

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
DE TIZI OUZOU



جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ

Département de Pharmacie
N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement

Le 02 JUILLET 2017

Thème :

**SYNTHESE, CARACTERISATION ET ETUDE DE
L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DU
CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE**

Promotrice : Dr HADHOUM Nadia

Co-promoteur : Dr DJARBOUA Taoufik

Réalisé par :

M^{elle} SIDER Thili Malha

M^{elle} YASSA Zahoua

Membres du jury :

Dr. MAMOU Marzouk	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Président de jury
Dr. HADHOUM Nadia	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promotrice
Dr. DJARBOUA Taoufik	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-promoteur
Dr. MOUHOUB Latifa	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à :

Ma douce YEMMA : aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour ta tendresse, ton amour, ta patience, tes sacrifices, ta générosité, ton encouragement, toi qui n'a jamais cessé de croire en moi.

Vava, mon exemple dans la vie : que tu puisses trouver dans ce travail le résultat de tant d'années de sacrifices et de privations pour mon éducation et ma formation. Je ne te remercierai jamais assez pour ton amour, ton soutien permanent et les valeurs que tu m'as transmises.

Ma chère et unique Sœur Thiziri et mes adorables Frères Aghiles et Takfarinas, je vous porterai dans mon cœur pour toujours.

Mon Ange, mon neveu Aris, je prie le bon Dieu de le bénir et de veiller sur lui.

Tous les membres de ma famille, trouvez ici l'expression de mon affection.

A mes amis Boussad et Zahoua, merci pour votre soutien, vos conseils, et vos encouragements, merci d'être toujours présents pour moi. Puisse Dieu vous aider à réaliser vos plus grands rêves.

Thili malha Sider

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur. Celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour, que dieu te garde pour moi **PAPA***

*A ma très chère maman en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour ton soutiens et les sacrifices dont elle a fait preuve à mon égard. Merci **Maman***

*A mon frère et mon ami **ALI** qui a toujours été à mes coté, et qui ma toujours soutenue, et à qui je souhaite tout le bonheurs et le succès du monde.*

*A ma princesse, ma petite sœur **ANNAIS**, la bougie de la maison à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite dans sa vie.*

A ma grand mère, pour tout l'amour que tu nous as donné. Je te souhaite un bon rétablissement et que dieu te garde.

*A mon fiancé **MEHDI**, pour ta compréhension, ta confiance, ta patience et ta tendresse. Tu m'as toujours soutenu et réconforté. Tu as supporté mon caractère et mes changements d'humeur pendant de longues périodes de mon parcours. Mes sincères gratitude.*

A tout les membres de ma famille : tantes, oncles, cousins, cousines.

*A mes amis que j'aime et qui m'ont toujours soutenus et étaient toujours à mes cotés. Spécialement à ma très chère amie et sœur **Malha** qui a toujours été à mes coté pendant tout ce parcours et avec qui je partage ce travail et pour qui j'adresse mes sincères remerciements pour tout ce qu'elle a fait pour la réussite de ce mémoire.*

YASSA ZAHOUA

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé vie et santé jusqu'à la réalisation de ce modeste mémoire.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre reconnaissance et nos sincères remerciements :

A notre respectueuse promotrice Dr HADHOUM Nadia maitre assistante hospitalo-universitaire en chimie thérapeutique au département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Nous vous exprimons particulièrement notre reconnaissance d'avoir accepté de nous encadrer pour notre mémoire de fin d'études, ainsi que pour votre soutien, vos remarques pertinentes et votre encouragement.

A notre Co-promoteur Dr DJARBOUA Taoufik maitre-assistant hospitalo-universitaire en microbiologie médicale au département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université de Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou. Nous vous adressons nos profonds remerciements de nous avoir assisté dans la réalisation de la pratique, également pour vos réflexions et vos conseils que vous avez pu nous prodiguer.

Au Docteur MAMOU Marzouk maitre-assistant hospitalo-universitaire en chimie analytique, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Vous nous avez fait honneur d'accepter de présider notre jury, veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.

Au Docteur MOUHOUB Latifa maitre assistante hospitalo-universitaire en pharmacologie au département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Vous nous avez fait honneur d'avoir accepté d'examiner notre travail. Veuillez accepter notre grande gratitude.

Nous témoignons notre gratitude à :

Madame LALAMI technicienne du laboratoire de chimie thérapeutique au département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour sa grande gentillesse, sa bonne humeur et de nous avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

Docteur H.BENSISAID assistant en chimie analytique au département de pharmacie de la faculté de Médecine de Tizi-Ouzou, pour ses réflexions et conseils qu'il a pu nous prodiguer.

Docteur A.AMZIANE ; maitre assistant en chimie analytique au département de pharmacie de la faculté de Médecine de Tizi-Ouzou : pour son aide dans notre pratique.

Docteur BOURSOUTI Mourad ; résident en chimie analytique au département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son aide et ses fructueuses réflexions.

Notre amie Dr AKLI Karima ; résidente en chimie analytique au département de pharmacie de la faculté de Médecine de Tizi-Ouzou, pour son aide et son soutien amical.

Nos gratitude s'adresseront également à madame TOUATI pour le temps qu'elle nous a consacré afin de nous aider dans notre pratique.

Nous tenons aussi à exprimer notre gratitude à Melle NOUALI Sabrina, pour son aide même de loin dans notre recherche bibliographique.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	v
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	viii
Introduction	1
Objectifs	2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES CONSERVATEURS ANTIMICROBIENS.

1. Définitions.....	3
1.1. Médicament	3
1.2. Principe actif.....	3
1.3. Excipient.....	3
2. Généralités sur les micro-organismes	4
2.1. Définition des micro-organismes.....	4
2.1.1. Définition des bactéries	4
2.1.2. Définition des champignons.....	5
2.1.3. Classification des bactéries	5
3. La qualité microbiologique des médicaments.....	6
3.1. Définition.....	6
3.2. Les préparations pharmaceutiques à grand risque de contamination	6
3.2.1. Préparations injectables	6
3.2.2. Préparations ophtalmiques multi-doses.....	7
3.3. Contrôle de la qualité microbiologique des médicaments.....	7
3.4. Origine de contamination microbienne des médicaments	8
3.5. Test d'efficacité de la conservation antimicrobienne	8
4. Les agents antimicrobiens utilisés pour la conservation des médicaments	10
4.1. Traitement par des moyens physiques à action antibactérienne.....	10
4.1.1. Traitement thermique	10
4.1.2. La filtration.....	11
4.1.3. Les rayonnements.....	11
4.2. Traitement par ajout de conservateurs antimicrobiens	11
5. Les conservateurs antimicrobiens	11
5.1. Définition d'un conservateur antimicrobien.....	11
5.2. Classification et mécanisme d'actions des différents conservateurs antimicrobiens	12
5.2.1. Les ammoniums quaternaires	12
5.2.2. Les dérivés organo-mercuriels	12
5.2.3. Les amidines.....	12
5.2.4. Les esters de l'acide parahydroxybenzoïque.....	13

5.2.5.	Les alcools.....	13
5.3.	Spectre d'activité des conservateurs antimicrobiens.....	14
5.3.1.	Détermination de la CMI et la CMB.....	14
5.3.2.	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	14
5.3.3.	Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	15
5.4.	Critères de choix d'un conservateur antimicrobien.....	15
6.	Toxicité des conservateurs.....	17
6.1.	Ammoniums quaternaires : chlorure de benzalkonium.....	17
6.2.	Parabènes.....	17
6.3.	Les alcools (Chlorobutanol).....	18
6.4.	Dérivés organo-mercuriels (thiomersal).....	18
6.5.	Les amidines (chlorhexidine).....	18

CHAPITRE II: ETUDE DU CHLOROBUTANOL

1.	Définition.....	19
2.	Historique.....	19
3.	Nomenclatures et structures.....	20
3.1.	Chlorobutanol anhydre.....	20
3.2.	Chlorobutanol hémihydraté.....	20
4.	Propriétés physiques, chimiques du chlorobutanol.....	21
5.	Synthèse chimique du chlorobutanol.....	24
5.1.	Procédé de synthèse.....	24
5.2.	Mécanisme de synthèse.....	25
6.	Relation structure activité.....	25
7.	Propriétés pharmacologiques et usages du chlorobutanol.....	25
7.1.	Usages en médecine humaine.....	25
7.2.	Usages en médecine vétérinaire.....	26
7.3.	Usages en industrie pharmaceutique et cosmétologie.....	26
8.	Effets et mécanismes d'action du chlorobutanol.....	26
8.1.	Chez l'homme.....	26
8.2.	Mécanisme d'action sur les microorganismes.....	28
9.	Pharmacocinétique du chlorobutanol.....	28
9.1.	Absorption.....	28
9.2.	Distribution.....	29
9.3.	Métabolisme.....	29
9.4.	Élimination.....	29
10.	Effets indésirables.....	29
11.	Contre indications et précautions d'emploi.....	30
12.	Toxicité du chlorobutanol.....	30

12.1. Toxicité par administration orale.....	30
12.2. Toxicité par administration parentérale.....	31
13. Dégradation du chlorobutanol dans les préparations pharmaceutiques aqueuses.....	31
13.1. Facteurs influençant la dégradation du chlorobutanol.....	33
13.2. Les produits de dégradation du chlorobutanol	33
14. Détermination de la teneur en chlorobutanol dans les produits finis.....	34

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I: SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DU CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE

1. Matériel et méthodes.....	35
1.1. Matériel.....	35
1.1.1. Appareillage	35
1.1.2. Verrerie et autres	36
1.2. Méthodes	36
1.2.1. Synthèse du chlorobutanol	36
1.2.2. Caractérisation et identification du chlorobutanol hémihydraté synthétisé	42
1.2.3. Essais sur le chlorobutanol hémihydraté.....	48
1.2.4. Détermination de la teneur en chlorobutanol	54
2. Résultats et discussion	57
2.1. Calcul du rendement de la réaction de synthèse.....	57
2.1.1. Détermination du réactif limitant	57
2.1.2. Calcul de la masse théorique du chlorobutanol.....	58
2.1.3. Calcul du rendement de la synthèse (R).....	58
2.2. Caractérisation et identification du chlorobutanol hémihydraté synthétisé.....	59
2.2.1. Aspect et odeur.....	59
2.2.2. Analyse par microscopie électronique à balayage	59
2.2.3. Solubilité	60
2.2.4. Température de fusion.....	61
2.2.5. Identification par des réactions colorimétriques	62
2.2.6. Identification par des méthodes spectrales.....	64
2.3. Essai sur le chlorobutanol hémihydraté.....	69
2.3.1. Aspect de la solution	69
2.3.2. Test d'acidité	70
2.3.3. Détermination de la teneur en eau dans le produit synthétisé.....	72
2.4. Détermination de la teneur en chlorobutanol	72

CHPITRE II: EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DU CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE.

1. Matériel et méthodes.....	75
1.1. Matériel utilisé.....	75
1.2. Méthodes	75
1.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	76
1.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB et de la concentration minimale fongicide CMF.....	80
2. Résultats.....	81
2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	81
2.1.1. Les souches bactériennes	81
2.1.2. Les souches fongiques.....	83
2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB et de la concentration minimale fongicide CMF.....	85
2.2.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	85
2.2.2. Détermination de la concentration minimale fongicide	87
3. Discussion.....	90
4. Limites de l'étude	91

CONCLUSION.....92

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

[Chlorobutanol] : Concentration du chlorobutanol

[c] : Concentration

µg : Microgramme

µl : Microlitre

ATC: classification Anatomique, Thérapeutique et Chimiques des médicaments.

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine Triphosphate

BGT: Bouillon Glucosé Tamponné

CAS : Chemical Abstracts Service.

CCK8: Cholécystokine 8

CFU: Colonie Formant Unité.

Clb: Chlorobutanol.

ClbH: Chlorobutanol hémihydraté.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMF : Concentration Minimale Fongicide.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

E.Coli : Escherichia Coli.

IUPAC: International union of Pure and Applied Chemistry.

Gram - : Gram négatif

Gram + : Gram positif

mg : Milligramme

ml : Millilitre

TCA: Tri-Chloro-Acétique.

TCE: Tri-Chloro-Ethanol.

.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les types de micro-organisme, leurs tailles et leurs natures cellulaires.	4
Tableau II : Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique des préparations non obligatoirement stérile	8
Tableau III : Les exigences de la pharmacopée européenne concernant l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	9
Tableau IV: Exigences des pharmacopées européenne et américaine concernant le test d'efficacité de la conservation antimicrobienne.....	10
Tableau V: Structure chimique et spectre d'activité des conservateurs antimicrobiens.	14
Tableau VI: La concentration minimal inhibitrice de quelques conservateurs antimicrobiens utilisés dans les préparations pharmaceutique	15
Tableau VII: Les valeurs de pH optimum de certains conservateurs antimicrobien et leurs incompatibilités avec d'autres produits chimiques	16
Tableau VIII : Propriétés physiques et chimiques du chlorobutanol	21
Tableau IX : Les taux de rendement selon les quantités de réactifs et conditions expérimentales	24
Tableau X : Les valeurs des CMI du chlorobutanol	28
Tableau XI : appareils utilisés pour la synthèse, la caractérisation et l'identification du chlorobutanol hémihydraté.....	35
Tableau XII : Verrerie et autres matériels utilisés pour la synthèse et caractérisation du chlorobutanol hémihydraté.....	36
Tableau XIII : Tableau d'avancement de la réaction de synthèse du chlorobutanol hémihydraté.....	41
Tableau XIV : Classification des solubilités des composés selon la pharmacopée européenne.	42
Tableau XV : Préparation des solutions témoins d'opalescence.....	49

Tableau XVI : Préparation des solutions témoins de coloration	50
Tableau XVII : Bilan de la réaction de synthèse du chlorobutanol hémihydraté.....	58
Tableau XVIII : Calcul du rendement de la synthèse du chlorobutanol hémihydraté	58
Tableau XIX : Les bandes d'absorption de l'infrarouge.....	66
Tableau XX : Tableau de comparaison entre les nombres d'onde des bandes du spectre d'absorption infrarouge de référence et du chlorobutanol synthétisé.	68
Tableau XXI : Résultats de la vérification du titre d'hydroxyde de sodium.....	70
Tableau XXXI : Résultats du test d'acidité.....	71
Tableau XXIII : Résultats du titrage de la solution du thiocyanate de sodium.....	72
Tableau XXIV : Tableau des résultats du dosage du chlorobutanol.	73
Tableau XXV : Matériel utilisé pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	75
Tableau XXVI : Les souches des micro-organismes testés	76
Tableau XXVII : Gamme de dilution du chlorobutanol.....	78
Tableau XXVIII : Les conditions d'incubation des micro-organismes testés.....	80
Tableau XXIX : Tableau des résultats de la CMI des souches testées.	85
Tableau XXX : Les résultats des CMB et CMF des souches testées	89
Tableau XXXI : Méthodes analytiques utilisées pour le dosage du chlorobutanol	IX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une cellule bactérienne (procaryote)	4
Figure 2 : Comparaison entre la composition des parois bactériennes des Gram+ et Gram- ...	5
Figure 3 : Formule développée et vue tridimensionnelle du chlorobutanol anhydre	20
Figure 4 : Formule développé du chlorobutanol hémihydraté	21
Figure 5 : Spectre infrarouge du chlorobutanol hémihydraté.....	22
Figure 6: Spectre de résonance magnétique nucléaire (13C RMN).....	23
Figure 7: Spectre de résonance magnétique nucléaire 1H RMN	23
Figure 8: Spectre de masse du chlorobutanol.....	23
Figure 9 : Schéma de la réaction de synthèse du chlorobutanol.	25
Figure 10 : Voies de dégradation du chlorobutanol	32
Figure 11 : Mécanisme de dégradation du chlorobutanol en milieu alcoolique non aqueux. .	34
Figure 12 : Mécanisme de dégradation dans le milieu alcalin.	34
Figure 13 : Les réactifs de synthèse et mélange réactionnel sous hotte	37
Figure 14 : Précipité d'hydroxyde de potassium, et la filtration sous-vide.....	37
Figure 15 : Elimination de l'excès d'acétone par le Rotavapeur	38
Figure 16 : Cristallisation du produit synthétisé dans l'eau glaciale.....	39
Figure 17 : Elimination de l'excès d'eau du produit final.....	39
Figure 18 : Test de point de fusion.....	43
Figure 19 : Spectrophotomètre UV-VISIBLE à Balayage PerkinElmer Lambda 25.....	46
Figure 20 : Spectrophotometer Infrarouge SPECTRUM TWO PerkinElmer.....	47
Figure 21 : Pastilleuse	47

Figure 22 : Les solutions témoins d'opalescences	49
Figure 23 : Solutions témoins du degré de coloration.....	51
Figure 24 : Appareil de Karl Fisher Mettler Toledo	53
Figure 25 : Schéma de dosage du chlorobutanol.....	56
Figure 26 : Aspect final du produit synthétisé	59
Figure 27 : Image prises au microscope électronique à balayage aux grossissements	60
Figure 28 : Test de solubilité du produit synthétisé dans l'eau, éthanol et glycérol.	61
Figure 29 : Résultats du test de point de fusion	62
Figure 30 : Réaction du chlorobutanol avec la pyridine	62
Figure 32 : Formation d'un précipité noir avec le nitrate d'argent ammoniacal.....	63
Figure 33 : Précipité jaune de la réaction avec l'iodure de potassium.	63
Figure 35 : Spectre d'absorption dans UV-Visible du chlorobutanol synthétisé.....	64
Figure 36 : Spectre d'absorption dans l'infrarouge du chlorobutanol Synthétisé.....	65
Figure 37 : Spectre d'absorption infrarouge du chlorobutanol hémihydraté	68
Figure 38 : Résultat du test d'opalescence.	69
Figure 39 : Résultat du test de degré de coloration	70
Figure 40 : Les souches microbiennes utilisées dans le contrôle de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté synthétisé.....	77
Figure 41 : Distribution des inoculums microbiens	79
Figure 42 : Boîtes des contrôles	79
Figure 43 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i>	82
Figure 44 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	82

Figure 45 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis du <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Figure 46 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis du <i>candida albicans</i>	84
Figure 47 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis d' <i>Aspergillus niger</i>	84
Figure 48 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i>	86
Figure 49 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis du <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ..	86
Figure 50 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis de <i>staphylococcus aureus</i>	87
Figure 51 : La valeur de la CMF du chlorobutanol vis-à-vis du <i>candida albicans</i>	88
Figure 52 : Les résultats de la CMF du chlorobutanol vis-à-vis de l' <i>aspergillus niger</i>	88
Figure 53 : Schéma du Rotavapeur	II
Figure 54 : Schéma de principe de l'arrivée des électrons sur l'échantillon dans un MEB	II
Figure 55 : Les différentes étapes de changements d'une substance pendant le cycle de chauffage	III
Figure 56 : Schéma comparatif des 2 méthodes de dosage de l'eau par Karl Fisher	IV
Figure 57 : Les différents types de transition électronique	IV
Figure 58 : Corrélation dans le moyen infrarouge entre groupes fonctionnels et bandes d'absorption.....	VII

Introduction

Les excipients jouent un rôle capital dans la conception, la fabrication, et la conservation des médicaments. La connaissance de leurs toxicités, des propriétés physico-chimiques, de la fonctionnalité ainsi que les domaines d'application de ces derniers est donc primordiale.

L'ajout d'un conservateur antimicrobien présente un grand intérêt dans le cas où les préparations pharmaceutiques ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, (notamment les préparations aqueuses), ce pour éviter la prolifération ou limiter la contamination microbienne. Car celles-ci, même dans les conditions normales de conservation et d'emploi (surtout dans le cas des récipients multi-doses), peuvent se produire et entraîner une infection pour le malade et/ou une détérioration de la préparation.

Le chlorobutanol est un alcool trihalogéné doué d'une activité hypnotique, sédatrice, antalgique et anesthésique locale, mais aussi bactériostatique et fongistatique. Contrairement aux propriétés pharmacologiques qui sont actuellement délaissées, la propriété antimicrobienne est encore exploitée dans plusieurs formulations pharmaceutiques dédiées à l'antisepsie buccale, auriculaire, oculaire, et aussi dans la conservation antimicrobienne (excipient) des collyres, pommades ophtalmiques et certaines préparations injectables.

Dans ce contexte, notre travail est structuré en deux parties :

Une partie bibliographique, dans laquelle nous aborderons des généralités sur les conservateurs antimicrobiens et une étude pharmaco-chimique du chlorobutanol.

Une partie expérimentale portée sur la synthèse, l'identification, la caractérisation et l'évaluation de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté.

Objectifs

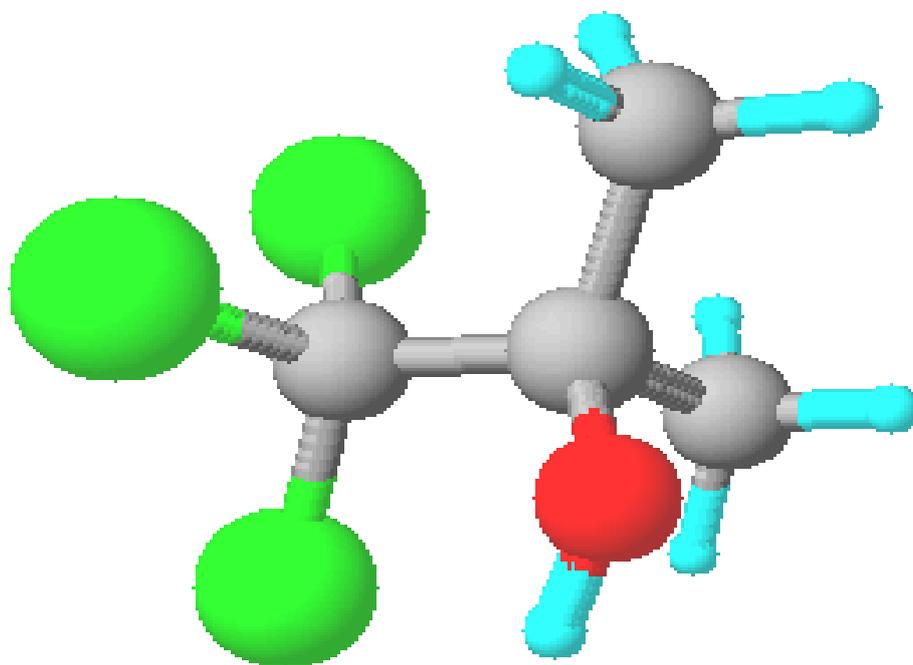
Ce mémoire de fin d'études ; à l'image de la polyvalence de la pharmacie, nous a permis d'appliquer les connaissances acquises durant notre cursus dans différents domaines à savoir : la chimie thérapeutique, la chimie analytique, la pharmacologie, la bactériologie et autres.

L'objectif principal de notre travail était l'obtention du chlorobutanol hémihydraté par synthèse chimique, ainsi que l'étude de son activité antimicrobienne.

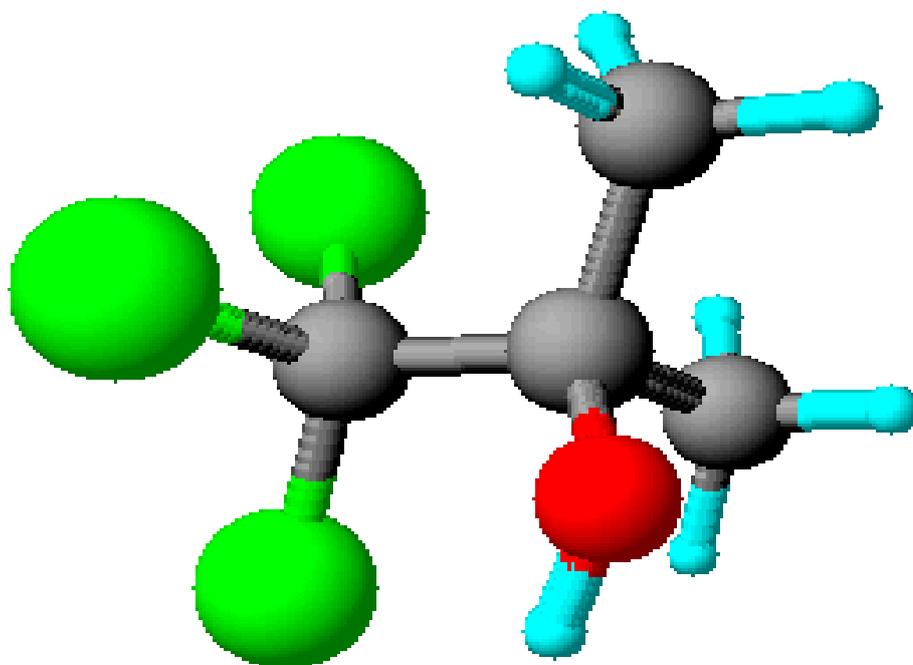
Secondairement à cet objectif principal, d'autres objectifs doivent être atteints à savoir:

- Purification du chlorobutanol hémihydraté synthétisé ;
- Identification et caractérisation du chlorobutanol synthétisé en faisant appel aux différentes techniques monographiées ;
- Détermination de la teneur en principe actif ;
- Evaluation de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol synthétisé vis-à-vis de certaines souches microbiennes.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I
GENERALITES SUR LES
CONSERVATEURS
ANTIMICROBIENS



1. Définitions

1.1. Médicament

Selon la loi 85-05 (article 170) le médicament est défini comme suit :

²« toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, tous produit pouvant être un diagnostic médical ou de restaurer, corriger, modifier leurs fonctions organique » [1].

Un médicament comprend une partie responsable de ses effets sur l'organisme humain qui est le principe actif, et une partie inactive faite d'un ou plusieurs excipients[2].

1.2. Principe actif

Un médicament peut contenir un ou plusieurs principes actifs ou substances actives.

Un principe actif est tout composant d'un médicament qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou agir sur la structure ou la fonction de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques[3].

Un principe actif peut être soit [2]:

D'origine synthétique : les substances sont obtenues par synthèse chimique dont les caractéristiques sont bien définies.

D'origine naturelle : les substances sont extraites à partir des produits naturels : végétal, minéral, biologique.

D'origine hémisynthétique : les substances d'origine naturelle qui subissent des modifications structurales pour diminuer leurs effets secondaires et augmenter le tropisme d'action.

1.3. Excipient

La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients qui sont inactifs quant à leurs intérêts thérapeutiques, cependant ils peuvent entraîner des effets nocifs pour l'organisme.

On entend par excipient tout composant, autre que le principe actif qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur au principe actif, ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à obtenir certaines propriétés du produit telle que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect, l'acceptabilité pour le patient et la facilité de fabrication.[3].

2. Généralités sur les micro-organismes

2.1. Définition des micro-organismes

Les micro-organismes sont des organismes de petite taille (Tableau I), visibles à l'aide d'un microscope à savoir : les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires ainsi que certaines algues appartenant à cette catégorie[4].

Tableau I : Les types de micro-organisme, leurs tailles et leurs natures cellulaires.

Micro-organismes	Taille	Nature des cellules
Virus	0.01-0.25µm	Acellulaires
Bactéries	0.1-10 µm	Procaryote
Champignons	2 µm-10 µm	Eucaryote
Protozoaires	2-1000 µm	Eucaryote
Algues	1 µm- plusieurs mètres	Eucaryote

2.1.1. Définition des bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes de petits diamètres entre 0.1µm et 10µm, unicellulaires. Elle appartient à un groupe appelé procaryote (Figure1) car leur unique chromosome n'est pas entouré d'une membrane nucléaire[5].

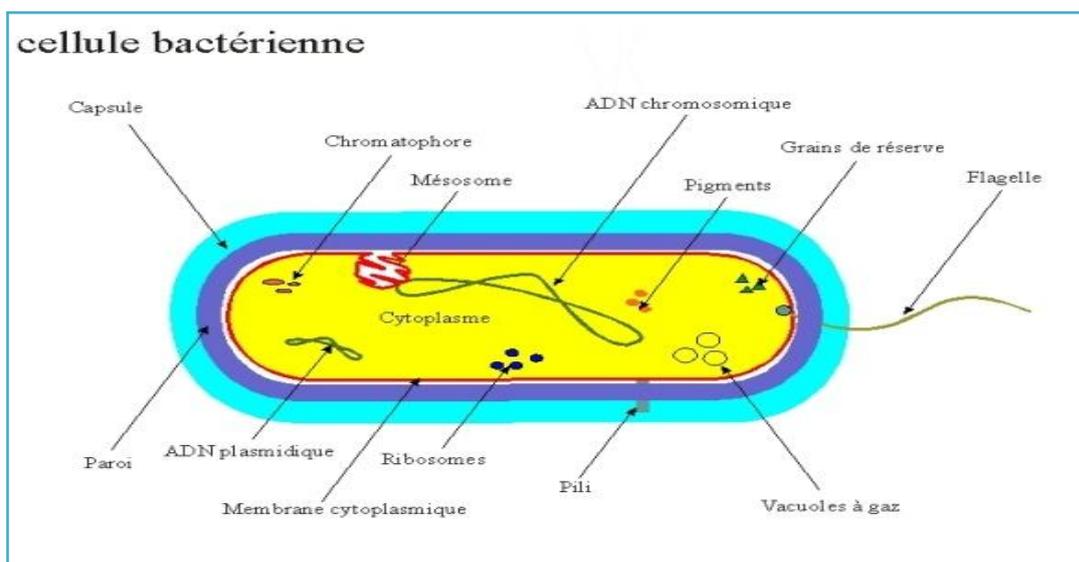


Figure 1 : Structure d'une cellule bactérienne (procaryote) [5]

2.1.2. Définition des champignons

Les champignons sont des micro-organismes vivants, de taille qui varie entre 2 μ m et 10 μ m, eucaryotes, principalement pluricellulaires tels que les moisissures et les levures [5].

2.1.3. Classification des bactéries

Les bactéries peuvent être distinguées par leur taille, leurs activités biochimiques, les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires, les conditions physiques dans lesquelles elles peuvent croître, leur forme ainsi que leur paroi cellulaire [5].

▪ La paroi cellulaire

Les parois cellulaires peuvent être différenciées par leur épaisseur, leur structure et leur composition. Toutefois, il n'y a que deux grands types de parois ; on peut facilement déterminer si une cellule possède l'un ou l'autre de ces types, grâce à leur réaction avec un colorant établi par danois Christian Gram. Une fois colorées par le violet de cristal et l'iode, les cellules qui sont dotées du premier type de paroi gardent le colorant et sont nommées Gram+, alors que les cellules dotées du deuxième type de parois ne gardent pas le colorant et sont appelés Gram – (Figure 2).

La paroi des Gram + est constituée d'une membrane plasmique entourée d'une couche épaisse de peptidoglycane, tandis que celle des Gram– possède seulement une couche fine de peptidoglycane mais elles sont entourées d'une seconde membrane externe agissant comme une barrière[5].

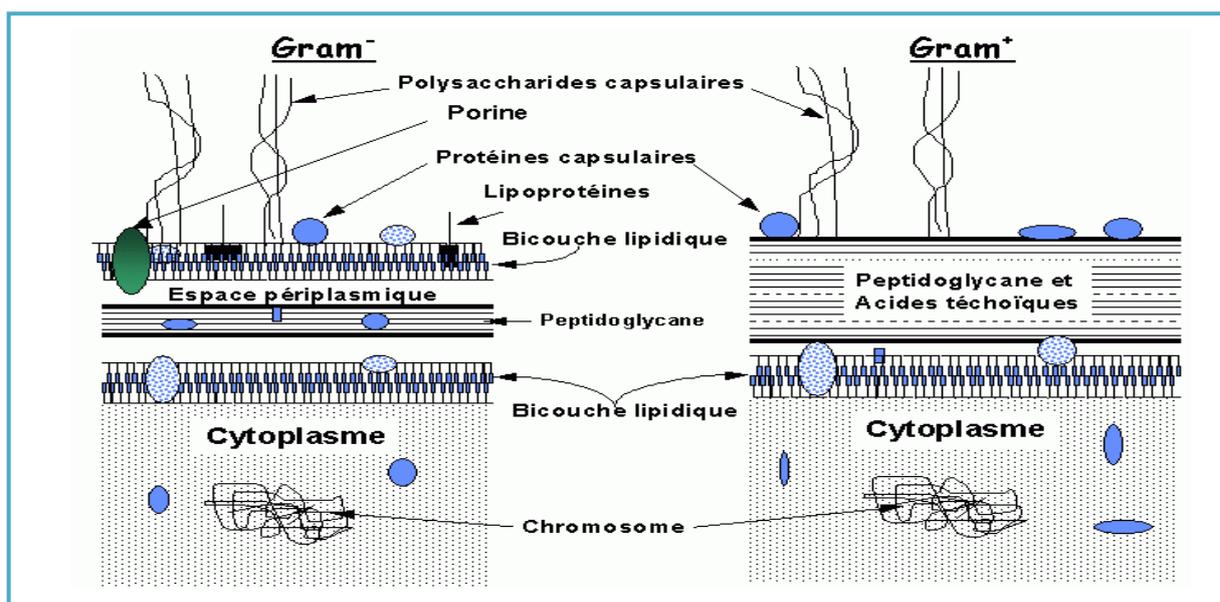


Figure 2 : Comparaison entre la composition des parois bactériennes des Gram+ et Gram-[5]

3. La qualité microbiologique des médicaments

3.1. Définition

Les produits pharmaceutiques étant destinés à être mis en contact avec différentes parties du corps, ils ne doivent pas contenir de micro-organismes susceptibles de nuire à l'utilisateur, que ce soit par leur nature ou leur concentration. Cependant, les micro-organismes font partie de notre environnement, il faudra donc s'assurer que les produits pharmaceutiques mis sur le marché sont capables de résister aux développements de micro-organismes initialement présents ou involontairement inoculés par le consommateur. A cette fin, un test appelé « Test d'efficacité de la conservation antimicrobienne » a été instauré afin d'évaluer la résistance des produits face à une inoculation volontaire et contrôlée de micro-organismes[6].

3.2. Les préparations pharmaceutiques à grand risque de contamination

Les préparations pharmaceutiques présentant les risques les plus élevés de contamination microbienne sont les préparations aqueuses, telles que les solutions, suspensions et les émulsions pour administration orale, parentérale, oculaire, notamment les préparations multi doses.

3.2.1. Préparations injectables

Les préparations parentérales sont des solutions, des émulsions et des suspensions stériles, contenant un ou plusieurs ingrédients actifs destinés à être administrés par injection, infusion ou implantation dans le corps. Ils sont conditionnés dans des contenants à dose unique ou multi- doses dans des récipients clos et transparents. Ces préparations doivent être [7]:

- Stériles : absence de tout microorganisme vivant ;
- Apyrogènes ;
- Isotoniques au plasma : osmolalité des solutions= 270 à 300 mosmol/kg. ;
- Limpides ;
- La valeur de pH tolérée : doit être comprise entre 3 et 9 afin d'assurer la stabilité du principe actif, ainsi que l'absence de la douleur à l'injection ;
- La formulation doit être stable pendant toute la durée de conservation.

3.2.2. Préparations ophtalmiques multi-doses

Les préparations ophtalmiques sont des préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et les conjonctives ou à être introduites dans le cul du sac conjonctival.

Le rôle des conservateurs dans les préparations ophtalmiques notamment les multi-doses est d'éviter, sinon de limiter la contamination bactérienne des flacons. Ils peuvent être aussi employés pour stabiliser le principe actif. La contamination peut se produire soit par contact de l'embout du flacon avec les paupières, les cils, la conjonctive ou les larmes. Sans conservateur, le contenu d'un flacon multi dose utilisé deux fois par jour est habituellement contaminé en 1 à 2 semaines. Le risque de la transmission bactérienne croisée est multiplié lors de l'utilisation d'un même flacon par plusieurs personnes d'une même famille ou en milieu hospitalier[8].

3.3. Contrôle de la qualité microbiologique des médicaments

La présence de certains microorganismes dans des préparations pharmaceutiques peut réduire voire annuler son activité, et constituer un danger potentiel pour la santé du patient. Afin d'assurer la qualité microbiologique des produits, des mesures appropriées doivent être prises tout au long de la fabrication, du conditionnement, de la conservation et de la distribution des préparations pharmaceutiques.

La pharmacopée européenne 6^{ème} éditions définit la qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques ainsi[9] :

- Pour les préparations obligatoirement stériles il faut faire un essai de stérilité en vérifiant l'absence de tout micro-organisme (levures, moisissures, bactéries) mais aussi d'endotoxine ;
- Pour les préparations non obligatoirement stériles (Tableau II), il faut faire un dénombrement de germes indicateurs de la qualité globale à savoir les germes totaux, les levures et moisissures ainsi qu'une recherche des microorganismes spécifiques pour certains produits, exemple : *E.coli* , *Salmonella* , *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Tableau II : Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique des préparations non obligatoirement stérile [9].

	DGAT (UFC /g ou UFC /ml)	DMLT (UFC/g ou UFC/ml)
Substances pour usage pharmaceutique	10^3	10^2

DGAT : dénombrement des germes aérobies totaux.

DMLT : dénombrement des moisissures et levures totales.

3.4. Origine de contamination microbienne des médicaments

Il existe deux origines majeures de contamination :

Les contaminations primaires qui peuvent survenir lors de la fabrication et les contaminations secondaires qui surviennent au cours du stockage ou de l'utilisation du produit.

Les contaminations primaires peuvent être la conséquence des matières premières utilisées, des locaux, du matériel ou encore du personnel chargé de la fabrication.

Les contaminations secondaires résultent de l'utilisation du produit par le consommateur[10].

Tout produit mis sur le marché doit comporter aussi bien sur son conditionnement primaire que sur son conditionnement secondaire une date limite de consommation (DLC), et une période après ouverture (PAO), indiquant la date jusqu'à laquelle le produit peut être utilisé avec toute sécurité. Cette disposition permet d'éviter tout danger infectieux pour le consommateur[10].

3.5. Test d'efficacité de la conservation antimicrobienne

Le test d'efficacité de la conservation antimicrobienne est une technique expérimentale suivant un protocole précis, qui permet de démontrer l'efficacité du système conservateur présent dans la formulation. Ce test consiste en l'inoculation volontaire d'une concentration connue de micro-organismes de référence dans des conditions bien définies et à température contrôlée. Ce test utilise comme micro-organismes ; les souches pathogènes pour l'être humain à savoir [9]:

- *Pseudomonas aeruginosa* ;
- *Staphylococcus aureus* ;
- *Candida albicans* ;
- *Aspergillus niger/brasiliensis* ;

Après la contamination, les bactéries, les levures et les moisissures sont dénombrées par analyse microbiologique à différents intervalles de temps (Tableau III) ; qui sont en général la sixième heure, la vingt quatrième heures, le septième jour ainsi que le vingt-huitième jour ;

- Il doit y avoir une réduction de 2 unité sur une échelle logarithmique des concentrations bactérienne à six heures et de 3 unité à vingt-quatre heures, sans survivants le vingt huitième jour ;

- Pour les levures et moisissure, il doit y avoir une réduction d’une unité logarithmique en vingt-quatre heures, et de 2 unités le septième jour sans prolifération des champignons entre la première et la quatrième semaine.

Cela permet de déterminer si le produit mis à la disposition du consommateur ne présente aucun risque.

Pour évaluer la réduction des germes, on établit la formule de calcul suivante :

$$\text{Log du nombre de micro-organismes de l'inoculum initial introduit (CFU /ml)} - \text{Log du nombre de micro-organisme au moment du prélèvement (CFU/ml)}$$

Tableau III : Les exigences de la pharmacopée européenne concernant l’évaluation de l’activité antimicrobienne[9].

		Réduction logarithmique					
		6h	24h	2j	7j	14j	28j
Préparations parentérales et ophtalmiques	Bactéries	2	3				NR
	Champignons				2		NI
Préparation pour applications locales	Bactéries			2	3		NI
	Champignons					2	NI
Préparations orales	Bactéries					3	NI
	Champignons					1	NI

NR : non retrouvé NI : pas d’augmentation

Il existe différentes normes définissant les tests d’efficacité de la conservation antimicrobienne en fonction du domaine d’application, la pharmacopée européenne et l’USP représentent la référence pour le domaine pharmaceutique, néanmoins il existe quelques différences d’exigence entre ces pharmacopées comme il est illustré dans le(tableau IV) [11].

Tableau IV: Exigences des pharmacopées européenne et américaine concernant le test d'efficacité de la conservation antimicrobienne[12].

Le temps	Pharmacopées américaine	Pharmacopées européenne
Exigences pour une réduction logarithmique bactérienne		
6h	/ (non applicable)	2
24h	/ (non applicable)	3
7j	1	/ (non applicable)
14j	3	/ (non applicable)
28j	Aucune augmentation	Pas de survivant
Exigences pour une réduction logarithmique des champignons		
7j	Aucune augmentation	2
14j	Aucune augmentation	Aucune augmentation
28j	Aucune augmentation	Aucune augmentation

4. Les agents antimicrobiens utilisés pour la conservation des médicaments

La préparation d'un produit pharmaceutique passe par plusieurs étapes à savoir la formulation, le conditionnement et le stockage, où il est exposé aux différentes contaminations microbiennes. Cette contamination peut le rendre dangereux pour le consommateur d'où la nécessité d'utilisation d'agents antimicrobiens permettant de lutter contre les dégradations d'origine bactérienne ou fongique apportées lors d'une contamination.

4.1. Traitement par des moyens physiques à action antibactérienne

4.1.1. Traitement thermique

Le traitement par le froid permet de ralentir la croissance des micro-organismes et d'augmenter la durée de conservation du produit, soit par réfrigération ou congélation. Néanmoins les micro-organismes psychrophiles et psychotrophes peuvent se développer au froid.

Le traitement par la chaleur permet de tuer les micro-organismes par différents procédés thermiques :

- La chaleur sèche : le traitement se fait à 180° C pendant 1H.
- La chaleur humide : le traitement se fait à 121° C pendant 20mn par plusieurs méthodes : pasteurisation, ébullition, autoclave, appertisation, tyndallisation[13].

4.1.2. La filtration

La filtration est un procédé applicable aux fluides liquides ou gaz. Elle est basée sur la rétention des particules et micro-organismes après passage à travers un réseau filtrant de porosités variables. La rétention se fait soit par criblage ou par adsorption. Ce procédé est applicable aux médicaments fragiles, thermosensibles, qui ne peuvent supporter des traitements thermiques à haute température[13].

4.1.3. Les rayonnements

4.1.3.1. Ultraviolets

Les radiations ultraviolettes (UV) proches de 260 nm sont très létales. En pharmacie, ce mode de stérilisation ne peut être appliqué aux préparations en ampoules ou flacons car les rayons UV ne peuvent franchir les parois de verre (La stérilisation UV est un phénomène de contact, seules les surfaces en contact direct avec les rayonnements sont stérilisées[13].

4.1.3.2. Radiations X et Y

Leur pouvoir de pénétration est plus important. Les radiations Y sont utilisées dans la stérilisation à froid des antibiotiques, des hormones ou des objets thermosensibles[13].

4.2. Traitement par ajout de conservateurs antimicrobiens

Il existe un grand nombre de conservateurs utilisés en association avec un ou plusieurs principes actifs dans les différentes préparations pharmaceutiques. Ces conservateurs ont été classés en deux groupes de substances : les conservateurs antioxydants, qui sont capables de s'opposer aux phénomènes d'oxydations et à l'apparition de radicaux libres, et les conservateurs antimicrobiens, qui agissent sur les micro-organismes.

5. Les conservateurs antimicrobiens

5.1. Définition d'un conservateur antimicrobien

Les conservateurs antimicrobiens sont des substances chimiques, d'origine naturelle ou synthétique, qui sont ajoutées aux produits pharmaceutique et cosmétique finis, afin de les mettre à l'abri de prolifération microbienne ou d'inhiber leur développement , assurant ainsi la sécurité du produit pour une longue période et, en conséquence celle des consommateurs[14].

5.2. Classification et mécanisme d'actions des différents conservateurs antimicrobiens

5.2.1. Les ammoniums quaternaires

Les sels d'ammoniums quaternaires sont des composés chimiques constitués en général d'un atome d'azote substitué par quatre groupements comportant entre huit et 35 atomes de carbone. Parmi les ammoniums quaternaires, le chlorure de benzalkonium est le plus couramment utilisé. On trouve également dans les préparations ophtalmiques le bromure de cétrimonium (cétrimide), le bromure de benzododécinium et le chlorure de cétylpyridinium. Ce sont des composés bipolaires, très hydrosolubles, ayant des propriétés tensioactives (surfactants)[15].

- Mécanisme d'action des ammoniums quaternaires

Ils agissent principalement par leur activité détergente plus ou moins puissante conduisant à la dissolution des parois et membranes bactériennes, à la destruction de la couche semi-perméable cytoplasmique et au relargage du contenu intracellulaire. Leur pouvoir bactéricide est rapide et maximal à 37°C en milieu alcalin[15].

5.2.2. Les dérivés organo-mercuriels

Ce sont le phénylmercure sous forme d'acétate de borate ou de nitrate, le mercurbutol et le mercurothiolate sodique (thiomersal ou thimerosal). Le thimerosal reste le seul utilisé actuellement car il a moins d'effets secondaires[15].

- Mécanisme d'action des dérivés organo-mercuriels

Ils sont efficaces grâce aux propriétés thiolooprives de l'ion mercuriel. Ils agissent par combinaison avec les groupements sulfhydryles des protéines formant des précipités de protéinates de mercure[15].

5.2.3. Les amidines

Le principal agent utilisé est la chlorhexidine, agent cationique appartenant à la famille des biguanides. Elle est utilisée sous forme de digluconate soluble dans l'eau, active dans un milieu neutre ou légèrement alcalin (pH 8). Le gluconate de chlorhexidine est incompatible avec des savons, des détergents et des composés anioniques qui annulent son action[15].

- Mécanisme d'action des amidines

Elle agit en détruisant la couche semi-perméable des membranes cytoplasmiques. Elle inhibe le transport transmembranaire des cations et l'hydrolyse de l'ATP membranaire. En outre, elle retarde la germination des spores des bactéries[15].

5.2.4. Les esters de l'acide parahydroxybenzoïque

Les parabènes sont des esters de l'acide parahydroxybenzoïque. On distingue le méthylparaben, l'éthylparaben, le propylparaben, l'isopropylparaben, le butylparaben et l'isobutylparaben[15].

- Mécanisme d'action des parabènes

Les parabènes sont actifs vis-à-vis d'un grand nombre de micro-organismes. Ils interagissent avec les voies métaboliques clés, l'efficacité étant plus importante vis-à-vis des levures et moisissures que vis-à-vis des bactéries [85].

Ils présentent de multiples actions biologiques, mais il est généralement admis que les effets sur le transport à travers la membrane cellulaire et la paroi cellulosique, et sur le fonctionnement des mitochondries, sont la clé de leur action.

Ils se fixent à la surface de la membrane cytoplasmique des bactéries ce qui provoque son altération. Il en résulte une fuite extra-cellulaire des électrolytes et des constituants vitaux qui induit la destruction de la bactérie[15].

Au niveau du cytoplasme, les parabènes agissent en provoquant une perturbation de la respiration cellulaire (effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène), du transport des électrons et des systèmes enzymatique d'oxydation. [85].

5.2.5. Les alcools

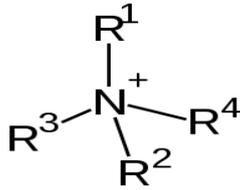
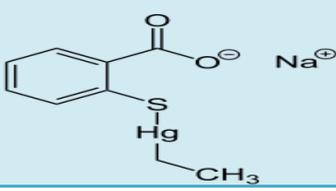
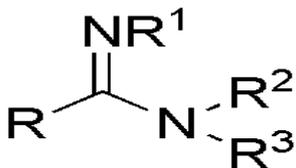
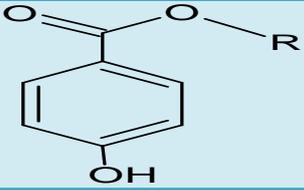
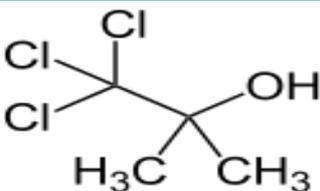
Tels que le chlorobutanol et le phényléthanol et le phénylméthanol (l'alcool benzylique).

- Mécanisme d'action des alcools

Le chlorobutanol possède une activité bactériostatique et antifongique. Son activité est basée sur sa capacité à traverser la couche lipidique bactérienne, en augmentant la solubilité lipidique grâce à son effet détergeant [15].

5.3. Spectre d'activité des conservateurs antimicrobiens

Tableau V: Structure chimique et spectre d'activité des conservateurs antimicrobiens[16].

Conservateurs	Structure	Bactéries		Champignons	Spores	Virus
		Gram +	Gram -			
Ammonium quaternaires		+++	+	+	-	-
Dérivés organo-mercuriels (thiomersal)		++	++	+	-	-
Amidines		+++	++	+	-	+/-
Parabens		++	+	+++	++	+/-
Alcools (chlorobutanol)		+++	+++	+++	+	+/-

Activité létale forte : +++ moyenne : ++ faible : + lente : +/- absente : -

5.3.1. Détermination de la CMI et la CMB

Ces deux paramètres caractérisent le pouvoir antimicrobien d'un agent conservateur, ils sont définis comme suit [17] :

5.3.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Elle est définie comme la plus petite concentration d'un conservateur antimicrobien ou d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18-24 h de culture à 37°C.

Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un conservateur antimicrobien ou de l'antibiotique. Plus la CMI d'un antibiotique est faible, plus son effet antimicrobien est prononcé.

5.3.3. Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Elle se définit comme la plus petite concentration d'un conservateur antimicrobien ou d'antibiotique capable de laisser 0,01% de survivants après 18-24 h de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un conservateur antimicrobien ou de l'antibiotique.

- Antimicrobien bactériostatique : $CMB/CMI = 8-16$.
- Antimicrobien bactéricide : $CMB/CMI = 4$

Tableau VI: La concentration minimal inhibitrice de quelques conservateurs antimicrobiens utilisés dans les préparations pharmaceutique [12].

Conservateurs antimicrobiens	[C] usuelles	La concentration minimale inhibitrice d'un conservateur antimicrobien en µg/ml			
		Bactérie Gram +	Bactérie Gram -	Levure	Moisissure
Chlorobutanol	0.3-0.5%	650	1000	2500	5000
Méthylparaben	0.2%	2000	1000-4000	2000	1000
Phénoxyéthanol	1%	8500	3600	5400	3300
Propylparaben	0.2%	500	100-500	250	200-500
Thiomersal	0.002-0.01%	0.2	4-8	32	128

5.4. Critères de choix d'un conservateur antimicrobien

En pratique aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal. Pour cela on a recours dans la majorité des cas à utiliser une association de conservateurs afin de limiter leurs effets secondaires. Un conservateur doit remplir les critères suivants [18] :

- La solubilité : Les micro-organismes se multiplient essentiellement en phase aqueuse, il est donc important que les conservateurs se maintiennent à une concentration efficace dans la phase hydrophile du produit, d'où l'importance de la solubilité du conservateur dans cette phase. Idéalement, un conservateur doit avoir une grande solubilité en phase aqueuse et une solubilité moindre en phase grasse, donnant ainsi un coefficient de partage huile/eau faible (K).

- **Innocuité** : un conservateur utilisé à court et à long terme à la concentration adéquate pour la conservation doit être dénué de tout effet toxique, irritant, sensibilisant au niveau de la peau, les muqueuses ou les organes.
- **Le spectre d'activité** : un conservateur doit posséder un large spectre d'activité incluant les bactéries Gram+ et Gram-, les champignons et les moisissures.
- **Le pH** : le conservateur doit être actif sur une large marge de pH, incluant celui de la stabilité de la formulation et celui de la prolifération des micro-organismes (tableau VII).
- **Compatibilité avec la formulation** : il faut considérer la compatibilité du conservateur avec le ou les principes actifs, les excipients présents dans la formulation mais aussi avec le processus de fabrication et les articles de conditionnements (tableau VII).

Tableau VII: Les valeurs de pH optimum de certains conservateurs antimicrobien et leurs incompatibilités avec d'autres produits chimiques [16].

Classe chimique du conservateur	Les conservateurs	pH optimum	Incompatibilité avec d'autres produits chimiques	Conditionnement, stockage
Ammoniums quaternaires	-Chlorure de benzalkonium -Cétrimide -Bromure de benzododécinium -Chlorure de cétylpyridinium	4-10	-Les agents tensioactifs -nitrate de phénylmercure -les savons	-Thermostables
Organo-mercuriels	-Nitrate/ acétate/ borate de phénylmercure -Thiomersal	7-8	-Halogénures métallique - Acide borique -EDTA -benzalkonium	-Thermostables -Sensible à la lumière absorbée par les fermetures en caoutchoucs.
Les alcools	-Chlorobutanol -Phényléthanol -Alcool benzylique	5.5	-Polysorbate 80 - Carboxymethylcellulose -Agents oxydants	-Thermolabiles -Volatiles
Phénols	-Méthyl/ propyl parabens	4-9	-Les agents surfactants non ionique	-Thermostables
Amidines	-Digluconate de chlorhexidine	5-9	-Les savons anioniques -Carbonate -Phosphate -Citrate	-Instable au-dessus de 70 °C -hydrolysable à -4 °C

- Propriétés physiques : le conservateur idéal doit être incolore, indolore, insipide dans le produit fini. En outre, il doit être facile à utiliser et à incorporer.
- Volatilité : les conservateurs ne doivent pas être volatiles pour éviter une perte d'activité si le produit est sujet à des élévations de température, que ce soit pendant la fabrication ou durant son usage.
- Efficacité à long terme : un conservateur doit garantir son efficacité durant toute la vie du produit. Il doit avoir une efficacité constante et ne doit pas être dégradable.
- Coût : un conservateur doit répondre aux exigences des pharmacopées et du marché en respectant le rapport qualité-prix.

6. Toxicité des conservateurs

6.1. Ammoniums quaternaires : chlorure de benzalkonium

Leurs utilisations dans les préparations ophtalmiques provoquent :

- Des dommages sur les tissus de l'œil à savoir la cornée, la conjonctive, et les cellules épithéliales ;
- Réaction immuno-allergique ;
- L'utilisation des ammoniums quaternaires à des concentrations de 0.001 à 0.01%, provoque une diminution de l'intégrité membranaire et une dissolution du film lacrymal ;
- Cytotoxicité et apoptose cellulaires[19].

6.2. Parabènes

- Selon les études disponibles, les méthyl et éthyl parabènes ne provoquent aucun effet sur la fertilité masculine, quant au propyl et butyl parabènes les résultats sont controversés malgré leurs effets néfastes sur la qualité spermatique.
- Différentes études utilisant des modèles in vitro et in vivo, ont supposé que les parabènes possèdent une activité de perturbateur endocrinien en raison de leur action ostéogénique, qui se traduit par un effet utéro-trophique, qui croît avec la longueur de la chaîne alkyle.

- Des parabènes ont été retrouvés dans les cellules tumorales mammaires, d'où l'hypothèse du lien possible entre les parabènes et le cancer du sein. Cependant il n'est pas encore possible d'affirmer l'effet carcinogène des parabènes.

- Des allergies cutanées ont été observées lors d'application des parabènes sur la peau[20].

6.3. Les alcools (Chlorobutanol)

Cette partie sera détaillé dans le chapitre II [21].

6.4. Dérivés organo-mercuriels (thiomersal)

Le thiomersal peut engendrer :

- Trouble neuropsychique notamment chez les nouveau-nés et les prématurés (autisme) ;
- Atteintes cérébrales, sclérose en plaque ;
- Réactions allergiques de type eczéma, asthme ;
- Atteinte rénal : tubulonéphrite [22].

6.5. Les amidines (chlorhexidine)

Les principaux effets toxiques observés avec les amidines sont :

- Réactions d'hypersensibilité : urticaires, bronchospasmes, œdème de Quincke, choc anaphylactique ont été rapportés suite à l'application cutanée ou muqueuse de chlorhexidine.

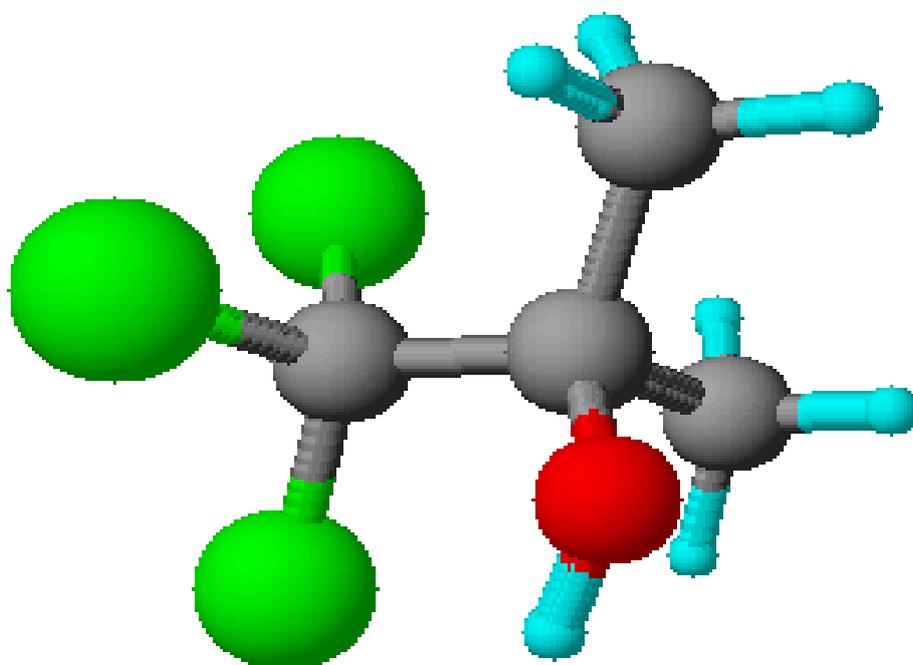
- Toxicité oculaire :

La chlorhexidine possède une toxicité dose dépendante sur les cellules épithéliales de la cornée, les cellules endothéliales et les fibroblastes ;

Des conjonctivites et des irritations de la muqueuse oculaire ont été observées à des concentrations égales ou inférieure à 0.02% [23].

CHAPITRE II

ETUDE DU CHLOROBUTANOL



1. Définition

Le chlorobutanol est un conservateur antimicrobien et sédatif aux propriétés anesthésiantes proche de l'hydrate de chloral. Il entre notamment dans la composition de certains médicaments indiqués dans le traitement des rhinites, des infections buccales, des irritations oculaires ou pour des soins postopératoires. Il est commercialisé sous plusieurs noms, notamment Balsamorhinol, Alodont, Givalex ou Optrex. Il s'obtient par une addition nucléophile du chloroforme sur l'acétone[24].

2. Historique

Le chlorobutanol ou trichlorobutanol fut Synthétisé pour la première fois en 1881 par l'Allemand Dr Willegerodt. Il a été utilisé comme conservateur antimicrobien pour la première fois en 1889 par Park Davis et al, dans une solution d'adrénaline injectable. En 1919 le Dr T.ALDRICHE a réussi à conserver des organes d'animaux dans de l'eau de chloretone (chlorobutanol). Il écrit au Dr Oliver FARWELLI (botaniste) lui suggérant d'utiliser cette molécule pour y conserver des végétaux et du matériel de laboratoire. Ce dernier constata l'effet fixateur et conservateur sur les végétaux, il publia à son tour, recommandant au monde scientifique, notamment aux chercheurs toxicologues d'approfondir les recherches sur cette molécule.

Par la suite, son effet narcotique doux et anesthésique local ont été repérés par analogie structurale au métabolite actif de l'hydrate de chloral. Ses emplois médicaux furent diversifiés : sédatif, hypnotique, anesthésique local, antiémétique, antiseptique, prévention du mal de mer et dans la maladie de chorée, sous différentes formes galéniques.

En 1981 ; des chercheurs pharmacologues australiens ont étudié sa pharmacocinétique. Ils constatèrent que son métabolisme est beaucoup plus lent que l'hydrate chloral, avec effet cumulatif très important dans les organes adipeux.

Dans les années qui ont suivi, la majorité de ses utilisations médicales furent délaissés, à cause de sa grande toxicité, notamment neurologique. Actuellement il est utilisé comme antiseptique en association avec d'autres principes actifs et comme conservateur antimicrobien dans les formulations pharmaceutiques et cosmétiques.

3. Nomenclature et structure

3.1. Chlorobutanol anhydre

- Nom :IUPAC: 1,1,1-trichloro-2-methylpropan-2-ol
- Nom en Latin : **Chlorobutanolum**
- Formule brute : **C₄ H₇ Cl₃ O**
- N° CAS : **57-15-8**
- Formule développée et tridimensionnelle : la figures 3 représente les formule développée et la vue tridimensionnelle du chlorobutanol.

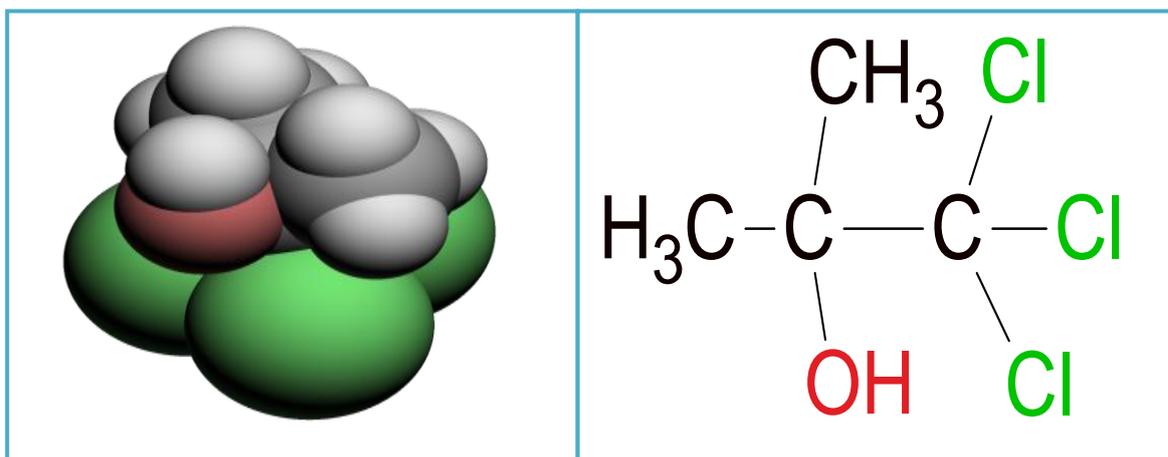


Figure 3 : Formule développée et vue tridimensionnelle du chlorobutanol anhydre

- Autre appellations : Acéton-chloroforme, Chlorbutol, Chloreton, Trichlorbutanol Trichlorisobutylalcool [25,26,27].

3.2. Chlorobutanol hémihydraté

- Nom : IUPAC: 1,1,1-trichloro-2-methylpropan-2-ol;hemihydrate

Ou : 1,1,1-Trichloro-2-méthylpropan-2-ol ; $\frac{1}{2}$ H₂ O

- Nom Latin : chlorobutanolum Hemihydricum
- Formule brute : **C₄ H₇ Cl₃ O. $\frac{1}{2}$ H₂ O**
- N° CAS : 6001-64-5

- ATC : A04AD04 [28]
- Formule développée : la figure ci-dessous représente la formule développée du chlorobutanol hémihydraté [25,26,27].

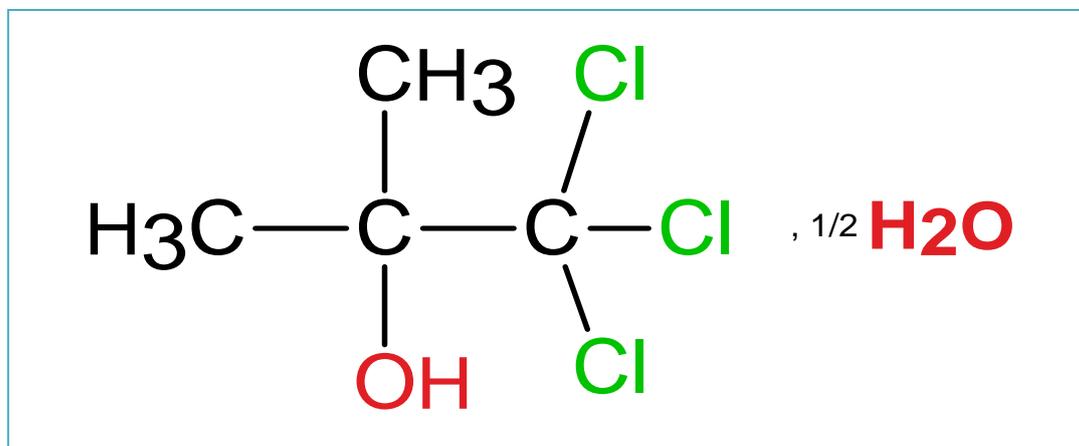


Figure 4 : Formule développée du chlorobutanol hémihydraté

4. Propriétés physiques, chimiques du chlorobutanol

Le tableau suivant résume les propriétés physicochimiques du chlorobutanol anhydre et hydraté [25,26,27].

Tableau VIII : Propriétés physiques et chimiques du chlorobutanol

	Chlorobutanol anhydre	Chlorobutanol hémihydraté
Masse moléculaire	177.449 g/mol	186.449 g/mol
Log p (octanol/eau)		2
Pouvoir rotatoire		0
Aspect	Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, se sublimant facilement.	
Gout et odeur	Camphrés ; avec un arrière gout astringent qui peut persister pendant un certain temps et un engourdissement doux sur la langue.	
Point de fusion	97 °C	78°C (substance non desséchée au préalable)
Température d'ébullition	167 °C	
Solubilité	-Insoluble dans l'eau froide, peu soluble dans l'eau chaude (1g dans 125ml). -Très soluble dans les alcools (1g dans 1ml d'alcool). -Assez soluble dans le glycérol (1 g dans 10 ml). - soluble dans : l'éther, chloroforme, acétone, acide acétique.	
Stabilité	Stable dans les milieux acides (pH < 5)	

▪ Propriétés spectrales du chlorobutanol

- Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible

Le chlorobutanol ne présente aucune absorption significative dans le domaine de l'UV-Visible allant de 230nm à 700nm [29].

- Spectrophotométrie d'absorption Infrarouge

Le spectre infrarouge du chlorobutanol est représenté dans la figure ci-après [30].

Les nombres d'ondes des pics principaux du chlorobutanol sont : 790 cm^{-1} , 833 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} , 917 cm^{-1} , 980 cm^{-1} [29].

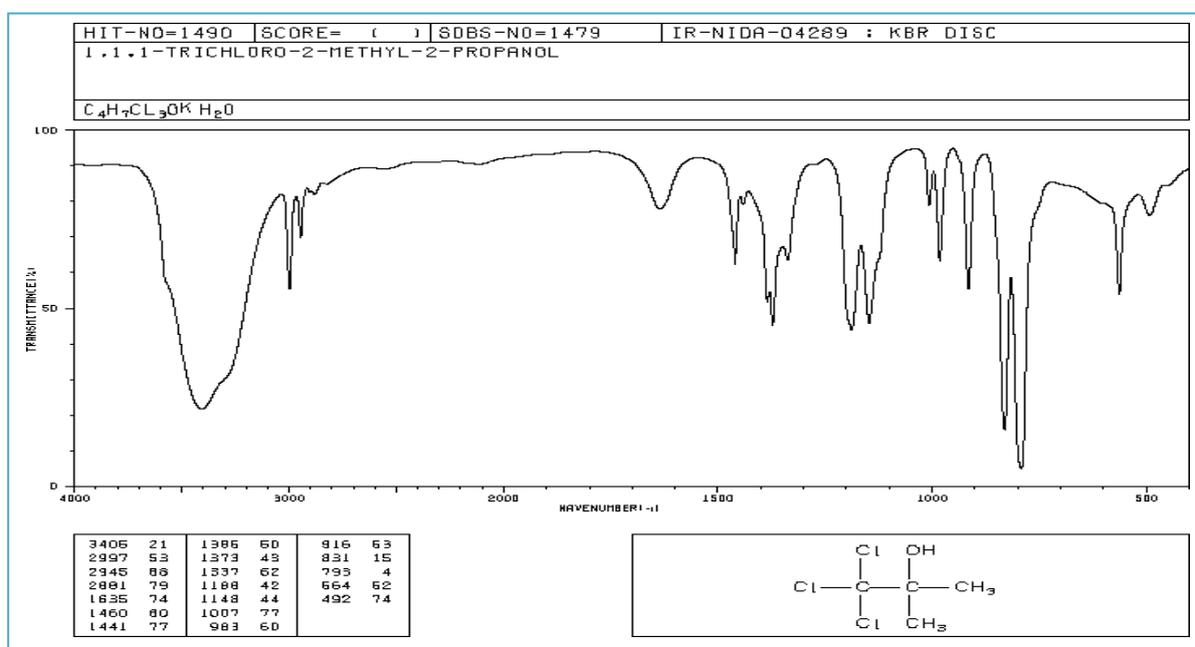


Figure 5 : Spectre infrarouge du chlorobutanol hémihydraté

- Spectrophotométrie de Masse SM et de Résonance Magnétique Nucléaire SRMN

Le spectre de masse et les spectres de résonance magnétique nucléaire avec le proton et le carbone 14, propres au chlorobutanol sont représentés dans les figures 6,7 et 8.

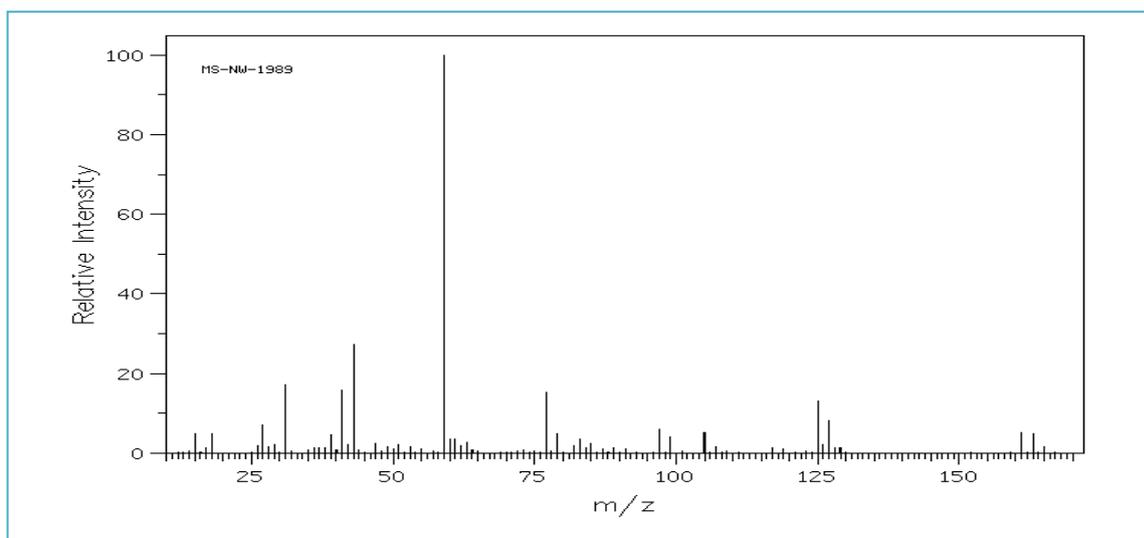


Figure 8: Spectre de masse du chlorobutanol[30].

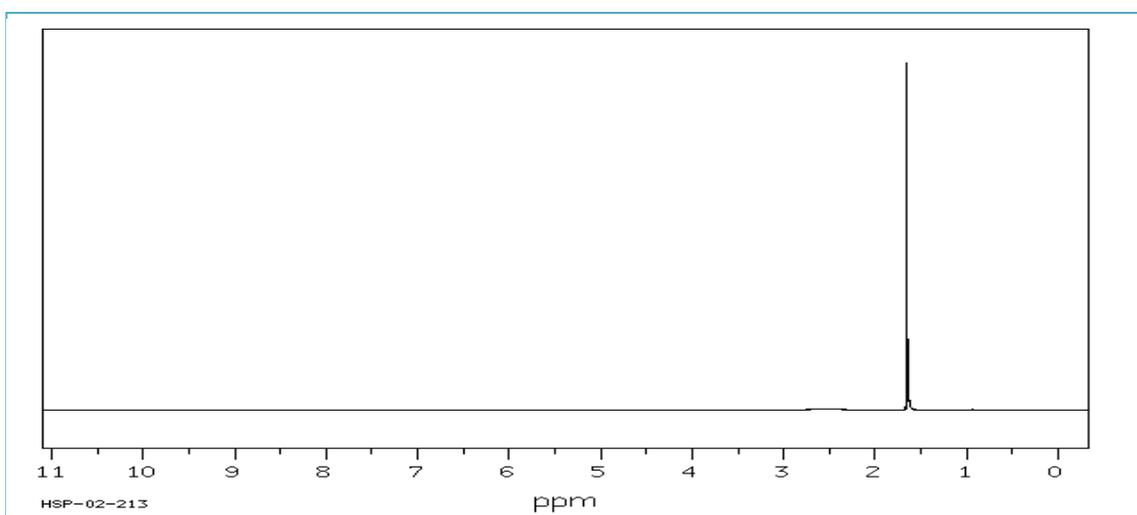


Figure 7: Spectre de résonance magnétique nucléaire ¹H RMN [30].

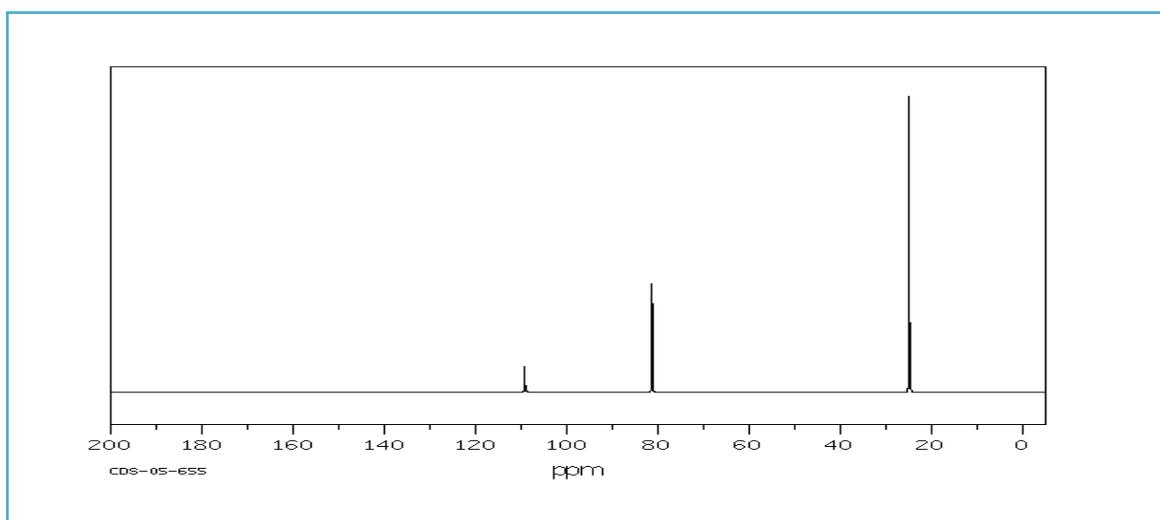


Figure 6: Spectre de résonance magnétique nucléaire (¹³C RMN) [30].

5. Synthèse chimique du chlorobutanol

5.1. Procédé de synthèse

Le chlorobutanol est formé par une simple addition nucléophile du chloroforme sur l'acétone. Cette réaction est catalysée par l'hydroxyde de sodium ou de potassium à froid.

- Le chlorobutanol a été préparé la première fois en 1881 par l'Allemand Willgerodt., d'abord par condensation du chloroforme et l'acétone en présence d'un catalyseur complexe (hydroxyde de potassium et méthylal = diméthoxymethane).et plus tard uniquement avec l'hydroxyde de sodium aqueux comme catalyseur.
- Il a été préparé aussi par action du tétrachlorure de carbone sur l'acétone en présence d'hydroxyde de potassium en poudre [31–33].

Plusieurs essais ont été effectués pour trouver les meilleures conditions pour un meilleur rendement de cette réaction, en faisant varier la température, les quantités de catalyseurs, et les réactifs (Tableau IX).

- Le meilleur rendement a été obtenu lorsque la proportion acétone/chloroforme est égale à 10/1 avec un gramme de catalyseur en poudre à -5 degré C pendant deux heures (rendement=71.0%).
- L'hydroxyde de potassium est préféré à l'hydroxyde de sodium pour sa meilleure solubilité.
- Le chlorobutanol se sublime si facilement, que son odeur de camphre est hautement détectable dans des zones fermées, d'où la nécessité de le sécher sous vide et de le garder dans un récipient en verre fermé (Cette odeur peut être détectée au moins une heure après sa synthèse)[31–33].

Tableau IX : Les taux de rendement selon les quantités de réactifs et conditions expérimentales [31].

Exp N°	Acetone ml	Chloroform ml	Acet/chlo (mol)	KOH G	Temps (h)	Tempetature °C	Rendement %
1	24.0	26.0	1 :1	2	2	-5	14.1
2	24.0	26.0	1 :1	4	2	-5	13.3
3	16.0	34.0	1 :2	2	2	-5	5.9
4	32.5	17.5	2 :1	2	2	-5	16.3
5	36.5	13.5	3 :1	2	2	-5	26.9

6	39.0	11.0	4 :1	2	2	-5	32.7
7	42.3	7.7	6 :1	2	2	-5	52.2
8	44.0	6.0	8 :1	2	2	-5	64.2
9	45.0	5.0	10 :1	1	2	-5	69.3
10	45.0	5.0	10 :1	1	2	-5	71.0
11	45.0	5.0	10 :1	.0.5	2	-5	51.9
12	45.0	5.0	10 :1	1	1	-5	68.4
13	45.0	5.0	10 :1	1	2	0	63.2

5.2. Mécanisme de synthèse

Il y'aura une attaque nucléophile par le carbanion formé dans le milieu alcalin (hydroxyde de potassium) sur le carbone partiellement chargé positivement du groupement carbonyle de l'acétone (Figure 9).

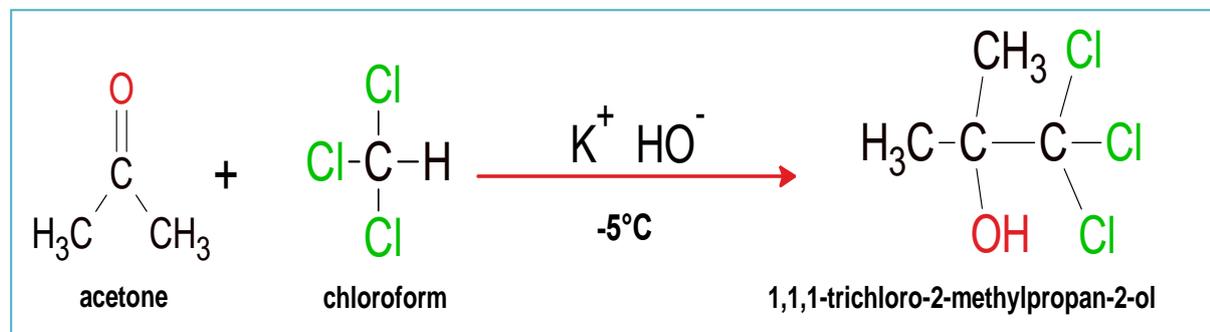


Figure 9 : Schéma de la réaction de synthèse du chlorobutanol.

6. Relation structure activité

- Fonction alcool : la fonction alcool est responsable de la solubilisation des membranes lipidiques des microorganismes (chapitre I)
- Substitution chlorale : La trichloration est nécessaire pour l'action inhibitrice des canaux sodiques voltage-dépendants [43].

7. Propriétés pharmacologiques et usages du chlorobutanol

7.1. Usages en médecine humaine

- Effet narcotique doux, rapide et long, assimilable à l'hydrate de chloral ; autrefois utilisé à des dose 0.3 à 1.2 g [29], dans les états d'anxiété lié au sevrage d'alcool, insomnie, et la maladie de chorée chez les enfants [34,35] ;
- Antiémétique et anti nauséux, utilisé pour les vomissements dus aux gastrites, et pour la Prévention du mal de mer [35,36] ;

- Anesthésique local et faible antalgique : dans les odontalgies en bain de bouche, hémorroïdes en suppositoires [37] ;
- Antiseptique buccal dans la prise en charge des infections buccopharyngées et des soins poste opératoires en stomatologie, et aussi l'antiseptie oculaire et auriculaire ;
- Anti inflammatoire : en association dans des aérosols pour le traitement de certaines inflammations chroniques de la sphère ORL ; comme les rhinites chroniques post-traumatiques.

7.2. Usages en médecine vétérinaire

- Sédatif ;
- Anesthésique local ;
- Antiémétique ;
- Antiseptique et Antiprurite [25].

7.3. Usages en industrie pharmaceutique et cosmétologie

Utilisé comme Conservateur antimicrobien dans :

- Les préparations multidoses : collyre et gouttes auriculaires ;
- Dans les préparations injectables [38,39] à une concentration de 0.25% à 0.5%. Le chlorobutanol confère aussi un effet anesthésique local au niveau des points d'injections ;

Utilisé aussi comme Plastifiants et conservateurs en cosmétologie [38].

La FDA énumère 13 produits à usage parentérale contenant des concentrations de 0.01 à 0.5% et 15 produits ophtalmiques contenant de 0.2 à 0.5 % du chlorobutanol [39].

8. Effets et mécanismes d'action du chlorobutanol

8.1. Chez l'homme

Les études expérimentales sur cette molécule ont permis d'élucider quelques-uns de ces mécanismes d'action.

- Pour expliquer son effet narcotique, plusieurs chercheurs ; parmi eux ; J.Mager et Y.Avodor qui ont pu conclure que le chlorobutanol inhibe la respiration mitochondriale au niveau du cerveau, cervelet et le cœur (effet beaucoup plus prononcé sur le cervelet), et ce en bloquant une étape située entre le transfert d'électron et la phosphorylation de

l'adénosine di-phosphate. Rosenberg et al ont aussi démontré que le chlorobutanol diminue de 50% la consommation de l'oxygène par le cerveau [41,42].

- G.Kracke, A.Landrum ont montré que le chlorobutanol maintient ; les canaux sodiques voltage dépendant type $Na_{v1/2}$ du cerveau sous forme fermée ou inactivée ce qui augmente donc leur période réfractaire [43,44].

Cet effet est réversible, dose-dépendant, et peut apparaitre à des concentrations inférieures à celle utilisées en conservation, ce qui lui permet d'ajouter une composante antalgique et anesthésique aux solutions parentérales qu'il conserve.

- M.Fisher a trouvé que le chlorobutanol induit aussi une hyperpolarisation au niveau des terminaisons primaires et secondaires du fuseau neuromusculaire des muscles striés, en activant les pompes $Na^+/K^+ ATP_{ase}$ (cet effet est inhibé par la OUBAINE) [44].

Un effet antispasmodique sur les intestins comparable au benzylalcool a été également noté par L.W.ROWE en 1924 [45].

- Habara et Kana après avoir testé des solutions de chlorobutanol in vitro sur des acini pancréatiques isolées, ils ont constaté que le chlorobutanol inhibe la sécrétion pancréatique induite par la CCK8 ont avancé plusieurs théories pour expliquer ce phénomène comme : l'antagonisme des récepteurs CCK8, l'inhibition de la conduction du signal intracellulaire par blocage de l'activation de la protéine G, ou par perturbation de la dynamique du calcium (diminution du calcium intracellulaire) [46].
- D'autres chercheurs ont aussi lié l'effet de la désynchronisation du rythme cardiaque et l'hypotension engendrés par de grandes concentrations de chlorobutanol à cet effet de perturbation de la dynamique du calcium intracellulaire [46,47].
- **J. Sequira** et T.mckenna ont prouvé in vitro ; que l'effet inhibiteur de la production de l'aldostérone constaté lors des administrations d'héparine est dû plutôt au chlorobutanol présent comme conservateur dans ces solutions. En inhibant deux étapes importantes de la production endogène de l'aldostérone [48]. En plus de cet effet, ils ont montré que le chlorobutanol est doté d'un effet antiagrégant plaquettaire [49,50].

8.2. Mécanisme d'action sur les microorganismes

- Le chlorobutanol agit par un effet détergeant en provoquant des dommages sur la paroi cellulaire des micro-organismes, par la dénaturation des membranes lipidique et une coagulation des protéines, provoquant ainsi la lyse des cellules microbiennes. Cette activité antimicrobienne est basée sur sa capacité à traverser la couche lipidique bactérienne. Aux concentrations usuelles (0,2—0,5 %), il possède une activité bactériostatique et antifongique. Il est actif à la fois sur les Gram positifs et Gram négatifs (*P. Aeruginosa*) et *C. Albicans*[51,52] ;

- Il est également capable de potentialiser l'effet bacteriostatique d'autres antiseptiques. Dans l'étude préclinique faite sur Eludril^r (chlorhexidine+chlorobutanol), ils ont constaté que le chlorobutanol diminuait de 1000 fois la CMI de la chlorhexidine[53].

Tableau X : Les valeurs des CMI du chlorobutanol [54]

Microorganisme	Les bactéries gram +	Les bactéries gram -	Levures (candida.a)	Moisissures (Aspergillus.n)
CMI en µg/ml	650	1000	2500	5000

9. Pharmacocinétique du chlorobutanol

Ce n'est qu'en 1981 qu'une équipe australienne de pharmacologues a détaillé la pharmacocinétique du chlorobutanol dans l'objectif d'évaluer son effet sédatif et hypnotique et cela suite à un cas d'intoxication par dépendance au Sedaform^R, où ils ont constaté des effets graves qui ont durés plus de deux mois [55,29].

9.1. Absorption

L'absorption du chlorobutanol est très rapide, les concentrations plasmatiques maximales sont Observées entre 15 et 60 min après l'administration orale. Les concentrations plasmatiques Ensuite baissent de façon bi-phasique. La première phase dure environ 24 h, au cours de laquelle les concentrations plasmatiques diminuent d'environ 50 pour cent. Par la suite, le déclin des Concentrations plasmatiques est log-linaire.

Sa clairance plasmatique par rapport au débit sanguin hépatique est très faible, ne dépasse pas 17 ml/min [55,29].

9.2. Distribution

- Haute solubilité lipidique surtout au niveau du cerveau, du cervelet, des reins, et du foie ;
- Grand volume de distribution environ 230 litres (3L/Kg) ;
- La liaison du chlorobutanol aux protéines plasmatiques est d'environ 57% [55,29].

9.3. Métabolisme

Un faible pourcentage de chlorobutanol absorbé est métabolisé dans le foie en dérivés plus hydrophiles (glucorono-canjugué et sulfo-conjugué).

Cependant, alors que le TCE (métabolite actif de l'hydrate chlorale) peut être oxydé à un métabolite inactif qui l'acide trichloroacétique TCA, Le chlorobutanol est un alcool tertiaire et par conséquent ne peut pas être oxydé par l'alcool déshydrogénase ADH. En partie, cela peut expliquer l'élimination beaucoup plus lente du chlorobutanol (par rapport au TCE qui a une demi-vie d'environ 8 h)[55,29].

9.4. Élimination

- Demi-vie plasmatique est de 9,3 à 14,2 jours ;
- 10% de la dose totale du chlorobutanol sont éliminées en 17 jours (environ 2 demi-vies) ;
- L'excrétion rénale du Chlorobutanol est majoritairement sous forme inchangée (les métabolites conjugués sont rares dans les urines) ;
- D'autres voies d'élimination sont possibles mais, très mineurs comprenant les voies biliaires et pulmonaires [55,29].

10. Effets indésirables

Les effets les plus observés sont :

- Par voie orale : Ataxie, Somnolence, confusion, Cauchemar...
- Par voie oculaire: Irritation oculaire, kératite épithéliale inconfortable, sensation de corps étranger, trouble de vision avec halo de lumière [25,56] ;

Il a été signalé que l'usage occasionnel (deux fois par jour jusqu'à 12 jours) des collyres conservés par le chlorobutanol donnent lieu à des exfoliations modestes des cellules épithéliales de la cornée. Cet effet est réversible et l'œil pourrait s'adapter à une utilisation répétée de ces collyres.

- Autres : Irritation cutanée et respiratoire [35].

11. Contre indications et précautions d'emploi

- Hypersensibilité au chlorobutanol
- Grossesse, allaitement : Les préparations contenant du Chlorobutanol doivent être utilisées avec précaution Pendant la grossesse, en particulier lorsque la posologie est répétée entraînant l'accumulation du chlorobutanol à des niveaux potentiellement embryotoxiques [57,58].

12. Toxicité du chlorobutanol

La dose létale 50 du chlorobutanol par voie orale est de : 50-500 Mg/Kg [59].

12.1. Toxicité par administration orale

Le tableau clinique de l'intoxication au chlorobutanol par voie orale a été rapporté dans la littérature dans plusieurs cas d'intoxications (volontaires ou par surdosage) [35,50,60–62].

- Neurotoxicité :
 - Coma calme hypertonique,
 - Convulsions cloniques irrégulières ;
 - Trouble de parole et incohérence dans la pensée (peu durer jusqu'à deux semaines).
- Cardiotoxicité :
 - Trouble du rythme avec diminution de la contractilité isométrique cardiaque et perturbation de l'automatisme.
- Hypotension.
- Perturbation du bilan biologique
- Hémococoncentration en sodium, calcium, potassium, chlorure, et bicarbonate. Elévation des concentrations des gamma glutamyl transférase, alanine transaminase, aspartate transaminase.
- Accumulation de cette drogue dans les organes lipophiles, notamment au niveau du cerveau, cervelet, rein et foie.
- Les concentrations tissulaires dosées chez un sujet intoxiqué par le chlorobutanol en post-partum étaient comme suit : -Sang : 64mg/L -Urine : 31mg/L -Bile : 123mg/L- Cerveau : 161µg/g -Rein : 87 µg/g -Foie : 141 µg/ml - Rate : 120µg/g.

12.2. Toxicité par administration parentérale

La toxicité du chlorobutanol par voie parentérale semble rare à faibles concentrations et à une utilisation limitée mais, en cas d'exposition prolongée à des produits contenant cette molécule, certains effets toxiques parfois mortels pourraient être induits.

- Des chercheurs neurologues de l'université de Nante ont démontré sur des lapins de laboratoire que l'injection de Kétamine par voies intrathécale induisait des lésions neurologiques très graves dues au chlorobutanol présent comme conservateur antimicrobien dans cette solution (depuis ils ont interdit l'utilisation de ce conservateur dans les produit destiné à cette voie d'administration) [63].
- Une réaction d'hypersensibilité retardée avec des indurations au site d'injection, et une éruption érythémateuse observée sur les deux cuisses ont été signalées chez une femme de 26 ans en post-partum recevant de l'héparine conservé par le chlorobutanol [64].
- Une éruption maculopapuleuse prurigineuse a été attribuée au chlorobutanol utilisé comme conservateur dans une solution nasale de DDAVP chez une femme de 54 ans atteinte de diabète insipide. Le prurit a été reproduit avec une solution saline de chlorobutanol et non pas par une solution de DDAVP administré sans conservateur [65].
- Un choc anaphylactique grave ; confirmé par scratch test positif ; a été signalé chez une femme de 34 ans suite à l'injection de l'ocytocine conservée par le chlorobutanol [66].
- Une baisse de tension artérielle systolique a été documentée chez 20 patients ayant reçu des injections d'héparine conservée par le chlorobutanol (à 2.5 mg/ Kg) dans une étude randomisée à double aveugle. L'héparine sans chlorobutanol n'a pas donné d'effets significatifs [67]

13. Dégradation du chlorobutanol dans les préparations pharmaceutiques aqueuses

En plus des pertes dues à la volatilisation (grande capacité de sublimation même à température ambiante), le chlorobutanol subit sous l'effet de la chaleur (figures 10), durée de conservation et du pH alcalin; une dégradation considérable [68,69].

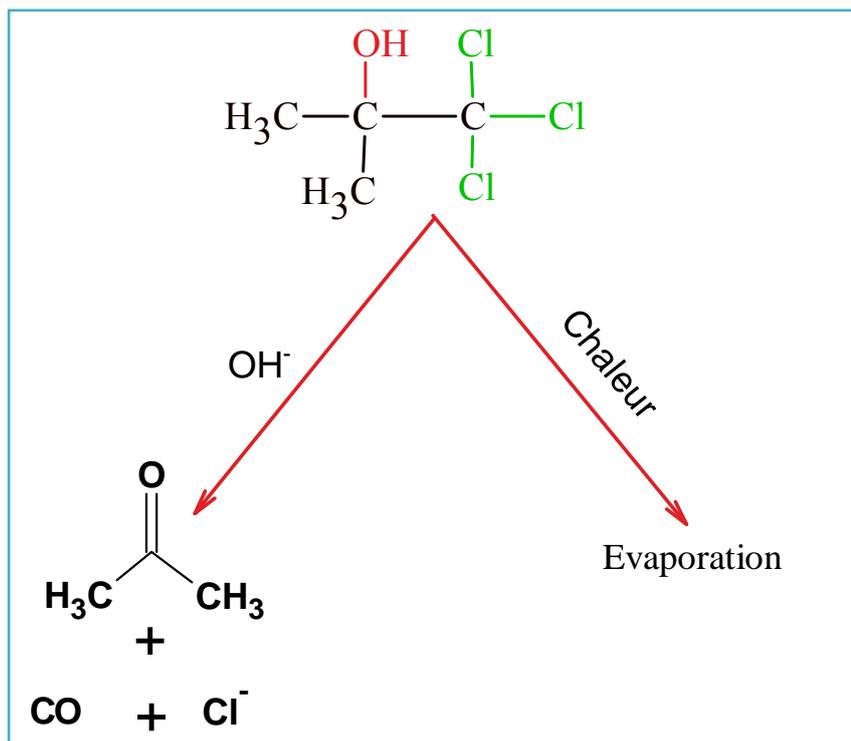


Figure 10 : Voies de dégradation du chlorobutanol

La cinétique de cette dégradation a été étudiée par plusieurs chimistes ; parmi eux A.Damodaran Nair et John L.Lach qui aboutirent aux résultats suivants :

- La dégradation est due à une réaction spécifique d'hydrolyse catalysée par l'ion OH^- , son taux se calcule avec la formule suivante :

$$T = K'[\text{CLB}]^\alpha$$

Avec :

K' : constante spécifique de réaction (coefficient de vitesse), elle dépend de la température, du pH, du temps, et de l'énergie d'activation de cette réaction.

α : Ordre partiel de réaction en rapport avec le chlorobutanol.

13.1. Facteurs influençant la dégradation du chlorobutanol

- Le pH du milieu

Le chlorobutanol n'est stable que dans des milieux acides à pH inférieur à 5, au-delà de ce pH le chlorobutanol subit une hydrolyse forte, rapide et dépendante de la concentration de l'ion hydroxyle OH⁻.

- La température

- Des températures supérieures à 65°C accélèrent fortement la réaction de décomposition du chlorobutanol ;

- Le temps de demi-vie calculé à 25°C dans les solutions tamponnées à pH=3 est de 90ans alors qu'il est de 0.23ans dans les solutions tamponnées à pH=7.5;

- Le taux de dégradation à 105°C pendant 30 minutes à des pH de 5 et de 6, sont de 13% et 58% respectivement.

Il est donc à noter que :

- Pendant la formulation du chlorobutanol dans les préparations pharmaceutiques, il est souhaitable de maintenir le pH inférieur à 4, puisque le taux de sa dégradation en pH 2 et 4 est très faible et constant.

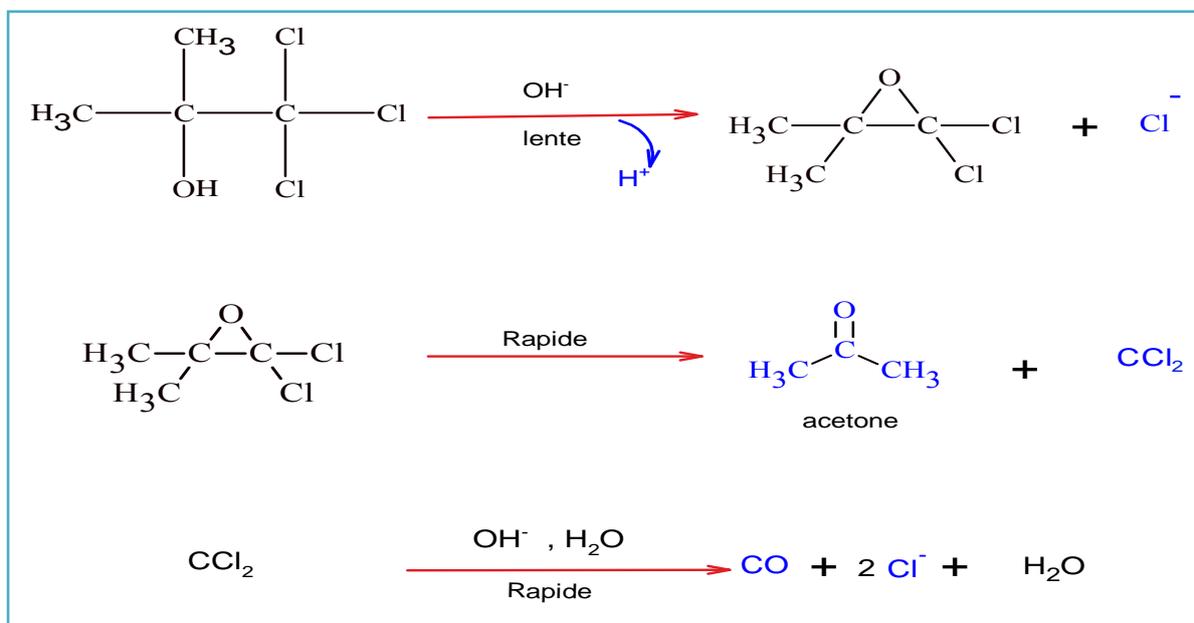
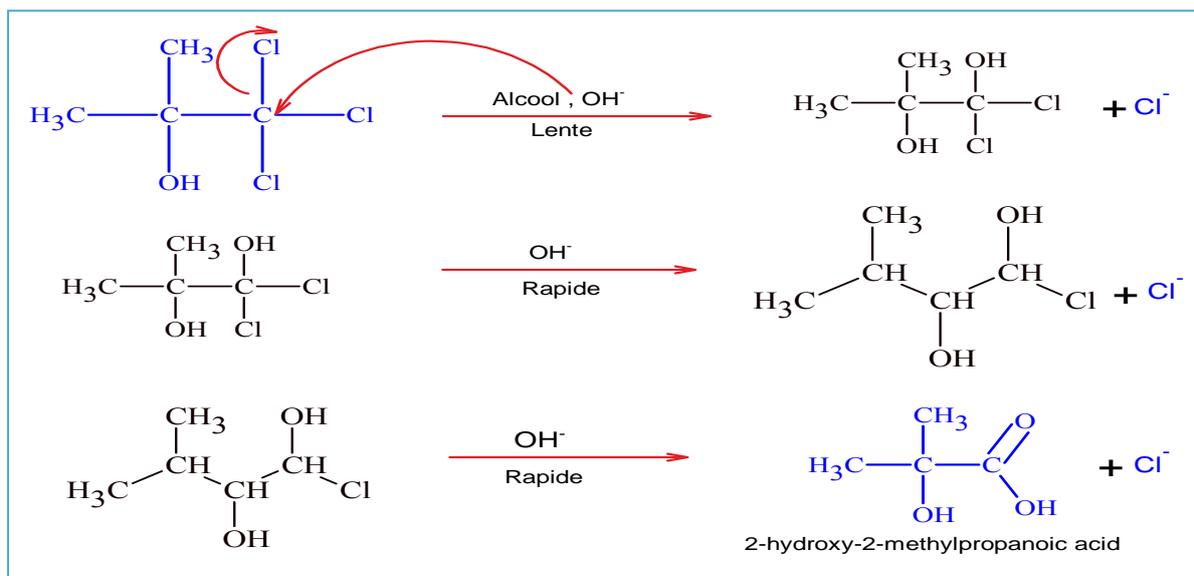
- Si le milieu de formulation doit avoir un pH supérieur à 4: le pourcentage de Chlorobutanol qui sera dégradé dans ces conditions (pH, température, durée de stockage) ; peut être calculé avec la formule précédente, ce pourcentage calculé peut être ajouté en excès initialement dans la mesure de possible, pour compenser les pertes dues à cette dégradation.

13.2. Les produits de dégradation du chlorobutanol

- Les principaux produits de dégradation du chlorobutanol en milieu aqueux sont : acétone, monoxyde de carbone, H⁺, Cl⁻ et des traces de l'acide -hydroxy-butyrique ;

- La formation de l'acide -hydroxy-butyrique est due à une réaction compétitive très favorable en milieu alcalin alcoolique non aqueux (figure12) :

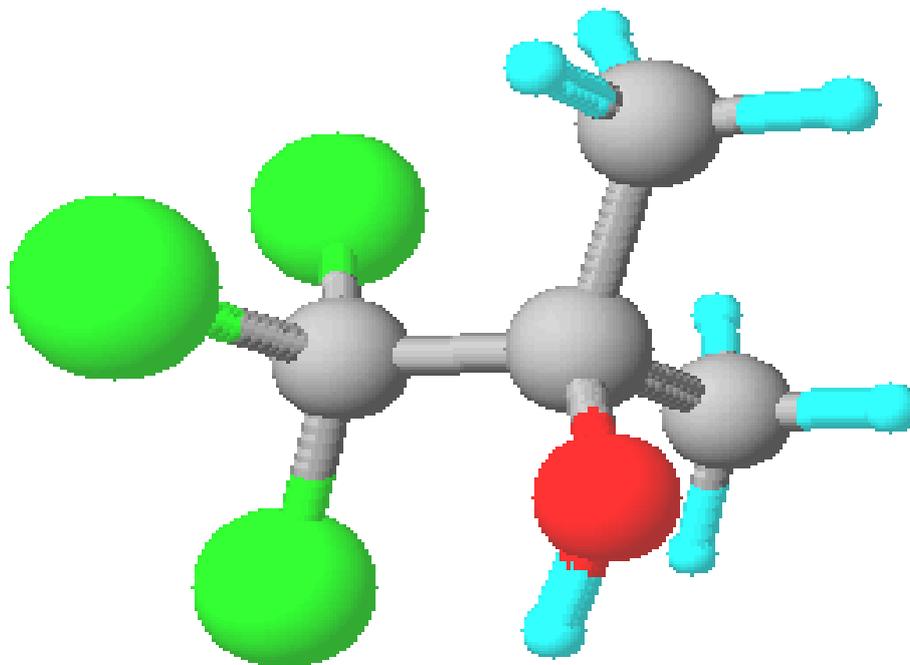
- Plusieurs mécanismes réactionnels ont été proposés, le plus probable est celui proposé donné par BRESSANIN et SERGE (figure11).



14. Détermination de la teneur en chlorobutanol dans les produits finis

Plusieurs méthodes sont connues pour le dosage de ce composé, basées sur l'hydrolyse alcaline du chlorobutanol, suivie d'un titrage des produits de dégradation ou de l'excès de la base après hydrolyse complète. Ces méthodes bien que relativement exactes, sont plutôt longues et inadaptées pour l'utilisation de routine dans les préparations pharmaceutiques. Par la suite plusieurs méthodes plus spécifiques et plus exactes ont été développées, notamment les méthodes spectrales et chromatographiques (Tableau Annexe II) [70–74].

ETUDE EXPERIMENTALE

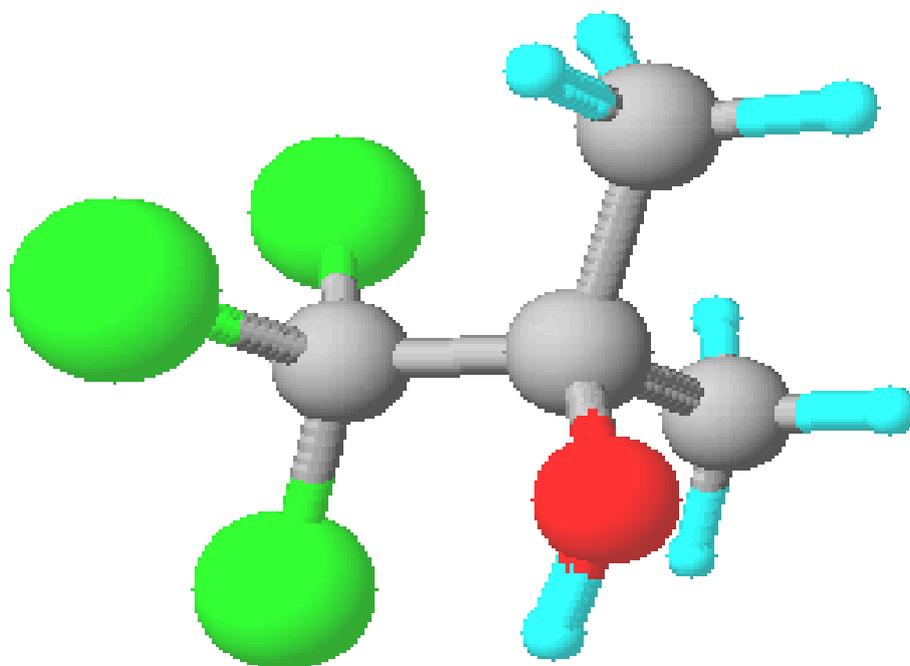


CHAPITRE I

SYNTHESE ET CARACTERISATION

DU CHLOROBUTANOL

HEMIHYDRATE



Nous nous sommes intéressées, dans un premier temps à la synthèse et la caractérisation du chlorobutanol hémihydraté ;

- La synthèse ainsi qu'une partie des analyses physicochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de chimie thérapeutique du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ;
- La détermination de la teneur en principe actif réalisée au niveau, du laboratoire de chimie analytique, du département de pharmacie de la faculté de Médecine T-O ;
- L'analyse par spectroscopie infrarouge a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie du département de la pharmacie de la faculté de médecine T-O ;
- L'analyse du produit synthétisé par microscope électronique à balayage a été faite au niveau du laboratoire de chimie de la faculté de chimie de l'université Mouloud Mammeri T-O ;
- La détermination de la teneur en eau de notre produit a été réalisée au niveau du CRD SAIDAL ;

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Appareillage

Tableau XI : appareils utilisés pour la synthèse, la caractérisation et l'identification du chlorobutanol hémihydraté

Appareil	Spécifications
Balance analytique	ABT 220-5DM, KERN
Machine à glace	Machine à glace
Plaque chauffante + Agitateur magnétique	STUART-HEAT-Stir /SB162
Hotte à vapeur	KOTTERMANN.
Rotavapeur	ROTARY EVAPORATOR, HS- 2005V
Thermomètre	
Pompe à vide	
Microscope électronique à balayage	
Point de fusion	Auto melting point MP120 HANON
Appareil Ultra-sons	Fisher Brand

Spectrophotomètre balayage	UV-Visible	à	UV-VIS SPECTRUM, PERKIN-ELMER
Spectrophotomètre infrarouge			SPECTRUM-TWO PERKIN-ELMER
Distillateur d'eau			LAB-TECH WD.2004F
Appareil Karl Fisher Mellter Teldo			

1.1.2. Verrerie et autres

Tableau XII : Verrerie et autres matériels utilisés pour la synthèse et caractérisation du chlorobutanol hémihydraté.

VERRERIE	AUTRES
Ballon bicol de 250ml Eprouvettes Verre de montre Cristallisoirs Béchers Fioles Erlenmeyers Entonnoir de Büchner et entonnoir Tubes à essai Pipettes Micropipettes Burettes	Pissette Barreau aimanté Spatules Papier filtre Poire Portoirs Statifs Pince en bois, pince à ballon et pince à burette. Porte-ballon

1.2. Méthodes

1.2.1. Synthèse du chlorobutanol

1.2.1.1. Réactifs utilisés

- Acétone
- Chloroforme
- Hydroxyde de potassium
- Ethanol
- Eau distillée

1.2.1.2. Protocol de synthèse

- Dans un ballon bicol de 250 ml équipé d'un barreau aimanté et d'un thermomètre, placé dans un bain de glace sur un agitateur magnétique. Introduire 45 ml d'acétone et 5 ml de chloroforme ;
- ajouter par la suite 1g d'hydroxyde de potassium quand la température du mélange réactionnel se stabilise à 0° C;
- Maintenir la réaction sous une agitation permanente pendant deux heures (figure 13).

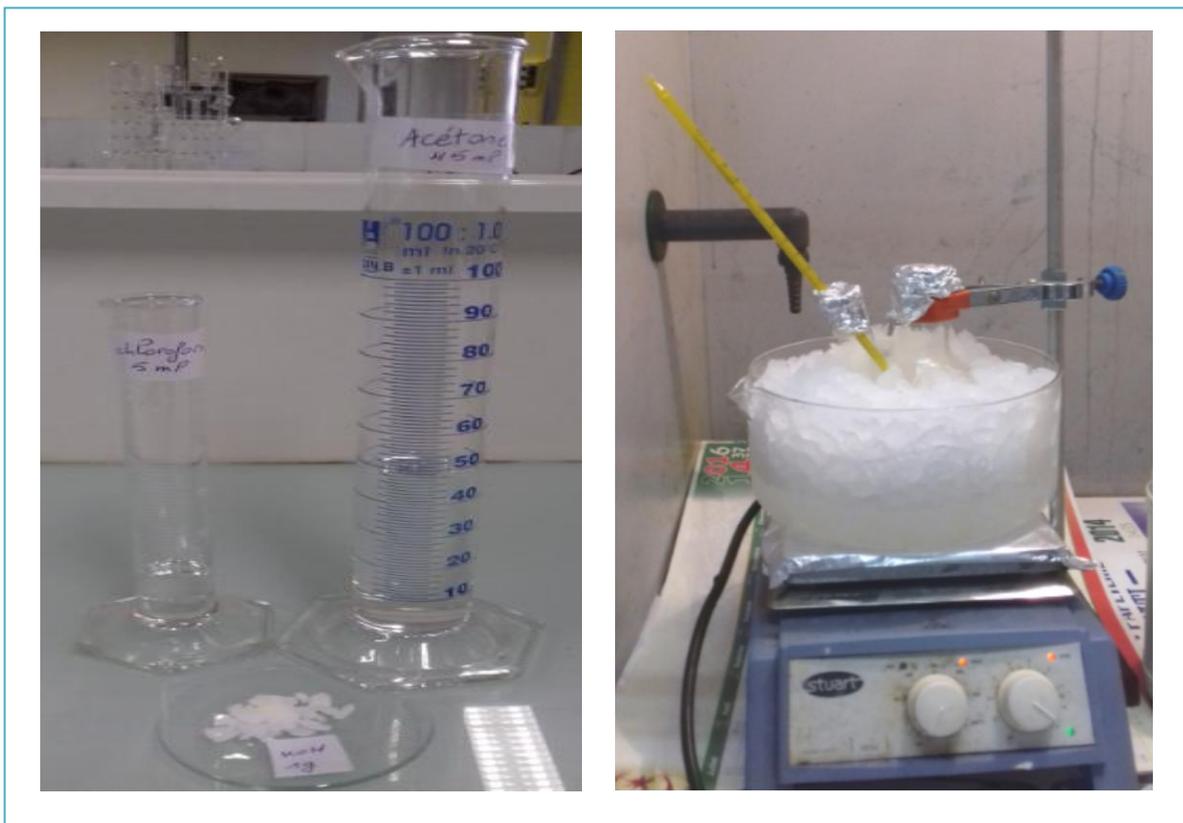


Figure 13 : Les réactifs de synthèse et mélange réactionnel sous hotte

Réaliser une filtration sous vide au bout de deux heures, afin d'éliminer le précipité d'hydroxyde de potassium, et récupérer le filtrat contenant le chlorobutanol (figure14).



Figure 14 : Précipité d'hydroxyde de potassium, et la filtration sous-vide.

▪ Elimination de l'excès d'acétone par le ROTAVAPEUR :

- Programmer la température du bain marie à 65°C et la vitesse à 95 tours par minute ;
- Introduire le filtrat obtenu, dans un ballon adapté au Rotavapeur (il doit être propre et exempt d'eau) ;
 - Lancer la distillation et l'arrêter quand il n'y a aucune goutte qui distille et le volume du filtrat réduit de moitié ;
 - Le résidu obtenu est un liquide huileux de couleur jaunâtre ; (figure15)
 - l'acétone recueillie dans le ballon de récupération, peut être utilisée pour une synthèse ultérieure.



Figure 15 : Elimination de l'excès d'acétone par le Rotavapeur

▪ Cristallisation du chlorobutanol :

- Dans un erlenmeyer verser environ 200 ml d'eau glaciale sur le résidu huileux récupéré de la distillation tout en remuant avec une spatule en verre. Le chlorobutanol hémihydraté précipite progressivement sous forme de solides blancs légèrement cristallins ;
 - Procéder par la suite à une filtration sous vide, et récupérer les cristaux du chlorobutanol hémihydraté impurs. (figures 16).



Figure 16 : Cristallisation du produit synthétisé dans l'eau glaciale.

- Purification du chlorobutanol hémihydraté :
 - Solubiliser les cristaux impurs dans environ 10 cc d'éthanol à 96%, puis recrystalliser dans 200 ml d'eau glaciale ;
 - Procéder par la suite à une ultime filtration et récupérer les cristaux purs du chlorobutanol hémihydraté.

- Elimination de l'excès de l'eau dans le Chlorobutanol hémihydraté :
 - Solubiliser dans un cristalliseur les cristaux du chlorobutanol hémihydraté dans un petit volume d'éthanol, puis laisser l'éthanol s'évaporer complètement ;
 - Récupérer par la suite le chlorobutanol hémihydraté cristallisé avec une spatule plate; (figure 17).
 - Peser le produit final. Etablir le bilan de la réaction et calculer le rendement de cette synthèse.

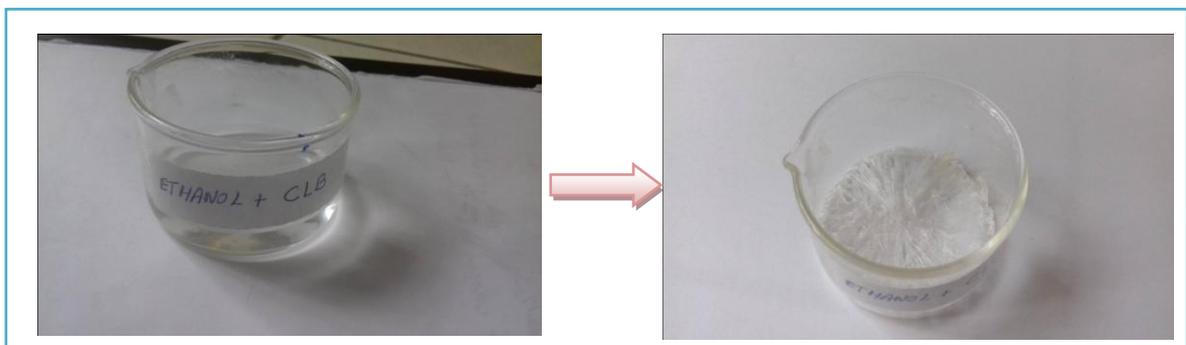
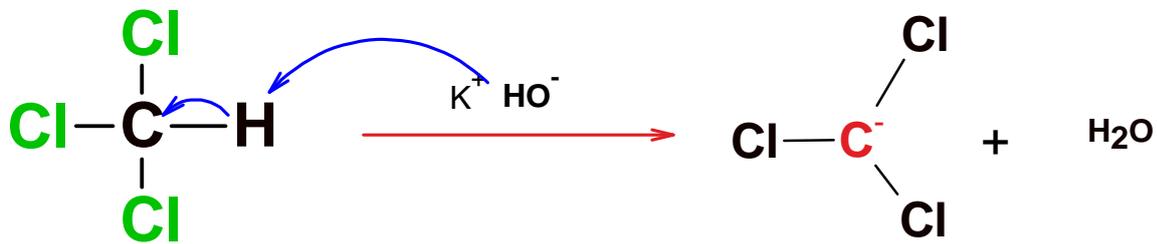


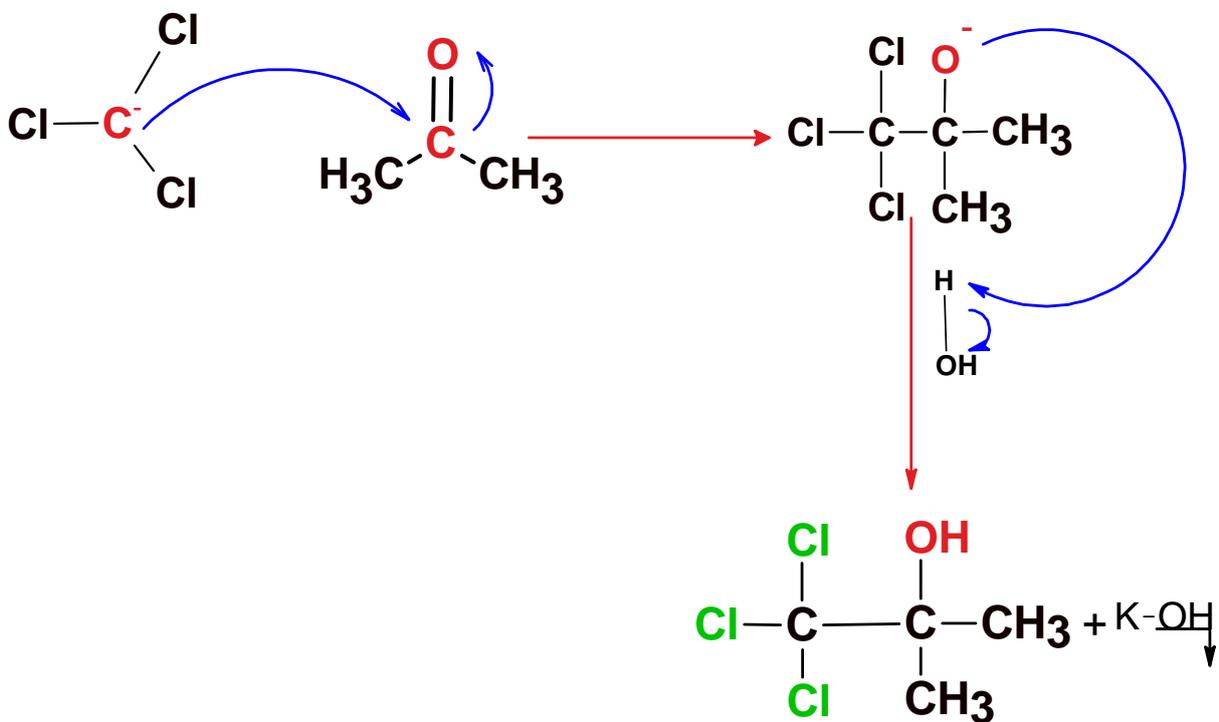
Figure 17 : Elimination de l'excès d'eau du produit final

1.2.1.3. Mécanisme réactionnel

a. Formation de l'entité nucléophile



b. L'attaque nucléophile sur le carbone du carbonyle



1.2.1.4. Calcul du rendement de la réaction

Le rendement d'une réaction est le rapport de masse expérimentale sur la masse théorique. Il est exprimé en pourcentage (%):

$$R\% = \frac{\text{Masse expérimentale}}{\text{Masse théorique}} \times 100$$

▪ **Calcul de la masse théorique du chlorobutanol hémihydraté :**

Le déroulement de la réaction de synthèse est représenté dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Tableau d'avancement de la réaction de synthèse du chlorobutanol hémihydraté

	Réactifs		Produit
Réaction	$\text{CHCl}_3 + \text{C}_3\text{H}_6\text{O} \xrightarrow{\text{KOH}, 0^\circ\text{C}}$		$\text{C}_4\text{H}_7\text{Cl}_3 \cdot 0.1/2 \text{H}_2\text{O}$
Début de réaction	n_1	n_2	0
Avancement de la réaction	$n_1 - X_t$	$n_2 - X_t$	X_t
Fin de la réaction (2 heures)	$n_1 - X_{\max}$	$n_2 - X_{\max}$	X_{\max}

n_1 : n chloroforme

n_2 : n acétone

Selon la réaction mise en jeu, nous avons une mole de chloroforme qui réagit avec une mole d'acétone pour donner une mole de chlorobutanol hémihydraté, les coefficients stœchiométriques étant égaux à 1 ; le réactif limitant est celui qui a la plus petite quantité initiale. Par conséquent, le X_{\max} représente le nombre de moles initial de ce réactif limitant. La formule de calcul de la masse théorique du chlorobutanol hémihydraté est la suivante :

$$n_{\text{clbh}} = X_{\max} = m_{\text{clbh}} / Mr_{\text{clbh}}$$

$$m_{\text{clbh}} = X_{\max} \times Mr_{\text{clbh}}$$

Donc la formule de calcul du rendement de la réaction de synthèse du chlorobutanol hémihydraté s'écrit comme suit :

$$R = \frac{\text{Masse expérimentale}}{X_{\max} \times Mr_{\text{clbh}}} \times 100$$

1.2.2. Caractérisation et identification du chlorobutanol hémihydraté synthétisé**1.2.2.1. Caractères organoleptiques et solubilité****a. Aspect et odeur**

Nous avons vérifié l'aspect par simple observation visuelle du produit final ; et nous avons aussi vérifié l'odeur de ce dernier.

b. Test de solubilité

La solubilité d'un composé dans un solvant est la quantité maximale pouvant passer en solution dans un volume donné. Au-delà, la solution est saturée et le composé ne se dissout plus. Elle est exprimée en g/l ou en mol/l [16]. Comme l'illustre le tableau XIV.

Tableau XIV : Classification des solubilités des composés selon la pharmacopée européenne.

Les termes descriptifs	Volumes approximatifs de solvant en ml /g de substance à 25 °C
Très soluble	Inférieur à 1
Facilement Soluble	De 1 à 10
Soluble	De 10 à 30
Assez soluble	De 30 à 100
Peu soluble	De 100 à 1000
Très peu soluble	1000 à 10000
Pratiquement insoluble	Plus de 10000

▪ Réactifs utilisés :

- Glycérol
- Ethanol
- Eau distillée

▪ Technique proprement dite :

- Tester la solubilité de 0.1g de du produit synthétisé dans 8ml, 9ml, 12.5ml et 15 ml d'eau distillée ;
- Tester la solubilité de 1g du produit synthétisé dans 1ml d'éthanol 96% ; 5ml et 10 ml de glycérol.

1.2.2.2. Analyse par microscopie électronique à balayage.

- Déposer l'échantillon du produit synthétisé sur le porte objet du MEB couplé à un système complet de microanalyse EDS;
- Recueillir les images.

1.2.2.3. Détermination de la température de fusion

La température de fusion d'une espèce chimique correspond à la température à laquelle la dernière particule solide de la substance passe à l'état liquide. C'est une constante physique, dont la détermination pourra permettre à la fois l'identification et la vérification de l'absence de substances étrangères.

▪ Méthode proprement dite :

- Préchauffer l'appareil à moins 5°C de la température de fusion du chlorobutanol hémihydraté c'est-à-dire à 73°C ;
- Remplir le tube capillaire avec le produit synthétisé à environ 3 mm puis le renverser tout en tapotant faire chuter le produit au fond (figure 18) ;
- Une fois l'appareil préchauffé, au bip sonore, introduire le tube dans l'appareil et chauffer. Au deuxième bip sonore, noter la température de début et de fin de fusion.

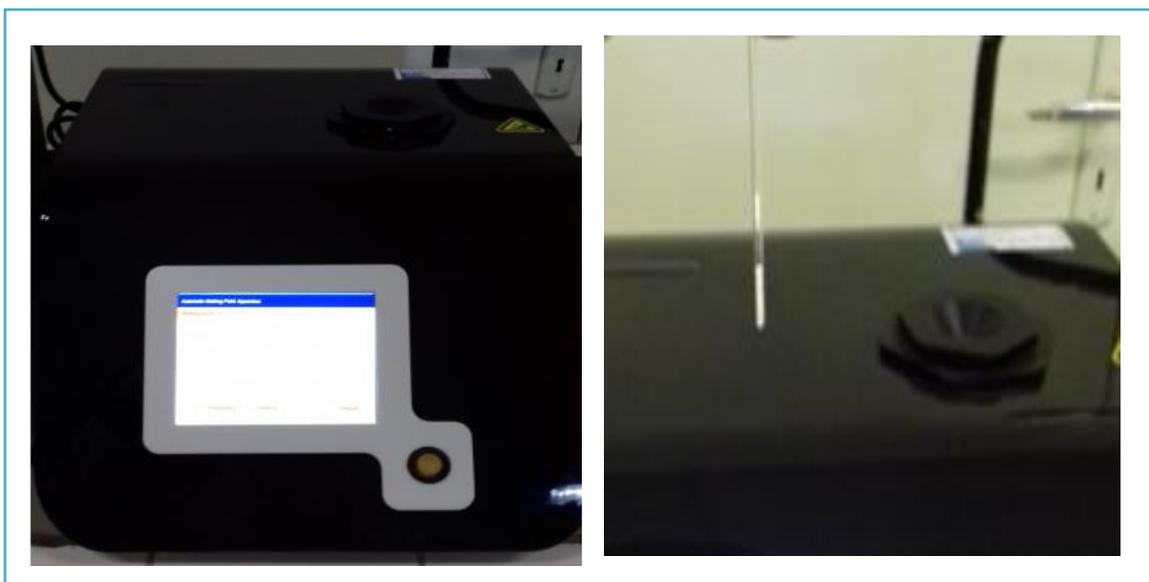


Figure 18 : Test de point de fusion

1.2.2.4. Identification par réactions colorimétriques**a. Réaction avec la pyridine****▪ Réactifs utilisés :**

- Hydroxyde de sodium
- Pyridine
- Eau distillée

▪ Préparation des réactifs :

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium concentrée

Faire dissoudre aux ultra-sons, 4,2 g d'hydroxyde de sodium dans 10 ml d'eau distillée.

▪ Méthode

- A un mélange de 1 ml de pyridine et de 2 ml de solution concentrée d'hydroxyde de Sodium, ajouter environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté ;
- Chauffer au bain-marie, agiter et laisser reposer ;
- Noter l'observation.

b. Réaction avec le nitrate d'argent ammoniacal**▪ Réactifs utilisés :**

- Nitrate d'argent
- Ammoniaque concentré
- Eau distille

▪ Préparation des réactifs :

- Préparation de la solution de nitrate d'argent ammoniacal :

Faire dissoudre 2.5 g de nitrate d'argent dans 80 ml d'eau ; ajouter, goutte à goutte en agitant, de l'ammoniaque diluée jusqu'à dissolution du précipité.

- Préparation de la solution d'ammoniaque diluée :

Prélever 45 ml d'ammoniaque concentré, puis compléter à 100 ml avec de l'eau.

▪ Méthode :

- A 5 ml de solution ammoniacale de nitrate d'argent, ajouter environ 20 mg du produit synthétisé et chauffer légèrement ;
- Noter l'observation.

c. Réaction avec l'iodure de potassium iodé**▪ Réactifs utilisés :**

- Iode
- Iodure de potassium
- Hydroxyde de sodium
- Eau distillée

▪ Préparation des réactifs :

- Préparation de l'hydroxyde de sodium 1M :

Faire dissoudre 42 g d'hydroxyde de sodium dans l'eau exempt de dioxyde de carbone et compléter jusqu'à 1000 ml.

- Préparation de la solution d'iodure de potassium iodée :

Faire dissoudre 500 mg d'iode et 1.5 g d'iodure de potassium, dans de l'eau et compléter à 25 ml avec le même solvant.

▪ Méthode :

- Faire dissoudre par agitation environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté dans 3 ml d'hydroxyde de sodium 1 M ;
- Ajouter par la suite 5 ml d'eau ,2 ml de solution d'iodure de potassium iodée lentement ;
- Noter l'observation.

1.2.2.5. Identification spectrale du chlorobutanol synthétisé**a. Spectroscopie d'absorption UV-VISIBLE**

Figure 19 : Spectrophotomètre UV-VISIBLE à Balayage PerkinElmer Lambda 25.

▪ Méthode :

- Préparation de la solution échantillon de chlorobutanol hémihydraté :

Solubiliser 0.1 g du produit synthétisé dans une fiole de 100 ml contenant environ 50 ml d'eau chaude. Mettre aux ultra-sons pendant 30 minutes, puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le même solvant;

Faire passer un blanc d'eau distillée et éliminer son absorbance;

Réaliser 03 balayages de 200 à 700 nm, et noter l'absorbance du produit synthétisé (figure 19).

b. Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge

Figure 20 : Spectrophotometer Infrarouge SPECTRUM TWO PerkinElmer

- **Réactif** : Bromure de potassium pur et sec (KBr)
- **Méthode** :
 - Dans un mortier, broyer quelques milligrammes de cristaux du produit synthétisé avec une quantité suffisante de bromure de potassium;
 - Placer ensuite le mélange dans le moule adapté, l'introduire dans la pastilleuse et appliquer une pression de 10 tonnes pour former une pastille fine et compacte (figure 21);
 - La pastille formée est ensuite introduite dans l'automate, pour effectuer la lecture.



Figure 21 : Pastilleuse

1.2.3. Essais sur le chlorobutanol hémihydraté

Dans cette partie nous réalisons les tests concernant le degré d'opalescence, le degré de coloration, l'acidité ainsi que la teneur en eau du chlorobutanol hémihydraté synthétisé ;

- Préparation de la solution S à examiner :

Faire dissoudre 5 g de produit synthétisé dans de l'éthanol à 96%, puis compléter à 10 ml avec le même solvant.

1.2.3.1. Aspect de la solution du chlorobutanol hémihydraté synthétisé

a. Degré d'opalescence

- **Réactifs utilisés :**

- Sulfate d'hydrazine
- Héxaméthylènetétramine
- Ethanol
- Eau distillée

- **Préparation des solutions :**

- Préparation de la solution de Sulfate d'hydrazine :

Faire dissoudre 1 g de sulfate d'hydrazine dans de l'eau, puis compléter à 100 ml avec le même solvant. Laisser reposer pendant 5h.

- Préparation de la solution d'héxaméthylènetétramine :

Dans une fiole de 100 ml à bouchon rodé, dissoudre 2.5 g de l'hexaméthylènetétramine dans 25 ml d'eau.

- Préparation de la suspension-mère d'opalescence (suspension de fromazine) :

Introduire 25 ml de la solution de sulfate d'hydrazine dans la fiole contenant la solution d'héxaméthylènetétramine, puis mélanger et laisser reposer pendant 24 heures.

- Préparation de l'étalon d'opalescence :

Prélever 15 ml de la suspension-mère d'opalescence et compléter à 1000 ml avec de l'eau. Cette solution est préparée au moment de l'utilisation.

- Préparation des solutions témoins :

Les solutions témoins d'opalescence sont préparées comme le montre le tableau ci-dessous

Tableau XV : Préparation des solutions témoins d'opalescence.

Témoin	Témoin I	Témoin II	Témoin III	Témoin IV
Etalon d'opalescence (ml)	5	10	30	50
Eau (ml)	95	90	70	50

▪ **Méthode :**

- Comparer par la suite l'opalescence de la solution à examiner S aux cinq témoins préparés à lumière diffuse du jour (Figure.22).

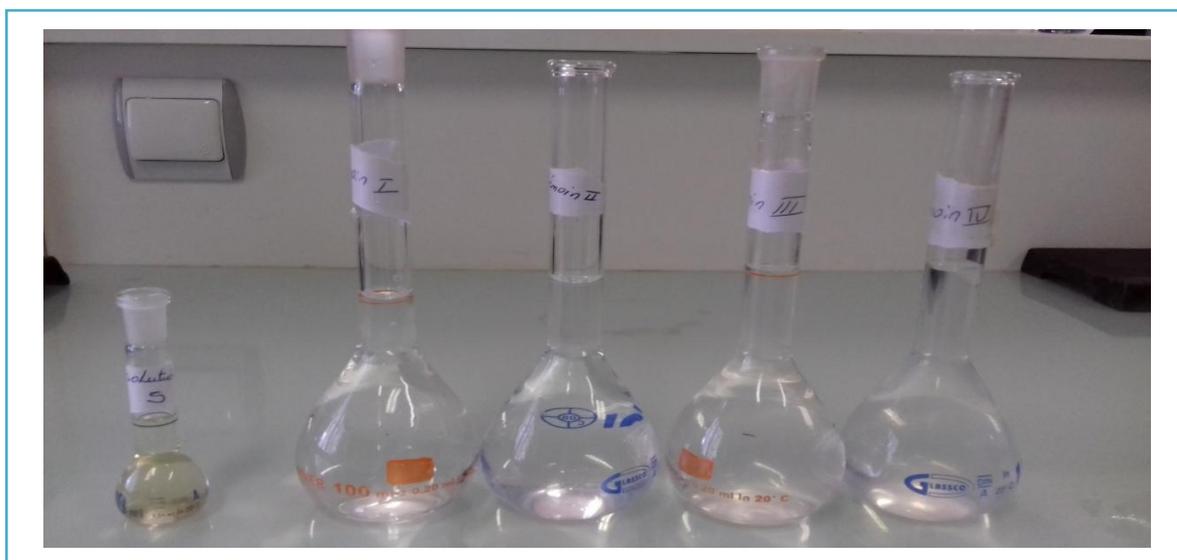


Figure 22 : Les solutions témoins d'opalescences

b. Degré de coloration

▪ **Réactifs utilisés :**

- Chlorure ferrique
- Chlorure de cobalt
- Sulfate de cuivre
- Acide chlorhydrique
- Eau distillée

▪ **Préparation des solutions :**

- Préparation de la Solution jaune :

Faire 4,6 g de chlorure ferrique dans 90 ml environ d'un mélange de 2.5 ml d'acide chlorhydrique et de 97.5 ml d'eau, puis compléter à 100 ml avec le même mélange.

- Préparation de la solution rouge :

Faire dissoudre 12 g de chlorure de cobalt dans 180 ml environ d'un mélange de 5 ml d'acide chlorhydrique et de 195 ml d'eau, puis compléter à 200 ml avec le même mélange.

- Préparation de la solution bleue :

Faire dissoudre 15.75 g de sulfate de cuivre dans 225 ml environ d'un mélange de 6.25 ml d'acide chlorhydrique et de 243.75 ml d'eau, puis compléter à 250 ml avec le même mélange.

- Préparation de la solution jaune-Brune :

Nous avons mélangé 2.4 ml de la solution jaune, 1 ml de la solution rouge, 0.4 ml de la solution bleue et 6.2 de l'acide chlorhydrique.

- Préparation des solutions témoins (figure 23) :

Les solutions témoins de colorations sont préparées comme le montre le tableau suivant ;

Tableau XVI : Préparation des solutions témoins de coloration

Témoin	JB1	JB2	JB3	JB4	JB5	JB6	JB7
Solution JB (ml)	100	75	50	25	12.5	5	2.5
Acide chlorhydrique (ml)	0	25	50	75	87.5	95	97.5

▪ **Méthode :**

- Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, à fond plat, comparer la solution S aux solutions témoins de coloration ;
- Apprécier les nuances à la lumière diffuse du jour par examen dans l'axe du tube et sur fond blanc.

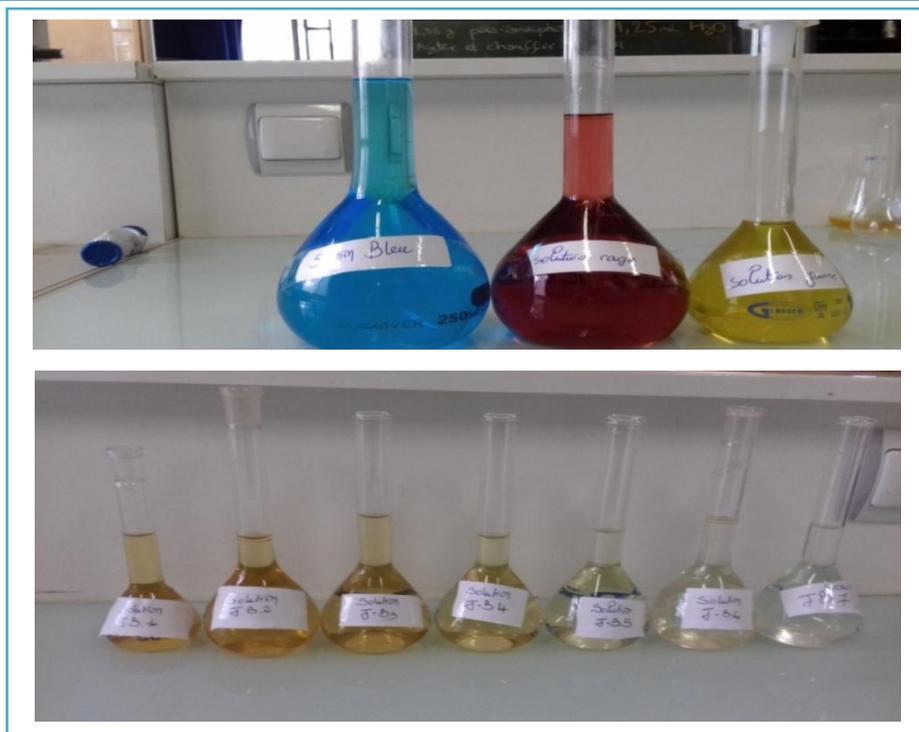


Figure 23 : Solutions témoins du degré de coloration.

1.2.3.2. Test d'acidité

▪ Réactifs utilisés :

- Carbonate de sodium
- Hydroxyde de sodium
- Bleu de bromothymol
- Acide chlorhydrique
- Méthylorange
- Eau distillée
- Ethanol

▪ Préparation des réactifs :

- Préparation de méthylorange :

Faire dissoudre 0.1 g de méthylorange dans 80 ml d'eau, puis compléter à 100 ml avec l'éthanol ;

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium 0.02 M :

Introduire 2 ml de la solution d'hydroxyde de sodium 1M dans une fiole de 100 ml, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Préparation de la solution de bleu de bromothymol :

Faire dissoudre 50 mg de bleu bromothymol dans un mélange de 4 ml d'hydroxyde de sodium 0.02 M et 20 ml d'éthanol, puis compléter à 100 avec de l'eau ;

- Préparation de l'acide chlorhydrique à 0.1M :

Introduire 1.8 ml d'acide chlorhydrique concentré dans une fiole de 100 ml contenant environ 30 ml d'eau puis compléter au trait de jauge avec de le même solvant.

- Détermination du titre le l'acide chlorhydrique à 0.1 M :

Dissoudre 53 mg de carbonate de sodium dans 10 ml d'eau ; ajouter 0,1ml de solution de méthylorange puis titrer par l'acide chlorhydrique jusqu'au début du virage au rouge-jaune ;

- Chauffer ensuite à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Refroidir et titrer jusqu'à coloration rouge-jaune ;

- Formule de calcule du titre de HCl :

1 ml d'acide chlorhydrique 1 M \longrightarrow 53,00 mg de Na₂ CO₃.

Ve_q d'acide chlorhydrique C M \longrightarrow m (mg) de Na₂ CO₃

$$m \text{ (mg)} = V_{\text{eq HCl}} \times C_{\text{HCl}} \times 53$$

Donc :

$$C = \frac{PE \text{ (Na}_2\text{ CO}_3\text{)mg}}{53 \times V_{\text{eqHCl}}}$$

Avec :

C : concentration de l'acide chlorhydrique en mole/l

PE = m : masse du carbonate de sodium en mg

Ve_q (ml) : volume de chute de burette en HCl.

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.01M :

Prélever 10,0 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et compléter à 1000 ml avec de l'eau.

- Vérification du titre de l'hydroxyde de sodium à 0.01M :

Titrer 20,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium par l'acide chlorhydrique préalablement préparé, en présence du bleu de bromothymol. Le point d'équivalence correspond au virage de la couleur du bleu vers le jaune.

Effectuer trois dosages et prendre la moyenne des volumes d'équivalence.

- Formule de la détermination du titre de NaOH :



Donc:

$$[\text{NaOH}] = \frac{[\text{HCl}] \times V_{\text{HCl}}}{V_{\text{eq}}}$$

Avec :

V_{HCl} : volume de HCl titré en ml (20 ml).

V_{eq} : volume de chute de burette en NaOH en ml.

▪ Méthode :

- A 4 ml de solution S, ajouter 15 ml d'éthanol à 96% et 0,1 ml de solution de bleu de bromothymol. Titrer par la solution l'hydroxyde de sodium préalablement préparée et titrée.
- Le point d'équivalence est déterminé par le virage de la couleur de l'indicateur du jaune au bleu.

1.2.3.3. Détermination de la teneur en eau

- Remplir la burette avec le titrant en positionnant le flacon du réactif dans son emplacement prévu ;
- Introduire environ 30 à 40 ml de solvant dans la cellule à l'aide de la touche « solvant » situé sur la face avant de l'appareil ;
- Effectuer un pré-titrage qui nous permet d'éliminer toute trace d'eau amené par le solvant ;
- Lorsque l'appareil indique « introduire échantillon », Introduire 0.300 g du chlorobutanol hémihydraté synthétisé ;
- Le résultat est ensuite calculé et affiché (Figure 24).



Figure 24 : Appareil de Karl Fisher Mettler Toledo

1.2.4. Détermination de la teneur en chlorobutanol

▪ **Réactifs utilisés :**

- Acide nitrique
- Hydroxyde de sodium
- Nitrate d'argent
- Thiocyanate d'ammonium
- Sulfate ferrique et d'ammonium
- Eau distillée.

▪ **Principe**

Il s'agit d'une méthode de dosage argentimétrique en milieu acide (indirect et par retour) des ions chlorures issus de la dégradation du chlorobutanol (méthode de Charpentier Volhard) (figure 25)

▪ **Préparation des réactifs :**

- Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1N :

Dans une fiole de 100ml préalablement remplie d'environ 30 ml d'eau distillée, ajouter une masse 0.4g de NaOH.

Mettre la fiole aux ultra-sons pendant 5minutes puis laisser la solution se refroidir. Ajuster ensuite le volume de la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Préparation d'une solution d'acide nitrique à 0.1N :

Dans une fiole de 100 ml préalablement remplie d'environ 30ml d'eau distillée, ajouter un volume de 0.7 ml d'acide nitrique. Puis compléter le volume de la fiole jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée.

- Préparation d'une solution de nitrate d'argent à 0.1N :

Dans une fiole de 100 ml préalablement remplie d'environ 30 ml d'eau distillée, ajouter une masse 1.693 g de nitrate d'argent AgNO₃ ;

Mettre aux ultra-sons pendant 5minutes. Puis ajuster le volume de la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Préparation de la solution de thiocyanate d'ammonium à 0.1N :

- Dans une fiole de 100ml préalablement remplie d'environ 30ml d'eau distillée, ajouter une masse de 0.761 g de thiocyanate d'ammonium ;

Mettre aux ultra-sons pendant 5 minutes, puis ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Vérification du titre de la solution de thiocyanate d'ammonium :

- Dans un erlenmeyer de 50 ml mettre un volume de 10 ml de nitrate d'argent 0.1N puis ajouter 2ml d'acide nitrique concentrée et environ 2ml d'indicateurs de précipitation ; l'alun de fer ammoniacal.

Titrer ensuite par la solution de thiocyanate d'ammonium préparée ;

Le point de fin de titrage est apprécié par le virage de la coloration au jaune rougeâtre.

Répéter l'opération trois fois, noter les volumes et calculer le volume équivalent moyen.

- Formule de calcul de la teneur en SCN⁻ :



Donc :

$$[\text{SCN}^-] = \frac{[\text{AgNO}_3] \times V}{V_{eq}}$$

Avec :

V : volume titré de nitrate d'argent en ml (10ml)

V_{eq} : volume de chute de burette en thiocyanate de sodium en ml

▪ Dosage du chlorobutanol

- Dans un erlenmeyer, solubiliser aux ultra-sons une prise d'essai (environ 0.1g) du produit synthétisé dans 15ml d'eau distillée ;

- Ajouter 10ml de la solution d'hydroxyde de sodium 0.1N, chauffer au bain marie pendant 5minutes puis laisser refroidir ;

- Ajouter successivement un volume de 20 ml d'acide nitrique dilué et 25ml de nitrate d'argent 0.1 N. Il se forme un précipité blanc ; chauffer à ébullition et laisser refroidir.

- Filtrer ensuite, pour éliminer le précipité formé ;

- Ajouter 2ml de la solution d'alun de fer ammoniacal au filtrat récupéré, puis titrer par le thiocyanate d'ammonium préparé et titré, jusqu'au virage à l'orange ;

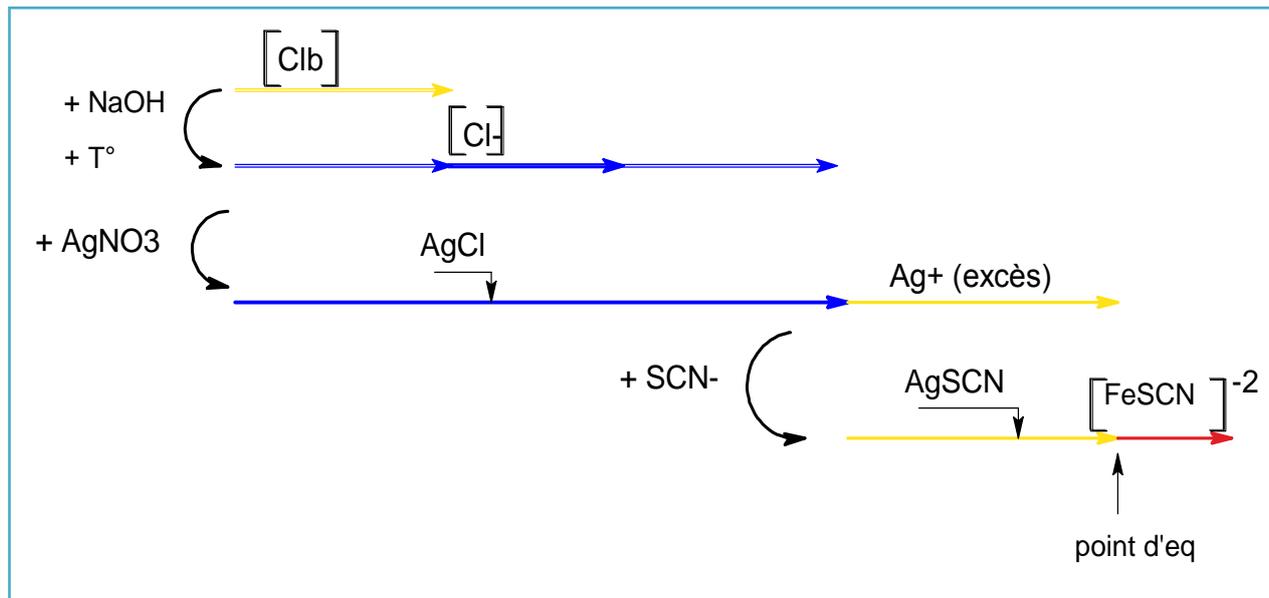


Figure 25 : Schéma de dosage du chlorobutanol

- Nous avons effectué cinq dosages, et nous avons calculé les teneurs avec la Formule suivante :

$$n_{Clb} = n_{Cl^-} / 3$$

$$n_{Cl^-} = n_{AgNO_3} - n_{SCN^-} = [AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}$$

$$n_{Clb} = \frac{[AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}}{3}$$

$$M_{Clb} = n_{Clb} \times Mr = \frac{[AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}}{3} \times Mr$$

$$T = \frac{M_{Clb}}{PE(1-Te)} = \frac{[AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}}{3(PE(1-Te))} \times Mr \times 100$$

$$T = \frac{[AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}}{3(PE(1-Te))} \times 176.5 \times 100$$

$$T = \frac{[AgNO_3] \times V_1 - [SCN^-] \times V_{eq}}{(PE(1-Te))} \times 59.2 \times 100$$

Donc :

$$T\% = \frac{(V_1[AgNO_3] - v_{eq}[SCN^-]) \times 59.2}{PE(1 - Te)} \times 100$$

Avec :

T% : teneur en pourcentage du chlorobutanol (substance anhydre) ;

V₁ : volume de nitrate d'argent en ml (25ml) ;

V_{eq} : Volume de chute de burette en thiocyanate d'ammonium en ml ;

[AgNO₃] : concentration du nitrate d'argent en mole/l ;

[SCN⁻] : concentration du thiocyanate d'ammonium en mole/l ;

PE : prise d'essai de l'échantillon du chlorobutanol hémihydraté en mg ;

Teau : teneur en eau du chlorobutanol hémihydraté synthétisé en %.

2. Résultats et discussion

2.1. Calcul du rendement de la réaction de synthèse

2.1.1. Détermination du réactif limitant

- Calcul du nombre de mole du chloroforme n₁ :

$$n_1 = \frac{d_1 \times v_1}{M_1} = \frac{1.49 \times 5}{119.378}$$

Avec :

d₁ : densité du chloroforme = 1.49

M₁: masse molaire du chloroforme = 119.378 g/mole

V₁ : volume du chloroforme = 5 ml

$$n_1 = 0.0624 \text{ mole}$$

- Calcul du nombre de mole de l'acétone n₂ :

$$n_2 = \frac{d_2 \times v_2}{M_2} = \frac{0.791 \times 45}{58.08}$$

Avec :

d₂ : densité de l'acétone = 0.791

M₂ : masse molaire de l'acétone = 58.08 g/mole

V₂ : volume du chloroforme = 45 ml

$$n_2 = 0.612 \text{ mole}$$

n₂ > n₁ : Le chloroforme est le facteur limitant dans cette réaction, donc :

$$X_{\max} = n_1 = 0.0624 \text{ mole}$$

Tableau XVII : Bilan de la réaction de synthèse du chlorobutanol hémihydraté

	Réactifs		Produit
Réaction	CHCl ₃	+ C ₃ H ₆ O	$\xrightarrow{\text{KOH}}$ C ₄ H ₇ Cl ₃ O.1/2 H ₂ O
Début de réaction	0.0624mole	0.612mole	0
Avancement de la réaction	0.062 - X _t	0.612 - X _t	X _t
Fin de la réaction 2 heures	0	0.612 - 0.062	0.062

2.1.2. Calcul de la masse théorique du chlorobutanol

$$n_{\text{clbh}} = X_{\text{max}} = 0.0624 \text{ mole}$$

$$m_{\text{clbh}} = 0.0624 \times 186.5$$

$$m_{\text{clbh}} = 11.637 \text{ g}$$

2.1.3. Calcul du rendement de la synthèse (R)

Nous avons calculé le rendement des trois synthèses avec la formule suivante, et établi le rendement moyen (tableau XVIII)

$$R\% = \frac{m_{\text{expérimentale}}}{11,637} \times 100$$

Tableau XVIII : Calcul du rendement de la synthèse du chlorobutanol hémihydraté

N° de la synthèse	La masse réelle (g)	Rendement (%)	Rendement moyen %
Synthèse 01	5.772	49.60	53,03
Synthèse 02	6.590	56.62	
Synthèse 03	6.15	52.89	

Le rendement moyen de nos synthèses du chlorobutanol hémihydraté est de 53,03 %.

2.2. Caractérisation et identification du chlorobutanol hémihydraté synthétisé

2.2.1. Aspect et odeur

Le produit que nous avons synthétisé est une poudre cristalline, de couleur blanche, avec une odeur camphrée très forte. Ce qui est conforme aux spécifications exigées par la Pharmacopée Européenne (Figure 26).



Figure 26 : Aspect final du produit synthétisé

2.2.2. Analyse par microscopie électronique à balayage

Les images obtenues de l'examen au microscope électronique à balayage du produit synthétisé, ont montré des formes d'aspect tubulaire avec une surface lisse, ce qui confirme la forme cristalline du produit synthétisé. (Figure 27)

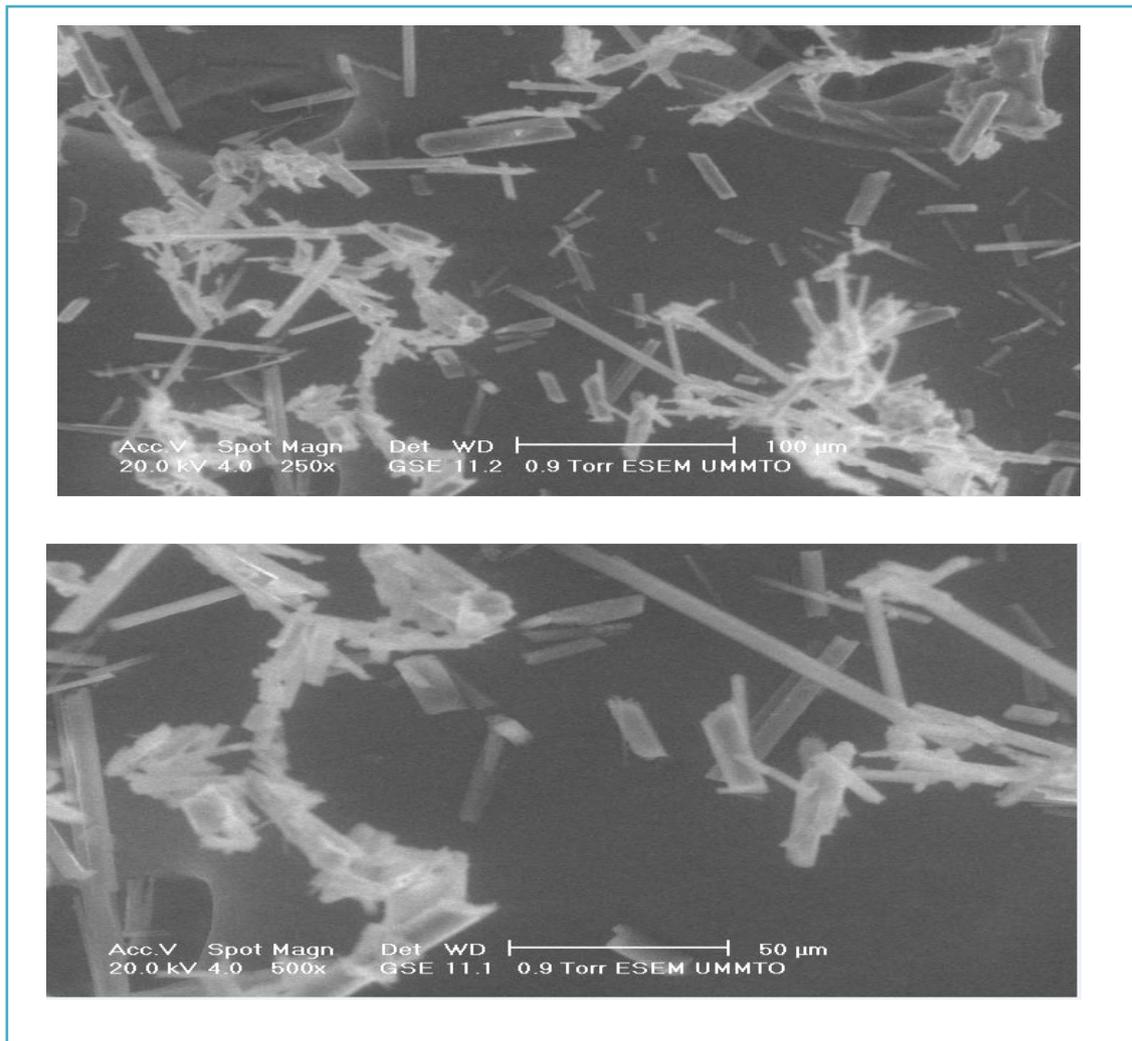


Figure 27 : Images prises au microscope électronique à balayage aux grossissements 250 et 500

2.2.3. Solubilité

- Le produit synthétisé est insoluble dans l'eau froide, et peu soluble dans l'eau chaude : nous avons pu solubiliser 0.1g dans un volume de 12.5 ml d'eau (Figure 28).
- Il est très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent : nous avons pu solubiliser 1g dans 1ml d'éthanol 96% et il est soluble dans le glycérol à 85 pour cent : 1g dans 10 ml de glycérol (Figure 28).
- Ces résultats sont conformes aux exigences de la pharmacopée européenne.



Figure 28 : Test de solubilité du produit synthétisé dans l'eau, éthanol et glycérol.

2.2.4. Température de fusion

Les températures de fusions obtenues avec le chlorobutanol synthétisé sont :

Premier essai : 77.8 °C

Deuxième essai : 78.0 °C (Figure 29).

Ces valeurs obtenues répondent à celle exigée par la pharmacopée européenne, qui fixe la température de fusion du chlorobutanol à 78 °C.

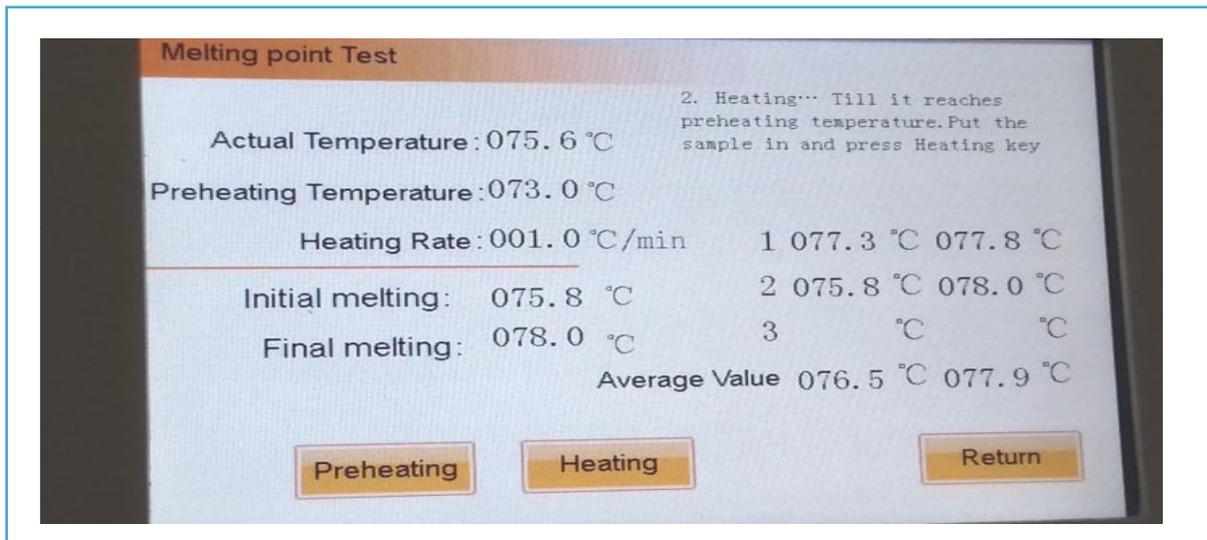


Figure 29 : Résultats du test de point de fusion

2.2.5. Identification par des réactions colorimétriques

2.2.5.1. Réaction avec la pyridine

La réaction de la pyridine avec notre produit a donné lieu à une couche rouge à la surface après le chauffage, ce qui répond aux exigences de la pharmacopée européenne. (Figure 30) Cette couche rouge correspond à la réaction de Fujiwara-Ross qui oriente vers le carbone trichloré du chlorobutanol hémihydraté. (Figure 31)

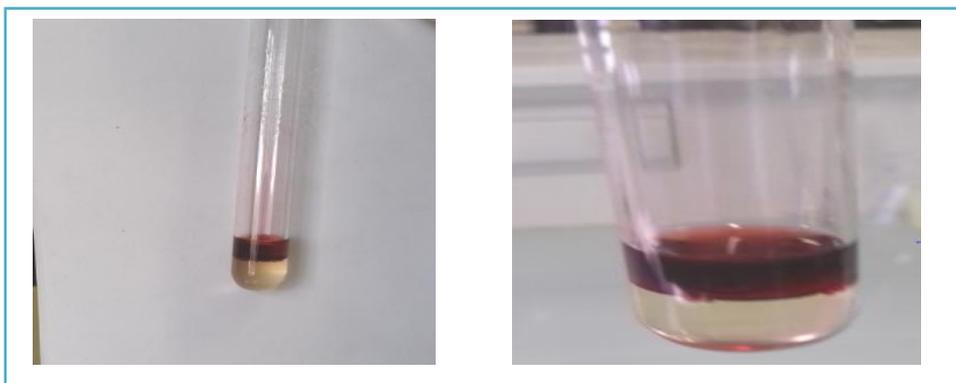


Figure 30 : Réaction du chlorobutanol avec la pyridine

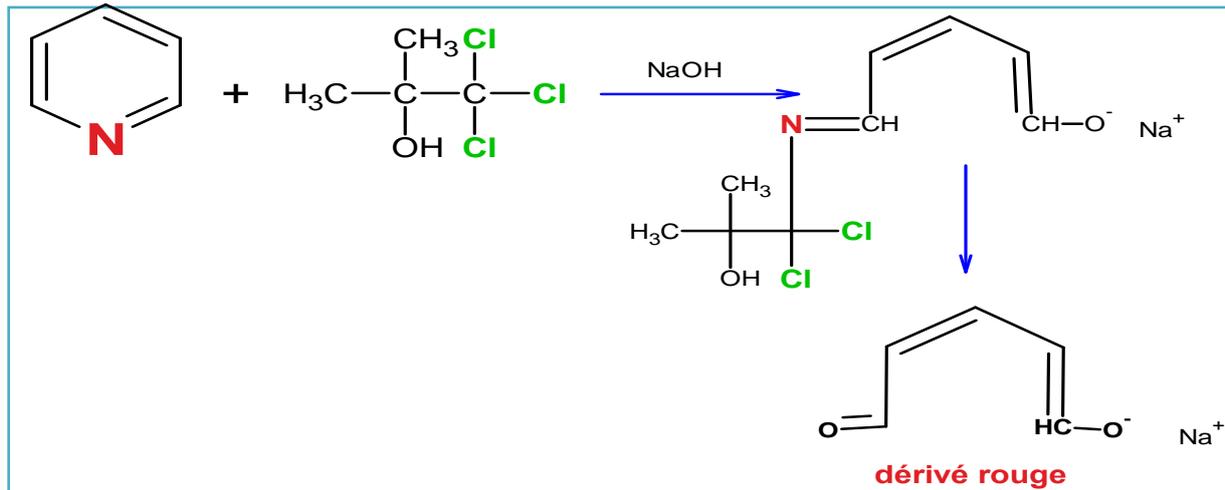


Figure 31 : Réaction de Fujiwara-Ross entre le chlorobutanol et la pyridine

2.2.5.2. Réaction avec le nitrate d'argent ammoniacal

- La réaction du produit synthétisé avec le nitrate d'argent ammoniacal a donné lieu à un précipité noir, ce qui est conforme aux exigences de la pharmacopée européenne (figure 32).
- Ce précipité correspond à l'hydroxyde d'argent, formé en milieu alcalin à partir de l'AgCl ; issu de la réaction entre les ions chlorure (libérés de la dégradation du chlorobutanol) avec le nitrate d'argent (figure34).

2.2.5.3. Réaction avec l'iodure de potassium iodé

- La réaction du produit synthétisé avec l'iodure de potassium a donné lieu à un précipité jaunâtre, qui correspond à l'exigence de la pharmacopée européenne (figure 33).
- Ce précipité correspond à la formation de l'iodoforme à partir d'iodure de potassium et l'acétone issue de la dégradation de la fonction alcool du chlorobutanol en milieu alcalin (figure 34).

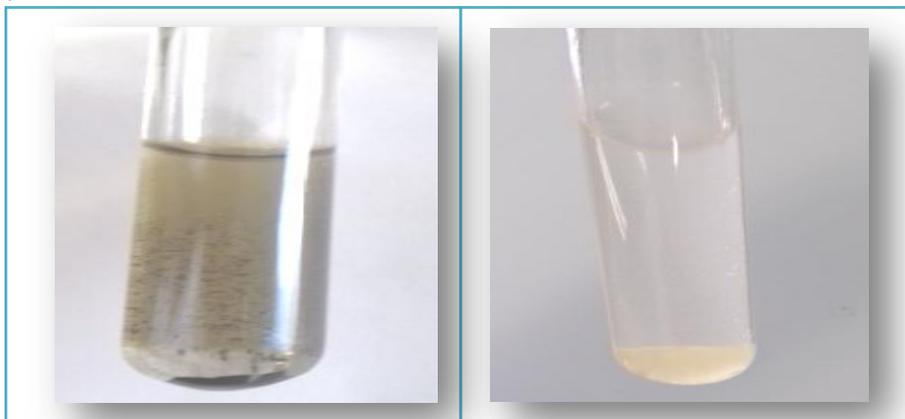


Figure 32 : Formation d'un précipité noir avec le nitrate d'argent ammoniacal

Figure 33 : Précipité jaune de la réaction avec l'iodure de potassium.

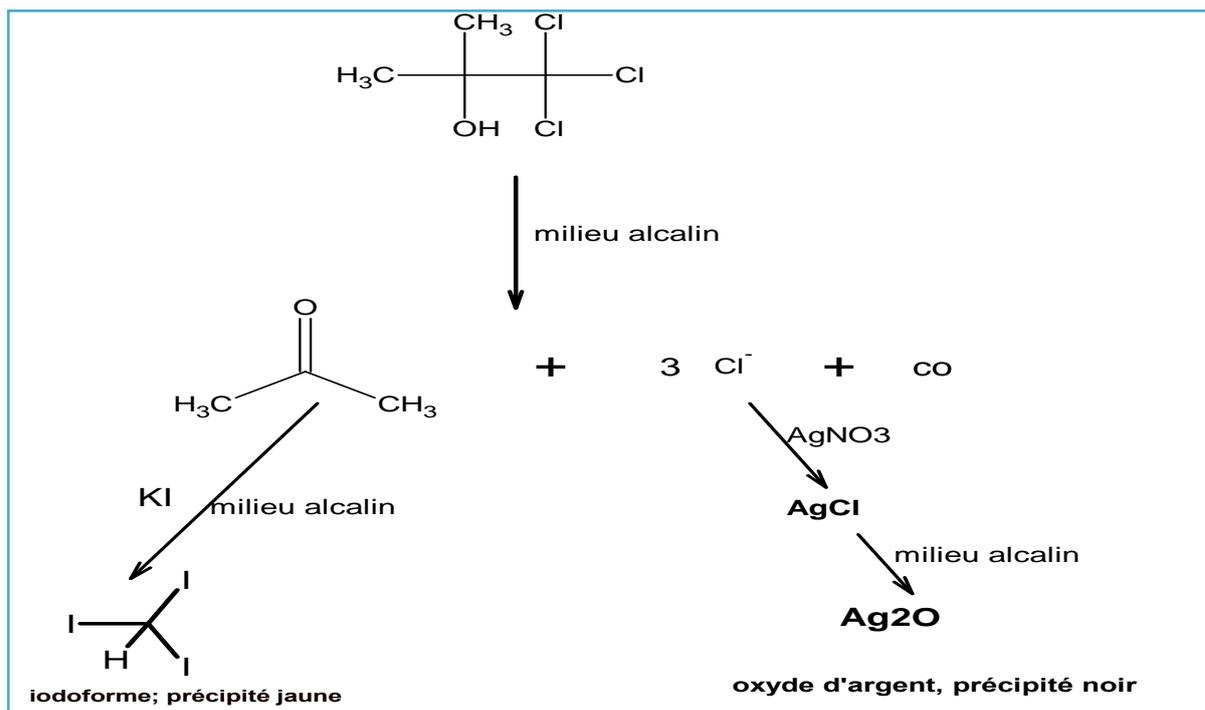


Figure 34 : Réaction du chlorobutanol avec l'iodure de potassium et le nitrate d'argent.

2.2.6. Identification par des méthodes spectrales

2.2.6.1. Identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-VISIBLE

Le produit ne présente aucune absorbance de 200 jusqu'à 700 nm ; ce qui est conforme aux données de la littérature sur cette molécule (Figure 35).

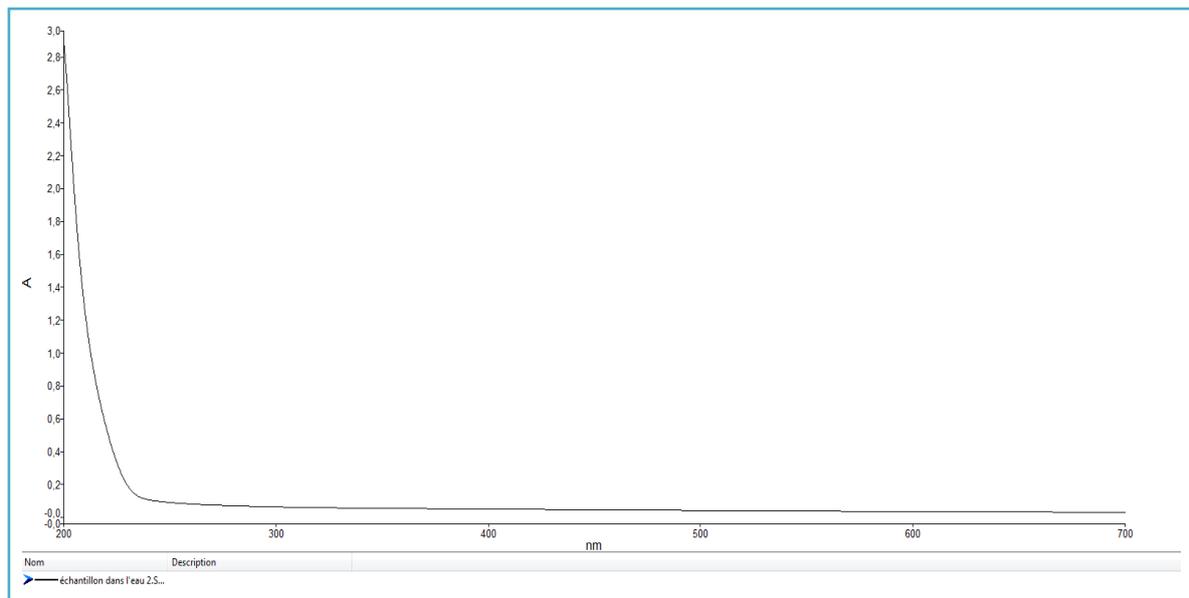


Figure 35 : Spectre d'absorption dans UV-Visible du chlorobutanol synthétisé

2.2.6.2. Analyse par spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge

La figure ci-après représente le spectre d'absorption infrarouge du chlorobutanol synthétisé

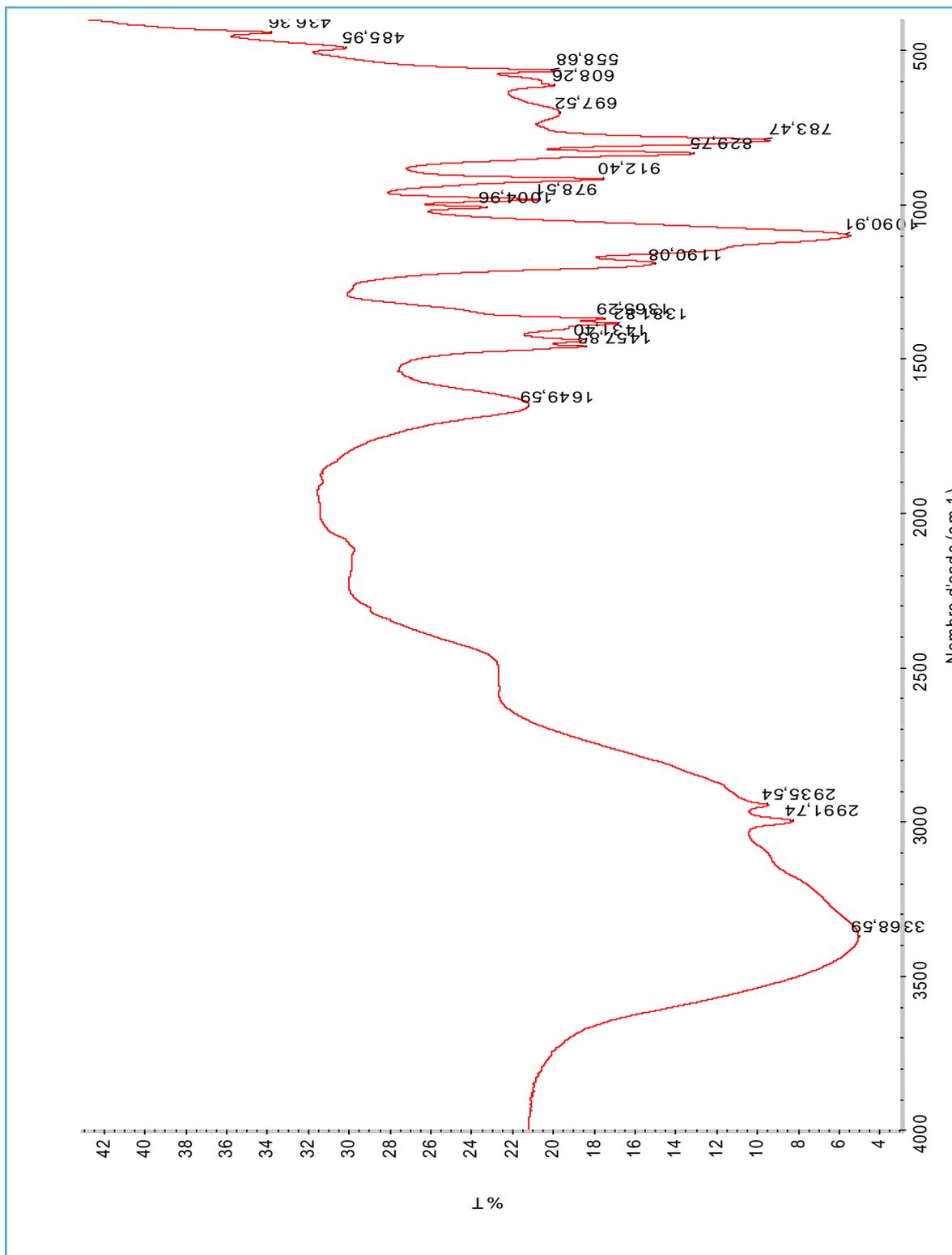


Figure 36 : Spectre d'absorption dans l'infrarouge du chlorobutanol Synthétisé

Le tableau ci-après montre les nombres d'ondes, l'attribution de chaque bande du spectre IR obtenu avec le chlorobutanol synthétisé [75].

Tableau XIX : Les bandes d'absorption de l'infrarouge

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attributions		Vibration
3369.88	O-H Libre	Alcool Liaison intermoléculaire	Elongation symétrique
2995.99	CH ₃	Alcane Méthyle	Elongation symétrique
2945.02			Elongation symétrique
1651.74	C=C	Phényl	Elongation
1459.26	CH ₃	Alcane	Cisaillement
1440.87			
1385.39	CH ₃		Rotation
1370.33	C-O O-H	Alcool tertiaire Alcool	Elongation Déformation
1188.95	C-C + CH ₃		Elongation
1099.68	O-H + C-C + CH ₃		
1008.43	CH ₃		Torsion
983.16	CH ₃ +C-C +C-O	Alcane	Torsion
		Alcool	Elongation
917.83	CH ₃ + C-C	Méthyl	Balancement
		Alcane	Elongation
833.3	C-Cl + C-C +C-C-O		Elongation
			Elongation
			Elongation
791.18	C-Cl + C-C		Elongation
			Déformation
704.05	C=C	Benzène monosubstitué	
612.69	C-Cl Carbone trichloré		Elongation
565.17	C-C-O +CH ₃ -C-CH ₃		Déformation
492.40	C-C-O +CH ₃ -C-CH ₃		Déformation
442.3	O-H		Torsion

- Interprétation du spectre

Pour interpréter le spectre d'absorption dans l'infrarouge du chlorobutanol synthétisé, nous le scindons en deux régions principales :

- La région des groupements fonctionnels de 4000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} :

Dans cette région nous trouvons les principaux groupements fonctionnels du Chlorobutanol à savoir :

Le groupement alcool (OH) qui est caractérisé par une bande large à $3369,88\text{ cm}^{-1}$ due à l'élongation de la liaison O-H libre, et les groupements méthyles CH₃ caractérisée par des bandes à $2995,99\text{ cm}^{-1}$ et $2945,02\text{ cm}^{-1}$ dues aux élongations symétriques des liaisons C-H.

- La région de l'empreinte digitale de 1500 cm^{-1} à 400 cm^{-1} :

Dans cette région nous retrouvons toutes les bandes des liaisons caractéristiques du chlorobutanol

- Les bandes $1459,26\text{ cm}^{-1}$; $1440,87\text{ cm}^{-1}$; $1385,39\text{ cm}^{-1}$ et $917,83\text{ cm}^{-1}$ dues à différentes déformations des liaisons C-H des méthyles ;
- Nous avons pu confirmer avec les bandes $1370,33\text{ cm}^{-1}$, $983,16\text{ cm}^{-1}$, $565,17\text{ cm}^{-1}$, $442,3\text{ cm}^{-1}$ la présence d'un alcool tertiaire liée à un alcane, substitué par des radicaux méthyles dans la structure de notre produit.
- Les bandes $791,18\text{ cm}^{-1}$ et $612,69\text{ cm}^{-1}$ confirme la présence d'un carbone trichloré;
- Par ailleurs la bande de $833,30\text{ cm}^{-1}$ confirme que l'alcool tertiaire et le carbone trichloré appartiennent au même composé.
- Toutefois, on souligne la présence de deux bandes étrangères à la structure du chlorobutanol, à savoir la bande de $704,05\text{ cm}^{-1}$ et la $1651,74\text{ cm}^{-1}$ qui orientent vers un benzyl monosubstitué, qui seraient dues probablement à la présence des substances apparentés du chlorobutanol à savoir le phénoxyéthanol ou le phényléthanol.

- Comparaison spectre obtenu avec le spectre de référence du chlorobutanol :

Le tableau ci-après montre la comparaison entre les nombres d'ondes des bandes obtenues par le produit synthétisé et celles du spectre de référence.

Tableau XX : Tableau de comparaison entre les nombres d'onde des bandes du spectre d'absorption infrarouge de référence et du chlorobutanol synthétisé.

Positions des bandes IR du spectre de référence (cm ⁻¹)	Positions des bandes IR de l'échantillon (cm ⁻¹)
3406	3369.88
2997	2995.99
2945	2945.02
2881	/
1635	1651.74
1460	1459.26
1441	1440.87
1386	1385.39
1373	1370.33
1337	/
1188	1188.95
1148	1099.68
1007	1008.42
983	983.16
916	917.83
831	833.30
793	791.18
664	612.94
492	492.40

La figure ci-dessous montre le spectre d'absorption infrarouge de référence du chlorobutanol selon SDBS-DATA BASE [76].

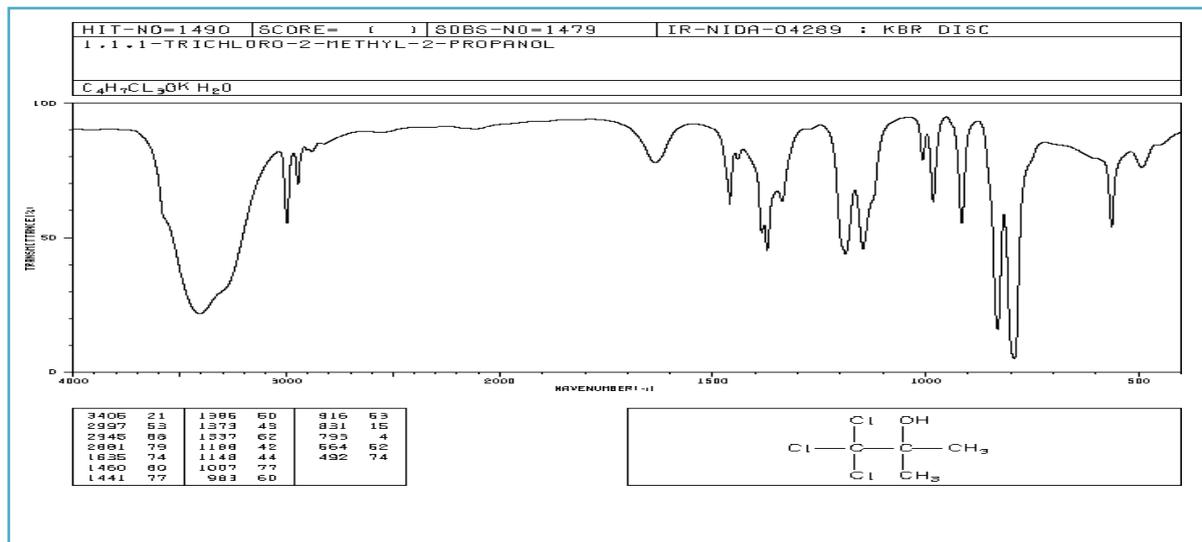


Figure 37 : Spectre d'absorption infrarouge du chlorobutanol hémihydraté

En conclusion, l'analyse du spectre d'absorption infrarouge de notre produit a montré la présence de toutes les bandes caractéristiques liées à la structure du chlorobutanol (790 cm^{-1} , 833 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} , 917 cm^{-1} , 980 cm^{-1}) [29], et sa comparaison au spectre de référence a montré une très grande similitude.

2.3. Essai sur le chlorobutanol hémihydraté

2.3.1. Aspect de la solution

2.3.1.1. Degré d'opalescence

Après comparaison visuelle de la solution S du chlorobutanol synthétisé avec les solutions témoins d'opalescences préparées, nous avons constaté que la solution S est moins opalescente que le témoin II, ce qui est conforme à l'exigence de la pharmacopée européenne (Figure 38).

2.3.1.2. Degré de coloration

Après comparaison visuelle entre la solution témoin S et les témoins de coloration, nous avons constaté que, La solution S est plus colorée que la solution témoin JB4 mais moins colorée que la solution témoin JB5. Ce qui correspond à l'exigence de la pharmacopée européenne. (Figure 39).

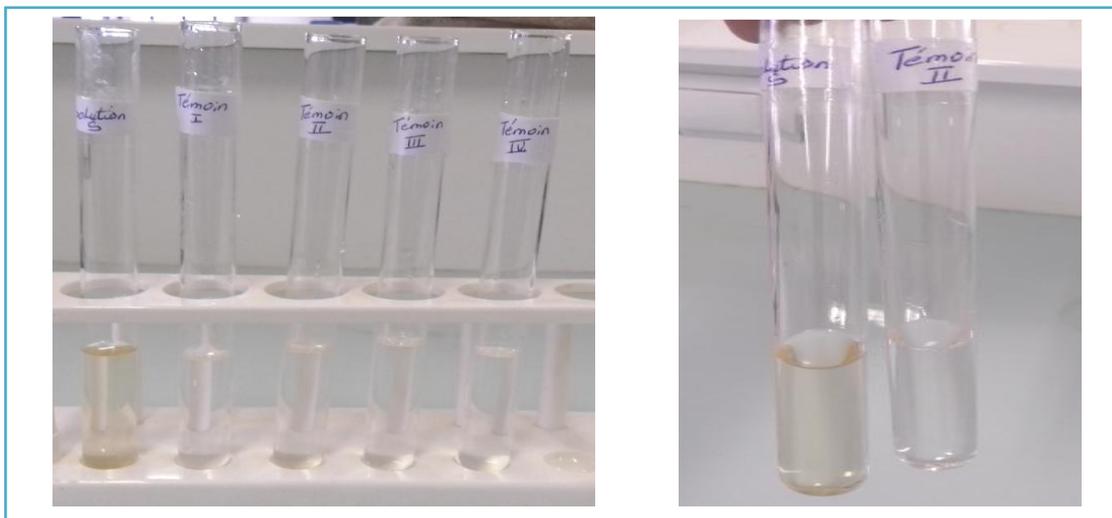


Figure 38 : Résultat du test d'opalescence.

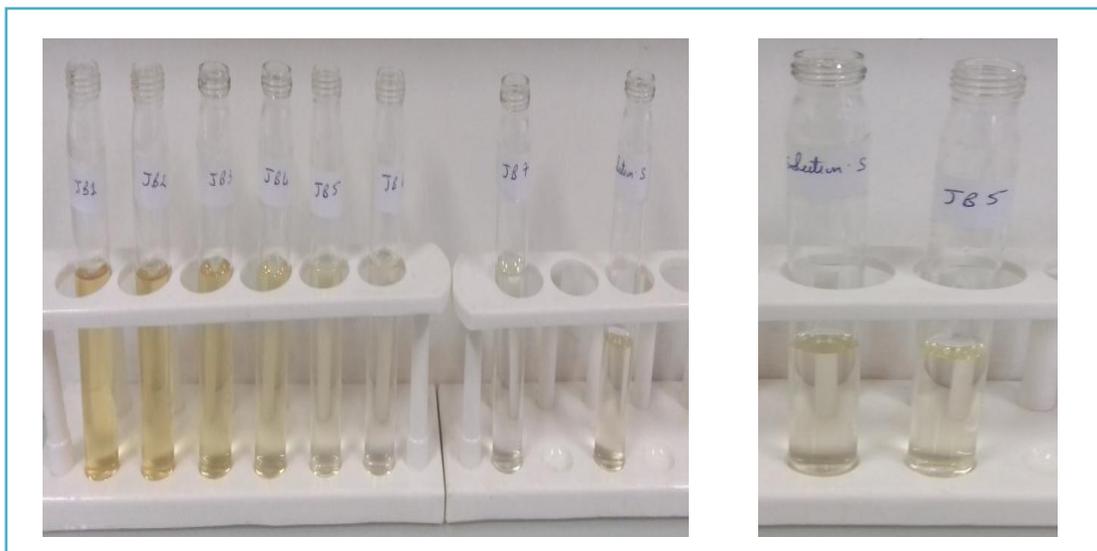


Figure 39 : Résultat du test de degré de coloration

2.3.2. Test d'acidité

- Vérification du titre de la d'acide chlorhydrique 0.1 M :

Nous avons utilisé la formule préétablie pour le calcul du titre de l'acide chlorhydrique ;

$$V_{\text{HCl Eq}} = 10 \text{ ml}$$

$$[\text{HCl}] = \frac{53}{53 \times 10}$$

$$[\text{HCl}] = 0.1 \text{ M}$$

Donc le titre de la solution d'HCl préparée avec laquelle nous avons vérifié le titre de la solution de l'hydroxyde de sodium est à 0.1 M.

- Vérification du titre de l'hydroxyde de sodium 0.01 M :

Les résultats de la vérification du titre du NaOH sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXI : Résultats de la vérification du titre d'hydroxyde de sodium.

Essais X	Volume de NaOH (ml)	Ve _q de HCL (ml)	Ve _q Moyen (ml)
01	20	2.00	2.033
02		2.10	
03		2.00	

Nous avons utilisé la formule préétabli pour le calcul de la teneur en NaOH ;

$$[\text{NaOH}] = \frac{0.1 \times 2.033}{20}$$

$$[\text{NaOH}] = 0.01 \text{ M}$$

Donc le titre de la solution de l'hydroxyde de sodium avec laquelle, nous avons titré l'acidité du chlorobutanol est à 0.01 M.

- Résultats du dosage de l'acidité du chlorobutanol hémihydraté synthétisé

Les résultats des quatre dosages sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXII : Résultats du test d'acidité.

Essai N°	Volume d'essai en solution S (ml)	Ve _q en naoh (ml)	Volume Moyen (ml) (\bar{X})	Ecart type σ	Intervalle de confiance IC
1	4	1.0	0.825	0,125	[0.64 ; 1.00]
2		0.7			
3		0.8			
4		0.8			

Nous avons calculé l'écart type σ et l'intervalle de confiance puis comparé chaque volume à cet intervalle. Et ce afin d'estimer la précision des différentes mesures effectuées.

Il faut, au moins, que 95% des quatre volumes (c'est à dire les 4essais) soit compris dans cet intervalle de confiance.

$$\bar{X} = \frac{\sum V}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{1 + 0.7 + 0.8 + 0.8}{4} = 0.825$$

$$\bar{X} = 0.825 \text{ ml}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - V)^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(1 - 0.825)^2 + (0.7 - 0.825)^2 + (0.8 - 0.825)^2 + (0.8 - 0.825)^2}{3}}$$

$$\sigma = 0.125$$

$$\text{IC} = \bar{X} \pm t \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 0.825 \pm 3.18 \times \frac{0.125}{\sqrt{4}} = 0.825 \pm 0.17$$

$$\text{IC} = [0.64 ; 1.00]$$

Avec :

-n : nombre d'essai = 4

- $t_{ddl; \frac{\alpha}{2}}$: Quantile de distribution de student pour ddl (degré de liberté) ; et α (la probabilité du risque attendu du contenu de l'intervalle de confiance

-Dddl = n-1 = 5-4-1 = 3

- $\alpha = 5 \%$

-t = 3.18

Nous constatons que toutes les teneurs des quatre essais sont comprises dans l'intervalle de confiance qui est de [0.64 ; 1.00].

Le volume moyen obtenu était de 0.84 ml, ce qui est conforme à l'exigence de la pharmacopée qui fixe ce volume à moins de 1 ml.

2.3.3. Détermination de la teneur en eau dans le produit synthétisé

Le résultat de la teneur en eau du produit synthétisé est de 5.7 %.

Cette teneur est proche de l'intervalle fixé par la pharmacopée européenne à [4.5, 5.5]. Tout de même il faut insister sur l'étape de l'élimination de l'excès d'eau par l'éthanol.

2.4. Détermination de la teneur en chlorobutanol

- Vérification du titre de la solution du thiocyanate de sodium 0.1M :

Les résultats de ce dosage sont résumés dans le tableau suivant

Tableau XXIII : Résultats du titrage de la solution du thiocyanate de sodium

Essai N°	Volume du nitrate d'argent (ml)	Veq en thiocyanate de sodium (ml)	Veq Moyen (ml)
01	10	10.1	10.2
02		10.3	
03		10.2	

Nous avons utilisé la formule établie pour calcul la concentration molaire du thiocyanate d'ammonium :

$$[\text{SCN}^-] = \frac{[\text{AgNO}_3] \times V}{V_{\text{eqMoySCN}}} = \frac{0.1 \times 10.2}{10}$$

$$[\text{SCN}^-] = 0.098 \text{ M}$$

Le titre de la solution du thiocyanate utilisée pour le dosage du chlorobutanol est à 0.098M.

- Détermination de la teneur en chlorobutanol (substance anhydre) dans le produit synthétisé :

Nous avons utilisé la formule de calcul préétablie pour le calcul de la teneur en chlorobutanol (substance anhydre) ;

Les résultats des 5 dosages effectués sont résumés dans le tableau dans le tableau XXIV ;

Nous avons calculé l'écart type σ et l'intervalle de confiance puis comparer chaque rendement à cet intervalle ; afin d'estimer la précision des différentes mesures effectuées.

Il faut, au moins, que 95% des teneurs trouvées dans les cinq essais (c'est-à-dire toutes les teneurs) ; soient comprises dans cet intervalle de confiance.

Tableau XXIV : Tableau des résultats du dosage du chlorobutanol.

Essai N°	Prise d'essai PE mg	Veq en thiocyanate de sodium (ml)	Teneur en clbh %	Teneur moyenne en clbh % (\bar{X})	Ecart type σ	Intervalle de confiance IC
01	100.53	11.6	84.96	85.15	2.57	[81.95 ; 88.34]
02	101.00	11.8	83.29			
03	99.80	11.2	88.21			
04	102.00	11.9	82.09			
05	99.20	11.4	87.2			

$$\bar{X} = \frac{\sum T}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{84.96 + 83.29 + 88.21 + 82.09 + 87.2}{5} = 85.15\%$$

$$\bar{X} = 85.15 \%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - T)^2}{n - 1}}$$

$$= \sqrt{\frac{(85.15 - 84.96)^2 + (85.15 - 83.29)^2 + (85.15 - 88.21)^2 + (85.15 - 82.09)^2 + (85.15 - 87.2)^2}{4}}$$

$$\sigma = 2.57 \%$$

$$IC = \bar{X} \pm t \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = 85.15 \pm 2.77 \times \frac{2.57}{\sqrt{5}} = 85.15 \pm 3.19$$

$$IC = [81.95 ; 88.34]$$

Avec :

-n : nombre d'essai = 5

- $t_{ddl; \frac{\alpha}{2}}$: Quantile de distribution de student pour ddl (degré de liberté) ; et α (la probabilité du risque attendu du contenu de l'intervalle de confiance)

-Dddl = n-1 = 5-1 = 4

- $\alpha = 5 \%$

-t = 2.77

Nous constatons que toutes les teneurs des cinq essais sont comprises dans l'intervalle de confiance qui est de [81.95 ; 88.34].

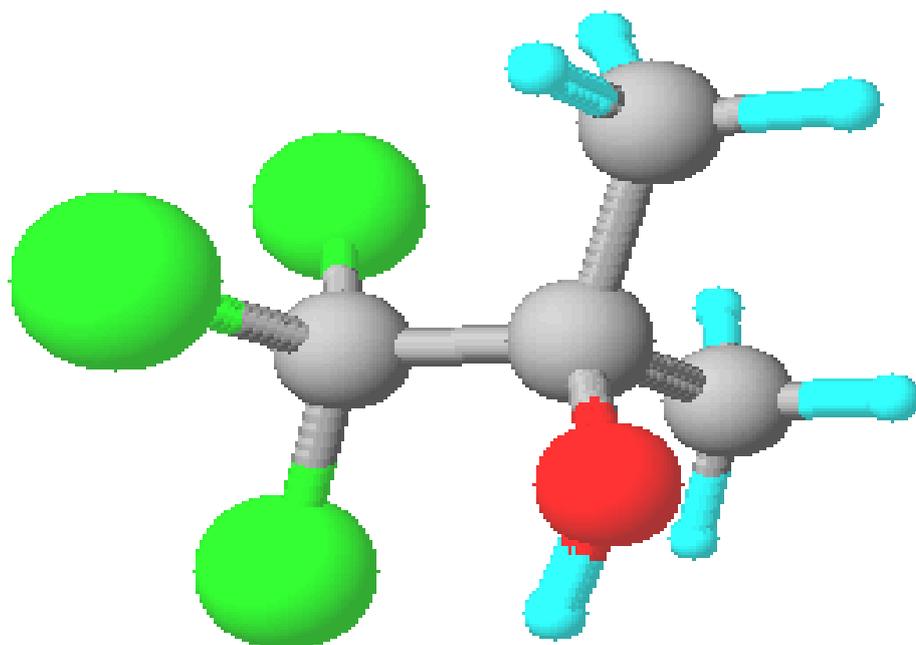
Selon la pharmacopée européenne la teneur en chlorobutanol (substance anhydre) doit être incluse dans l'intervalle de [98-100.5]. Notre produit est donc sous dosé, il faut insister sur l'étape de purification pour éliminer le maximum d'impuretés.

CHAPITRE II

EVALUATION DE L'ACTIVITE

ANTIMICROBIENNE DU

CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE



Le chlorobutanol synthétisé au niveau du laboratoire de chimie thérapeutique de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou est soumis aux tests bactériologiques au niveau du laboratoire de microbiologie de la même faculté, afin d'étudier son activité antimicrobienne. Pour cela nous avons utilisés des souches bactériennes de référence (ATCC= American type culture collection), et des levures et moisissures fournies par le la centre hospitalo-universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel utilisé

Tableau XXV : Matériel utilisé pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Matériels	Appareillages	Milieux de cultures
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spatule ▪ Verre à montre ▪ Tubes en verre stériles ▪ Pipettes pasteurs ▪ Anse de platine ▪ Embouts propres ▪ Portoirs ▪ Boîtes pétries 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Balance analytique KERN ABT 220-5DM ▪ Ultrason FISHER BRAND FB 15052 ▪ Agitateur vortex ZX³ VELP SCIENTIFICA ▪ Bec benzène ▪ Etuve MEMMERT ▪ Micropipette SMART 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bouillon glucosé tamponné BGT liquide ▪ Bouillons nutritifs BN liquide ▪ Gélose nutritive ▪ Gélose sabouraud sans antibiotiques

1.2. Méthodes

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté synthétisé par [77]:

- La méthode de macro-dilution sur milieu liquide pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).

1.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice**1.2.1.1. Les espèces microbiennes testées**

Nous avons testé l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté synthétisé sur les espèces microbiennes (tableau XXVI) préconisés par la pharmacopée européenne 8^{ème} édition (souches différentes) , pour l'évaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne des préparations pharmaceutiques [78].

Tableau XXVI : Les souches des micro-organismes testés

Règne	Espèces testées	Souches testées	Origine
Bactéries	Gram -	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25 922)	Souches de références American culture collection (ATCC)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27 853)	
	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25 923)	
Champignons	Levure	<i>Candida albicans</i>	Laboratoire de parasitologie du CHU de Tizi-Ouzou
	Moisissure	<i>Aspergillus niger</i>	

- **La mise en culture des souches :**

- a. **Activation des souches bactériennes de référence**

Effectuer des isolements en strie (méthode des quatre quadrants) directement à partir des lyophilisats des souches de référence sur les milieux sélectifs à chaque bactérie (Figure 40) :

- Milieu Chapman pour le *staphylococcus aureus*

- Milieu Hektoen pour le *pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*

- b. **Les souches fongiques**

Les souches fongiques testées sont des cultures de 15 jours fournies par le laboratoire de parasitologie du Centre hospitalo-universitaire de Tizi-Ouzou sur milieu gélosé en tube (Figure 40) :

- Milieu sabouraud-chloramphénicol-actidione pour le *candida albicans*

- Milieu sabouraud-chloramphénicol pour *aspergillus niger*.



Figure 40 : Les souches microbiennes utilisées dans le contrôle de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté synthétisé

1.2.1.2. Préparation de la gamme de dilution du chlorobutanol synthétisé

a. Préparation de la solution mère à 5000 µg/ml (0.5%)

Peser à l'aide d'une balance analytique 58.82 mg du chlorobutanol hémihydraté synthétisé qui correspond à 50mg de chlorobutanol pure (prise d'essai corrigée par rapport à la teneur en principe actif qui est de 85%), solubiliser aux ultra-sons dans 10 ml de bouillon glucosé tamponné ou du bouillon nutritif.

b. Préparation des diluions

- Effectuer des dilutions semi-logarithmiques de demi en demi du chlorobutanol hémihydraté synthétisé pour une gamme de concentration allant de 5000µg/ml jusqu'à 312.5µg/ml (XXVII)
- Préparer une gamme de dilution pour chaque souche testée à savoir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *candida albicans*, *aspergillus niger*
- Prévoir un tube témoin négatif et un tube témoin positif pour chaque série de dilution.

Tableau XXVII : Gamme de dilution du chlorobutanol

Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
[ClbH] %	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
[ClbH] en µg/ml	5000	2500	1250	625	312.5

[ClbH] : concentration du chlorobutanol hémihydraté.

1.2.1.3. Préparation de l'inoculum microbien

La suspension mère microbienne doit avoir une turbidité de 0.5Mac Farland ce qui correspond à 1.10^8 CFU/ml. Dans notre travail à défaut de densitomètre, nous avons estimé cette densité à 1 ou 2 colonies identiques et bien isolées qui causerait un léger trouble du bouillon, cette densité est appréciée par dénombrement des colonies formé après incubation des boîtes témoins (de contrôle).

a. Préparation de la suspension bactérienne

- A partir d'une culture jeune de 24heures et à l'aide d'une anse de platine, prélever une à deux colonies bactérienne bien isolées et identique ;
- Introduire les colonies prélevées dans environ 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de NaCl, homogénéiser au vortex et vérifier l'apparition d'un léger trouble ;
- Prélever 100 µl de l'inoculum bactérien, et l'introduire dans 9.9ml d'eau physiologique stérile pour avoir une dilution de $1/100^{\text{ème}}$.

b. Préparation de la suspension fongique

- A l'aide d'une anse stérile, prélever1 à 2 colonies fongiques ;
- immerger les colonies prélevées dans environ 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, homogénéiser et vérifier l'apparition d'un léger trouble ;
- Prélever 100 µl de l'inoculum fongique, et l'introduire dans 9.9 ml d'eau physiologique stérile ;

1.2.1.4. Distribution de l'inoculum microbien

- La distribution de l'inoculum doit se faire dans les 15 mn suivant sa préparation. Incorporer 100µl de suspension microbienne dans chaque tube de la gamme de dilution ;

- Procéder à partir de la plus faible concentration jusqu'à la concentration la plus élevée
- préparer un tube témoin positif ; en incorporant 100µl de l'inoculum dans un tube contenant 5ml de BGT sans chlorobutanol (Figure 41).
- Préparer une boîte témoin (boîte contrôle) en étalant à l'aide d'un râteau 100µl de chaque suspension sur une gélose nutritive pour les bactéries et sur un milieu Sabouraud sans antibiotique pour les levures et moisissures, ce contrôle nous permet de vérifier la pureté de chaque souche et d'estimer la densité microbienne (Figure 42).



Figure 41 : Distribution des inoculums microbiens



Figure 42 : Boîtes des contrôles

1.2.1.5. Incubation

- Incuber les bouillons ainsi que les témoins, dans des étuves programmées selon les conditions mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII : Les conditions d'incubation des micro-organismes testés

Micro-organisme	Température d'incubation	Durée d'incubation
<i>Escherichia coli</i>	37 °C	24 heures
<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C	24 heures
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37°C	24 heures
<i>Candida albicans</i>	37°C	48 heures
<i>Aspergillus niger</i>	25°C	48 heures

1.2.1.6. Lecture de la CMI

- La lecture de la CMI se fait visuellement, par l'observation de la présence ou de l'absence de trouble dans les bouillons incubés ;

- La valeur de la CMI correspond à la plus petite concentration de l'antimicrobien qui inhibe toute croissance bactérienne visible à l'œil nu, ce qui correspond à la concentration du premier tube clair dans la gamme de dilution.

- La valeur de la CMI caractérise l'effet bactériostatique et fongistatique d'un antimicrobien [17].

1.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB et de la concentration minimale fongicide CMF**1.2.2.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB**

La détermination de la CMB permet d'apprécier la nature de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté synthétisé (bactériostatique ou bactéricide).

- Pour chaque germe, transférer et étaler à l'aide d'un râteau 100 µl de chaque suspension dont la concentration est supérieure ou égale à la CMI, sur des boîtes de la gélose nutritive.

- Les boîtes sont incubées 24heures à 37°C.

1.2.2.2. Détermination de la concentration minimale fongicide CMF

- Pour chaque germe, transférer et étaler à l'aide d'un râteau, 100µl de chaque suspension dont la concentration est supérieure ou égale à la CMI sur gélose sabouraud sans antibiotique,
- Incuber les boites à 37 °C pour le *candida albicans* et à 25 °C pour *Aspergillus niger* pendant 48heures.

1.2.2.3. Lecture des CMB et CMF

La CMB et CMF correspondent aux plus petites concentrations en chlorobutanol, dont le nombre de colonies des survivants est inférieur ou égale à 0.01% de l'inoculum initial (comparées aux boites témoins) [17] .

La valeur de la CMB caractérise l'effet bactéricide ou fongicide de l'antimicrobien.

- Effet bactéricide ou fongicide : CMB/CMI = 4 ;
- Effet bactériostatique ou fongistatique : CMB/CMI = 8-16.

2. Résultats

2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

2.1.1. Les souches bactériennes

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices du chlorobutanol hémihydraté synthétisé pour les souches bactériennes (tableau XXIX), après une incubation de 24 heures à 37°C sont :

2.1.1.1. CMI d'*Escherichia coli*

Pour *Escherichia coli* nous avons observé un trouble dans le tube témoin positif, la dilution à 0.031% et la dilution à 0.062 % témoignant de la présence d'une poussée bactérienne. Cependant aucun trouble n'a été observé dans le tube témoin négatif, la dilution à 0.125%, la dilution à 0.25% et la dilution à 0.5% (figure 43).

La valeur de la CMI du chlorobutanol hémihydraté synthétisé sur la souche d'*Escherichia coli* (ATCC 25 922) testée est donc de 0.125%

$$CMI_{\text{Chlorobutanol -E.coli (ATCC 25 922)}} = 1250 \mu\text{g/ml}$$



Figure 43 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis d'*Escherichia coli*

2.1.1.2. La CMI du *Pseudomonas aeruginosa*

Pour *Pseudomonas aeruginosa* nous avons observé un trouble dans le tube témoin positif, la dilution à 0.031% et la dilution à 0.062 % témoignant de la présence d'une poussée bactérienne. Cependant, aucun trouble n'est observé dans le tube témoin négatif, la dilution à 0.125%, la dilution à 0.25% et la dilution à 0.5% (figure 44).

La valeur de la CMI du chlorobutanol hémihydraté synthétisé sur la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27 853) testée est donc de 0.125% :

$$\text{CMI}_{\text{Chlorobutanol-pseudomonas}} (\text{ATCC } 27 \text{ } 853) = 1250 \mu\text{g/ml}$$



Figure 44 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1.3. CMI de *Staphylococcus aureus*

Pour *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923) nous avons observé un trouble dans le tube témoin positif, la dilution à 0.031% et la dilution à 0.062 % témoignant de la présence d'une poussée bactérienne. Cependant, aucun trouble n'est observé dans le tube témoin négatif, la dilution à 0.125%, la dilution à 0.25% et la dilution à 0.5%. (Figure 45)

La valeur de la CMI du chlorobutanol hémihydraté synthétisé sur la souche de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) testée est de 0.125% :

$$CMI_{\text{chlorobutanol-staphylococcus(ATCC 25 923)}} = 1250 \mu\text{g/ml}$$



Figure 45 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*

2.1.2. Les souches fongiques

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices du chlorobutanol hémihydraté synthétisé, après une incubation de 48 heures à 37°C pour le *candida albicans* et de 48 heures à 25°C pour l'*aspergillus niger* sont (Tableau XXIX):

2.1.2.1. La CMI du *Candida albicans*

Pour le *Candida albicans*, nous avons observé un trouble dans : le tube témoin positif, la dilution à 0.031%, la dilution à 0.062 % et la dilution à 0.125% qui témoigne de la présence d'une poussée bactérienne. Cependant, aucun trouble n'est observé dans le tube témoin négatif, la dilution à 0.25% et la dilution à 0.5% (Figure 46).

La valeur de la CMI du chlorobutanol hémihydraté synthétisé sur la souche de *candida albicans* testée est donc de 0.25% :

$$CMI_{\text{Chlorobutanol-candida}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

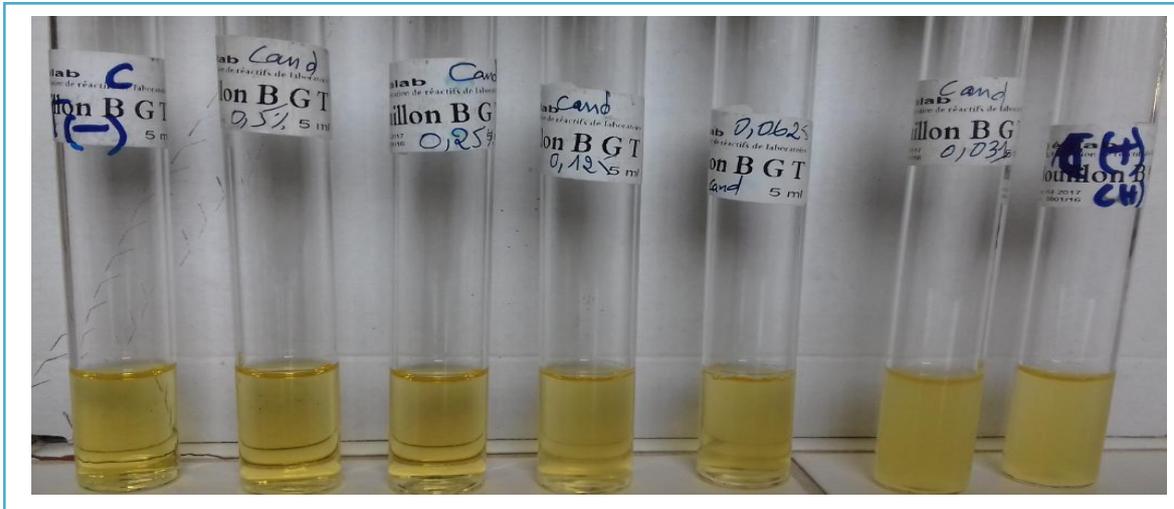


Figure 46 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis du *Candida albicans*

2.1.2.2. La CMI d'*Aspergillus niger*

Pour l'*Aspergillus niger*, nous avons observé un trouble dans : le tube témoin positif, la dilution à 0.031%, la dilution à 0.062 % et la dilution à 0.125% qui témoigne de la présence d'une poussée bactérienne. Cependant, aucun trouble n'est observé dans le tube témoin négatif, la dilution à 0.25% et la dilution à 0.5% (Figure 47)

La valeur de la CMI du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche d'*Aspergillus niger* testé est donc de 0.5% :

$$CMI_{\text{chlorobutanol-aspergillus}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

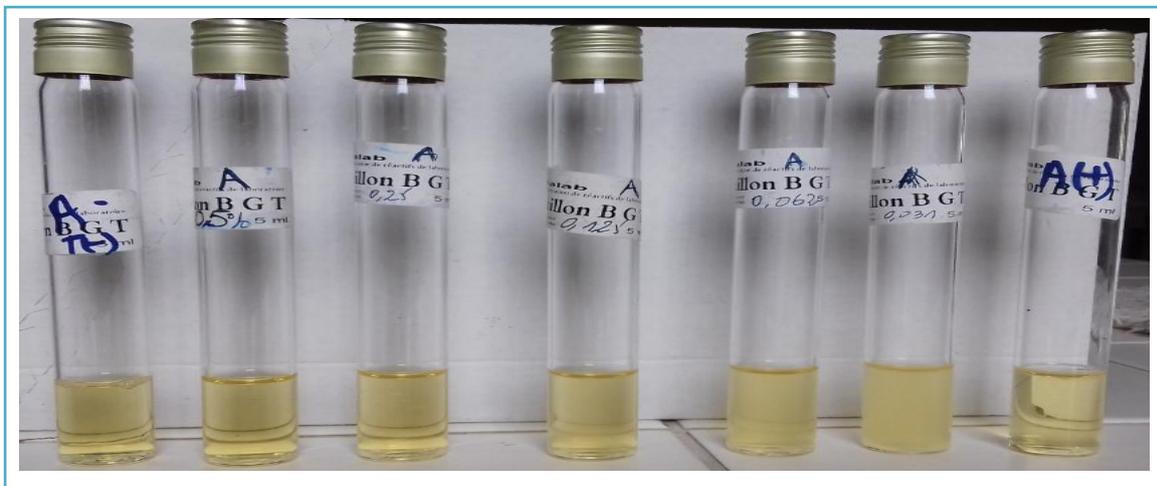


Figure 47 : Le résultat de la CMI du chlorobutanol vis-à-vis d'*Aspergillus niger*

Tableau XXIX : Tableau des résultats de la CMI des souches testées.

	312.5	625	1250	2500	5000
E.coli	+	+	- (CMI)	-	-
Pseudomonas aeruginosa	+	+	- (CMI)	-	-
Staphylococcus aureus	+	+	- (CMI)	-	-
Candida albicans	+	+	+	- (CMI)	-
Aspergillus niger	+	+	+	- (CMI)	-

2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB et de la concentration minimale fongicide CMF

2.2.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide

2.2.1.1. La CMB d'*Escherichia coli*

Pour *Escherichia coli*, nous avons observé des colonies isolées et uniformes sur la boîte témoin, aussi une présence de colonies de survivants supérieur à 0.01% dans la boîte qui correspond à la dilution 0.125%, et une absence de colonies dans les boîtes qui correspondent aux dilutions 0.25% et 0.5% (Figure 48).

La valeur de la CMB du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche d'*Escherichia coli* testée est de :

$$CMB_{\text{chlorobutanol-E.coli}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

$$CMB/CMI = 2500/1250 = 2$$

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé possède une activité bactéricide vis-à-vis de la souche d'*Escherichia coli* testée.

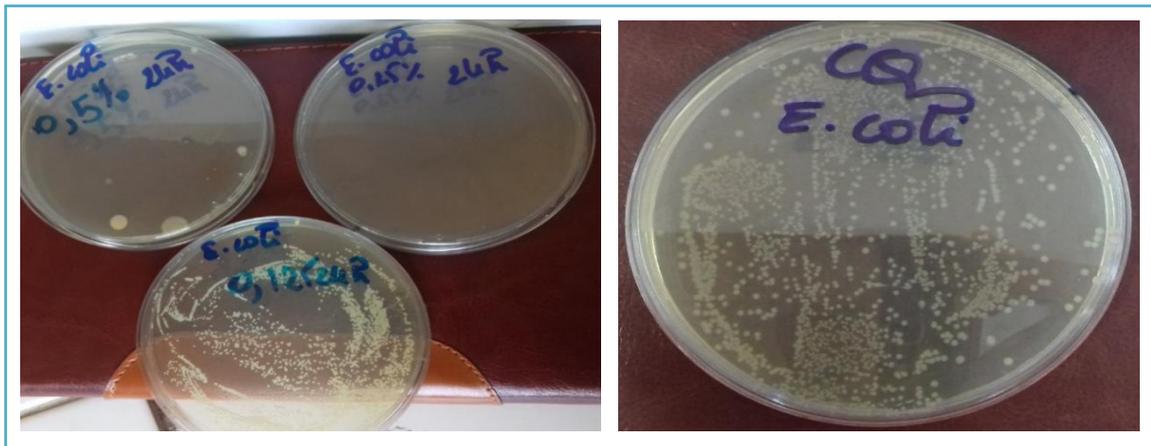


Figure 48 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis d'*Escherichia coli*

2.2.1.2. La CMB du *Pseudomonas aeruginosa*

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, nous avons observé des colonies isolées et uniformes sur la boîte témoin, ainsi une présence de colonies de survivants supérieur à 0.01% dans la boîte qui correspond à la dilution 0.125%, et une absence de colonies dans les boîtes qui correspondent aux dilutions 0.25% et 0.5%. (Figure 49).

la valeur de la CMB du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* testée est de :

$$\text{CMB}_{\text{chlorobutanol-Pseudomonas}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{CMB/CMI} = 2500/1250 = 2$$

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé possède une activité bactéricide vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* testée.



Figure 49 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis du *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.1.3. La CMB du *Staphylococcus aureus*

Pour le *Staphylococcus aureus*, nous avons observé des colonies isolées et uniformes sur la boîte témoin, aussi une présence de colonies de survivants supérieur à 0.01% dans la boîte qui correspond à la dilution 0.125%, et la dilution de 0.25%, et une absence de colonies dans la boîte qui correspond à la dilution 0.5%. (Figure 50).

La valeur de la CMB du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche de *Staphylococcus aureus* testée est de 0.125% :

$$\text{CMB}_{\text{chlorobutanol-staphylococcus}} = 5000 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{CMB/CMI} = 5000/1250 = 4$$

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé possède une activité bactéricide vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* testée.



Figure 50 : La valeur de la CMB du chlorobutanol vis-à-vis de *staphylococcus aureus*

2.2.2. Détermination de la concentration minimale fongicide

2.2.2.1. CMF du *Candida albicans*

Pour le *Candida albicans*, nous avons observé des colonies isolées et uniformes sur la boîte témoin, mais absence de colonies de survivants dans la boîte qui correspond à la dilution 0.25% et à la dilution 0.5%. (Figure 51)

La valeur de la CMF du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche de *candida albicans* testée est donc de 0.25%

$$CMF_{\text{chlorobutanol-candida}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

$$CMF/CMI = 2500/2500 = 1$$

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé possède une activité fongicide vis-à-vis de la souche de *candida albicans* testée.



Figure 51 : La valeur de la CMF du chlorobutanol vis-à-vis du *candida albicans*

2.2.2.2. CMF d'*Aspergillus niger*

Pour l'*Aspergillus niger*, nous avons observé des colonies isolées et uniformes sur la boîte témoin, mais absence de colonies de survivants dans la boîte qui correspond à la dilution 0.25% et la dilution 0.5%. (Figure 52)

La valeur de la CMF du chlorobutanol hémihydraté synthétisé vis-à-vis de la souche d'*aspergillus niger* testée est donc de 0.25% :

$$CMF_{\text{Chlorobutanol-aspergillus}} = 2500 \mu\text{g/ml}$$

$$CMF/CMI = 2500/2500 = 1$$

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé possède une activité fongicide vis-à-vis de la souche d'*aspergillus niger* testée.

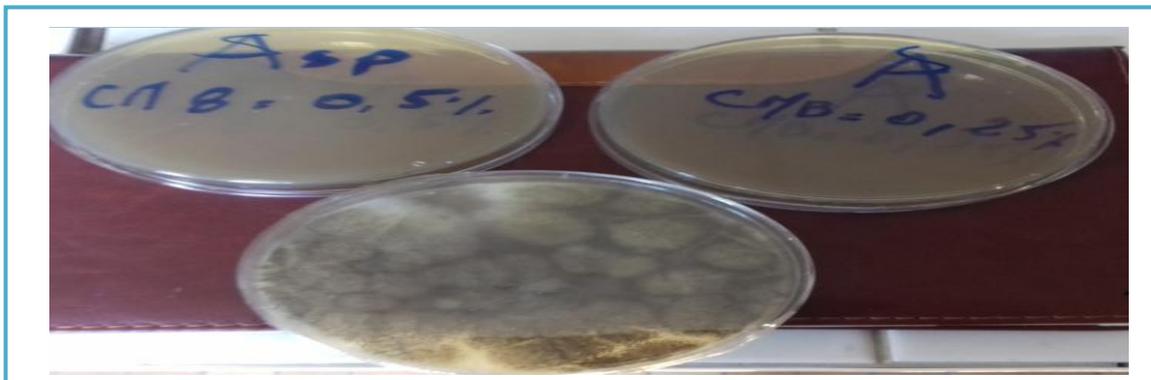


Figure 52 : Les résultats de la CMF du chlorobutanol vis-à-vis de l'*aspergillus niger*

Tableau XXX : Les résultats des CMB et CMF des souches testées

Les souches testées	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Candida albicans	Aspergillus niger
Les CMBs et CMF du chlorobutanol en µg/ml	2500	2500	5000	2500	2500
CMB/CMI	2	2	4	1	1

3. Discussion

L'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté était variable d'une souche testée à une autre[59].

- La CMI du chlorobutanol synthétisé sur la souche de *Staphylococcus aureus* testée est proche de celle citée dans la littérature concernant les CMI du chlorobutanol sur les gram+ (650µg/ml).

- La CMI du chlorobutanol synthétisé sur les souches *E.Coli* et *Pseudomonas aeruginosa* testées rejoint celle trouvée dans la littérature concernant les CMI du chlorobutanol sur les gram- (1000µg/ml).

- La CMI du chlorobutanol synthétisé sur le *Candida albicans* testée rejoint celle donnée dans la littérature concernant les CMI du chlorobutanol sur les levures (2500µg/ml).

- La CMI du chlorobutanol synthétisé sur l'*Aspergillus niger* testée est inférieure à celle trouvée dans la littérature pour les CMI du chlorobutanol sur les moisissures (5000 µg/ml).

Le chlorobutanol hémihydraté synthétisé a donc montré un important effet inhibiteur sur les bactéries, et un effet inhibiteur moins prononcé sur les champignons. Cette inhibition est observée à des concentrations allant de 1250 µg/ml à 2500 µg/ml.

Cette différence de sensibilité entre les bactéries et les champignons, peut être due à la différence de la composition de la paroi bactérienne et fongique qui est la cible principale du chlorobutanol.

- Nos résultats des concentrations minimales bactéricides ont montré un effet bactéricide du chlorobutanol synthétisé, à des concentrations de 2500-5000µg/ml, sachant que la littérature a classifié l'effet antibactérien comme bactériostatique plus que bactéricide[59].

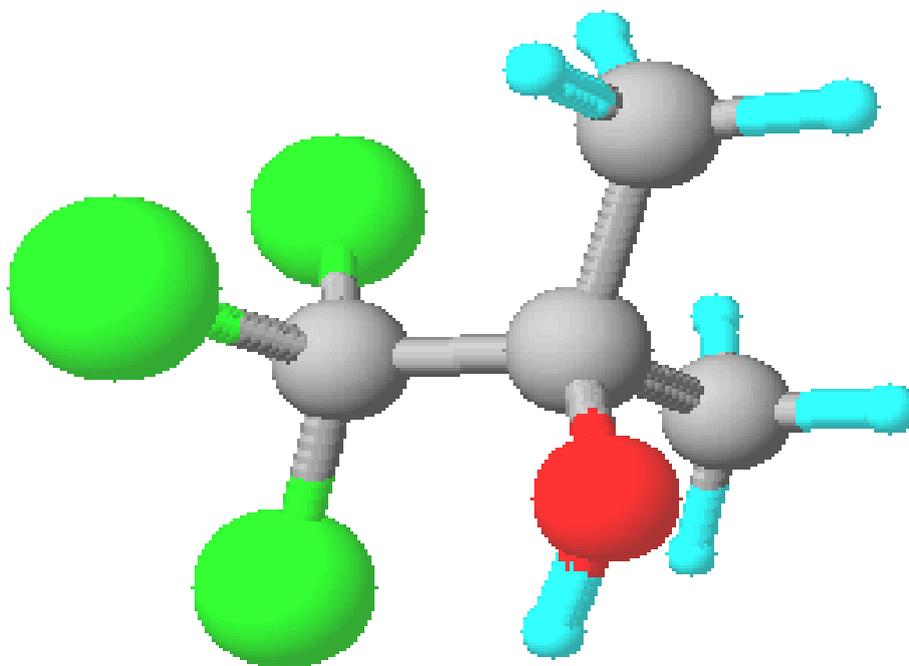
- Les concentrations minimales fongicides obtenues ont montré un effet fongicide du chlorobutanol synthétisé, à une concentration de 2500µg/ml.

4. Limites de l'étude

Les principales causes qui peuvent limiter nos résultats sont :

- L'indisponibilité des souches de référence fongiques ;
- L'imprécision de la densité de l'inoculum microbien préparé par la méthode visuelle (à défaut de densitomètre) ;
- L'éventuelle présence de substances apparentées dans notre produit synthétisé, qui possède un effet antimicrobien notamment le phénoxyéthanol qui peut donner un effet synergique avec l'activité du chlorobutanol[79].
- Nous avons adapté une technique dédiée aux antibiotiques pour la détermination des CMI et CMB.

Conclusion



CONCLUSION

Le chlorobutanol synthétisé selon la réaction d'addition nucléophile du chloroforme sur l'acétone était obtenu avec un rendement acceptable. Les tests de caractérisation du produit obtenu ont montré un aspect blanc et cristallin (confirmé par l'examen au microscope électronique à balayage), des solubilités (dans l'eau, éthanol et glycérol), et une température de fusion (78°C), conformes aux exigences de la pharmacopée européenne.

Les réactions colorimétriques ont orienté vers la présence d'un carbone trihalogéné et d'une fonction alcool. L'identification spectrale (IR, l'UV-Visible) a montré la présence des pics caractéristiques au chlorobutanol et confirmé la structure de ce dernier.

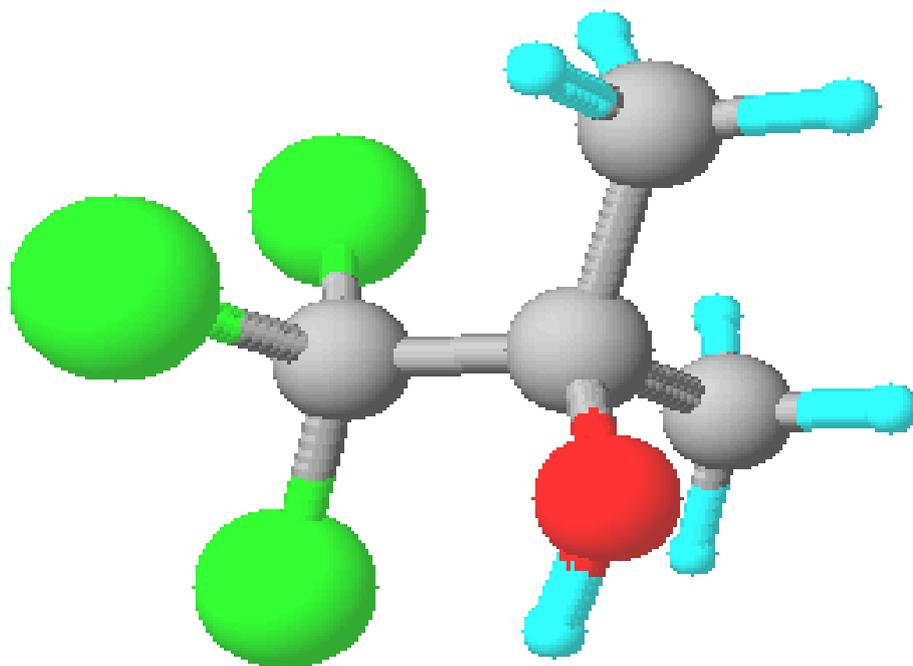
Le degré de coloration, l'opalescence et le taux d'acidité de solution du chlorobutanol sont conformes aux exigences de la pharmacopée européenne, par contre la teneur en eau est 5.7 % légèrement supérieure à la norme exigée, tandis que la teneur en chlorobutanol (de 85 %) est inférieure à l'intervalle fixé par la pharmacopée européenne.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol a révélé un effet antimicrobien sur l'ensemble des souches testées (*Sataphylococcus aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*) avec des valeurs de CMI proches des données de la littérature.

En perspective nous souhaitons :

- Améliorer le procédé de synthèse et proposer des techniques fiables pour la purification du chlorobutanol ;
- Tester l'activité antimicrobienne sur des souches fongiques de référence et des souches bactériennes autres que celles testées ;
- Synthétiser le chlorobutanol anhydre, et comparer ces résultats aux résultats du présent travail.

BIBLIOGRAPHIE



- [1] la loi n° 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé. Titre V, Chapitre I: Dispositions générales. Article 170.
- [2] JACQUE DANGOUMAN. PHARMACOLOGIE GENERALE. 2006^e éd. université Victor Segalen- Bordeaux 2: Département de pharmacologie;
- [3] Jean-marc aiache, Eric beyssac, Jean michel cardot, Valerie hoffart, Robert renoux,.. Initiation à la connaissance du médicament. 5^{ème} édition. MASSON;
- [4] Nicklin J, Graeme-cook K, Paget T, Killington R. L'essentiel en microbiologie. BERTI. PARIS;
- [5] Paul singleton traduit de l'anglais par Jean Dusart. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6^{ème} édition. DUNOD; 2012.
- [6] Fernandez X, Merck F, Kerdudo A. conservateurs pour cosmétiques- Généralités et conservateurs antimicrobiens. formulation. Technique de l'ingénieur. 2012;
- [7] Denis WOUESSI DJEWE. Formes galénique administrées par voies parentérales. 2011.
- [8] Berthélémy S. Préparations ophtalmiques et conseils d'utilisation. Actual. Pharm. 2009;48:22–23.
- [9] 5.1.4. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES PRÉPARATIONS PHARMACEUTIQUES. PHARMACOPÉE Eur. 6.0. p. 566-567.
- [10] Jessica Bile. Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés. [Ecole doctorat de chimie]: Université Claude Bernard-Lyon I; 2014.
- [11] Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens [Internet]. [cité 29 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/cosmetiques-42634210/conservateurs-pour-cosmetiques-j2284/>
- [12] Meyer BK, Ni A, Hu B, Shi L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present. J. Pharm. Sci. 2007;96:3155-67.
- [13] Conseil Supérieur d'Hygiène. Recommandations en matière de techniques de stérilisation,.. 1993;
- [14] Giménez-Arnau E. À la recherche d'un conservateur idéal : la nature versus les molécules de synthèse ? Le point de vue du chimiste. Rev. Fr. Allergol. 2015;55:210-1.
- [15] Vaede D, Baudouin C, Warnet J-M, Brignole-Baudouin F. Les conservateurs des collyres : vers une prise de conscience de leur toxicité. J. Fr. Ophtalmol. 2010;33:505-24.
- [16] Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2002;53:263–280.

- [17] Muylaert A, Mainil J. Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann Méd Vét.* 2012;156:109–123.
- [18] Martini M-C. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Lavoisier; 2011.
- [19] Debbasch C, Brignole F, Pisella P-J, Warnet J-M, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42:642–652.
- [20] Alexandre Marques. Phtalates et parabenes dans les médicaments : impact pour l'industrie pharmaceutique d'une évolution de la réglementation visant à les interdire. [U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES]: Université de Bordeaux; 2015.
- [21] Deeb EN, Boenigk JW. Preservative action of combined bacteriostatic agents I. Preservative action of chlorobutanol in combinations with certain other bacteriostatic agents. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1958;47:807–809.
- [22] Marie Grosman, Professeur agrégé en Sciences de la Vie et de la Terre. Dr Jean Jacques Melet. Le mercure des amalgames dentaires : Quels risques pour la santé et l'environnement ?
- [23] Fleurette J, Freney J, Reverdy ME. Antiseptique et désinfection. Paris. ESKA; 1995.
- [24] Chlorobutanol - Définition - Santé-Médecine [Internet]. [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: <http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/faq/45188-chlorobutanol-definition>
- [25] Pubchem. C₄H₇Cl₃O.₁/2H₂O | C₄H₁₁Cl₃O₂ - PubChem [Internet]. [cité 11 déc 2016]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102594540>
- [26] Pubchem. Chlorobutanol | C₄H₇Cl₃O - PubChem [Internet]. [cité 11 déc 2016]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorobutanol>
- [27] PHARMACOPEE EUROPEENNE 2008.
- [28] Chlorobutanol - Drugs.com [Internet]. [cité 12 déc 2016]. Disponible sur: <https://www.drugs.com/international/chlorobutanol.html>
- [29] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J, éditeurs. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Fourth edition. London ; Chicago: Pharmaceutical Press; 2011.
- [30] AIST:Spectral Database for Organic Compounds,SDBS [Internet]. [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- [31] synthesis on 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol. [Internet]. [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <https://eroxid.org/archive/rhodium/chemistry/chlorobutanol.TXT>
- [32] M.Saljoughian, A.Raisi, E.Alipour et al. An improved synthesis of 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol. *Monast. Chim. Mon.* p. 813-6.
- [33] Ho C-K, Wang T-C. Synthesis of Chlorobutanol. *J. Chin. Chem. Soc.* 1959;6:80-3.
- [34] Wynter WE. THE USES OF CHLORETONE. *The Lancet.* 1929;214:1245–1246.

- [35] TOXNET [Internet]. [cité 11 déc 2016]. Disponible sur: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+57-15-8>
- [36] Keay JH, Wood G. THE NATIONAL INSURANCE BILL. *The Lancet*. 1911;178:188.
- [37] Brødbaek HBO, Damkier P. [The treatment of hyperemesis gravidarum with chlorobutanol-caffeine rectal suppositories in Denmark: practice and evidence]. *Ugeskr. Laeger*. 2007;169:2122-3.
- [38] Taub A, Luckey WH. Chlorobutanol in parenteral solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1943;32:28-31.
- [39] Meriem NEBBALI. synthèse, caractérisation et effet antibactérien du chlorobutanol hémihydraté. Département de pharmacie, faculté de médecine de l'université Badji Moukhtar, Annaba.;
- [40] Mager J, Avi-Dor Y. Studies on the mechanism of the inhibitory action of chloretone on the respiration of washed particle preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 1956;62:40-54.
- [41] Annibal.P.Campello, Carlos.M.Vianna et all. The effect of chlorobutanol on the respiratory metabolism and the normal proteins isolated mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* p. 211-23.
- [42] Kracke G, Landrum A. Chlorobutanol, a Pharmaceutical Preservative and Sedative Hypnotic, Inhibits Brain Type Voltage Gated Sodium Channels. *Biophys. J.* 2011;100:421a.
- [43] V.J.Wulf and J.Fahy. The Latent Period of the Limbus Lateral eye Receptor potential : Action of chlorobutanol. *Brain Reserch Bull.* 1977. p. 197-202.
- [44] Effects of chlorobutanol on primary and secondary endings of isolated cat muscle spindles [Internet]. [cité 12 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899399023252>
- [45] Rowe LW. The antispasmodic action of chloretone. *J. Pharm. Sci.* 1924;13:22–27.
- [46] Habara Y, Kanno T. Dual effects of chlorobutanol on secretory response and intracellular Ca²⁺ dynamics in isolated pancreatic acini of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1993;109:685-92.
- [47] Hermsmeyer K, Aprigliano O. Effects of chlorobutanol and bradykinin on myocardial excitation. *Am. J. Physiol.* 1976;230:306-10.
- [48] Sequeira SJ, McKenna TJ. Chlorbutol, a new inhibitor of aldosterone biosynthesis identified during examination of heparin effect on aldosterone production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986;63:780-4.
- [49] Chen SL, Yang WC, Huang TP, Wann SA, Teng CM. Chlorobutanol, a preservative of desmopressin, inhibits human platelet aggregation and release in vitro. *Thromb. Haemost.* 1990;64:473-7.

- [50] Brun P-M, Querellou E, Leyral J, Barberis C, Levy D, Puidupin A. Intoxication médicamenteuse volontaire à l'Alodont® : à propos d'un cas. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation*. 2010;29:741-2.
- [51] Vaede D, Baudouin C, Warnet J-M, Brignole-Baudouin F. Les conservateurs des collyres : vers une prise de conscience de leur toxicité. *J. Fr. Ophtalmol*. 2010;33:505-24.
- [52] Tu EY. Balancing antimicrobial efficacy and toxicity of currently available topical ophthalmic preservatives. *Saudi J. Ophthalmol*. 2014;28:182-7.
- [53] Compositions antiseptiques a base de chlorobutanol et de chlorhexidine [Internet]. [cité 15 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/EP0884948A1>
- [54] Meyer BK, Ni A, Hu B, Shi L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present. *J. Pharm. Sci*. 2007;96:3155-67.
- [55] Tung C, Graham GG, Wade DN, Williams KM. The pharmacokinetics of chlorbutol in man. *Biopharm. Drug Dispos*. 1982;3:371-8.
- [56] Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2002;53:263-280.
- [57] Smoak IW, Amiss TJ. Chlorobutanol: maternal serum levels and placental transfer in the mouse. *Vet. Hum. Toxicol*. 1997;39:287-90.
- [58] Smoak IW. Embryotoxic effects of chlorobutanol in cultured mouse embryos. *Teratology*. 1993;47:203-8.
- [59] Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, American Pharmacists Association, éditeurs. *Handbook of pharmaceutical excipients* /: edited by Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Siân C. Owen. 5th ed. London ; Greyslake, IL : Washington, DC: Pharmaceutical Press ; American Pharmacists Association; 2006.
- [60] Borody T, Chinwah PM, Graham GG, Wade DN, Williams KM. Chlorbutol toxicity and dependence. *Med. J. Aust*. 1979;1:288.
- [61] Valentour JC, Sunshine I. Chlorobutanol poisoning. Report of a fatal case. *Z. Rechtsmed*. 1975;77:61-3.
- [62] Nordt SP. Chlorobutanol toxicity. *Ann. Pharmacother*. 1996;30:1179-80.
- [63] J.M.Malinovsky, J.M.Mussini, C de Dieulveut et al. NEUROTOXICITE DE LA KETAMINE ET DU CHLOROBUTANOL INJECTES PAR VOIE INTATHECALE CHEZ LE LAPIN. Laboratoire d'anatomo-Pathologie, Faculté de Medecine de l'université de Nantes.; :R12.
- [64] Dux S, Pitlik S, Perry G, Rosenfeld JB. Hypersensitivity reaction to chlorbutol-preserved heparin. *Lancet Lond. Engl*. 1981;1:149.
- [65] Itabashi A, Katayama S, Yamaji T. Hypersensitivity to chlorobutanol in DDAVP solution. *Lancet Lond. Engl*. 1982;1:108.

- [66] Hofmann H, Goerz G, Plewig G. Anaphylactic shock from chlorobutanol-preserved oxytocin. *Contact Dermatitis*. 1986;15:241.
- [67] Bowler GR, Galloway D, Meiklejohn B, Macintyre CA. Sharp fall in blood pressure after injection of heparin containing chlorbutol. *The Lancet*. 1986;327:848–849.
- [68] Nair AD, Lach JL. The kinetics of degradation of chlorobutanol. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1959;48:390–395.
- [69] Damodaran Nair A, Lach JL. The Kinetics of Degradation of Chlorobutanol**State University of Iowa, College of Pharmacy, Iowa City. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1959;48:390-5.
- [70] Rehm CR, Mader WJ. A Colorimetric Assay for Chlorobutanol**Research Department, Cida Pharmaceutical Products Inc., Summit, N. J. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1957;46:621-3.
- [71] Dunn DL, Jones WJ, Dorsey ED. Analysis of chlorobutanol in ophthalmic ointments and aqueous solutions by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 1983;72:277-80.
- [72] Chafetz L, Mahoney RW. Colorimetric Determination of Chlorobutanol in Injections Via the Fujiwara Reaction. *J. Pharm. Sci.* 1965;54:1805-6.
- [73] Amiss TJ, Smoak IW. Determination of chlorobutanol in mouse serum, urine and embryos by capillary gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995;673:59-66.
- [74] Koshy KT, Conwell RC, Duvall RN. Determination of Chlorobutanol in Pharmaceuticals by Gas Chromatography. *J. Pharm. Sci.* 1967;56:269-71.
- [75] Badawi HM. A study of the molecular structure and vibrational spectra of 1,3-dichloro-2-propanol and 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol (chlorobutanol). *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012;87:11-4.
- [76] SDBS. Chlorobutanol: Database For Organic Compounds 2017. SDBS-NO = 1479 [Internet]. Disponible sur: http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi
- [77] standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6^{ème} édition. document édité avec collaboration de l'OMS; 2011.
- [78] Conseil de l'Europe. Pharmacopée européenne. 8^{ème} édition.
- [79] agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Evaluation du risque lié à l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques. 2012.
- [80] Evaporateur rotatif [Internet]. [cité 17 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.lachimie.fr/materiel/evaporateur.php>
- [81] C.Graullière, S.Molon-Noblot. la microscopie électronique à balayage: principe et application. centre de recherche MSD-Chibret; 1989.

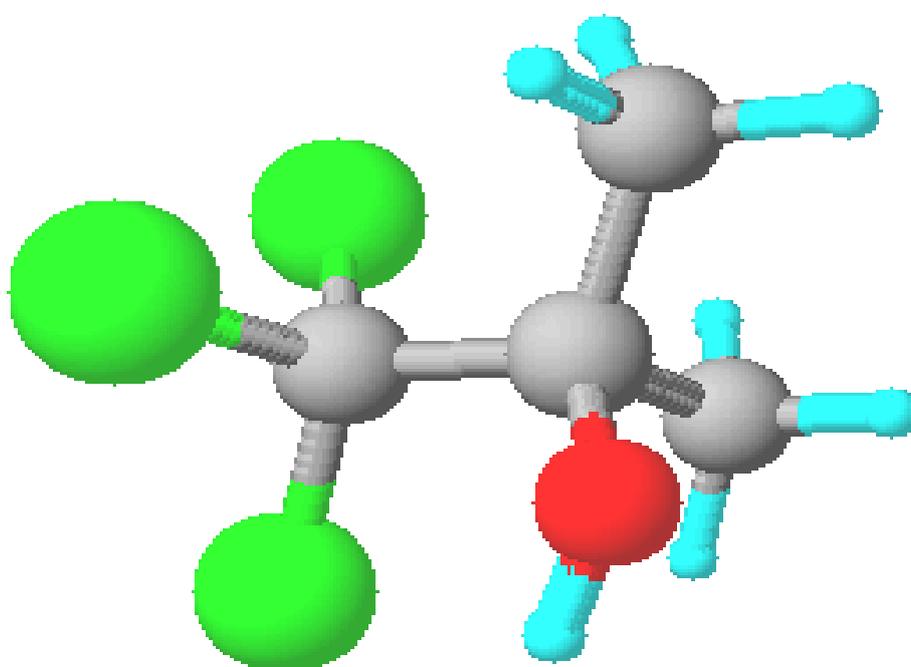
[82] Wiki des techniques - Mesure du point de fusion [Internet]. [cité 1 juin 2017]. Disponible sur: <https://wiki-des-techniques.wikispaces.com/Mesure+du+point+de+fusion>

[83] Principe de Analyse de l'eau (Karl Fisher) | UJF - Grenoble I - La Plateforme de Chimie Analytique [Internet]. [cité 17 juin 2017]. Disponible sur: <https://pca.ujf-grenoble.fr/techniques-d-analyses/analyse-l-eau>

[84] Francis Rouessac, Annick Rouessac avec collaboration de Daniel cruché. ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6^{ème} édition. DUNOD;

[85] Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybensoic acid (parabènes). Food and Chemical Toxicology. 2005; 43(7): 985-1015.

ANNEXES

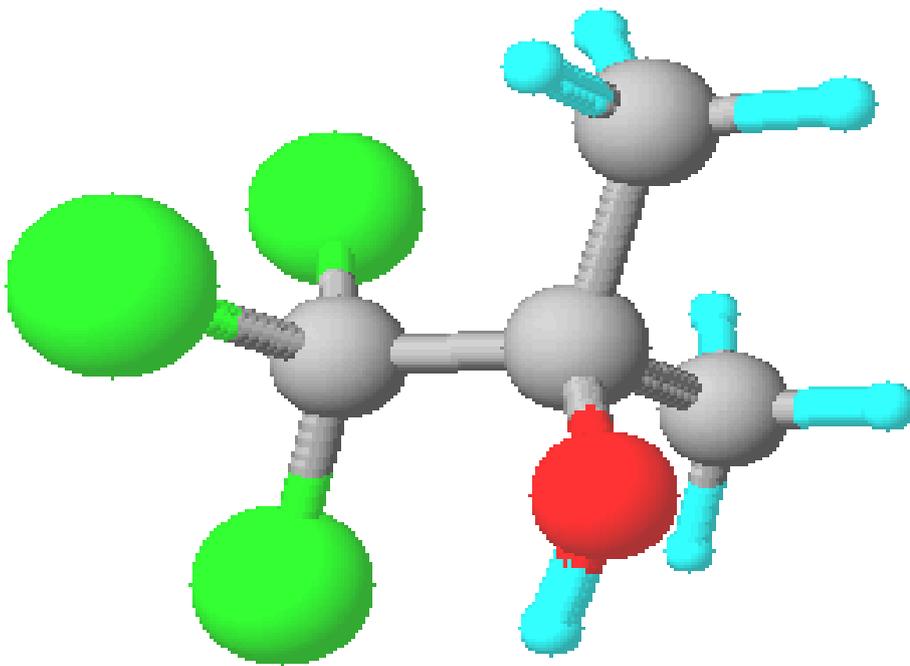


ANNEXES

LISTE DES ANNEXES	
ANNEXE I	Principes des techniques utilisées
ANNEXE II	Méthodes analytiques de dosage du chlorobutanol
ANNEXE III	Réactifs utilisés
ANNEXE IV	Pictogrammes de sécurité
ANNEXE V	Procédure d'analyse physico-chimique du chlorobutanol hémihydraté
ANNEXE VI	Monographie du chlorobutanol : pharmacopée européenne 8 ^{ème} édition
ANNEXE VII	Milieux de culture utilisée en microbiologie
ANNEXE VIII	Efficacité de la conservation antimicrobienne (Pharmacopée européenne 8 ^{ème} édition)
ANNEXE IX	Liste des médicaments contenant le chlorobutanol

ANNEXE I

PRINCIPES DES TECHNIQUES UTILISEES



1. Le Rotavapeur

Le principe de cet appareil est basé sur une distillation simple sous vide, qui permet d'éliminer rapidement de grandes quantités de solvant dans lequel se trouve un soluté qui, une fois le solvant évacué, pourra se présenter sous forme liquide ou solide.

- Pour ne pas perdre trop de produit, il faut que le solvant et le liquide qu'on veut récupérer aient des températures d'ébullition très différentes.
- Pour ne pas risquer de détruire le produit intéressant par un chauffage trop important, on opère avec un chauffage léger et sous aspiration : la baisse de pression permet d'abaisser la température d'ébullition du solvant[80].

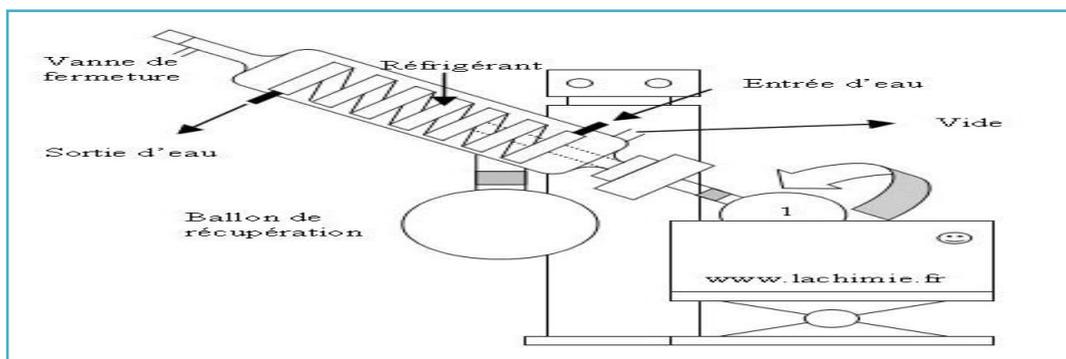


Figure 53 : Schéma du Rotavapeur

2. Microscopie électronique à balayage

Une sonde électronique fine (faisceau d'électrons) est projetée sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée(Figure 54)[81].

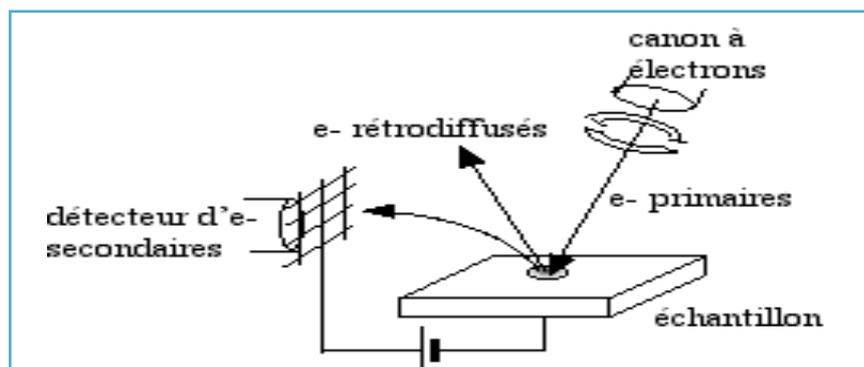


Figure 54 : Schéma de principe de l'arrivée des électrons sur l'échantillon dans un MEB

3. Point de fusion

Le point de fusion ou la température de fusion d'un corps représente la température à laquelle un élément pur ou un composé chimique fond c'est-à-dire passe de l'état solide à l'état liquide. Il existe principalement deux types d'appareils qui permettent la mesure de la température de fusion : l'appareil chauffant (Banc kofler) et l'appareil capillaire.

3.1. Principe de l'appareil capillaire.

Le principe de fonctionnement de cet appareil est basé sur le fait que, à l'état cristallin, les substances réfléchissent la lumière reçue, alors qu'elles la laissent passer à l'état fondu. Il est alors possible de déterminer le point de fusion à partir du comportement optique. Ainsi au cours de la fusion, l'intensité lumineuse mesurée par une cellule photoélectrique augmente et le chauffage est arrêté lorsque la transparence de l'échantillon atteint un seuil donné (Figure55). A cet instant, la température du four est retenue, corrigée et affichée comme la température de fusion réelle [82].

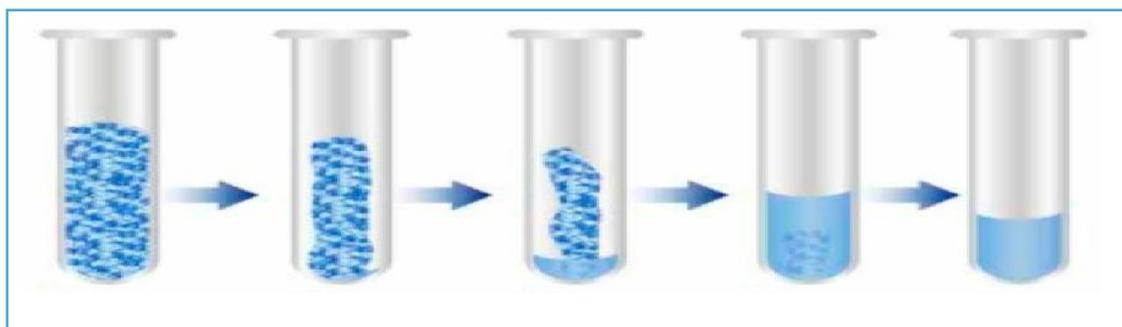


Figure 55 : Les différentes étapes de changements d'une substance pendant le cycle de chauffage

4. Karl Fisher

La méthode de Karl Fisher est Basée sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode dans une solution d'hydroxyde de méthane (méthanol et une base de type RN). En principe, la réaction produite est :



La solution Karl Fisher utilisée est un mélange d'iode, dioxyde de soufre et imidazole, dissout dans diéthylèneglycol monoéthyl éther.

Le titrage peut être réalisé par volumétrie ou par colorimétrie (Figure 56).

- Dans la méthode volumétrique, une solution Karl Fisher contenant de l'iode est ajoutée jusqu'à saturation. La quantité d'iode convertie est déterminée à partir du volume de

la burette contenant la solution iodée Karl Fisher. Des électrodes en platine, permettent la détection du point d'équivalence (brusque variation de tension aux bornes des électrodes).

- Dans le protocole coulométrique ; l'iode participant à la réaction est générée directement dans la cellule de titrage par une oxydation électrochimique de l'iodure jusqu'à ce que de l'iode non réactive soit détectée[83].

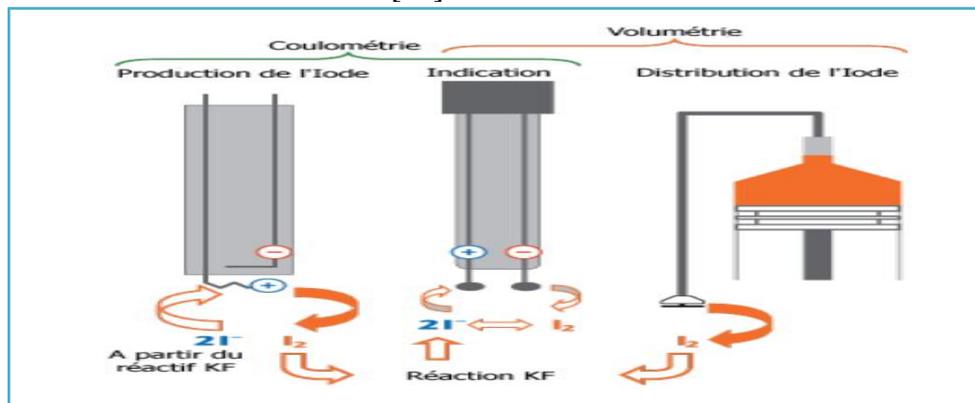


Figure 56 : Schéma comparatif des 2 méthodes de dosage de l'eau par Karl Fisher

5. Spectroscopie UV-VISIBLE

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées proche UV (185-400 nm), visible (400-700 nm) et très proche infrarouge (700-1 100 nm).

5.1. Principe

Une transition UV-visible correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante. La matière absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et s'excite (Figure 57). Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance en fonction des longueurs d'onde repérées en abscisses[84].

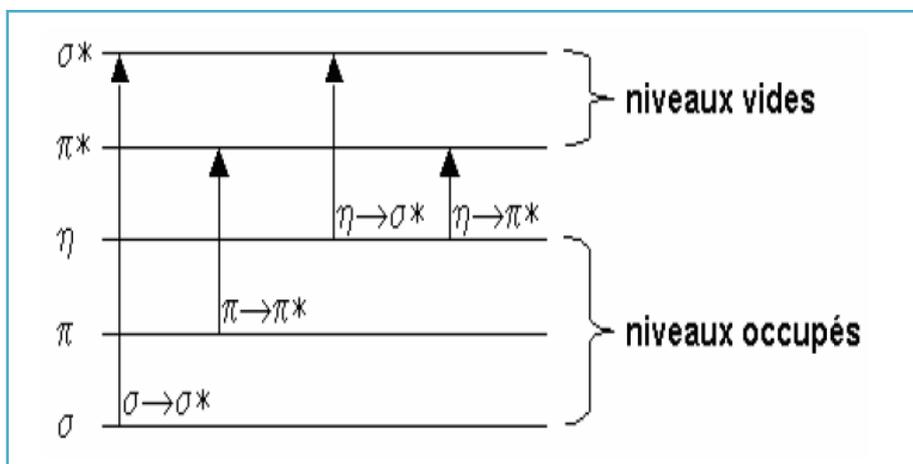


Figure 57 : Les différents types de transition électronique

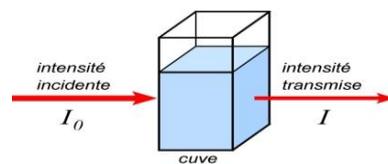
5.2. Loi de BEER- LAMBER

L'absorption de la lumière est directement proportionnelle à la fois à la concentration du milieu absorbant et à l'épaisseur de la cuve où se trouve le milieu.

-La transmittance (T) est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur.

T est exprimé par un nombre fractionnaire ou sous forme de pourcentage :

$$T = I/I_0 \text{ ou } T\% = I/I_0 \times 100$$



L'absorbance est la grandeur définie par : $A = \epsilon \cdot l \cdot C = \log I_0/I = -\log T$

A : absorbance

l : longueur de la cuve traversé (cm)

C : concentration (mole.litre⁻¹)

ϵ : coefficient d'absorption molaire (mole⁻¹.cm⁻¹ .litre)

6. La spectroscopie infrarouge

Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories : le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1})

La spectrométrie infrarouge est principalement utilisée pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements).

La majorité des applications se situe entre 2,5 et 15 μm soit en nombre d'ondes de 4000 cm^{-1} à 670 cm^{-1} (IR moyen) [84].

6.1. Principe

La spectrométrie infrarouge est la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Ce rayonnement dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs.

6.2. Modes de vibrations moléculaires

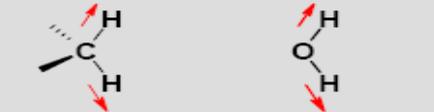
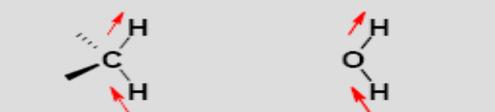
L'absorption du rayonnement IR par les composés organiques correspond à deux types principaux de vibrations :

- vibration de valence ou d'élongation
- vibration de déformation angulaire

6.2.1. Vibration de valence ou d'élongation :

Une vibration de valence (d'allongement ou d'élongation) est un mouvement des atomes le long de l'axe de la liaison. Ce mouvement implique une variation de la distance interatomique. Elles sont représentées par « ν ».

Ces vibrations se situent dans la région du spectre allant de 4000 à 1000 cm^{-1} .

Vibrations de valence (stretching)	
Symétrique (ν_s)	Asymétrique (ν_{as})
 $\nu_s = 2850 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_s = 3652 \text{ cm}^{-1}$	 $\nu_{as} = 2930 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_{as} = 3756 \text{ cm}^{-1}$

6.2.2. Vibration de déformation angulaire

Une vibration de déformation est un mouvement des atomes en dehors de l'axe de la liaison. Lors de ce mouvement, la distance interatomique reste constante. Elles peuvent se réaliser dans le plan ou perpendiculairement au plan. Ces vibrations sont représentées par « δ ».

Les vibrations de déformations sont d'intensité plus faible que celle des vibrations de valence. Elles constituent la région du spectre dite « empreinte digitale » (1000 à 600 cm^{-1}).

Vibrations de déformation (bending)			
Dans le plan		Perpendiculaire au plan	
Cisaillement (δ) (scissoring)	Rotation plane (ρ) (rocking)	Balancement (ω) (wagging)	Torsion (τ) (twisting)
 $\delta = 1596 \text{ cm}^{-1}$	 $\rho = \text{variable}$	 $\omega = \text{variable}$	 $\tau = 3756 \text{ cm}^{-1}$

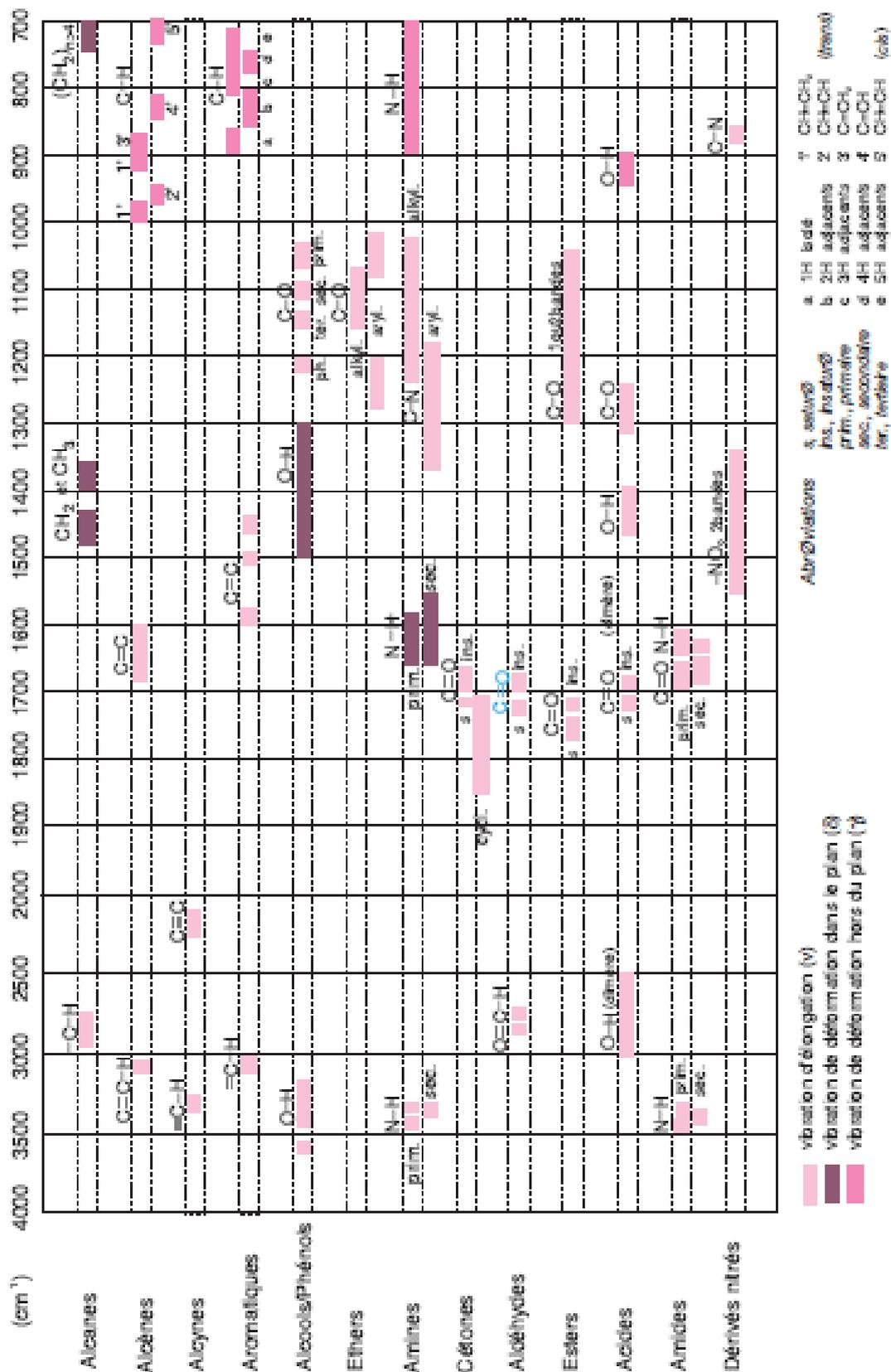


Figure 58 : Corrélation dans le moyen infrarouge entre groupes fonctionnels et bandes d'absorption

ANNEXE II

METHODES ANALYTIQUES DU DOSAGE DU CHLOROBUTANOL

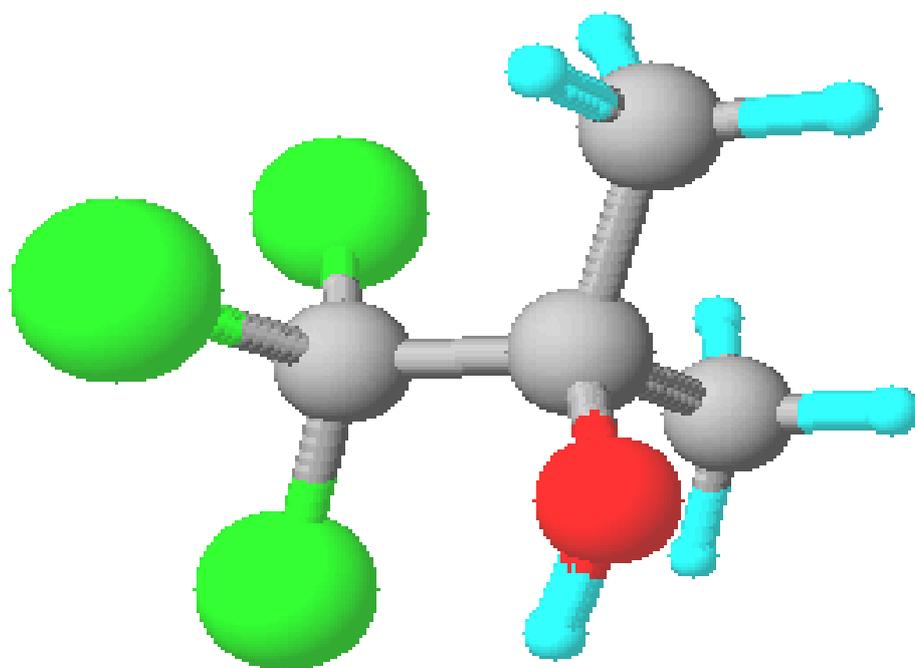
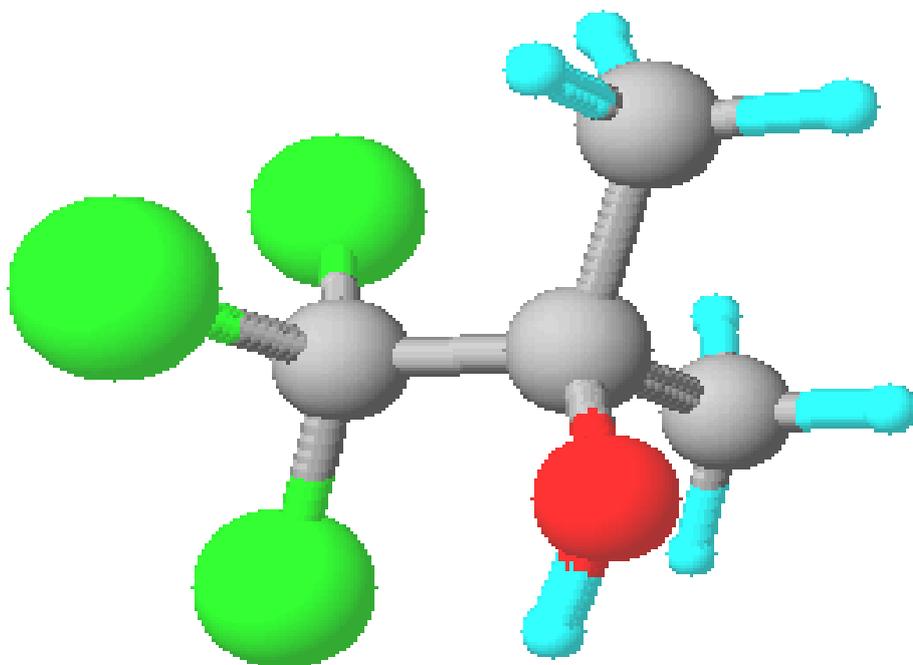


Tableau XXXI : Méthodes analytiques utilisées pour le dosage du chlorobutanol

Technique	Principe	Spécificité et sensibilité	Limites et interférents
Dosage des Produits de dégradation du chlorobutanol	basées sur la libération des ions chlorure après traitement avec une solution alcaline, ces ions chlorures sont par la suite tirés par : Argentimétrie, iodométrie, Gravimétrie, Turbidimétrie ou Ampèrométrie	peu sensible Peu spécifique	Ne différencient pas entre les chlorures libres et ceux formés par dégradation du chl _b , ne sont pas applicables si un autre composant de la formulation libère des ions chlorures par dégradation ou hydrolyse. (refr ampéro et cpg)
	Complexe hydroxamate ferrique	basée sur la formation d'un complexe coloré entre l'ion ferrique et un dérivé du chl _b ; linéarité : [0.1mg/ml ; 0,8mg/ml] Précision : +/- 2%	les esters, imides, acide chlorhydrique donneraient des surestimations. les anions, comme: tartrate, citrate qui forment des complexes avec l'ion ferrique.
Techniques Spectro-photométriques	Réaction de Fujiwara basée sur la formation d'un complexe de couleur rose par la réaction de la pyridine alcaline à chaud de Fujiwara. absorbe à 535 nm. facilement applicable sur Le chl _b vu qu'il est très volatile. Solution de n-hexane est utilisée pour extraire le chl _b des échantillons. Détection par : capture d'électron	Cette Technique est plus spécifique et plus sensible (1 microgramme), avec moins d'interférences	tous les composants polyhalogénés
Techniques chromatographiques	CPG	actuellement la plus sensible et utilisée pour les dosages dans les échantillons biologiques Limite de détection : 1 picogramme.	
	HPLC	Technique très sensible, simple et rapide utilisée pour les dosages du chl _b dans les formulations pharmaceutiques. Présente une alternative à la CPG	

ANNEXE III

REACTIFS UTILISES



Réactifs	Provenance	Données physico-chimiques	Précaution
Réactifs utilisés pour la synthèse et la purification du chlorobutanol hémihydraté			
Acétone	SIGMA-ALDRICH H	Formule brute : $C_3 H_6 O$ N° CAS : 67-64-1 Mr : 58.08 g/mol PF: -94.6 °C PE : 56.05 °C ρ : 0.78 g / cm ⁻³	
Chloroforme	RIEDEL-DE HAEN	Formule brute : $CHCl_3$ N° CAS : 67-66-3 Mr : 119.38 g/mol PF: -64 °C PE : 62 °C ρ : 1.48 g / cm ⁻³	
Hydroxyde de potassium		Formule brute : KOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 40 g/mol PF : 318 °C PE : 1390 °C ρ : 2.1 g / cm ⁻³	
Ethanol	SIGMA-ALDRICH H	Formule brute : $C_2 H_6 O$ N° CAS : 64-17-5 Mr : 46.07 g/mol PF: -114 °C PE : 79 °C ρ : 0.79 g / cm ⁻³	
Eau distillée	Préparée avec le distillateur LAB-TECH	Formule brute : $H_2 O$ N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol PF : 0 °C à 1 bar PE : 100 °C ρ : 1 g / cm ⁻³	

Réactifs utilisés pour le test de solubilité.		
Réactifs	Données physicochimique	Précautions
Glycérol	Formule brute : $C_3 H_8 O_3$ N° CAS : 56-81-5 Mr : 92g/mol PF : 318 °C PE : 1390 °C ρ : 2.1 g / cm ⁻³	
Réactifs utilisés pour la réaction avec la pyridine.		
Hydroxyde de sodium (pastille de soude)	Formule brute : NaOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 40 g/mol PF : 318 °C PE : 1390 °C ρ : 2.1 g / cm ⁻³	
Pyridine	Formule brute : $C_5 H_5 N$ N° CAS : 110-86-1 Mr : 79 g/ mol PF : - 41.15 °C PE : 115.35 °C ρ : 0.98 g/cm ⁻³	
Réactifs utilisés pour la réaction avec le nitrate d'argent.		
Nitrate d'argent	Formule brute : $AgNO_3$ N° CAS : 7761-88-8 Mr : 169.87 g/mol PF : 212 °C PE : 444 °C ρ : 4.352 g / cm ⁻³	
Ammoniaque concentré	Formule brute : $NH_4 OH$ N° CAS : 1336-21-6 Mr : 35.04 g/mol PF : -58 °C PE : 38 °C ρ : 0.892- 0.910 g / cm ⁻³ Pka : 9.25 à 25°C	
Réactifs utilisés pour la réaction avec l'iodure de potassium		
Iode	Formule brute : I_2 N° CAS : 7553-56-2 Mr : 234 g/mol PF : 113.7 °C PE : 184.4 °C	

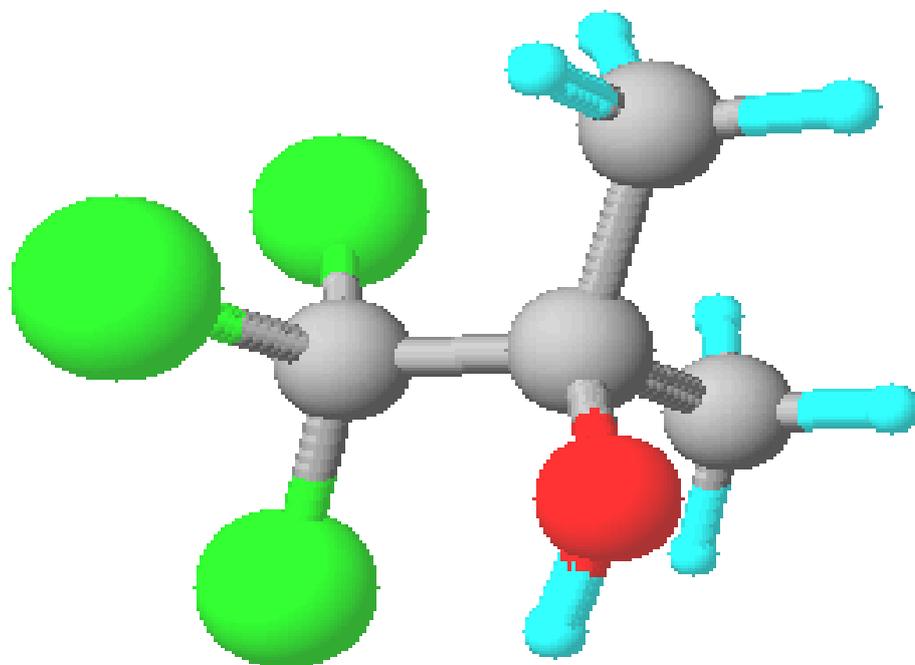
Iodure de potassium	Formule brute : KI N° CAS : 7681-11-0 Mr : 166 g/mol PF : 686 °C PE : 1330 °C ρ : 3.13 / cm ⁻³	
Hydroxyde de sodium (pastille de soude)	Formule brute : NaOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 40 g/mol PF : 318 °C PE : 1390 °C ρ : 2.1 g / cm ⁻³	
Réactifs utilisés pour le test d'opalescence.		
Sulfate d'hydrazine	Formule brute : H ₆ N ₂ O ₄ S N° CAS : 10034-93-2 Mr : 130.2 g/mol PF : 254 °C ρ = 1.37 g/cm ⁻³	
Hexaméthylènetétramine (Méthénamine)	Formule brute : C ₆ H ₁₂ N ₄ N° CAS : 100-97-0 Mr : 140.17g/mol PF : > 263 °C PE : 260 °C ρ : 1.33 / cm ⁻³	
Réactifs utilisés pour le test du degré de coloration		
Chlorure ferrique	Formule brute : FeCl ₃ N° CAS : 7705-08-0 Mr : 162.2 g/mol PF : 306 °C PE : 315 °C	
Chlorure de cobalt	Formule brute : COCl ₂ N° CAS : 7646-79-9 Mr : 129.84 g/mol PF : > 263 °C PE : 1049 °C ρ : 3.36 / cm ⁻³	

Sulfate du cuivre	Formule brute : CuSO_4 N° CAS : 7758-98-7 Mr : 159.6 g/mol PF: 110 °C PE : 650 °C ρ : 3.6 g / cm ⁻³	
Acide chlorhydrique	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 Mr : 36.46 g/mol PF: -30 °C PE : 48 °C ρ : 1.19 g / cm ⁻³	
Réactifs utilisés pour le test d'acidité.		
Carbonate de sodium	Formule brute : $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ N° CAS : 497-19-8 Mr : 105.99g/mol PF : 851 °C $\rho = 2.53 \text{ g/cm}^{-3}$	
Hydroxyde de sodium	Formule brute : NaOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 40 g/mol PF : 318 °C PE : 1390 °C ρ : 2.1 g / cm ⁻³	
Bleu de bromothymol	Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$ N° CAS : 76-59-5 Mr : 624.38g/mol PF: 204 °C ρ : 1.25 g / cm ⁻³	
Acide chlorhydrique	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 Mr : 36.46 g/mol PF: -30 °C PE : 48 °C ρ : 1.19 g / cm ⁻³	
Méthylorange	Formule brute : $\text{C}_{14} \text{H}_{14} \text{N}_3 \text{NaO}_3 \text{S}$ N° CAS : 547-58-0 Mr : 305.35 g/mol	

Réactifs utilisés pour le dosage du chlorobutanol.		
Acide nitrique	Formule brute : HNO_3 N° CAS : 7697-37-2 Mr : 63 g/mol PF : $-41.6\text{ }^\circ\text{C}$ PE: $121\text{ }^\circ\text{C}$ $d = 1.4$	
Hydroxyde de sodium	Formule brute : NaOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 40 g/mol PF : $318\text{ }^\circ\text{C}$ PE : $1390\text{ }^\circ\text{C}$ $\rho : 2.1\text{ g / cm}^{-3}$	
Nitrate d'argent	Formule brute : AgNO_3 N° CAS : 7761-88-8 Mr : 169.87 g/mol PF : $212\text{ }^\circ\text{C}$ PE : $444\text{ }^\circ\text{C}$ $\rho : 4.352\text{ g / cm}^{-3}$	
Thiocyanate d'ammonium.	Formule brute : $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ N° CAS : 1762-95-4 Mr : 76.12 g/mol PF: $149.6\text{ }^\circ\text{C}$ PE : $> 170\text{ }^\circ\text{C}$ $\rho : 1.3\text{ g / cm}^{-3}$	
Sulfate ferrique et d'ammonium (Alun de fer).	Formule brute : $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ N° CAS : 7783-83-7 Mr : 482.19 g/mol PF: $39-41\text{ }^\circ\text{C}$ PE : $230\text{ }^\circ\text{C}$ $\rho : 1.71\text{ g / cm}^{-3}$	

ANNEXE IV

PICTOGRAMMES DE SECURITE

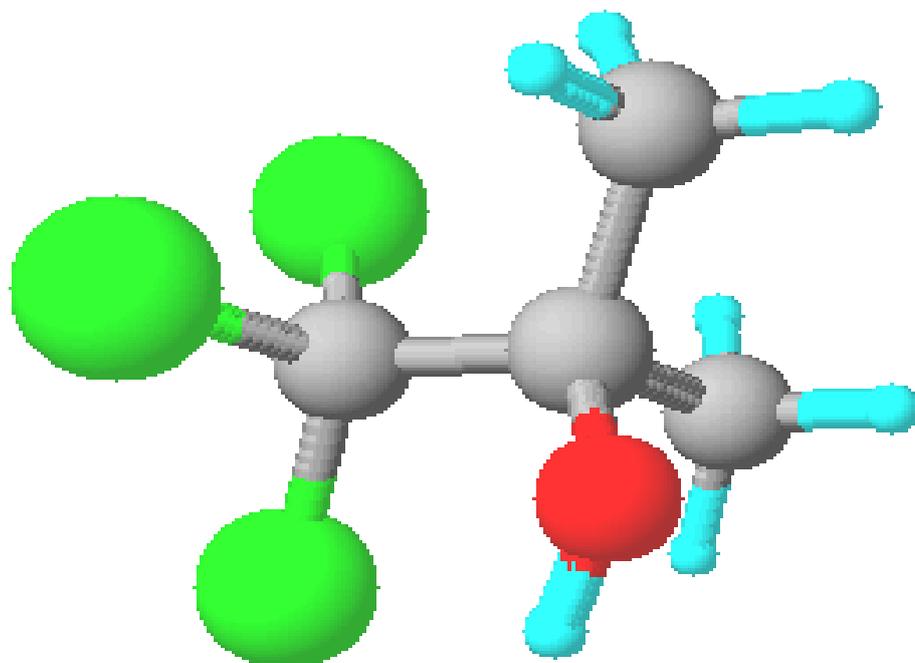


7. Pictogrammes de sécurité

Symboles	Signification
	Produit corrosif pour les mains et les yeux
	Produit corrosif et irritant de la peau
	Produit nocif
	Produit dangereux par aspiration
	Produit comburant
	Produit inflammable
	Produit toxique pour le milieu aquatique
	Produit toxique

ANNEXE V

PROCEDURE D'ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE DU CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE



8. Procédure d'analyse physicochimique du chlorobutanol hémihydraté

I. OBJECTIF

Cette procédure a pour but de décrire les méthodes de contrôle physico-chimique du CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE matière première.

II. DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure est spécifique au **CHLOROBUTANOL HEMIHYDRATE** matière première de la pharmacopée européenne 8^{ème} édition.

III. RESONSABILITES

SIDER Thili Malha et YASSA Zahoua

Encadrées par DR N.HADHOUM ; maitre assistante en chimie thérapeutique.

IV. DEFINITIONS :

1,1,1-Trichloro-2-méthylpropan-2-ol hémihydraté.

Teneur : 98,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance anhydre).

V. APPLICATION :

1. Caractères :

- **Aspect** : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, se sublimant facilement.

- **Solubilité** :

Peu soluble dans l'eau ; Très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent ; Soluble dans le glycérol à 85 pour cent.

-**Température de fusion** : 78°C.

2. Identification

A. A un mélange de 1 ml de pyridine et de 2 ml de solution concentrée d'hydroxyde de sodium, ajouter environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté. Chauffer au bain-marie, agiter et laisser reposer. La couche de pyridine devient rouge.

- Préparation de la solution concentrée d'hydroxyde de sodium :

Faire dissoudre aux ultra-sons, 4,2 g d'hydroxyde de sodium dans 10 ml d'eau distillée.

B. A 5 ml de solution ammoniacale de nitrate d'argent, ajouter environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté et chauffer légèrement. Il se forme un précipité noir.

- Préparation du nitrate d'argent ammoniacale :

Dissoudre 2,5 g de nitrate d'argent dans 80 ml d'eau; ajouter, goutte à goutte en agitant, de l'ammoniaque diluée jusqu'à dissolution du précipité. Compléter à 100 ml avec de l'eau. Préparer extemporanément.

Conservation: à l'abri de la lumière.

C. Dissoudre par agitation environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté dans 3 ml d'hydroxyde de sodium 1 M. Ajouter 5 ml d'eau et lentement 2 ml de solution d'iodure de potassium iodée. Il se forme un précipité jaunâtre.

- Préparation de l'hydroxyde sodium 1M :

Dissoudre 42 g d'hydroxyde de sodium dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone et compléter à 1000,0 ml avec le même solvant.

- Préparation de la solution d'iodure de potassium iodée

Dissoudre 500 mg d'iode et 1.5 g d'iodure de potassium dans de l'eau et compléter à 25 ml avec le même solvant.

3. Essai

Préparation de la solution S : Dissoudre 5 g de chlorobutanol hémihydraté dans de l'éthanol à 96 pour cent et compléter à 10 ml avec le même solvant.

3.1. Aspect de la solution :

- Degré d'opalescence :

La solution S n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II.

- Méthode

- Suspension-mère d'opalescence (suspension de formazine) : Prélever 25,0 ml de solution de sulfate d'hydrazine. Les introduire dans la fiole contenant la solution d'hexaméthylènetétramine. Mélanger. Laisser reposer pendant 24 h. Cette suspension peut être conservée pendant 2 mois dans un récipient de verre exempt de défauts de surface. La suspension ne doit pas adhérer aux parois du récipient et doit être soigneusement mélangée avant emploi.

- Etalon d'opalescence : Prélever 15,0ml de suspension-mère d'opalescence et compléter à 1000,0 ml avec de l'eau. Cette suspension est préparée au moment de l'emploi et peut être conservée pendant au plus 24 h.

- Solution témoin II : mélanger 10 ml d'étalon d'opalescence avec 90 ml d'eau.
- Préparation de la solution de sulfate d'hydrazine

Dissoudre 1 g de sulfate d'hydrazine dans de l'eau, puis compléter à 100 ml avec le même solvant. Laisser reposer pendant 5h.

- Préparation de la solution d'hexaméthylènetétramine

Dissoudre 2.5 g de l'hexaméthylènetétramine dans 25 ml d'eau compléter à 100 ml avec le même solvant.

➤ Degré de coloration :

N'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB₅.

▪ Méthode :

Dans des tubes à essai identiques, de verre neutre, incolore et transparent, d'un diamètre intérieur de 15 mm à 25 mm et à fond plat, comparer la solution S à la solution témoin JB₅, l'épaisseur de la couche étant de 40 mm. Apprécier les nuances à la lumière diffuse du jour par examen dans l'axe du tube sur fond blanc.

- Préparation des solutions

- **Solution jaune** : Dissoudre 46 g de chlorure ferrique dans 900 ml environ d'un mélange de 25 ml d'acide chlorhydrique et de 975 ml d'eau, puis compléter à 1000,0 ml avec le même mélange. Titrer et ajuster la solution à **45,0 mg** de FeCl₃, 6H₂O par millilitre, par addition du même mélange acide. Conserver à l'abri de la lumière.

Titration : Dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé, introduire 10,0 ml de la solution, 15 ml d'eau, 5 ml d'acide chlorhydrique et 4 g d'iodure de potassium. Fermez la fiole, laissez reposer à l'obscurité pendant 15 min, puis ajoutez 100 ml d'eau. Titrer l'iode libéré par le thiosulfate de sodium 0,1 M en présence de 0,5 ml de solution d'amidon ajouté en fin de titrage. 1 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 27,03 mg de FeCl₃, 6H₂O.

- **Solution rouge** : Dissoudre 60 g de chlorure de cobalt dans 900 ml environ d'un mélange de 25 ml d'acide chlorhydrique et de 975 ml d'eau, puis compléter à 1000,0 ml avec le même mélange. Titrer et ajuster la solution à 59,5 mg de CoCl₂, 6H₂O par millilitre, par addition du même mélange acide.

Titration : Dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé, introduire 5,0 ml de la solution, 5 ml de solution diluée de peroxyde d'hydrogène et 10 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 300 g/l. Faites bouillir doucement pendant 10 min, laisser refroidir, puis ajouter 60 ml d'acide sulfurique dilué et 2 g d'iodure de potassium. Fermer la fiole et dissoudre le précipité en agitant doucement.

Titrez l'iode libéré par le thiosulfate de sodium 0,1 M jusqu'à coloration rose, en présence de 0,5 ml de solution d'amidon ajouté en fin de titrage.

1 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 23,79 mg de $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

- **Solution bleue** : Dissoudre 63 g de sulfate de cuivre dans 900 ml environ d'un mélange de 25 ml d'acide chlorhydrique et de 975 ml d'eau, puis compléter à 1000,0 ml avec le même mélange. Titrer et ajuster la solution à 62,4 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ par millilitre, par addition du même mélange acide.

Titration : Dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé, introduire 10,0 ml de la solution, 50 ml d'eau, 12 ml d'acide acétique dilué et 3 g d'iodure de potassium. Titrer l'iode libéré par le thiosulfate de sodium 0,1 M jusqu'à faible coloration brun clair en présence de 0,5 ml de solution d'amidon ajouté en fin de titrage.

1 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 24,97 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Préparation de la solution thiosulfate de sodium 0.1M

Dissoudre 25 g de thiosulfate de sodium et 0,2 g de carbonate de sodium dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone et compléter à 1000,0 ml avec le même solvant.

Détermination du titre : Prélever 10,0 ml de bromate de potassium 0,033 M, ajouter 40ml d'eau, 10 ml de solution d'iodure de potassium et 5 ml d'acide chlorhydrique. Titrer par la solution de thiosulfate de sodium en présence de 1 ml de solution d'amidon ajouté en fin de titrage

- Solution témoin JB : mélanger 2.4 ml de la solution jaune, 1 ml de la solution rouge, 0.4 ml de la solution bleu et 6.2 ml d'acide chlorhydrique à 10g/l.

- Solution témoin JB₅ : mélanger 12.5 ml de la solution JB avec 87.5 ml d'acide chlorhydrique à 10g/l.

3.2. Acidité :

A 4 ml de solution S, ajouter 15 ml d'éthanol à 96 pour cent et 0,1 ml de solution de bleu de bromothymol.

Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 1,0 ml d'hydroxyde de sodium 0,01 M.

- Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.01M :

Prélever 10,0 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et compléter à 1000,0 ml avec de l'eau.

Détermination du titre. Titrez 20,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium par l'acide chlorhydrique 0,1 M en présence d'indicateur coloré.

$$[NaOH] = \frac{[HCl] * VHCl}{V_{eq}}$$

V_{HCl} : volume de HCl titré en ml (20 ml).

V_{eq} : volume de chute de burette en NaOH en ml.

- Acide chlorhydrique à 0.1M :

Prélever 10,30 g d'acide chlorhydrique et compléter à 1000,0 ml avec de l'eau.

Détermination du titre. Dissoudre 1,000 g de carbonate de sodium dans 50 ml d'eau. Ajouter 0,1ml de solution de méthylorange et titrer par l'acide chlorhydrique jusqu'au début du virage au rouge-jaune. Chauffer alors à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Refroidir et titrer jusqu'à coloration rouge-jaune.

1 ml d'acide chlorhydrique 1 M correspond à 53,00 mg de Na_2CO_3 .

$$C = \frac{PE (Na_2CO_3)mg}{53 * V_{eq} HCl}$$

C : concentration de l'acide chlorhydrique en mole/l

PE : prise d'essai du carbonate de sodium en mg (53 mg)

V_{eq} : volume de chute de burette en HCl.

3.3. Chlorures :

Au maximum 100 ppm.

- Méthode

A 1 ml de solution S, ajouter 4 ml d'éthanol à 96 pour cent et compléter à 15 ml avec de l'eau.

A 15 ml de cette solution, ajouter 1 ml d'acide nitrique dilué et verser ce mélange en une seule fois dans un tube à essai contenant 1 ml de solution de nitrate d'argent.

Préparer le témoin dans les mêmes conditions en utilisant un mélange de 10 ml de solution à 5 ppm de chlorure et de 5 ml d'éthanol à 96 pour cent.

Examiner latéralement les tubes à essai sur fond noir.

Après 5 min à l'abri de la lumière, si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle du témoin.

3.4. Eau :

4,5 pour cent à 5,5 pour cent, déterminé sur 0,300 g de chlorobutanol hémihydraté.

Méthode :

- **Procédé A.** Dans la fiole de titrage, introduire soit du méthanol, soit le solvant recommandé par le fournisseur du réactif titrant. Selon l'appareillage utilisé, réaliser le séchage de la cellule de mesure ou réaliser un pré-titrage. Introduire rapidement 0.300 g de chlorobutanol hémihydraté et effectuer le titrage en respectant le temps d'extraction nécessaire.

3.5. Cendre sulfurique :

Au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de chlorobutanol hémihydraté.

- Méthode :

Chauffer un creuset approprié (de silice, de platine, de porcelaine ou de quartz, par exemple) à 600 ± 50 °C pendant 30 min. Laisser refroidir dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié puis peser. Dans le creuset, introduire 1g de chlorobutanol puis peser. Humectez la substance à examiner avec un peu d'acide sulfurique (généralement 1 ml) et chauffer doucement, à une température aussi faible que possible, jusqu'à carbonisation complète de l'échantillon. Après refroidissement, humecter le résidu avec un peu d'acide sulfurique (généralement 1 ml). Chauffer doucement jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de fumées blanches, puis calciner à 600 ± 50 °C jusqu'à incinération complète du résidu. Veiller à ce qu'il n'y ait aucune émission de flammes lors du procédé. Laisser refroidir le creuset dans un dessiccateur sur du gel de silice ou autre desséchant approprié, puis peser à

nouveau et calculer le pourcentage de résidu. Si la quantité du résidu ainsi obtenue dépasse la limite indiquée, répéter l'addition d'acide sulfurique, puis la calcination comme précédemment pendant des périodes de 30 min jusqu'à ce que 2 pesées ne diffèrent pas de plus de 0,5 mg ou que le pourcentage de résidu soit conforme à la limite prescrite.

4. Dosage

Dissoudre 0,100 g de chlorobutanol hémihydraté dans 20 ml d'éthanol à 96 pour cent. Ajouter 10 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium. Chauffer au bain-marie pendant 5 min, puis refroidir. Ajouter 20 ml d'acide nitrique dilué, 25,0 ml de nitrate d'argent 0,1 M et 2 ml de phthalate de dibutyle. Agiter énergiquement. Ajouter 2 ml de solution de sulfate ferrique et d'ammonium. Titrez par le thiocyanate d'ammonium 0,1 M jusqu'à virage à l'orangé.

1 ml de nitrate d'argent 0,1 M correspond à 5,92 mg de $C_4H_7Cl_3O$.

$$T\% = \frac{(V1[AgNO_3] - V_{eq}[SCN^-]) \times 59.2}{PE(1 - T_e)} \times 100.$$

T% : teneur en pourcentage du chlorobutanol (substance anhydre) ;

V1 : volume de nitrate d'argent en ml (20 ml) ;

V_{eq} : Volume de chute de burette en thiocyanate d'ammonium en ml ;

[AgNO₃] : concentration du nitrate d'argent en mol/l ;

[SCN⁻] : concentration du thiocyanate d'ammonium en mol/l ;

PE : prise d'essai de l'échantillon du chlorobutanol hémihydraté en mg ;

T_e : teneur en eau du chlorobutanol hémihydraté synthétisé en %.

- Préparation de la solution de thiocyanate d'ammonium à 0,1 M :

Dissoudre 7,612 g de thiocyanate d'ammonium dans de l'eau et compléter à 1000,0 ml avec le même solvant.

Détermination du titre : Prélever 20,0 ml de nitrate d'argent 0,1 M. Ajouter 25 ml d'eau et 2 ml d'acide nitrique dilué; titrer par la solution de thiocyanate d'ammonium en présence de 2 ml de solution de sulfate ferrique et d'ammonium jusqu'à coloration jaune rougeâtre.

$$[SCN^-] = \frac{[AgNO_3] \cdot V}{V_{eq}}$$

V : volume titré de nitrate d'argent en ml (10ml)

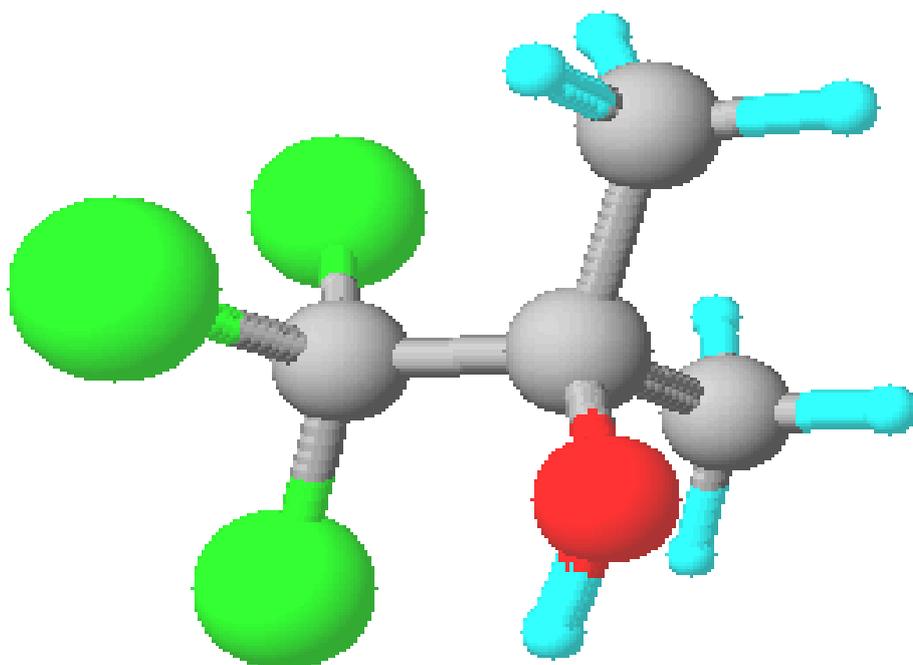
V_{eq} : volume de chute de burette en thiocyanate de sodium en ml

- Préparation de la solution de Nitrate d'argent 0.1M :

Dissoudre 17,0 g de nitrate d'argent dans de l'eau et compléter à 1000,0 ml avec le même solvant.

ANNEXE IV

MONOGRAPHIE DU CHLOROBUTANOL



9. Monographie du chlorobutanol selon la pharmacopée européenne 8^{ème} édition

Chlorobutanol anhydre

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 8.0

01/2008:0382
corrigé 6.0

1 mL de nitrate d'argent 0,1 M correspond à 5,92 mg de $C_4H_7Cl_3O$.

CHLOROBUTANOL ANHYDRE

Chlorobutanolum anhydricum



$C_4H_7Cl_3O$
[57-15-8]

M_r 177,5

DÉFINITION

1,1,1-Trichloro-2-méthylpropan-2-ol.

Teneur : 98,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance anhydre).

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, se subliment facilement.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans le glycérol à 85 pour cent.

F : environ 95 °C (substance non desséchée au préalable).

IDENTIFICATION

A. A un mélange de 1 mL de pyridine R et de 2 mL de solution concentrée d'hydroxyde de sodium R, ajoutez environ 20 mg de chlorobutanol anhydre. Chauffez au bain-marie, agitez et laissez reposer. La couche de pyridine devient rouge.

B. A 5 mL de solution ammoniacale de nitrate d'argent R, ajoutez environ 20 mg de chlorobutanol anhydre et chauffez doucement. Il se forme un précipité noir.

C. Dissolvez par agitation environ 20 mg de chlorobutanol anhydre dans 3 mL d'hydroxyde de sodium 1 M. Ajoutez 5 mL d'eau R et lentement 2 mL de solution d'iodure de potassium iodée R. Il se forme un précipité jaune.

D. Eau (voir Essai).

ESSAI

Solution S. Dissolvez 5 g de chlorobutanol anhydre dans de l'éthanol à 96 pour cent R et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Aspect de la solution. La solution S n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB₃ (2.2.2, Procédé II).

Acidité. A 4 mL de solution S, ajoutez 15 mL d'éthanol à 96 pour cent R et 0,1 mL de solution de bleu de bromothymol R1. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'hydroxyde de sodium 0,01 M.

Chlorures (2.4.4) : au maximum 300 ppm.

Dissolvez 0,17 g de chlorobutanol anhydre dans 5 mL d'éthanol à 96 pour cent R et complétez à 15 mL avec de l'eau R. Préparez le témoin en remplaçant les 5 mL d'eau R par 5 mL d'éthanol à 96 pour cent R.

Eau (2.5.12) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 2,00 g de chlorobutanol anhydre.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de chlorobutanol anhydre.

DOSAGE

Dissolvez 0,100 g de chlorobutanol anhydre dans 20 mL d'éthanol à 96 pour cent R. Ajoutez 10 mL de solution diluée d'hydroxyde de sodium R. Chauffez au bain-marie pendant 5 min, puis refroidissez. Ajoutez 20 mL d'acide nitrique dilué R, 25,0 mL de nitrate d'argent 0,1 M et 2 mL de phtalate de dibutyle R. Agitez énergiquement. Ajoutez 2 mL de solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2. Titrez par le thiocyanate d'ammonium 0,1 M jusqu'à virage à l'orangé.

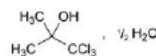
CONSERVATION

En récipient étanche.

01/2008:0383
corrigé 6.0

CHLOROBUTANOL HÉMIHYDRATÉ

Chlorobutanolum hemihydricum



$C_4H_7Cl_3O, \frac{1}{2}H_2O$
[6001-64-5]

M_r 186,5

DÉFINITION

1,1,1-Trichloro-2-méthylpropan-2-ol hémihydraté.

Teneur : 98,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance anhydre).

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores, se subliment facilement.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, soluble dans le glycérol à 85 pour cent.

F : environ 78 °C (substance non desséchée au préalable).

IDENTIFICATION

A. A un mélange de 1 mL de pyridine R et de 2 mL de solution concentrée d'hydroxyde de sodium R, ajoutez environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté. Chauffez au bain-marie, agitez et laissez reposer. La couche de pyridine devient rouge.

B. A 5 mL de solution ammoniacale de nitrate d'argent R, ajoutez environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté et chauffez légèrement. Il se forme un précipité noir.

C. Dissolvez par agitation environ 20 mg de chlorobutanol hémihydraté dans 3 mL d'hydroxyde de sodium 1 M. Ajoutez 5 mL d'eau R et lentement 2 mL de solution d'iodure de potassium iodée R. Il se forme un précipité jaunâtre.

D. Eau (voir Essai).

ESSAI

Solution S. Dissolvez 5 g de chlorobutanol hémihydraté dans de l'éthanol à 96 pour cent R et complétez à 10 mL avec le même solvant.

Aspect de la solution. La solution S n'est pas plus fortement opalescente que la suspension témoin II (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB₃ (2.2.2, Procédé II).

Acidité. A 4 mL de solution S, ajoutez 15 mL d'éthanol à 96 pour cent R et 0,1 mL de solution de bleu de bromothymol R1. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 1,0 mL d'hydroxyde de sodium 0,01 M.

Chlorures (2.4.4) : au maximum 100 ppm.

A 1 mL de solution S, ajoutez 4 mL d'éthanol à 96 pour cent R et complétez à 15 mL avec de l'eau R. Préparez le témoin en remplaçant 5 mL d'eau R par 5 mL d'éthanol à 96 pour cent R.

Eau (2.5.12) : 4,5 pour cent à 5,5 pour cent, déterminé sur 0,300 g de chlorobutanol hémihydraté.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de chlorobutanol hémihydraté.

DOSAGE

Dissolvez 0,100 g de chlorobutanol hémihydraté dans 20 mL d'éthanol à 96 pour cent R. Ajoutez 10 mL de solution diluée d'hydroxyde de sodium R. Chauffez au bain-marie pendant

5 min, puis refroidissez. Ajoutez 20 mL d'acide nitrique dilué R, 25,0 mL de nitrate d'argent 0,1 M et 2 mL de phtalate de dibutyle R. Agitez énergiquement. Ajoutez 2 mL de solution de sulfate ferrique et d'ammonium R2. Titrez par le thiocyanate d'ammonium 0,1 M jusqu'à virage à l'orangé.

1 mL de nitrate d'argent 0,1 M correspond à 5,92 mg de C_7H_7ClO .

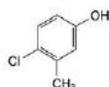
CONSERVATION

En récipient étanche.

01/2011:0384

CHLOROCRÉSOL

Chlorocresolum



C_7H_7ClO
[59-50-7]

 M_r 142,6

DÉFINITION

4-Chloro-3-méthylphénol.

Teneur : 98,0 pour cent à 101,0 pour cent.

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche

ou masses cristallines blanches ou sensiblement blanches et compactes, se présentant sous la forme de pastilles ou cristaux incolores ou blancs.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, facilement soluble dans les huiles grasses. Le chlorocrésol se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins.

IDENTIFICATION

A. Point de fusion (2.2.14) : 64 °C à 67 °C.

B. A 0,1 g de chlorocrésol, ajoutez 0,2 mL de chlorure de benzoyle R et 0,5 mL de solution diluée d'hydroxyde de sodium R. Agitez vigoureusement jusqu'à formation d'un précipité cristallin blanc. Ajoutez 5 mL d'eau R et filtrez. Faites cristalliser le précipité dans 5 mL de méthanol R et séchez à 70 °C. Le point de fusion (2.2.14) des cristaux est de 85 °C à 88 °C.

C. A 5 mL de solution S (voir Essai), ajoutez 0,1 mL de solution de chlorure ferrique R1. Il apparaît une coloration bleuâtre.

ESSAI

Solution S. Agitez 3,0 g de chlorocrésol finement pulvérisé avec 60 mL d'eau exempte de dioxyde de carbone R pendant 2 min et filtrez.

Aspect de la solution. La solution est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB₆ (2.2.2, Procédé II).

Dissolvez 1,25 g de chlorocrésol dans de l'éthanol à 96 pour cent R et complétez à 25 mL avec le même solvant.

Acidité. A 10 mL de solution S, ajoutez 0,1 mL de solution de rouge de méthyle R. La solution devient rouge ou orange. Le virage de l'indicateur au jaune franc ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'hydroxyde de sodium 0,01 M.

Substances apparentées. Chromatographie en phase gazeuse (2.2.28) : utilisez le procédé de normalisation.

Solution à examiner. Dissolvez 1,0 g de chlorocrésol dans de l'acétone R et complétez à 100 mL avec le même solvant.

Solution témoin. Prélevez 1,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec de l'acétone R. Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'acétone R.

Colonne :

- matériau : verre,
- dimensions : $l = 1,80$ m, $\varnothing = 3-4$ mm,
- phase stationnaire : terre d'infusoires silanisée pour chromatographie en phase gazeuse R imprégnée de 3-5 pour cent m/m de polyméthylphénylsiloxane R.

Gaz vecteur : azote pour chromatographie R.

Débit : 30 mL/min.

Température :

- colonne : 125 °C,
- chambre à injection : 210 °C,
- détecteur : 230 °C.

Détection : ionisation de flamme.

Enregistrement : 3 fois le temps de rétention du chlorocrésol.

Temps de rétention : chlorocrésol = environ 8 min.

Limites :

- impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum 0,10 pour cent,
- total : au maximum 1 pour cent,
- limite d'exclusion : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (0,05 pour cent).

Résidu à l'évaporation : au maximum 0,1 pour cent.

Evaporez à siccité au bain-marie 2,0 g de chlorocrésol et desséchez le résidu à 100-105 °C. La masse du résidu est au maximum de 2 mg.

DOSAGE

Dans une fiole à bouchon rodé, dissolvez 70,0 mg de chlorocrésol dans 30 mL d'acide acétique glacial R. Ajoutez 25,0 mL de bromate de potassium 0,0167 M, 20 mL d'une solution de bromure de potassium R à 150 g/L et 10 mL d'acide chlorhydrique R. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 15 min. Ajoutez 1 g d'iodure de potassium R et 100 mL d'eau R. Titrez par le thiosulfate de sodium 0,1 M, en agitant énergiquement, en présence de 1 mL de solution d'amidon R ajouté en fin de titrage. Effectuez un titrage à blanc.

1 mL de bromate de potassium 0,0167 M correspond à 3,565 mg de C_7H_7ClO .

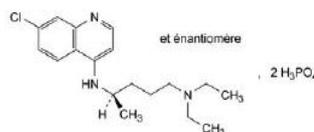
CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

01/2008:0544
corrigé 6.0

CHLOROQUINE (PHOSPHATE DE)

Chloroquini phosphas



$C_{18}H_{32}ClN_5O_8P_2$
[50-63-5]

 M_r 515,9

DÉFINITION

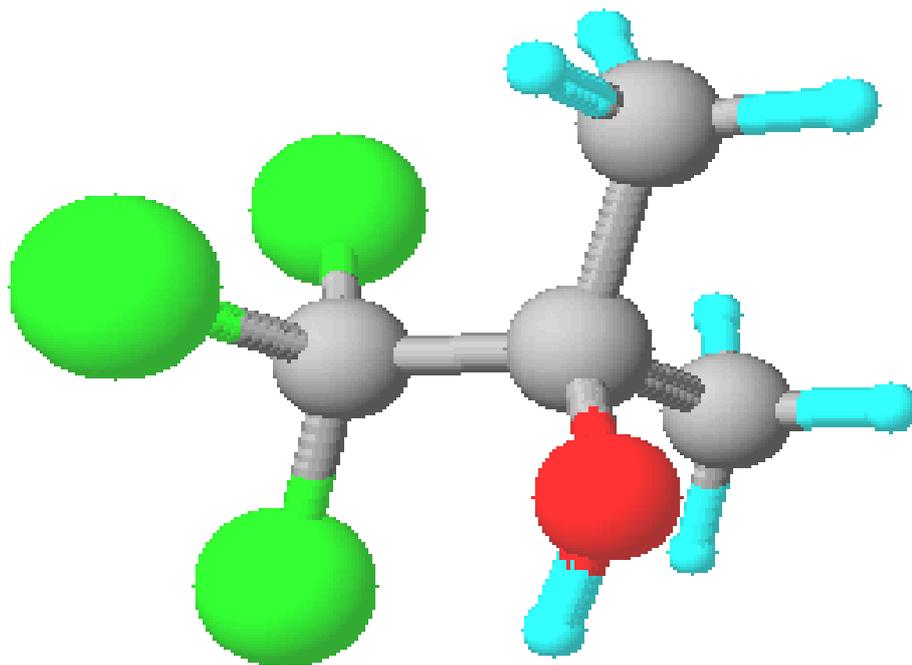
Le phosphate de chloroquine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de bis(dihydrogénophosphate) de N^4 -(7-chloroquinoléin-4-yl)- N^1,N^1 -diéthylpentane-1,4-diamine, calculé par rapport à la substance desséchée.

10. La composition des milieux de culture

Composants	Concentration en g/L
Bouillon nutritif (BN)	
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Extrait de bœuf	10
PH final = 7.3 ± 0.2	
BOUILLON GLUCOSE TEMPONNE (BGT)	
Peptone	20
Extrait de viande	2
Glucose	4
Chlorure de sodium	2.5
Dihydrogenophosphate de potassium	0.7
Hydrogenophosphate de sodium	8.3
PH final = 7.4	
GÉLOSE NUTRITIVE (GN)	
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone tryptique	5
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15 à 20
PH final = 7.4	
GÉLOSE SABOURAUD	
Digestion pancréatique de caseine	5
Digestion peptique du tissu animal	5
Dextrose	40
Agar-agar	15
PH final = 5 – 5.6	

ANNEXE VIII

EFFICACITE DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE



cas, au lieu d'employer des indicateurs biologiques, il est possible de démontrer l'existence d'une réduction de 3 log des endotoxines bactériennes résistant à la chaleur.

Stérilisation par irradiation. Les indicateurs biologiques peuvent être utilisés pour la surveillance des opérations de routine, comme moyen supplémentaire d'évaluer l'efficacité de la dose d'irradiation choisie, particulièrement dans le cas de la stérilisation par électrons accélérés. L'utilisation de spores de *Bacillus pumilus* (par exemple ATCC 27.142, NCTC 10327, NCIMB 10692 ou CIP 77.25) est recommandée. Le nombre de spores viables par support est supérieur à 1×10^7 et la valeur *D* est supérieure à 1,9 kGy. Il est vérifié qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition des indicateurs biologiques à 25 kGy (*dose minimale absorbée*).

Stérilisation par les gaz. L'utilisation d'indicateurs biologiques est nécessaire pour tous les procédés de stérilisation par les gaz, tant pour la validation des cycles que pour les opérations de routine. La stérilisation par les gaz est communément utilisée pour les dispositifs médicaux, les isolateurs, les locaux, etc. L'utilisation des gaz dans ce contexte n'entre pas dans le champ d'activités de la Pharmacopée Européenne. L'utilisation de spores de *Bacillus subtilis* (par exemple var. *niger* ATCC 9372, NCIMB 8058 ou CIP 77.18) est recommandée pour l'oxyde d'éthylène. Le nombre de spores viables par support est supérieur à 5×10^5 . Les paramètres de résistance sont les suivants : la valeur *D* est supérieure à 2,5 min pour un cycle d'essai mettant en jeu 600 mg/l d'oxyde d'éthylène, à 54 °C et sous 60 pour cent d'humidité relative. Il est vérifié qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition des indicateurs biologiques pendant 60 min au cycle d'essai décrit ci-dessus, et que l'exposition des indicateurs pendant 15 min à un cycle à température réduite (600 mg/l, 30 °C et 60 pour cent d'humidité relative) laisse des spores revivifiables. L'exposition des indicateurs à 600 mg/l d'oxyde d'éthylène, pendant 60 min, à 54 °C et sans humidification doit laisser des spores revivifiables, pour assurer que l'indicateur biologique est capable de révéler l'existence d'une humidification insuffisante.

01/2008:50103

5.1.3. EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, des agents de conservation antimicrobienne peuvent être ajoutés, spécialement aux préparations aqueuses, pour éviter la prolifération ou limiter la contamination microbienne qui, dans les conditions normales de conservation et d'emploi, notamment pour des récipients multidoses, pourrait se produire et entraîner un risque d'infection pour le malade et une détérioration de la préparation. Les agents de conservation antimicrobienne ne doivent pas remplacer des bonnes pratiques de fabrication.

L'efficacité d'un agent de conservation antimicrobienne peut être accrue ou diminuée par le composant actif de la préparation ou par la composition de la préparation dans laquelle il est incorporé ou par le récipient et le mode de fermeture adopté. L'activité antimicrobienne de la préparation dans son récipient définitif est évaluée pour sa durée de validité, afin de s'assurer que cette activité ne se modifie pas au cours de la période de conservation. Ces examens peuvent être effectués sur des échantillons prélevés à partir du récipient définitif immédiatement avant l'essai.

Au cours de la phase de développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que l'activité antimicrobienne de la préparation telle quelle ou, si nécessaire, additionnée d'un ou de plusieurs agents de conservation, assure une protection appropriée contre les effets nocifs qui peuvent résulter d'une contamination microbienne ou d'une prolifération au cours de la conservation et de l'usage de la préparation.

L'efficacité de l'activité antimicrobienne peut être démontrée à l'aide de l'essai décrit ci-dessous. L'essai n'est pas destiné au contrôle de routine.

ESSAI DE L'EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de microorganismes dans la préparation ensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits. Les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de microorganismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché (voir tableaux 5.1.3.-1, 5.1.3.-2, 5.1.3.-3).

Microorganismes d'essai

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 ; NCIMB 8626 ; CIP 82.118.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 ; NCTC 10788 ; NCIMB 9518 ; CIP 4.83.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 ; NCPF 3179 ; IP 48.72.
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404 ; IMI 149007 ; IP 1431.83.

Les essais sont effectués à l'aide de souches uniques. Aux microorganismes prescrits peuvent être ajoutées, dans les cas appropriés, d'autres souches ou espèces qui peuvent représenter des contaminants potentiels de la préparation. Il est recommandé d'utiliser, par exemple, *Escherichia coli* (ATCC 8739 ; NCIMB 8545 ; CIP 53.126) pour toutes les préparations orales et *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381 ; IP 2021.92) pour les préparations orales à concentration élevée en sucre.

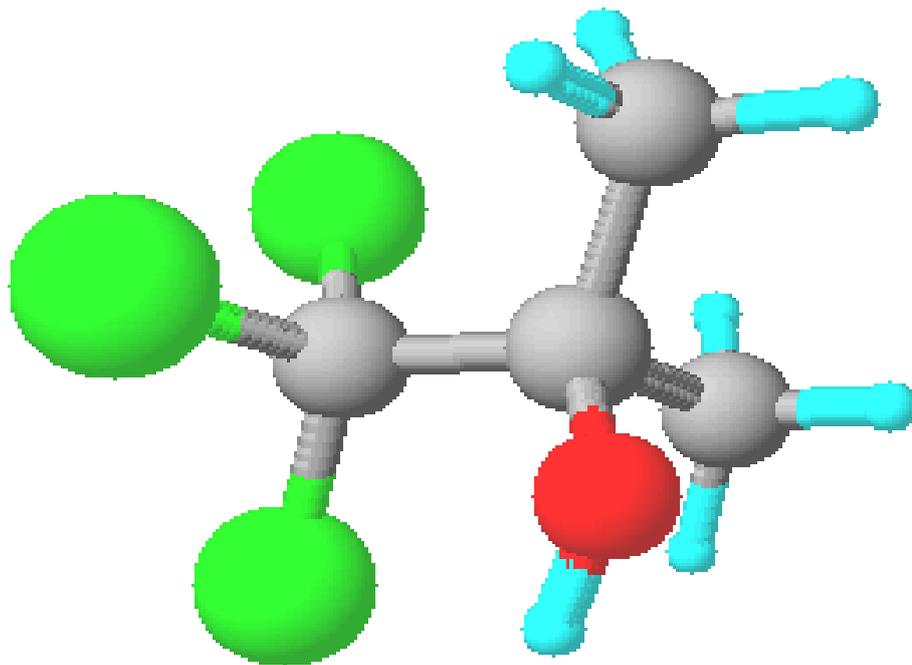
Préparation de l'inoculum

Avant l'essai, ensemencez la surface d'un milieu gélosé B (2.6.12) pour les bactéries ou celle d'un milieu gélosé C sans addition d'antibiotique (2.6.12) pour les champignons, avec la culture mère récemment obtenue de chacun des microorganismes spécifiés. Incubez les cultures bactériennes à une température de 30-35 °C pendant 18-24 h, la culture de *C. albicans* à une température de 20-25 °C pendant 48 h et la culture de *A. niger* à une température de 20-25 °C pendant 1 semaine ou jusqu'à obtention d'une sporulation satisfaisante. Des subcultures peuvent être nécessaires après reprise des microorganismes, avant qu'ils n'atteignent leur état optimal, mais il est recommandé de maintenir au minimum le nombre de repiquages.

Pour récolter les cultures bactériennes et de *C. albicans*, utilisez un liquide de suspension stérile contenant 9 g/l de chlorure de sodium R. Dispersez et transférez la culture développée en surface dans un récipient approprié. Ajoutez une quantité de liquide de suspension suffisante pour réduire le nombre de microorganismes à environ 10^8 par millilitre.

ANNEXE IX

MEDICAMENTS CONTENANTS LE CHLOROBUTANOL



11. Les médicaments contenant le chlorobutanol

11.1. Liste des médicaments à usage humain contenant le chlorobutanol

Dénomination commune internationale	[chlorobutanol]	PA/excipient	Forme galénique du produit	La classe pharmacothérapeutique
Cétylpiridinium chlorure/ chlorobutanol/ eugénol.	50 mg	PA	Solution pour bain de bouche	Stomatologie, traitement local à visée antiseptique.
Chlorobutanol/ lévomenthol	70 mg	PA	Solution pour instillation nasale	Préparation nasale pour usage local
Chlorhexidine/ Chlorobutanol	500 mg	PA	Solution pour bain de bouche	Préparation stomatologique, anti-infectieux pour traitement oral local
Chlorobutanol / acide salicylique /acide borique.	38 mg	PA	Solution pour lavage oculaire	Antiseptique local/ astringent léger.
Héxétidine/salicylate de choline/ chlorobutanol hémihydraté	250 mg	PA	Collutoire	Antiseptique
Chlorobutanol/ héxétidine/ acide propionique	500 mg	PA	Collutoire	Préparation à usage buccal, oropharyngé
Desmopressine	/	Excipient	Solution endonasale	Hormone antidiurétique
Déxaméthasone	/	Excipient	Pommade ophtalmique	Corticostéroïdes et anti-infectieux en combinaison

11.2. Liste des médicaments à usage animale contenant le chlorobutanol

Dénomination commune internationale	Espèces cible	Forme galénique	Classe pharmacothérapeutique
Oxytocine	Chien, ovin, bovin, porc	Solution injectable	Hormone post-hypophysaire
ketamine	Chiens, chats, bovins, ovins, caprins, équins,	Solution injectable	Anesthésique générale.
Doxapram	Bovins, équins, chiens et chats	Solution injectable.	Stimulation de la respiration et réanimation post-natale

Résumé

Le chlorobutanol est une matière première, utilisé principalement comme antiseptique et **conservateur antimicrobien** dans les préparations injectables et ophtalmiques.

L'objectif principal de notre étude était la synthèse et l'étude de l'activité antimicrobienne du chlorobutanol hémihydraté.

Le chlorobutanol hémihydraté a été obtenu avec un rendement satisfaisant. Les tests d'**identification** ont révélé les fonctions principales ainsi que le carbone trichloré. La **caractérisation** ainsi que l'ensemble des essais effectués sur ce produit étaient conformes aux exigences de la **pharmacopée européenne** ; et la teneur en principe actif inférieur aux normes exigées. Les examens microbiologiques ont confirmé **l'activité antimicrobienne** du chlorobutanol synthétisé sur les souches bactérienne et fongique testées.

Donc dans l'ensemble, le chlorobutanol synthétisé répondait aux exigences de la Pharmacopée européenne, et possède une activité antibactérienne et antifongique, néanmoins il faut insister sur l'étape de purification du produit pour éliminer le maximum d'impuretés.

Mots clé : conservateurs antimicrobiens – chlorobutanol hémihydraté – pharmacopée européenne - activité antimicrobienne.

Abstract

Chlorobutanol is a raw material, mainly used as an antiseptic and **antimicrobial preservative** in injectable and ophthalmic preparations.

The main objective of our study was the synthesis and evaluation of the antimicrobial activity of chlorobutanol hemihydrate

The **chlorobutanol hemihydrate** has been obtained with satisfactory yield. **Identification** tests revealed the main functions as well as trichloro carbon. The **characterization** and all the tests carried out on this product were conform with the requirements of the **European Pharmacopoeia**, and the content of active principle being lower than the required standards. Microbiological tests confirmed the **antimicrobial activity** of chlorobutanol synthesized on the bacterial and fungal strains tested.

Thus, on the whole, the synthesized chlorobutanol satisfied the requirements of the European Pharmacopoeia, and possesses antibacterial and antifungal activity; nevertheless it is necessary to insist on the purification step of the product in order to eliminate the maximum impurities.

Key words: antimicrobial preservatives - chlorobutanol hemihydrate - European pharmacopoeia - antimicrobial activity.