygène actif à l'intérieur de l'édifice glycéridique.

Nous avons d'autre part examiné des échantillons d'huile de *T. kurzii* et d'*H. anthelmintica* exposés à l'air pendant 8 ans. On constate que la partie supérieure est profondément altérée. Des prélèvements opérés sur cette portion supérieure accusent des indices de peroxydes de 52 (*T. kurzii*) et de 80 (*H. anthelmintica*).

Il faut donc conclure que l'air agit également sur les huiles brutes, en les transformant peu à peu en produits peroxydés ou auto-oxydés. L'agitation et l'état fluide, ainsi qu'une température élevée, favorisent cette transformation.

Emulsification des peroxydes chaulmoogriques.—Il est possible de préparer des émulsions aqueuses à 2 ou 3 pour cent, d'esters chaulmoogriques à condition que ces esters aient subi une peroxydation préalable.

On opère avec des esters éthyliques additionnés de 1/1000 d'acide chaulmoogrique libre, et ayant atteint un niveau de peroxydation de 100-120. On additionne d'eau distillée et ajuste le pH à 8 par addition de NaOH, N/10. On opérera par exemple avec 4 gr. d'esters éthyliques pour 100 cc. d'eau. L'émulsion est obtenue très rapidement dans un émulsionneur de laboratoire. On centrifuge pour séparer la partie huileuse non émulsionnée. Si l'émulsion est bien réussie, elle filtre facilement à travers un filtre à plis; ce qui peut éventuellement servir à séparer la portion huileuse si on ne dispose pas d'une centrifugeuse. Une telle émulsion est stable même après un an.

Si la teneur en peroxyde est faible, il n'est pas possible d'obtenir une émulsion stable. Il en est de même si on utilise une préparation trop peroxydée, ayant déjà subi une auto-oxydation.

Il convient de ne pas stériliser ces émulsions à l'autoclave, de façon à ne pas détruire les peroxydes. Il est possible que la tyndalisation respecte les peroxydes, bien que la question n'ait pas été examinée. Il semble préférable d'opérer d'une manière stérile ou de vérifier l'asepsie de l'émulsion par un ensemencement témoin.²

² Ces émulsions aqueuses, administrées à des rats infectés par le bacille de Stefansky, n'ont pas montré d'action retardatrice nette sur l'évolution de la maladie. L'expérience a porté sur une trentaine de rats. Le remède était donné par voie intraveineuse ou buccale.

Nature des produits oxygénés.—Cette question n'est pas complètement élucidée, et fera l'objet d'une communication ultérieure. Notons seulement que le rapport: oxygène absorbé/oxygène dosable est toujours égal ou supérieur à 2, et que ce rapport augmente toujours avec le temps et avec la teneur en peroxyde, jusqu'à atteindre 8 et plus, par suite probablement de l'auto-oxydation destructrice de la molécule.³ Le phénomène de fixation de l'oxygène est donc complexe.

CONCLUSIONS

1. L'action de l'oxygène pur et de l'air sur les esters de *Taraktogenos kurzii* et d'*Hydnocarpus anthelmintica*, ainsi que sur les huiles elles-mêmes, a été étudiée.
2. Ces diverses préparations, et plus spécialement les esters, absorbent facilement l'oxygène de l'air pour donner naissance à des peroxydes.
3. Cette absorption est facilitée par la présence d'acides libres, par la lumière.
4. Il est facile de préparer des mélanges peroxydés par exposition à l'air et à la température ambiante. Le niveau de peroxydation atteint facilement en quelques semaines l'indice 100. Il y a plus d'oxygène absorbé que d'oxygène dosable.
5. Une méthode de dosage des peroxydes est décrite, avec une solution acétonique d'iodure de sodium. (Une méthode de dosage avec une solution d'iodure de sodium dans l'anhydride acétique est également décrite. Cette dernière méthode donne une teneur supérieure en oxygène dosable.)
6. Si l'action de l'oxygène se prolonge, la quantité d'oxygène absorbé augmente rapidement, surtout à chaud lorsqu'intervient l'oxydation profonde de la molécule.
7. Certaines préparations peroxydées peuvent se mettre en émulsions aqueuses stables à 2 ou 3 pour cent. Ces émulsions peuvent être injectées par voie intraveineuse.
8. L'étude de la constitution des peroxydes ainsi que de leur activité thérapeutique est poursuivie d'autre part.

Nous remercions M. K. Filer qui a bien voulu assurer l'expérimentation sur la lèpre murine.

³ Si on tient compte des résultats fournis par la nouvelle méthode de dosage de Nozaki (2) on dira que le rapport: Oxygène absorbé/oxygène dosable, est toujours supérieur à 1. On pourrait supposer que la valeur inférieure 1 du rapport correspond au peroxyde pur, contenant 1 oxygène actif par molécule chaulmoogrique.

BIBLIOGRAPHIE

1. COLE, H. I. and CARDOSO, H. T. *J. American Chem. Soc.* **61** (1939) 2349-53.
2. NOZAKI, K. Iodometric method of analysis for organic peroxides. *Ind. Eng. Chem. Analytic.* **18** (1946), 583.
3. STEVENEL, L. L'épuration des huiles de chaulmoogra n'est-elle pas une erreur thérapeutic? Réflexions au sujet des injections intraveineuses d'huile. *Bull. Soc. Path. exot.* **28** (1935) 14-18.