BULLETIN TECHNIQUE

Gattefossé
ETABLISSEMENTS

SOMMAIRE

SUMMAI

4 EDITORIAL

5 LA CULTURE DES TISSUS VÉGÉTAUX
par G. NETIEN et J. RAYNAUD

11 LES TANINS
par H. POURRAT

25 BIOGÉNÈSE DES MONOTERPÈNES BICYCLIQUES
par MM. GRANGER, PASSET et Mlle ARBOUSSET

27 CALENDULA

29 MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DÉSAMÉRISATION
par A. VERAIN et G. BIENVENU

39 APPORT DE LA VISCOSIMÉTRIE A L'ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE AU SEIN D'HYDROGELS A BASE DE CARBOPOL
par J.-C. ETTER

47 ETUDE DE LA STABILITÉ D'UNE LIPASE D'ORIGINE FONGIQUE EN FONCTION DES EXCIPIENTS ET DES CONDITIONS DE CONSERVATION
par J.-M. AIACHE, P. MANDON, F. CHARBONNE et P. FEBVRE

53 ETUDE GALÉNIQUE, ANALYTIQUE ET TOXICOLOGIQUE D'UNE BASE D'EXCIPIENT

59 L'UVETON ANTISOLAIRE, ANTIÉRYTHÉMATEUX

63 POINT DE FUSION DES CORPS GRAS
par L. WAGINAIRE

67 INTÉRÊT DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DU « HEAD-SPACE » POUR L'ÉTUDE D'AROMES UTILISÉS EN PHARMACIE
par Madame J. WELBY

71 ABSORPTION RECTALE DE L'ERYTHROMYCINE
par F. SARAIVA DE PAIVA, L. SILVA CARVALHO, E. MANUELA, A. REGO

© The Author.All rights reserved

75 INFLUENCE DE L'EXCIPIENT SUR L'ABSORPTION DU SALICYLATE DE GLYCOL ADMINISTRÉ EN POMMADES PAR VOIE CUTANÉE ET PAR VOIE RECTALE
P. FEBVRE, J.-M. AIACHE, P. JABOT, P. ARMOIRY

77 HYGIÉNE BACTÉRIOLOGIQUE DU MATÉRIEL, DES LOCAUX DU PERSONNEL EN INDUSTRIE COSMÉTIQUE 81
par Madame L. COIGNERAI-DEVILLERS

82 THYMUS VULGARIS L. « CHEMOTAXONOMIE ET BIOGÉNÈSE MONOTERPÉNIQUE »
Analyse de thèse - Jean PASSET

83 AROMATISATION DE FORMES SÈCHES PAR DIVERSES PRÉPARATIONS GALÉNIQUES A BASE DE CITRON
Analyse de thèse - Marie-France COSTE-JALLAIS

84 LES EMULSIONS, ETUDE DU H.L.B. CRITIQUE D'UNE HUILE DE VASELINE
Analyse de thèse - Monique SEILLER

85 CONTROLE IN VITRO DES FORMES SOLIDES RETARD
Analyse de thèse - Charles JEANNIN

86 COLLOQUE DU 15 SEPTEMBRE 1970 87
PHYSIQUE ET TECHNOLOGIE DES MASSES POUR SUPPOSITOIRES

88 LE CENTRE DE RECHERCHE D'AROMATISATION

89 JOURNÉES GALÉNIQUES DE SAINT-RÉMY-DE-PROVENCE
21-22 Mai 1971

91 XVe JOURNÉE DE L'AROMATIQUE
23 Mai 1970 - Château de Lourmarin (Vaucluse)

93 XVIe JOURNÉE DE L'AROMATIQUE
8 Mai 1971 - Château de Lourmarin (Vaucluse)

95 5e SEMAINE DE DERMOPHARMACOLOGIE

© The Author.All rights reserved

éditorial

Le Bulletin Technique de notre Société qu'il nous plaît de retrouver au gré de nos déplacements sur les paillasses ou dans les bibliothèques, et souvent en bonne compagnie, en vient à rechercher sa propre définition.

De bulletin il n'en a pas le caractère strictement périodique ou anecdotique ; de technique il n'en a ni la structure, ni la fonction. Cet ouvrage est bien au-delà, le témoignage de l'éthique de notre entreprise et annonce autant ce qu'elle est que ce qu'elle fait. Nous imaginons que la notion d'entreprise trouve là sa fondamentale signification.

Nous participons à une action de sensibilisation des universitaires et des industriels sur des connaissances expérimentales et sur des idées.

L'approche immédiate des problèmes de la santé de l'homme pharmaceutique ou le bien-être de l'homme cosmétique ne passe ni par la chimie, ni par la physique, ni par la biologie, mais par l'appréciation cohérente et globale de besoins non fragmentaires spéculatifs, industriels et commerciaux.

L'ouverture de nos recherches, travaux et applications, faite dans nos murs et en dehors de nos murs, vers les aspects isolés et particuliers aussi bien que vers les éléments synthétiques et généraux de notre profession, débouche sur une activité de service au premier sens du terme.

Ce Bulletin Technique exprime plus que notre souci, notre besoin d'un enseignement, une propagande des idées, une publicité des produits, une relation publique des individus.

Notre Société trouve paradoxalement sa spécialisation dans l'élargissement de son éthique.

Que certains de nos lecteurs s'en soient déjà aperçus et en aient apprécié la valeur, est pour nous une réponse à notre monologue.

© The Author.All rights reserved

La culture des tissus végétaux

Extrait d'une communication * de G. NETIEN et J. RAYNAUD
Laboratoire de Botanique et de Biologie cellulaire **
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

[illegible]

HABERLANDT, au début de ce siècle (1902), fut le premier à entrevoir la possibilité d'une multiplication cellulaire hors de l'organisme.
En 1907 le physiologiste américain HARRISON place un fragment de tube neural de grenouille dans une goutte de lymphe coagulée et constate l'apparition de fibres nerveuses provenant de la croissance des neurones ; puis Alexis CARREL obtient dès 1912 la culture indéfinie de fibroblastes de poulet, grâce à l'action de substances qu'il trouva dans le suc embryonnaire du poulet et qu'il appela « trephones ».
MOLLIARD (1921) réussit un développement limité de racine de Radis dans un milieu sucré, et après de nombreuses tentatives en 1934 Ph. R. WHITE pouvait annoncer qu'il cultivait une racine isolée de Tomate depuis 3 ans dans une solution minérale additionnée de saccharose et d'extrait de levure. Au cours de cette période cette racine avait subi 160 repiquages, en une année elle s'accroissait de plus de 15.000 fois et produisait 35.400 ramifications.

* Présentée à Lourmarin (Journée de l'Aromatique), le 13 mai 1970 (voir page 91).

** U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, Lyon.

Ce fut une grande découverte.

R. J. GAUTHERET et L. NOBLECOURT eurent l'idée de s'adresser à des tissus méristématiques.

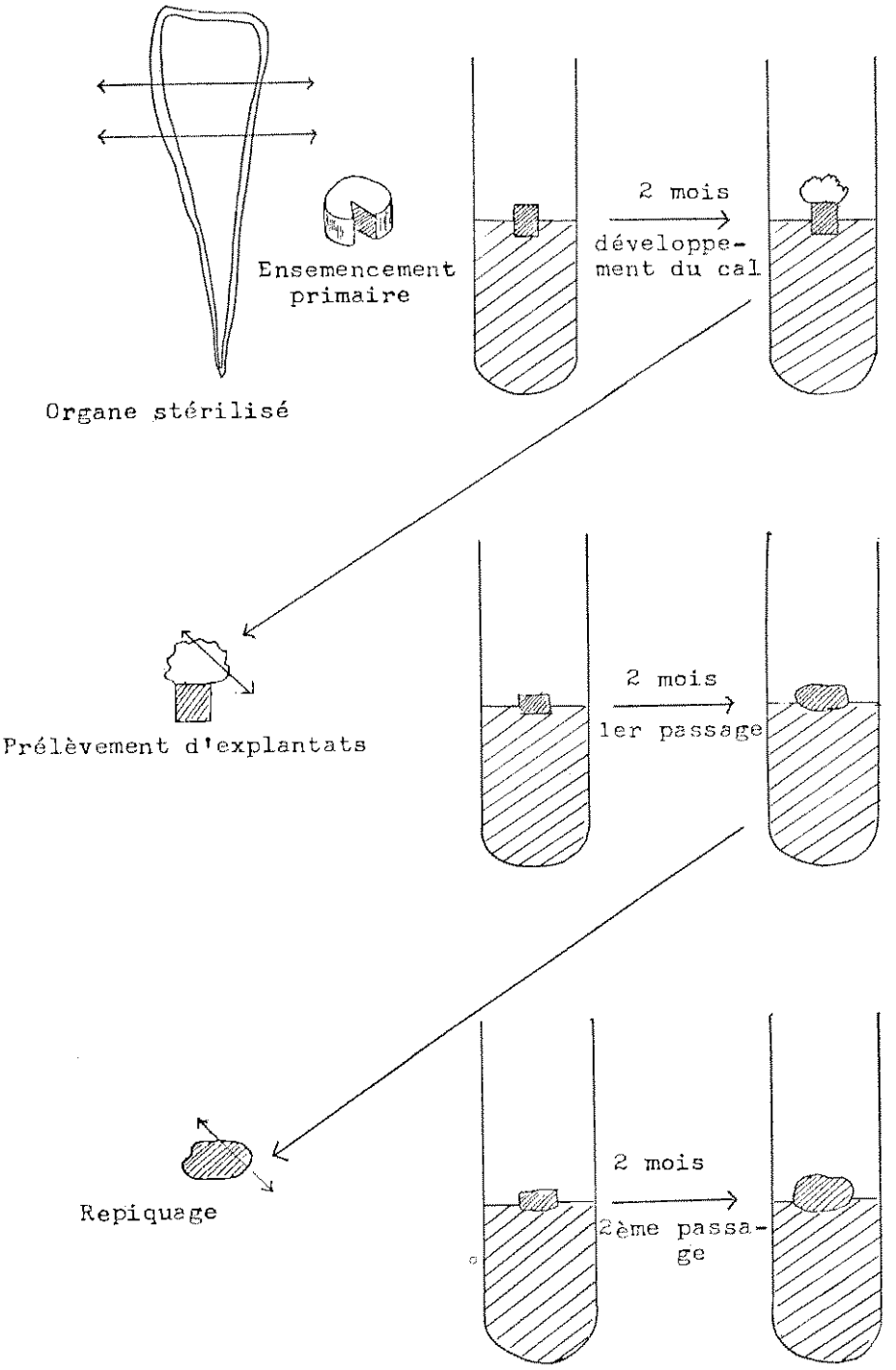
Ces deux chercheurs développent leurs recherches avec la racine de carotte, celle-ci présente un cambium facilement repérable et finalement des tranches aseptiques cultivées dans des milieux minéraux (type solution de Knop) contenant des traces de sels de cuivre, de nickel, de manganèse, de zinc, etc.... (solution oligodynamique de Berthelot), des extraits de levure, de la vitamine B1, de la cysteine et enfin de l'acide β indolacétique, donnent des proliférations cellulaires qui, repiquées, perpétuent une souche constamment entretenue depuis 1938.

A la même date le physiologiste américain WHITE annonçait qu'il cultivait des tissus d'un tabac hybride (**N. glauca × N. Langsdorffii**) ayant la propriété de produire des tumeurs sous l'influence d'un traumatisme léger.

A partir de cette époque, en France, les premiers résultats furent étendus à d'autres végétaux.

© The Author.All rights reserved

PRINCIPE DE PRÉPARATION DE LA CULTURE DES TISSUS



© The Author.All rights reserved

PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA CULTURE DES TISSUS VÉGÉTAUX

Le principe repose sur la possibilité d'isoler, par voie aseptique, une partie du végétal, de travailler dans un milieu conditionné et d'apporter les éléments nécessaires à sa nutrition.

Acceptons d'envisager la production d'une culture indéfinie de racine de carotte.

Le prélèvement s'effectuera, après stérilisation de l'ensemble, dans la région cambiale, à l'aide d'un scalpel préalablement flambé. Ces fragments sont placés en tube à essais de gros calibre, contenant un milieu nutritif minéral, glucosé et gélosé, au préalable également stérilisé.

On constate après plusieurs jours, l'apparition d'un cal, plus ou moins volumineux, chlorophyllien. Ceci constitue la première phase de l'opération. Après deux mois, la prolifération peut s'arrêter ayant épuisé les réserves du milieu. Il s'agit ensuite, dans un deuxième temps, de procurer un repiquage du cal, dans une autre série de tubes à essais, en s'entourant de toutes les conditions d'asepsie nécessaire.

De mois en mois la culture se développera si le milieu contient tous les éléments nécessaires à la nutrition des cellules.

La colonie devient plus homogène et sa croissance sera illimitée. L'obtention de la souche est définitive et pourra servir aux expériences de physiologie végétale.

MILIEUX DE CULTURE

Le milieu type renferme 5 catégories d'éléments : de l'eau, des sels minéraux, une source organique de carbone représentée par du saccharose et du glucose, des substances de division et enfin de la gélose.

Voici une formule type utilisée :

MURASHIGE - SKOOG	
KNO_3	1900 mg/l
NH_4NO_3	1440
$MgSO_4$ 7 H_2O	370
$CaCl_2$	332
KH_2PO_4	136
$MnSO_4$, 1 H_2O	14
$ZnSO_4$, 7 H_2O	8,1
H_3BO_3	4,8
KI	0,8
(NH_4) 6 $MoO_2 4H_2O$	0,18
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,02
Glucose	2 %
EDTA (Sel de 80 mg/L Na).	
Lait de Coco	15 %
Gélose	6 %
Nicotinamide	1 mg/l
Acide Pantothénique	1 mg/l
Pyridoxine	1
Thiamine	1
Riboflavine	0,1

Saccharose ou glucose

Eléments indispensables de la culture, car les tissus des plantes dans ces conditions n'élaborent guère de chlorophylle.

On se place ainsi dans les conditions des cultures bactériennes ou mycéliennes.

Substances de division

Ces substances agissent à l'état de traces ; ce sont des catalyseurs biochimiques.

Ce sont surtout les auxines naturelles et en particulier l'acide β indolacétique les grands responsables de cette action.

Autres facteurs de division cellulaire

Les possibilités de croissance des tissus végétaux se sont accrues lorsque les chercheurs ont découvert que l'acide β indolacétique n'était pas la seule substance capable d'enclencher la division cellulaire. L'entretien des souches fut facilité en s'adressant à d'autres substances naturelles, dont l'étude est encore à l'heure actuelle en pleine évolution.

© The Author.All rights reserved

ASPECT MORPHOLOGIQUE DES CULTURES DE TISSUS VÉGÉTAUX

On obtient, au bout de quelque temps, des colonies homogènes qui s'arrondissent de plus en plus et prennent parfois un aspect translucide particulier aux différentes espèces cultivées.

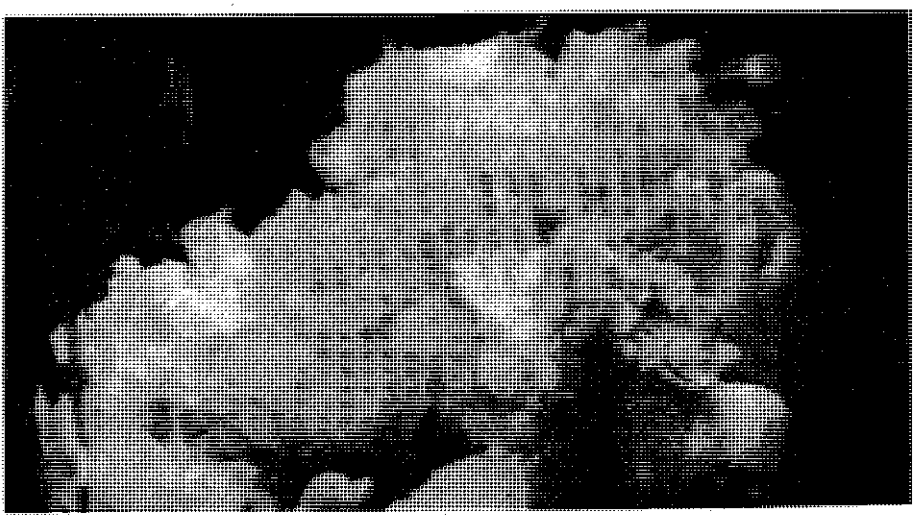
En coupe histologique, on constate alors que les tissus néoformés sont généralement constitués par des masses parenchymateuses au sein desquelles se différencient des formations cribo-vasculaires très aberrantes dans l'aspect de nodules ou d'anneaux.

Il est très possible de cultiver des tissus cancéreux. Après inoculation à la racine de Scorsonère d'une souche bactérienne on obtient une tumeur qui peut être repiquée et développée dans les milieux de culture précédemment indiqués. Les conditions expérimentales de cette culture ont été précisées ces dernières années (Manigault). On sait à l'heure actuelle que les tissus cancérisés fabriquent eux-mêmes leurs hormones de croissance et il ne devient pas nécessaire de les mettre dans les milieux nutritifs. L'aspect morphologique de ces tissus tumorisés est un peu différent des tissus normaux, on peut d'une façon très générale indiquer que ces cultures se présentent translucides, souvent hétérogènes et souvent très friables. L'examen histologique de ces cultures démontre d'énormes cellules, souvent polynucléées, dont l'architecture ressemble assez bien à celle que nous connaissons dans le domaine des tumeurs animales.

Il existe 3 types de cultures que l'on prépare généralement dans les laboratoires s'intéressant à cette question.

Tout d'abord les cultures de **tissus normaux** dont les polarités et les besoins nutritifs sont connus, ensuite les cultures de **tissus tumorisés** obtenus sur des plantes cancéreuses à l'aide de moyens techniques divers, enfin une troisième catégorie de tissus provenant généralement de modifications culturales obtenues au fur et à mesure des différents passages successifs dans les milieux nutritifs épuisant la culture et la modifiant dans ses polarités chimiques, c'est ce que l'on appelle les **cultures anergiées,** en particulier aux substances de croissance et dont les réactions morphologiques, histologiques et biochimiques sont très différentes des tissus normaux.

Culture de *Conium maculatum L.* âgée de 5 mois
(Formation d'embryoïdes)



© The Author.All rights reserved

LES APPLICATIONS DE LA CULTURE DES TISSUS VÉGÉTAUX

La culture des tissus végétaux a permis de soulever un certain nombre de problèmes dans de nombreux domaines de la physiologie végétale, alors que les tissus animaux intéressaient plus spécialement ceux de la cellule proprement dite.

LA NUTRITION DES TISSUS

Il est facile, dans un milieu conditionné, sur un ensemble de cellules homogènes de faire varier les conditions expérimentales et d'envisager alors la croissance ou l'inhibition en fonction du poids de culture obtenu dans un temps donné.

Il a donc été préparé des milieux de culture dans lesquels toutes les substances minérales qui paraissaient favorables à la multiplication des cellules furent ajoutées, puis en éliminant une à une ces substances on a pu connaître quelles étaient celles indispensables à la nutrition cellulaire.

Le saccharose en particulier ainsi que le glucose sont indispensables à la culture des tissus végétaux.

Certains tissus prolifèrent spontanément sans la nécessité des auxines, d'autres au contraire sont exclusifs à cette substance de croissance.

Une autre application qui intéresse le domaine pharmaceutique a été donnée d'envisager la culture des tissus végétaux comme un matériel biologique intéressant l'activité de différentes molécules utilisées en pharmacie. Les antimitotiques, comme la colchicine ont été expérimentés, les radio-éléments également, les antibiotiques dont l'activité est si importante pour notre problème également. Toutes les substances antagonistes et inhibitrices de croissance ont fait l'objet de recherches.

En pathologie végétale, les méthodes de cultures des tissus ont donné aussi d'intéressants résultats. De nombreux agents pathogènes des végétaux qui appartiennent à la catégorie des parasites obligatoires ont été cultivés en présence de la plante hote. C'est ainsi que le mildiou de la vigne a été cultivé sur des cals produits par des fragments de tige de vigne cultivés in vitro.

On a pu de la même manière cultiver le virus de la mosaïque du tabac en se servant comme support de cultures de tissus de tabac ayant subi de nombreux repiquages.

La connaissance des possibilités biochimiques des tissus tumoraux des plantes commence à être bien connue et la découverte d'un acide aminé nouveau, la lysopine, dans le tissu tumoral du Scorsonère par LIORET, et les importants travaux (Institut Pasteur, Pr. MANIGAULT) nous laissent espérer que nous arriverons à connaître un jour, avec plus de détails, les substances interférant dans ce phénomène pathologique.

The basic principle is to isolate, by aseptic means, part of the plant, to work in a carefully controlled environment, and to provide it with its nutritional requirements.

Sampling is carried out, after total sterilisation, in the cambial région, by means of a flame sterilised scalpel. These fragments are placed in a large diameter test tube containing a sterilised nutritional solution consisting of glucose, salts and agar agar. After several days, a chlorophyllian callosity of variable thickness is noticed. Proliferation stops after two months when the nutritional resources are exhausted. It is then necessary to prick out the callosity. The tissue will develop from month to month if all the requirements for cellular nutrition are present. The culture will become more homogeneous and its growth rate will decrease. The stock obtained is final and can be used for plant physiology experiments.

An application to pharmaceutics has been to consider the vegetable tissue culture as a biological material concerned with the different compounds used in pharmacology. Anti-mitosis agents such as colchine, radioactive tracers as well as antibiotics which are so important for our problem, have been the object of various research programmes. Tissue culture techniques have given some useful results in plant pathology studies. Many plant pathogenic agents, belonging to the category of obligatory parasites, have been cultivated in the presence of the plant host.

© The Author.All rights reserved

IMAGE DE LA CHIMIE AROMATIQUE

ESSENCES DÉTERPENÉES

LAVANDE - LAVANDIN - MENTHE

POUR COMPOSITIONS AROMATIQUES ET AROMATISATION

© The Author.All rights reserved

Les tanins *

Par H. POURRAT **
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Clermont-Ferrand

[illegible]

Cette définition n'a pas varié depuis la découverte des tanins par le chimiste français Proust qui les a étudiés à la suite de l'isolement par Seguin, en 1792, « d'un principe tannant soluble dans l'eau et formant avec la peau une combinaison qui cesse d'être soluble ». Seule l'orthographe de tanin s'est modifiée car le mot s'écrivait alors avec 2 n. Chevreul faisait déjà remarquer qu'on rangeait dans ce groupe des substances nettement différentes et à la fin du 19e siècle, divers chimistes demandaient que le terme générique de tanins soit banni de la chimie et de la physiologie végétales et qu'il soit réservé à la chimie technologique d'où il provenait. Aujourd'hui cette demande devrait être nuancée car l'étude de leur constitution chimique a fait apparaître quelques points communs entre eux, outre leur nature commune polyphénolique.

Nous conformant à l'usage, nous parlerons donc seulement des différents groupes de polyphénols à propriétés tannantes. Lorsqu'on parcourt les publications traitant de l'extraction des tanins, on est frappé par le fait que la solubilité ou l'insolubilité dans l'eau servent souvent de critères pour classer ces corps. Ceci est dû au fait qu'il est nécessaire pour avoir les propriétés tannantes, que le poids moléculaire soit au moins de 500 environ et que le corps soit soluble dans l'eau. Nous verrons que ce poids moléculaire de 500 est obtenu par condensation de plusieurs molécules et que dans les plantes la polymérisation se continue, sous diverses influences, pour donner des molécules insolubles dans l'eau, donc qui ne sont plus des tanins si on se limite strictement à la définition.

Le problème des précurseurs, c'est-à-dire la biogenèse, et, celui de leur évolution dans les plantes doivent être abordés pour expliquer leur formation et leur structure. Cela nous conduira à parler de divers corps voisins, qui, bien que ne possédant pas de propriétés tanantes, donnent la plupart des réactions des tanins. Précisons que les corps se combinent aux protéines mais ne se lient pas au collagène et par conséquent ne tannent pas.

* Conférence prononcée lors de la IVe Semaine de Dermopharmacologie, Lyon, 1970.

** Nous tenons à remercier Mme POURRAT, professeur agrégé, de l'aide qu'elle nous a apportée pour cette mise au point.

© The Author.All rights reserved

Enfin signalons que certains auteurs ont étendu l'appellation tanin à tous les corps qui se colorent en vert ou en noir, avec toutes les nuances intermédiaires, par les sels de fer. Nous ne souscrivons pas à cette définition trop élargie, et, en accord avec de nombreux chimistes et biologistes, nous classerons ces corps dans le groupe mal défini des « tannoïdes ». Certains d'entre eux peuvent se scinder en libérant des tanins et c'est à ce titre qu'ils peuvent rentrer dans le cadre de notre sujet.

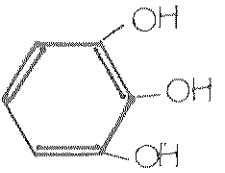
Depuis longtemps la classification chimique des tanins est basée sur leur division en deux grands groupes :

I. Tanins hydrolysables,
II. Tanins condensés.

En l'absence d'une classification plus précise, c'est celle-ci que nous adopterons.

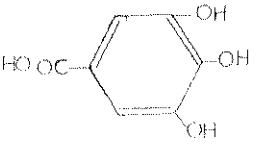
I - TANINS HYDROLYSABLES

Ils sont encore appelés tanins pyrogalliques car par fusion alcaline ils donnent du pyrogallol.

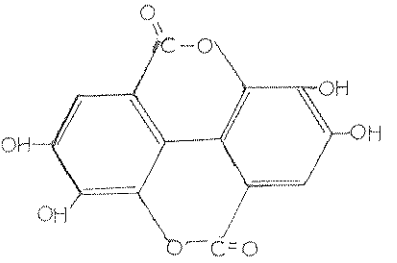


Leur hydrolyse peut être faite en milieu acide, en milieu alcalin, ou par voie enzymatique par la tannase extraite en particulier de Sterigmatocystis nigra Van Tieghem. Cette faculté d'être hydrolysés se comprend lorsque l'on sait que ces tanins sont des esters de sucres et d'acides-phénols ou de dérivés d'acides-phénols. Dans certaines molécules, les liaisons sucres-acides-phénols sont particulièrement fragiles et cela explique les possibilités d'hydrolyse lors de l'extraction. Nous reviendrons sur les conséquences importantes découlant de cette propriété quand nous parlerons de l'isolement des tanins.

Par hydrolyse ils donnent donc des sucres et soit uniquement de l'acide gallique, soit de l'acide gallique et de l'acide ellagique et des dérivés de cet acide. La présence de sucres dans leur molécule a été montré par Fischer vers 1918.



acide gallique



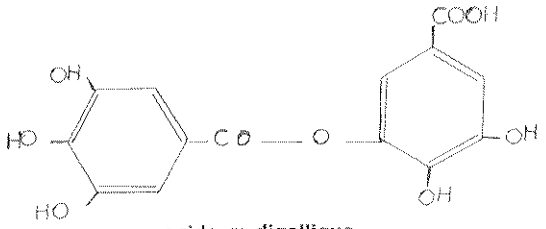
acide ellagique

Ces tanins sont les plus nombreux. Notons que le terme d'acide est impropre, l'acide ellagique ne possédant pas de carboxyle, mais une fonction lactone. On peut scinder les tanins pyrogalliques en deux sous-groupes :

— Les tanins galliques ou galliotanins,
— Les tanins ellagiques ou ellagitanins.

© The Author.All rights reserved

• **Tanins galliques.** Ce sont des esters du glucose ou d'un polysaccharide et de l'acide gallique ou de l'acide m-digallique ou d'acides polygalliques.



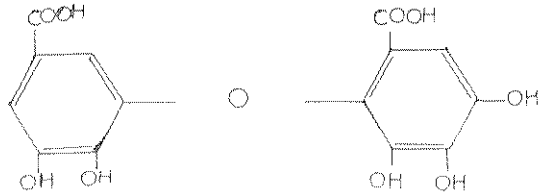
acide m-digallique

Les fonctions carboxyliques libres estérifient les OH des sucres.

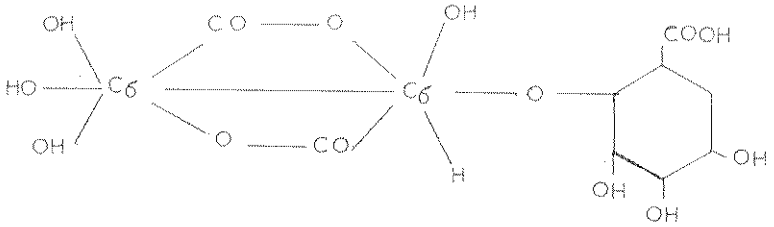
Le plus connu parmi ces tanins est le tanin de la noix de galle qui, sous les noms de tanin officinal, d'acide tannique et d'acide galiotannique, est inscrit à la Pharmacopée Française. L'emploi de l'éther pour sa préparation lui a fait également donner le nom de tanin à l'éther. Comme tous les tanins, il ne s'agit pas d'un produit pur mais d'un mélange d'esters galliques du glucose dont le nombre de molécules d'acide gallique estérifiant le glucose varierait de 2 à 5 ou de 4 à 10. D'après le Codex, le pentagalloylglucose serait le plus abondant. Environ 30 % d'acide gallique, m-digallique et trigallique libres existent dans ce produit, ces acides n'étant pas des tanins proprement dits. Il est significatif de constater que le tanin le plus classique est un mélange aussi complexe et qu'il n'est même pas constitué exclusivement par des tanins.

• **Tanins ellagiques.** Leur structure a surtout été étudiée à partir des corps obtenus par hydrolyse acide. Or tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître que lors de l'hydrolyse acide, il se produit des ruptures de certaines liaisons qui se reforment selon un autre schéma. On ne peut donc affirmer que les corps isolés existaient sous cette forme dans les molécules naturelles.

A côté de l'acide ellagique on a isolé, entre autres, de l'acide déhydrogallique qui possède deux carboxyles,



et la dilactone de l'acide valonéaïque, acide possédant un OH de plus que l'acide gallique, donc un hydroxygallique.



Dans ce sous-groupe on a également des molécules d'acides estérifiant les OH d'une ou plusieurs molécules d'oses.

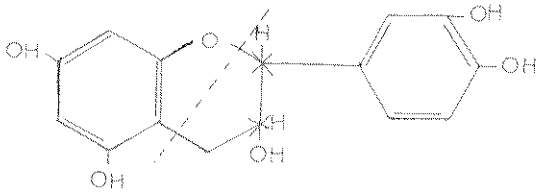
© The Author.All rights reserved

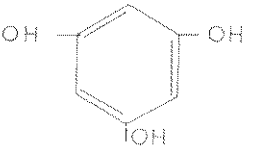
II - TANINS CONDENSES

Ils sont plus couramment connus sous le terme de tanins catéchiques qui est d'ailleurs impropre car certains ne possèdent pas dans leur molécule l'enchaînement du catéchol.

• **Dérivés du catéchol** (flavanols-3). Etudions d'abord la structure des plus anciennement connus qui sont constitués par plusieurs molécules de catéchol.

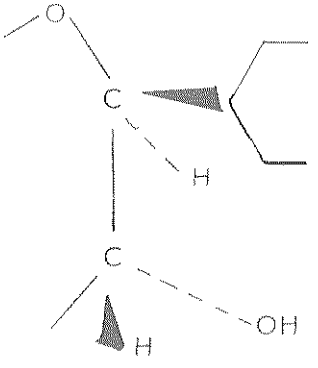
Le catéchol, appelé souvent improprement catéchine, possède la structure flavanol-3.



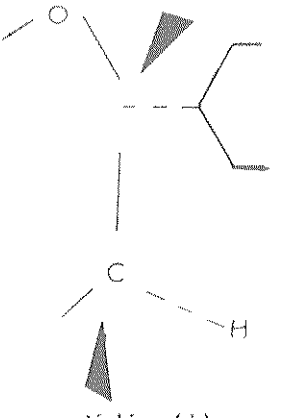


Sa molécule comporte dans son enchaînement le phloroglucinol

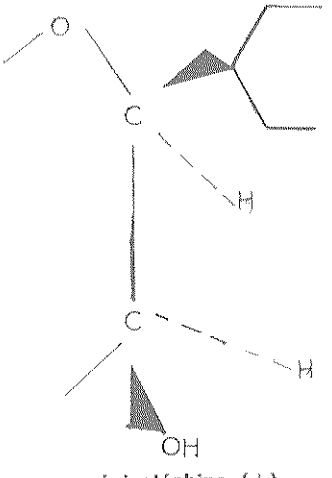
Nous voyons que sa molécule comporte deux carbones asymétriques 2 et 3, et qu'il existe donc 4 isomères optiques : catéchine (+). catéchine (—), épicatéchine (+) et épicatéchine (—).



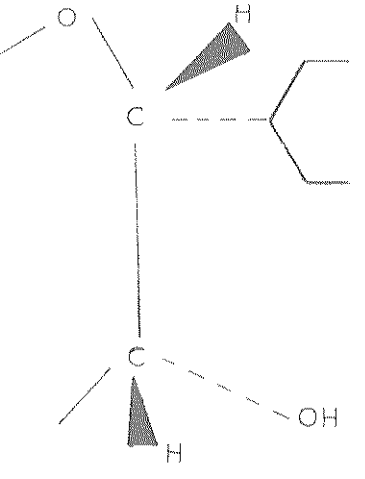
catéchine (—)



catéchine (+)



épicatéchine (+)



épicatéchine (—)

© The Author.All rights reserved

On connaît également les deux racémiques correspondants (±) catéchine et (±) épicatéchine.

Les formes (+) catéchine et (—) épicatéchine semblent être les plus fréquentes dans la nature.

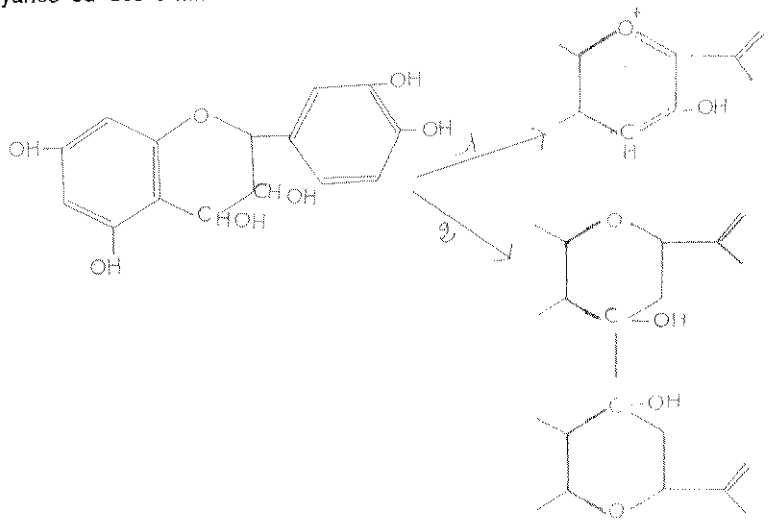
La structure électronique a fait l'objet d'un certain nombre de travaux récents.

• **Dérivés des leucoanthocyanidines** (flavanediols 3-4). Une partie importante des tanins condensés est formée par oxydation d'hydroxycatéchol ou de dérivés de ce corps. L'hydroxycatéchol est un flavanediol 3-4 ; il fait partie du groupe très important des leucoanthocyanidines souvent désigné sous le nom de leucoanthocyanes.

C'est Rosenheim qui, vers 1920, les découvrit.

Cette appellation est unanimement reconnue comme impropre. En effet, il est d'usage de réserver le terme de leucodérivé à des corps incolores qui, par oxydation, donnent un seul groupe de dérivés colorés.

Or les leucoanthocyanidines, selon les conditions d'oxydation, peuvent donner des anthocyanes ou des tanins.



Il existerait d'autres types de liaisons : 4-6, 4-7, 4-8, 3-7.

Dans la nature, c'est le mécanisme 2 qui existerait seul et Bate-Smith et Swain ont écrit que « la parenté unissant les leucoanthocyanidines aux anthocyanes, du point de vue de la physiologie végétale, serait tout à fait accidentelle ». Masquelier a d'ailleurs proposé que le mot de leucoanthocyane soit remplacé par celui de leucotannoïde, appellation plus conforme à la biogenèse. Pour les tanins formés à partir des leucoanthocyanidines on a proposé de les désigner par le nom général de « flavolanes ».

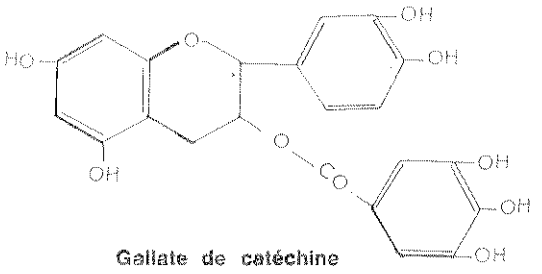
Les leucoanthocyanidines sont très répandues dans les plantes et la structure de nombre d'entre eux a été élucidée.

Ils se distinguent entre eux par le nombre et la position des hydroxyles méthylés. Le plus répandu semble être la leucocyanidine qui ne se différencie du catéchol que par la présence d'un hydroxyle en 4. Ces corps possèdent trois carbones assymétriques en 2, 3 et 4, pour chacun il peut donc exister huit isomères optiques.

• **Biflavanes.** Il y a une dizaine d'années on a isolé des dimères formés par l'union d'une molécule de flavanol-3 (catéchine) et une molécule d'un flavanediol 3-4 en particulier de leucocyanidine. Le carbone 4 de la leucoanthocyanidine est relié au carbone 8 du catéchol, l'hydroxyle en 4 permettant seul cette déshydratation et le catéchol ne possédant pas d'hydroxyle en 4 il est évident que la polymérisation s'arrête au dimère. Cependant ces dimères ayant un poids moléculaire supérieur à 500 et étant hydrosolubles, possèdent certaines propriétés des tanins. Bien qu'ils semblent peu abondants il était normal de les citer dans le cadre de cet exposé.

Nous disions au début de cet exposé que l'étude de la constitution chimique des tanins a fait apparaître quelques points communs de structure et la distinction entre tanins galliques et tanins condensés n'est plus aussi nette.

© The Author.All rights reserved



Gallate de catéchine

Longtemps la seule présence d'acide gallique dans les produits obtenus par décomposition d'un tanin permettait de le classer avec certitude dans les tanins galliques. La découverte, ces dernières années, de deux esters galliques de catéchol montre que les tanins catéchiques peuvent subir une hydrolyse partielle en libérant de l'acide gallique.

Mécanisme de polymérisation

La structure des tanins condensés est beaucoup moins connue que celle des tanins galliques. On s'était aperçu depuis longtemps que leur polymérisation se continuait pour donner des corps insolubles dans l'eau auxquels on avait donné le nom de phlobaphènes. On sait aujourd'hui que ces corps ont un poids moléculaire supérieur à 2 000, parfois de plusieurs milliers. Ils se forment spontanément pendant la conservation de différentes préparations renfermant des tanins condensés, par exemple dans le vin, et jouent un rôle important dans le vieillissement de ces préparations. Ces phlobaphènes, insolubles dans l'eau, ne sont plus des tanins.

Les études de fractionnement des tanins condensés, dans le but de préciser leur structure, ont dont porté sur des fractions d'un poids moléculaire compris entre 500 et 2 000. La chromatographie a été particulièrement utilisée. Nous ne rapporterons pas ici ces essais qui ont donné dans l'ensemble des résultats assez décevants mais qui permettent d'identifier les monomères et d'évaluer le degré de polymérisation.

Nous dirons que pratiquement tous les adsorbants connus ont été utilisés : alumine, sephadex, cellulose, polyamide, etc. L'extraction sélective à différents pH, méthode de Craig (partage à contre-courant) par des mélanges de solvants a fait également l'objet de travaux, qui n'ont guère apporté de résultats intéressants.

EXTRACTION DES TANINS

Nous avons vu que l'étude de la structure des tanins a abouti à des résultats appréciables, nous verrons que l'on s'intéresse beaucoup à leur biogenèse mais les méthodes d'isolement sont encore très empiriques et aucune n'a jamais permis l'isolement en quantité notable d'une substance définie. Il en est souvent ainsi en chimie végétale peut-être parce que les mises au point de méthodes d'isolement des divers constituants des plantes sont considérées par beaucoup de chercheurs modernes comme moins nobles que l'étude de leur structure ou de leur biogénèse et sans doute aussi parce qu'elles demandent une participation personnelle importante excluant l'emploi d'un appareillage physique automatique. Il est pourtant indispensable que la structure soit faite sur les vrais constituants des végétaux et non sur des artéfacts formés lors de l'extraction.

Les différents procédés d'extraction des tanins sont basés sur leurs solubilités dans l'eau et dans divers solvants et sur certaines de leurs propriétés chimiques découlant de leur nature polyphénolique. Il est important de souligner qu'un même procédé peut servir indifféremment à l'extraction de tanins condensés ou de tanins hydrolysables, ceci est normal puisqu'ils sont les uns et les autres hydrosolubles et polyphénoliques. Nous ne parlerons pas de l'extraction des phlobaphènes basée le plus souvent sur la solubilité de leurs formes moyennement condensés dans les alcools supérieurs.

La polymérisation des tanins résulte de leur oxydation. Celle-ci peut être le fait d'une réaction chimique classique ou être due à l'action d'enzymes, les oxydases, particulièrement répandues dans le règne végétal.

Les tanins possédant une structure glucosidique peuvent également subir l'action des glycosidases. Suivant la nature des sucres qu'ils renferment et selon les glycosidases

© The Author.All rights reserved

présentes il peut en résulter la formation d'hétérosides plus simples (hétérosides secondaires) ou le détachement de tous les sucres conduisant aux aglycones ou génines.

$$A - S_1 - S_2 \rightarrow A - S_1 \quad \text{ou} \quad A$$

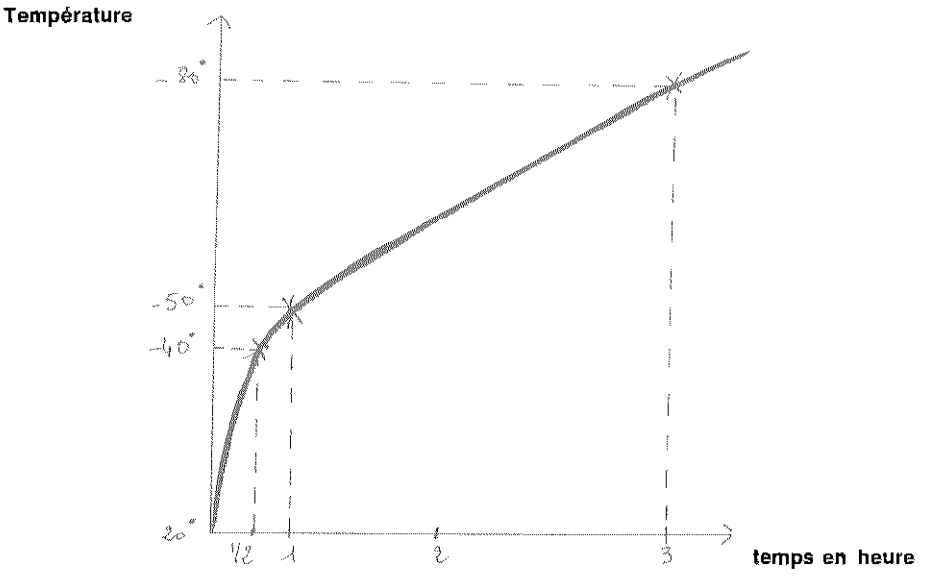
De ceci il résulte que ces molécules étant le plus souvent très fragiles il serait indispensable d'opérer sur du matériel frais ou stabilisé et de conduire l'extraction en évitant toute oxydation. L'emploi de plantes séchées sans précaution spéciale doit être réservé aux rares exemples où il a été prouvé que la structure des tanins n'a pas été modifiée lors du séchage, un séchage rapide ne suffit pas le plus souvent pour conserver les tanins intacts.

DIFFERENTS PROCEDES D'EXTRACTION

• **Congélation - Lyophilisation.** La congélation permet la conservation de matériel frais, sans altération, à condition qu'elle ait été bien conduite. Divers auteurs préconisent une congélation à —20°. Cette température est très souvent insuffisante. Les nombreuses études effectuées sur les plantes alimentaires ont suffisamment montré que seul un abaissement rapide de la température permettait une bonne conservation.

On utilise classiquement aujourd'hui des congélateurs et des fours tunnels permettant d'atteindre des températures de —80° à —100° et même, pour les organes fragiles, on refroidit par aspersion d'azote liquide. Au laboratoire, pour la conservation des plantes renfermant des corps polyphénoliques, nous les congelons entre —80° et —100°. D'autre part il est indispensable d'obtenir le plus rapidement possible la température de congélation du suc intracellulaire. Cette température de congélation est toujours inférieure à 0° en raison des substances dissoutes dans le suc. Elle varie de —0°,5 pour certains organes peu riches en substances de réserve, à —7° pour ceux renfermant une proportion élevée de lipides. En pratique, il est nécessaire que la température soit considérablement plus basse pour obtenir la congélation. En effet, au fur et à mesure de la solidification des liquides, il se produit un enrichissement des fractions restant liquides en produits dissous, ce qui abaisse leur point de congélation. En moyenne à —30°, 5 à 10 % du suc cellulaire n'est pas congelé.

Nous utilisons un congélateur qui nous permet de congeler selon le diagramme suivant :



© The Author.All rights reserved

Dans ces conditions les réactions enzymatiques sont pratiquement négligeables.

Lors de la décongélation les enzymes retrouvent leur activité et les altérations des tissus dues à des congélations insuffisamment rapides (rupture des parois cellulaires par de gros cristaux de glace) augmentent leur vitesse d'action. Dans les conditions les plus favorables on se retrouve presque dans le cas où l'on dispose d'un matériel frais. Toutefois, l'eau formée par fusion est liée moins fortement aux parois cellulaires que dans le produit frais. Ce phénomène est bien connu, c'est lui qui est responsable de la formation de jus lors de la décongélation de fruits ou de graines (fraises, petits pois, etc.).

Nous avons utilisé ce changement physique de structure cellulaire pour l'extraction de substances fragiles et en particulier des tanins. Si on soumet le matériel congelé à un broyage, il est possible de le presser et d'obtenir un suc cellulaire dont la température est seulement légèrement supérieure à la température de fusion. Dans ces conditions les actions enzymatiques sont pratiquement négligeables. Ce jus est aussitôt congelé et soumis à la lyophilisation et donne un résidu dans lequel les tanins ne doivent avoir subi que très peu de modifications. La séparation des tanins des autres corps les accompagnant pose des problèmes variés suivant la nature de ces substances. Disons simplement qu'il est très souvent préférable d'éliminer d'abord les substances étrangères que d'extraire les tanins.

Ce procédé d'extraction utilise l'eau du végétal comme solvant d'extraction. Il est d'ailleurs facile, dans les cas où la teneur en eau serait insuffisante pour dissoudre les tanins, d'hydrater le matériel par immersion préalable dans l'eau et même de l'hydrater après passage à la presse et de recommencer l'opération. Son inconvénient réside principalement dans le coût de l'opération mais il peut être utilisé pour l'obtention de quantités relativement faibles comme c'est le cas pour l'emploi en thérapeutique.

• **Stabilisation.** Pour éliminer les possibilités de réactions enzymatiques, il est classique de procéder à une stabilisation après la récolte dans un délai qui varie de quelques heures pour les organes très fragiles (ex. : fleurs) à quelques jours dans les cas où l'on traite des organes particulièrement riches en tissus lignifiés.

Les méthodes de stabilisation les plus couramment utilisées sont basées sur le traitement par des vapeurs de solvant, presque toujours eau ou éthanol (procédés Bourquelot et Perrot-Goris). Elles donnent des résultats à peu près acceptables lorsqu'on opère sur des organes fragiles et de faible épaisseur, mais ne conviennent pas pour ceux dont le diamètre atteint quelques millimètres surtout si un épiderme ou un suber épais jouent le rôle d'isolant. Nous savons, en effet, qu'il est indispensable que la montée en température soit suffisamment rapide pour que le temps de séjour aux températures optima d'action des enzymes soit aussi réduit que possible. Par exemple : il est admis, aujourd'hui, que la composition chimique de la racine de Valériane stabilisée par les vapeurs d'alcool se rapproche beaucoup plus de celle de la Valériane sèche que de celle de la Valériane fraîche.

Pour obtenir une montée rapide et homogène de température, on a proposé d'autres procédés, en particulier, les traitements par les I.R. ou par les courants hyper-fréquentiels. Le pouvoir pénétrant des I.R. est insuffisant et on provoque très souvent une altération des couches cellulaires externes, particulièrement riches en tanins, par suite d'une trop grande élévation de température.

L'emploi des courants hyper-fréquentiels n'avait fait, jusqu'à ces dernières années, l'objet que de peu de travaux. Cela était surtout dû aux difficultés de construction de l'appareillage se traduisant par un coût élevé et un fonctionnement délicat et irrégulier. L'introduction de ce mode de chauffage dans l'industrie et la cuisine (fours dans les grands restaurants) nous a permis de reconsidérer le problème de son emploi pour la stabilisation. Rappelons brièvement que la supériorité du chauffage hyper-fréquentiel sur les modes de chauffage conventionnels réside dans les faits que seule l'eau contenue dans l'organe s'échauffe, et que les parois cellulaires ne gênent pas leur pénétration en profondeur. Par voie de conséquence l'élévation de température est extrêmement rapide, de l'ordre de la minute pour 80°, et identique à tous les niveaux de l'organe ± 2° à 80°. Nous fondons beaucoup d'espoir sur ce mode de stabilisation que nous étudions au laboratoire.

© The Author.All rights reserved

EXTRACTION PAR SOLVANTS

• **Eau.** Il est évident que le premier solvant utilisé pour l'extraction des tanins a été l'eau et on l'emploie encore assez souvent aujourd'hui. Elle a l'avantage de permettre l'extraction de la totalité des tanins contenus dans un végétal. Cependant son emploi présente de nombreux inconvénients. D'abord il est difficilement possible de l'utiliser dans les appareils classiques d'extraction par solvant à l'état de vapeur, en raison des anomalies de sa viscosité. On est donc obligé d'opérer par percolation, par infusion ou par décoction, ce qui oblige, malgré la grande hydro-solubilité des tanins, à utiliser des quantités importantes de solvant. En moyenne, il est nécessaire d'employer une quantité d'eau correspondant à 20 fois le poids de drogue sèche pour les extractions effectuées par infusion et décoction et plus du double lorsqu'on emploie la percolation (les appareils d'extraction classiques demandent 3 à 5 fois le poids de solvant).

Ensuite les réactions d'oxydation et d'hydrolyse se produisent particulièrement rapidement en milieu aqueux, surtout à chaud, et le volume de solution extractive, rendant la concentration longue, facilite également ces réactions. Enfin, l'eau n'est pas un solvant sélectif, et en plus des tanins, elle extrait de nombreux autres constituants organiques ou minéraux.

• **Solvants hydroxylés.** Il est le plus souvent préférable d'utiliser des solvants hydroxylés au lieu de l'eau. Deux alcools sont très couramment employés, l'éthanol et le méthanol.

La solubilité des tanins dans le méthanol est en général suffisamment grande pour qu'on puisse l'utiliser pur, mais à l'éthanol absolu ou à 95° on doit souvent substituer les alcools dilués à 90° ou même 80°.

On a signalé quelques exemples d'extraction par l'acétone qui, grâce à sa forme énolique peut être considérée comme un solvant hydroxylé.

Ces solvants peuvent être utilisés dans des appareils d'extraction classiques et la concentration des solutions extractives ne pose pas de problèmes.

Lorsqu'on emploie des alcools purs pour l'extraction des tanins, il se produit souvent ce qu'on a appelé une anomalie d'extraction. En effet, différents auteurs ont signalé qu'il n'était souvent pas possible d'extraire la totalité des tanins présents dans une plante malgré leur solubilité dans l'alcool utilisé et ils donnent l'explication suivante pour ce phénomène. Selon leur structure et leur degré de polymérisation les tanins seraient plus ou moins fixés aux polysaccharides et aux protéines présents dans les membranes cellulaires et l'intervention de l'eau serait nécessaire pour rompre ces liaisons hydrogène. Ces liaisons sont d'autant plus difficiles à rompre que les tanins sont plus polymérisés. Nous sommes tout à fait d'accord avec cette explication, mais nous nous refusons à considérer qu'il s'agit d'une anomalie. En effet, de nombreux corps sont liés aux membranes cellulaires et dans la majorité des extractions utilisant les alcools nous avons constaté que l'addition d'une quantité variable d'eau facilitait l'extraction. Nous avons même constaté ce phénomène dans des cas d'extraction de saponines qui sont pourtant des tensio-actifs. Il est d'ailleurs souvent préférable d'humidifier la poudre avant de procéder à l'extraction par un alcool fort plutôt que d'opérer avec un alcool dilué, la désadsorption s'effectuant beaucoup mieux ainsi.

• **Autres solvants.** Divers autres solvants ont été essayés pour l'extraction des tanins dont l'acétate d'éthyle pour les tanins de nature glucosidique. Ces solvants permettent seulement d'obtenir une partie, généralement faible, des tanins totaux. Cette affirmation pourrait sembler curieuse à ceux qui penseraient au tanin officinal appelé aussi tanin à l'éther. Le début de la nomenclature qui lui est consacrée à la Pharmacopée Française indique que : « Le tanin est retiré de la noix de galle d'Alep à l'aide d'éther contenant à la fois de l'eau et de l'alcool... ». De cette phrase très ambiguë il semblerait découler que l'éther joue le rôle d'un des solvants d'extraction. Mais si on consulte un peu plus loin le paragraphe « Caractères » on lit dans les solubilités que ce tanin est insoluble dans l'éther. Je pense que mes collègues de la sous-commission de Galénique vont soumettre cette nomenclature à une nouvelle rédaction lors de la révision en cours de la Pharmacopée.

© The Author.All rights reserved

ESSAIS DE FRACTIONNEMENT

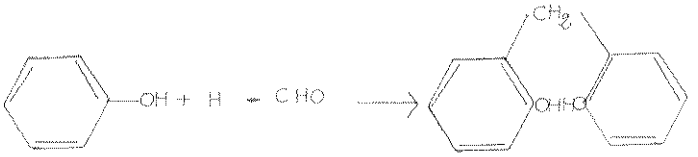
Dans une plante les tanins ne sont jamais représentés par un seul corps d'un poids moléculaire bien défini, mais par un mélange plus ou moins complexe de molécules. Ils sont toujours accompagnés des monomères dont ils proviennent, phénols divers, acide gallique, catéchol ou leucoanthocyanidines et dans le cas des tanins condensés par les polymères. Si les phlobaphènes sont facilement séparables des tanins en raison de leurs différences de solubilité, il n'en est pas de même des monomères. La séparation des différentes fractions est compliquée par le fait que tout traitement risque de provoquer des changements de structure et de poids moléculaire. On voit donc que le problème n'est pas simple et c'est pourquoi il n'a jamais été résolu de manière satisfaisante. On a en particulier utilisé les différences de solubilité dans les mélanges de solvants, eau-alcool, eau-acétone, alcool-acétone, alcool-éther. On a naturellement fait intervenir les diverses chromatographies, mais leur coût élevé les réserve à l'isolement des petites quantités nécessaires à l'étude des structures chimiques.

Ces tentatives de fractionnement sont encore compliquées dans les nombreux cas où tanins condensés et tanins hydrolysables existent à la fois dans une plante. Il est alors nécessaire de séparer quantitativement les tanins des deux groupes, ce qui nous conduit à parler maintenant des méthodes de dosage.

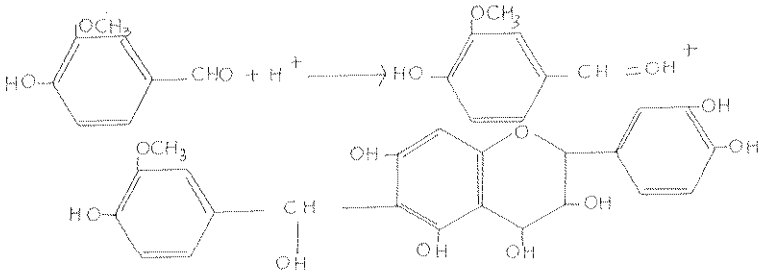
METHODES DE DOSAGE

Il existe de nombreuses méthodes de dosage des tanins mais elles ne permettent que rarement de doser séparément les deux types de tanins. Un groupe de méthodes basées sur l'oxydation des hydroxyles phénoliques ou sur la mesure au spectrophotomètre de coloration obtenues grâce aux OH phénoliques ne peut être utilisé qu'en l'absence d'autres corps phénoliques et les résultats sont donc toujours entachés de l'erreur due à la présence des monomères.

• **Tanins catéchiques.** Une seule méthode permet une bonne séparation des tanins catéchiques, elle est basée sur la réaction de Stiasny décrite il y a plus de cinquante ans. Cette réaction dite du formol chlorhydrique consiste à chauffer une solution de tanin avec du formol chlorhydrique, ce qui entraîne la précipitation des seuls tanins catéchiques. Il se produit la polymérisation classique des phénols grâce au formol, réaction qui est à la base de la préparation des bakélites.



Le remplacement du formol chlorhydrique par la vanilline chlorhydrique ou sulfurique donne des produits colorés qui permettent le repérage sur un chromatogramme papier ou plaque ou qui peuvent servir à un dosage spectrophotométrique.



On voit d'après ce mécanisme que la vanilline réagit sur le noyau du phloroglucinol. Par voie de conséquence, elle réagit d'autant moins que le tanin est plus condensé, ce qui rend souvent les résultats du dosage discutables.

© The Author.All rights reserved

a) **Méthodes par précipitation.** Voyons maintenant les principales méthodes de dosage s'appliquant à tous les tanins. Afin de séparer les tanins des autres corps pouvant fausser le dosage, on a proposé depuis longtemps de les précipiter par divers sels de métaux lourds et en particulier par les acétates de Pb, surtout l'acétate neutre. Le précipité formé est recueilli, lavé et décomposé par H_2S. On utilise également l'acétate de Zn à la place de l'acétate de Pb. Ces réactifs ne donnent pas de bons résultats mais quelquefois ils sont utilisés pour éliminer les tanins gênant l'extraction d'autres corps.

Mais il existe une méthode de dosage par précipitation qui est largement utilisée, c'est la méthode à la poudre de peau (shake method). Elle utilise la propriété qu'ont les tanins de se fixer sur les collagènes. On agite une solution de tanin avec de la poudre de peau chromée standard, préparée par l'Association Française des Chimistes du Cuir, on filtre et on détermine l'extrait sec de la solution. La différence entre le $\longrightarrow$ % d'extrait sec dosé avant l'addition de poudre de peau donne la quantité de tanins. Cette méthode a l'inconvénient d'exiger des conditions rigoureusement identiques pour être reproductible, mais elle a été adoptée par l'Association internationale des Industries du Cuir et la Pharmacopée Helvétique, et elle a reçu récemment un accueil favorable à la sous-commission de Matière Médicale de la Pharmacopée en vue de son inscription à la Pharmacopée Européenne.

On a proposé également de doser le précipité formé avec la poudre de peau.

b) **Méthodes volumétriques.** Les méthodes de dosages volumétriques sont basées sur l'oxydation des tanins par le permanganate de potassium, l'iode ou le bichromate de potassium, l'oxydation permanganique étant le plus souvent choisie. Elles présentent l'intérêt d'indiquer le nombre moyen d'hydroxyles phénoliques libres présents dans les molécules. On leur reproche un virage du réactif difficile à saisir, brun ou rose avec MnO_4K, on opère d'ailleurs souvent en présence de carmin d'indigo pour mieux saisir le virage.

c) **Méthodes colorimétriques.** Les phénols, et surtout les polyphénols, donnant des colorations intenses avec de nombreux métaux, on a choisi ceux qui donnaient les résultats les plus reproductibles. La plus utilisée est la méthode de Lang qui utilise la coloration bleue, donnée par le réactif phosphotungstique de Folin-Denis, dont l'intensité est mesurée à 730-760 nm. C'est la méthode qui a été retenue par la Pharmacopée Allemande de 1964 (D.A.B. 7).

On exprime parfois le résultat en acide tannique ou en pyrogallol en comparant la densité optique obtenue à celle donnée dans les mêmes conditions par ces phénols. Si on effectue un nouveau dosage des phénols restant en solution après élimination des tanins par la méthode à la poudre de peau, la différence des deux d_o donne la teneur en tanins vrais de la solution.

BIOSYNTHESE DES TANINS

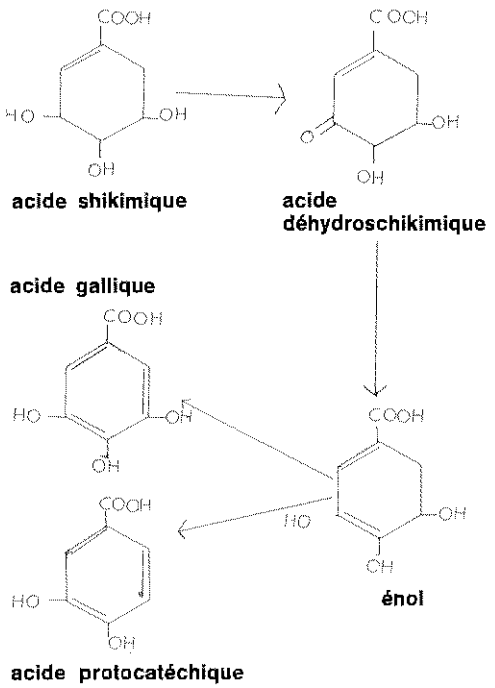
Les tanins se rencontrent dans les plantes appartenant à toutes les familles des Phanérogames, mais aussi chez les Cryptogames vasculaires. Cette distribution aussi vaste a toujours attiré l'attention des chercheurs s'intéressant au métabolisme des plantes et plus récemment celle des biochimistes s'occupant des problèmes de biosynthèse. Les tanins étant avant tout des phénols, il est normal d'exposer d'abord le mécanisme de formation des cycles phénoliques.

La formation des cycles A et B peut se faire par deux mécanismes différents, examinons ces deux types de biosynthèse.

• **Cycle B et cycle des tanins galliques.** Ce cycle B des tanins condensés peut comporter 3 substituants en 3, 4 et 5 dans les tanins condensés, figurant alors le pyrogallol ou l'acide gallique ou seulement 2 substituants en 3 et 4 correspondant à l'acide protocatéchique.

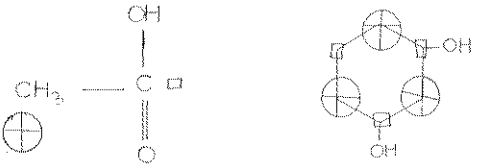
Davis, en 1955, a démontré que la formation de composés aromatiques pouvait se faire par l'intermédiaire de l'acide shikimique à partir du glucose et de l'acide phosphoénol-pyruvique, en étudiant les produits du métabolisme d'une culture d'Escherichia coli.

© The Author.All rights reserved



Des analyses effecuées au cours de la végétation ont confirmé ces différentes études. L'étude de ce métabolisme est plus difficile chez les plantes supérieures, mais il est certain que cette voie représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes.

• **Cycle A.** C'est en 1953 que Birch et Donovan ont confirmé que les noyaux aromatiques pouvaient se former à partir d'unités acétate, grâce au coenzyme A, par des réactions de réduction et d'acylation et par des énolisations.

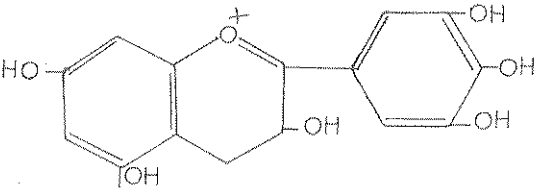


On comprend aisément les possibilités de soudure de ce cycle avec des homologues supérieurs des acides galliques ou catéchiques.

Cette condensation peut donner non seulement des tanins mais des flavones, des anthocyanes et des leucoanthocyanidines. Or, on a vu que les leucoanthocyanidines fournissaient par oxydation des tanins catéchiques. Cette oxydation se fait non seulement pendant la vie du végétal mais après sa mort et même après extraction des leucoanthocyanidines. On est sûr que les leucoanthocyanidines du vin se polymérisent au cours du vieillissement pour donner d'abord des tanins catéchiques, puis des phlobaphènes insolubles. Egalement au cours de la maturation du raisin, la teneur en tanins augmente grâce à cette transformation.

• **Marquage.** Pour étudier ces biosynthèses, on a eu recourt, ces dernières années, aux éléments marqués. Pour mettre en évidence la synthèse du noyau A par l'union de 3 molécules d'acide acétique, on a fourni aux plantes de l'acétate marqué au carbone 14. Récemment, Dainciart a arrosé des pieds de Muscat de Hambourg, en juillet, avec de l'acétate de sodium marqué. Après vinification, il a mis en évidence des leucoanthocyanes marqués sur le noyau A.

Enfin l'acide gallique peut se former au cours de la végétation ou lors de la conservation d'une plante par catabolisme. Les anthocyanes possédant 3 OH en 3, 4, 5 (Delphinidol) peuvent se couper et s'oxyder et donner de l'acide gallique.



© The Author.All rights reserved

Cette réaction est rapide dans les cas où elle s'adresse à des génines ou même à des monoglucosides, les diglucosides étant beaucoup plus stables.

Cela nous amène à dire que flavones, anthocyanes et tanins existent souvent sous forme glucosidique plus stable. Le mode de fixation de ces sucres est encore mal connu mais ces composés représentent certainement les formes actives au point de vue thérapeutique, il suffit de voir le succès de ces médicaments. C'est leur stabilité qui nous conduit à mettre au point, à partir des myrtilles, la seule méthode industrielle de préparation des glucosides d'anthocyanes.

REPARTITION - PROPRIETES

Les glucosides de tanins peuvent exister dans les plantes sous forme de complexes. Perrot et Goris ont les premiers montré la présence dans la Kola fraîche des complexes avec la caféine et on a retrouvé les associations de ce type avec divers alcaloïdes. Lemesle a signalé l'existence de la combinaison tanin-mucilage. Plus récemment, nous avons isolé avec Mme Pourrat, de plusieurs Rosacées (Fraisier, Pimprenelle et Eglantier), des complexes tanin-triterpènes et des tanins catéchiques.

Parler des plantes à tanin nous conduirait à une longue énumération. Les tanins, même ceux d'un même groupe, peuvent avoir des propriétés pharmacodynamiques très différentes. Il est classique d'écrire que les tanins possèdent des propriétés antiseptiques, comme les complexes tanins-triterpènes, antidiarrhéiques, astringents, qu'ils inhibent les enzymes, agglutinent les hématies et qu'ils sont utilisés en dermatologie.

Mais à partir de plantes d'intérêt thérapeutique très inégal, on a isolé les mêmes fragments de molécules qui ne possèdent pas l'activité de la drogue et on en conclut un peu hâtivement que l'emploi de la plante (Kinkeliba, Salicaire, Ratanhia...) n'était pas justifiée. Cette constatation peut d'ailleurs s'appliquer dans de nombreux cas où les tanins ne sont pas en jeu.

Traiter dans un seul exposé une question aussi vaste que les tanins impliquait la nécessité de faire un choix. A côté de points importants qu'il n'était pas possible de négliger, nous nous sommes surtout attachés à montrer les immenses possibilités de recherches dans ce domaine. Les procédés d'extraction, de séparation et de conservation n'ont guère fait de progrès depuis plusieurs décades et relèvent toujours d'un empirisme archaïque. Pour les tanins, plus peut-être que pour tout autre groupe de corps tirés du règne végétal, la chimie végétale doit permettre la découverte de nouveaux médicaments.

The chemistry of tannins and their biogenesis has made incontestable progress ; there are however many important points which are unknown. I only need as proof the definition admitted by all workers in this field : phenolic hydrosoluble substances having tanning properties in common.

It is classical to state that tannins have antiseptic properties as the tannin-triterpene complexes, are anti-diarrhea agents, are astringents, inhibit enzyme activity, agglutinate red blood corpuscules and are used in dermatology.

But from plants with very unequal therapeutic values, the same molecular fragments have been isolated which have none of the activity the drug had, and it has been concluded rather hastily that the use of the plant (Kinkeliba, Loosestrife, Ratany...) has been unjustified. This could however be said to apply in cases where tannins do not have a role.

We have above all tried to show the immense research possibilities in this field. Extraction, separation and preservation methods have made no progress, and have remained archaically empirical. For tannins more than for any other group of compounds obtained from the other vegetal kingdom, vegetal chemistry must allow the discovery of new medicaments.

© The Author.All rights reserved

IMAGE DE LA CHIMIE AROMATIQUE

PLURESSENCES

ESSENCES D'AGRUMES CONCENTREES

CITRON / ORANGE / MANDARINE

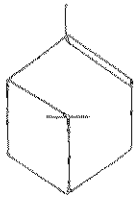
© The Author.All rights reserved

Biogénèse des monoterpènes bicycliques*

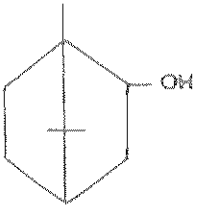
chez Rosmarinus officinalis L. et Lavandula Stoechas L.

MM. GRANGER, PASSET et Mlle ARBOUSSET

[illegible]



α-pinène



bornéol

Si la composition qualitative des essences de romarin est assez constante, le taux des constituants varie par contre dans des proportions considérables selon l'origine géographique : de 7 à 27 % pour l'α-pinène, de 1 à 35 % pour l'eucalyptol, de 1 à 29 % pour la verbénone, de 1 à 38 % pour le camphre.

Les différences de composition quantitative des essences « collectives » semblent relever surtout de facteurs écologiques, car l'influence des saisons ne se manifeste que par des variations assez faibles du taux de chacun des constituants.

La composition d'une essence « collective » est fonction de celle des essences « individuelles » qui la composent. Or, les populations sont généralement hétérogènes au point de vue chimique : les individus se répartissent en trois types principaux selon le composé prédominant de l'essence : camphre, bornéol ou verbénone, avec de nombreuses formes intermédiaires.

L'essence de **Lavandula Stoechas L.** a une composition plus simple que celle de **Rosmarinus officinalis L.** La somme des deux principaux constituants camphre et fenchone est en effet toujours supérieure à 75 % et peut atteindre 98 %. La fenchone domine pondéralement dans cinq essences « collectives » examinés (50 à 88 %) tandis que dans la sixième, provenant de Corse, le camphre est majoritaire. D'autre part, chez sept plantes récoltées le même jour au même endroit et distillées individuellement, le taux de fenchone varie de 60 à 70 % et celui du camphre de 12 à 30 %.

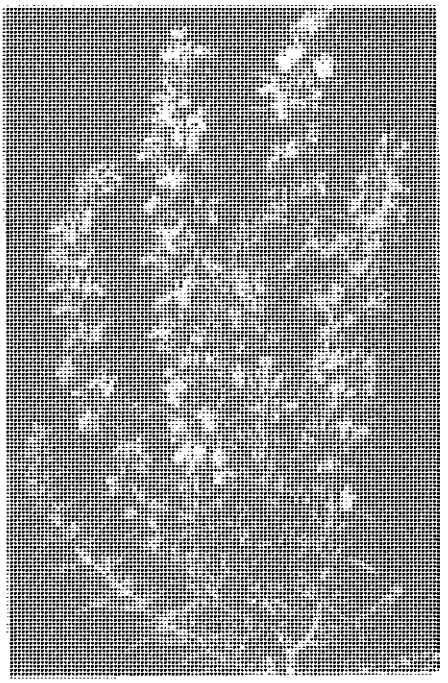
On se trouve en présence de plantes d'où l'on peut isoler des terpènes bicycliques appartenant aux trois séries : pinane, bornane et fenchane, aux fins de déceler d'éventuelles corrélations structurales.

Les couples α-pinène-verbénone, bornéol-camphre chez **Rosmarinus officinalis L.** et fenchone-camphre chez **Lavandula Stoechas L.** sont ainsi successivement examinés.

L'α-pinène est très répandu dans le monde végétal, alors que la verbénone n'a été signalée, par contre, que rarement. La présence de cette dernière serait courante dans les essences riches en α-pinène et altérées par le contact de l'air ce qui pourrait laisser supposer qu'elle provient de l'auto-oxydation du pinène.

* Conférence prononcée à Lourmarin au cours de la XVIe Journée de l'Aromatique, 8 mai 1971.

© The Author.All rights reserved



Chez **Rosmarinus officinalis L.** la verbénone est un constituant normal, puisqu'elle existe dans l'essence fraîchement distillée, et de plus elle présente un pouvoir rotatoire dextrogyre constant, proche du maximum connu. L'activité optique de l'α-pinène par contre est variable, ce qui indique l'absence de relations stériques rigoureuses entre les deux composés, puisqu'un mélange des (+) et (—) α-pinène doit conduire à un mélange en proportions identiques des (+) et (—) verbénones.

Il ne semble pas toutefois que ces deux composés de la série pinane puissent provenir de précurseurs différents, et il est plus vraisemblable d'envisager une oxydation enzymatique préférentielle de la forme (+) α-pinène.

Deux composés de la série bornane sont présents simultanément dans l'essence de romarin : camphre et borméol. In vitro, la réduction du camphre conduit au borméol de même signe, avec conservation de la stéricité et avec un certain pourcentage d'isoborméol de signe opposé. Cette concordance stérique ne se retrouve pas dans le romarin, et il faut envisager également un système oxydo-réducteur intéressant préférentiellement l'un des énantiomères du camphre ou du borméol.

Chez **Lavandula Stoechas L.**, l'une des cétones bicycliques présente (camphre) appartient à la série bornane, tandis que l'autre (fenchone) a le squelette fenchane. RUZICKA fait découler les cations « bornyle » et « fenchyle » du même cation « pinanyle » précurseur, par extension de cycle.

La configuration absolue des deux cétones optiquement actives étant connue et compte tenu de la spécificité de la transposition que démontre la construction des modèles moléculaires, on doit s'attendre à ce qu'un cation stériquement défini engendre camphre et fenchone de même signe.

Or chez **Lavandula Stoechas L.** la fenchone est constituée par l'énantiomère dextrogyre pratiquement pur dans toutes les essences, tandis que le camphre est composé par le mélange des deux isomères optiques, avec prédominance de l'un ou de l'autre selon l'essence examinée. La synthèse asymétrique est donc spécifique pour la fenchone et ne l'est pas pour le camphre, ce qui infirme l'hypothèse de Ruzicka et milite à envisager l'indépendance de leurs voies biogénétiques.

L'ensemble des observations ne concorde pas avec la conception des interconversions entre les composés présents dans les essences. Il semble plus vraisemblable d'admettre la présence d'un ensemble de voies enzymatiques parallèles et concurrentes, procédant toutes du pyrophosphate de néryle par l'intermédiaire du cation non classique dont la charge, en se fixant sur différentes positions, oriente la cyclisation vers l'une des structures pinane, bornane ou fenchane.

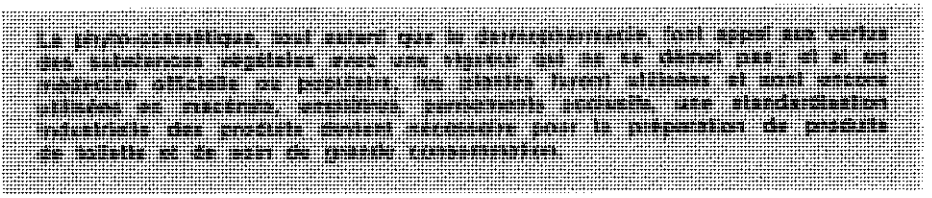
L'équilibre du système enzymatique peut être plus ou moins déplacé en faveur de l'une des voies et il en résulte une prépondérance des composés qui en découlent. La structure moléculaire étant déterminée, des processus oxydatifs ou réductifs s'exercent également selon un équilibre qui peut favoriser la formation de l'un ou l'autre des isomères optiques.

The biogenesis of monoterpenes, despite their apparent structural simplicity, has remained little known. The method, little used until now, consists in comparing the optical activity of these components which are optically active and has allowed the genesis of the acyclic and monocyclic terpenes of THYMUS VULGARIS L.; it has been taken up for the study of the monoterpenes of two meridional Labiates rich in these compounds : ROSMARINUS OFFICINALIS L. and LAVANDULA STOECHAS L.

© The Author.All rights reserved

Calendula Phytocosmétique

Note du Laboratoire d'application de Gattefossé Ets



Entre une substance végétale fraîche et un produit de soin appliqué sur la peau, s'accumule un nombre important de transformations physiques, chimiques, biologiques, qui méritent d'être connues et contrôlées.

A l'origine la plante, Calendula officinalis par exemple, est connue pour ses applications médicales et pharmaceutiques à l'état d'extrait, alcoolature, pommade ou mélange d'herboristerie : c'est la fleur entière, en pleine maturité, qui est utilisée et traitée pour l'obtention d'une préparation qui, à priori, et pendant longtemps on s'en est tenu là, assure la liaison végétal-récepteur biologique ou encore fleur-peau.

Les méthodes nouvelles d'extraction et de contrôle conjuguées à des expérimentations cliniques et esthétiques permettent de mieux orienter la technologie industrielle et les applications.

En médecine, en usage externe notamment, Calendula est prescrit à l'état de préparation alcoolique ou huileuse, pour ses propriétés :

- décongestionnantes, antiphlogistiques, diaphorétiques, topiques, circulatoires, antiséborrhéiques.

Toutes ces propriétés ont un point commun : elles intéressent le mouvement des liquides cutanés, les sécrétions, le mouvement de l'eau, la circulation du sang. En résumé on pourrait avancer que Calendula est un stimulateur cutané, un excitant dermique.

Ses effets curatifs sur les plaies, ulcères, cicatrices, brûlures, impétigo, peaux d'orange, etc., peuvent s'expliquer par cette propriété de « stimulation ».

En cosmétique et en dermopharmacie, les effets recherchés ne peuvent et ne doivent être aussi héroïques, aussi phénoménaux, mais ils peuvent être, et ils sont, de même nature.

C'est ainsi que les centres d'esthétique, certains dermatologues et autres cosméticiens, rapportent des expérimentations ou des utilisations très positives et très favorables de Calendula comme :

- agent anti-séborrhéique (et pores dilatés)
- agent anti-inflammatoire (couperose)
- agent sédatif des peaux irritées.

En revitalisant le derme, par l'excitation vraisemblable des fonctions sudoripares et circulatoires, Calendula redonne à la peau sa morphologie et sa physiologie, une peau souple, fine, lisse, sensible et vivante.

Calendula est un nom (R. BENIGNI rapporte son origine étymologique du latin Calendulae : « le premier jour du mois » puisque la plante fleurit tous les mois, presque toute l'année), mais aussi contribue à la préparation d'un produit qui dans des conditions précises d'emploi, conduit à la manifestation des effets cutanés signalés ci-dessus.

Ces mêmes effets sont attribués aux composants chimiques de la plante qui

© The Author.All rights reserved

sont très connus qualitativement et quantitativement.

Si la graine de Calendula renferme à l'état sec plus de 40 % d'huile riche en acide poly-insaturé, la fleur par contre, et pour ses vertus ornementales, est exceptionnellement riche en substances caroténoïdes (3 p. cent). Ces substances sont constituées de carotène, flavochromone, flavoxanthine, xanthophylle, etc...

Ces pigments sont accompagnés d'huile fixe et de résine, d'acides organiques dont l'acide malique (6 à 7 p. cent), de substances aromatiques terpéniques et de vitamine C.

Il n'est pas possible d'attribuer à tel ou tel constituant l'effet thérapeutique ici, et là l'effet cosmétique. Ce serait aller contre la phyto-cosmétique dont un des principes admet qu'une substance végétale développe des propriétés biologiques sur la peau par la combinaison harmonieuse de ses constituants en répartition naturelle, à l'état naturel. On peut néanmoins accorder au complexe caroténoïde une préférence.

Par voie de conséquence, les préparations médicales et cosmétiques à base de Calendula ont toujours été faites avec des huiles, graisses ou alcools susceptibles d'extraire tout ou partie des substances caroténoïdes. C'est ce que nous avons réalisé sur le plan industriel avec Végétol huileux Calendula 4192.

Mais dans le souci d'extraire la majeure partie des constituants de la fleur dans leur état naturel, avec leur liaison aux tanins, sucres et saponines, nous avons étudié et appliqué une extraction à l'aide d'un solvant poly-alcoolique associé à des substances amphiphiles (huiles végétales polyoxyéthylénées) susceptibles d'extraire des substances de polarité diverse.

Le produit obtenu, Calenfil 3646, soumis à l'analyse chromatographique montre une somme de composants plus importants et plus nombreux.

En outre le solvant extractif possède par lui-même des propriétés de diffusion par le jeu de son amphiphilie, très favorables à la mise en disponibilité biologique des composants de Calendula au niveau de la peau.

L'ajout de substances aromatiques à l'extrait huileux permet la préparation d'une variante très séduisante d'extrait de Calendula.

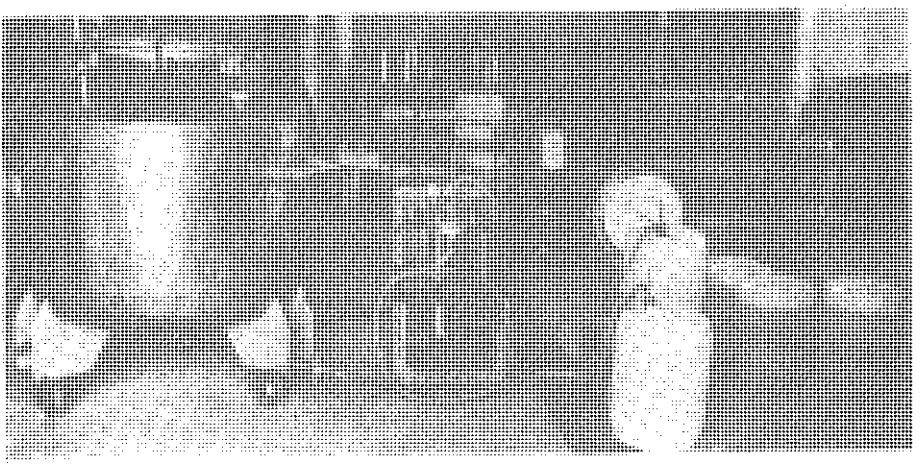
Aux propriétés stimulantes de Calendula mises à la disposition de l'épiderme par l'huile végétale amphiphile, s'ajoutent les propriétés eudermiques des huiles essentielles qui semblent prendre le relais sur les récepteurs biologiques : après le mouvement et la mobilisation de l'eau, des sécrétions, doit s'installer une excitation tonique des couches profondes du derme.

Une histo-pharmacologie d'une extrême délicatesse devrait être abordée pour confirmer nos assertions.

Qu'il s'agisse d'un extrait huileux standard, d'extrait Calenfil, ou d'extrait aromatique, le Calendula demeure une association de substances biologiques donc fondamentalement fragile. Producteurs, transformateurs, consommateurs, prennent toutes précautions pour éviter hydrolyse et oxydation, contamination métallique, pollutions bactériennes et fongiques.

Chaque lot de fabrication subit le contrôle bactériologique qui complète l'analyse chimique et physique, colorimétrie trichromatique, indice de saponification, pH, etc...

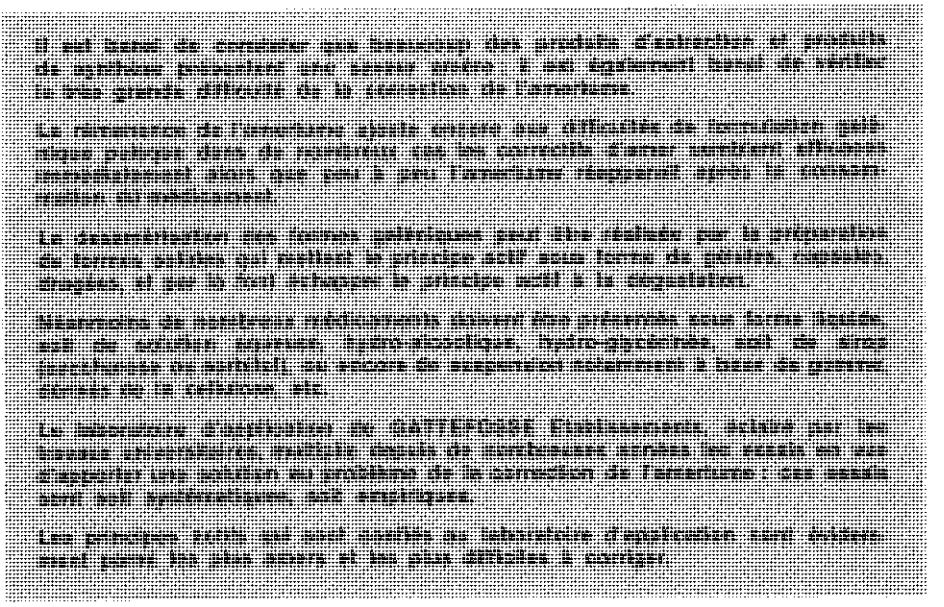
L'identification chromatographique sur couche mince peut être doublée d'une spectrographie dans ultra-violet qui donnera une image définie et constante du produit.



© The Author.All rights reserved

Mise au point d'une technique de desamérisation

Travail du Centre d'Aromatisation
professeurs A. VERAIN et G. BIENVENU
et du Laboratoire d'Application de GATTEFOSSÉ, D. FELISAZ



Nous nous proposons de diminuer, à titre expérimental, voire de supprimer totalement la perception de la saveur amère d'un principe actif médicamenteux : le chlorhydrate de quinine, incorporé au sein de deux formes destinées à l'administration par voie orale : la forme soluté et la forme sirop.

Pourquoi ces choix ?

- Le chlorhydrate de quinine est choisi comme standard de l'amertume dans de nombreux pays. Cet alcaloïde est d'un maniement aisé et présente en outre une solubilité remarquable dans les véhicules aqueux.
- Les formes liquides (soluté et sirop en l'occurrence) sont les plus difficiles à utiliser du point de vue correction du goût amer, à cause des faibles concentrations en principe amer susceptibles d'être décelées par l'homme (5×10^{-6} grammes de chlorhydrate de quinine / 1 ml de soluté aqueux). Par contre, les formes liquides présentent une souplesse de manipulation que n'offrent pas, par exemple, les formes pulvérulentes et à plus forte raison, les formes solides.
- Sur ces deux formes précédemment définies, nous voulons mettre en pratique conjointement deux techniques : une technique de masquage de l'amertume proprement dite, associée à une aromatisation.

* Extrait de la présentation faite au cours de la Table ronde du 14 septembre 1971 à Grenoble.

© The Author.All rights reserved

I - LES TECHNIQUES DE MASQUAGE DE L'AMERTUME

Nos précédents travaux sur la correction de l'amertume nous ont laissé entrevoir la possibilité d'aborder le problème du masquage de l'amertume par trois voies possibles :

1) Modifier la viscosité du milieu,
2) Ajouter des solutions salines à faibles concentrations,
3) Modifier la tension superficielle.

Deux de ces techniques suivent les principes directeurs émis par Eastland et Short. La troisième est une donnée nouvelle que nous avons voulu introduire ici.

Chacune de ces techniques a été étudiée séparément de manière à obtenir des résultats valables, permettant de comparer l'efficacité des techniques entre elles.

Nous avons mené conjointement nos essais sur un soluté aqueux de chlorhydrate de quinine à la concentration de 5 grammes de principe actif amer pour 1 000 grammes de soluté (5 p. mille) et sur un sirop de chlorhydrate de quinine à la même concentration de 5 p. mille.

• **Utilisation d'un jury de dégustation** : L'appréciation de l'intensité de l'amertume des échantillons a été confiée à un jury de cinq personnes (trois hommes et deux femmes) non fumeurs, et en bonne santé.

Le code de l'intensité de l'amertume ressentie par les membres du jury était le suivant :

très amer	: + + +
amer	: + +
légèrement amer	: +
amer non perceptible	: O

• **Autres goûts** : les définir : stryptique, astringent, salé, etc.

Les dégustations se faisaient chaque jour, entre 11 heures et midi.

1) Modification de la viscosité du milieu :

Nous avons cherché à augmenter la viscosité du soluté et du sirop de chlorhydrate de quinine en utilisant un certain nombre de polymères, parmi lesquels :

— la gomme arabique,
— la carboxyméthylcellulose,
— la méthylcellulose,
— la polyvinylpyrrolidone.

Déjà, par rapport au soluté, le sirop de chlorhydrate de quinine présente une certaine viscosité, due à la grande quantité de sucre entrant dans sa composition. Il est un fait que la forme sirop est mieux tolérée que la forme soluté au point de vue amertume, par la totalité du jury de dégustation. La raison de cette prédilection est peut-être double : elle tient sûrement au caractère édulcorant du sucre qui tend à diminuer notablement l'intensité de l'amertume de la quinine, et peut-être également à l'augmentation de viscosité du milieu provoqué par ce même sucre.

Pour vérifier ce phénomène, il y a donc intérêt à opérer conjointement les essais de viscosité sur les deux formes : soluté et sirop, pour voir la part qui revient au seul sirop et celle qui est le fait de l'intervention des polymères cités précédemment.

• **Formes d'utilisation de ces polymères** : les quatre polymères choisis sont tous solubles dans l'eau, à froid ou à chaud selon leur nature.

• **Gomme arabique** : nous avons utilisé la gomme arabique en larmes, en vue de la préparation d'une solution aqueuse à 33 p. cent. Au bout de 24 heures de contact, la dissolution de la gomme arabique dans l'eau est totale. On filtre pour éliminer les débris végétaux. L'odeur de la solution aqueuse rappelle celle de la farine. La saveur est mucilagineuse.

• **Carboxyméthylcellulose sodique** : ce corps se présente sous la forme d'une poudre blanche, granuleuse, hygroscopique. On en fait une dispersion aqueuse à la concentration de 2 p. cent. La dispersion s'effectue dans de l'eau portée à 70° - 80° C, sous agitation constante. Après refroidissement, on obtient une solution colloïdale. L'odeur et la saveur de la solution sont nulles.

• **Méthylcellulose** : poudre granuleuse blanchâtre, constituée de grains vermiculés, opaques, de consistance fibreuse. On disperse les granulés dans de l'eau chaude, non bouillante, sous agitation constante (concentration = 1 p. cent). La pseudosolution obtenue est visqueuse, transparente et contient quelques fragments non dispersés. On filtre sur gaze. La pseudosolution ainsi préparée est inodore et insipide.

• **Polyvinylpyrrolidone** : poudre fine blanche, légèrement hygroscopique, soluble dans l'eau froide. Pour obtenir une viscosité supérieure à celle de l'eau, il est nécessaire d'incorporer la PVP à un taux supérieur à 10 p. cent. On a préparé une solution de PVP au taux de 35 p. cent. Cette solution ne présente ni odeur, ni goût caractéristiques, mais semble s'altérer au cours de la conservation (développement d'une teinte jaune orangé de plus en plus soutenue).

© The Author.All rights reserved

● **Comportement rhéologique de ces quatre polymères :** le comportement rhéologique est défini d'après l'analyse d'un rhéogramme obtenu grâce aux données d'un viscosimètre coaxial, à cisaillement : « Contraves AG - Epprecht Rhéomat 15 ».

— La gomme arabique et la polyvinylpyrrolidone se comportent comme des substances dites Newtoniennes, c'est-à-dire qu'il existe un rapport linéaire entre les gradients de vitesse de rotation et la force de cisaillement.

— La carboxyméthylcellulose sodique et la méthylcellulose se comportent comme des substances pseudoplastiques. Pour de telles substances, la viscosité dépend du gradient de vitesse choisi, jusqu'au moment où les molécules sont toutes dirigées dans le sens de la direction d'écoulement.

Les résultats obtenus :

Pour réaliser les échantillons d'essais, nous traitons une prise d'essai de soluté de chlorhydrate de quinine ou de sirop par des concentrations croissantes du polymère dont nous voulons analyser les effets. Nous soumettons ensuite les échantillons au jury pour la dégustation.

A - UTILISATION DE LA GOMME ARABIQUE :

On réalise une gamme avec la solution de gomme arabique à 33 p. cent, de manière à ce que les échantillons terminés renferment 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 grammes de gomme pure pour 100 grammes d'échantillon.

a) **Avec le soluté de chlorhydrate de quinine à 5 p. mille :** soumis à la dégustation, le jury a estimé que l'échantillon renfermant 40 g de gomme pure / 100 g de soluté était le plus « acceptable » au point de vue amertume, dans la gamme proposée. On ne peut donc tirer aucun enseignement avec le soluté.

b) **Avec le sirop de chlorhydrate de quinine à 5 p. mille :** les meilleurs résultats de « couverture » de l'amertume semblent être donnés par les échantillons renfermant 40, 36 et 32 grammes de gomme pure. De plus, si on compare les échantillons réalisés avec, d'une part le soluté et d'autre part le sirop de chlorhydrate de quinine, pour la même concentration de 40 g de gomme pour 100 g d'échantillon, on constate un meilleur masquage de l'amertume de la quinine dans le cas du sirop que dans le cas du soluté. Donc, le sirop intervient pour une bonne part dans la couverture de l'amertume.

B - UTILISATION DE LA CARBOXYMETHYLCELLULOSE SODIQUE :

On utilise une dispersion aqueuse à la concentration de 2 p. cent en carboxyméthylcellulose sodique. On réalise une première gamme très étalée, avec comme concentrations : 10, 30 et 50 grammes de solution de CMC pour 100 grammes d'échantillon, ce qui correspond à : 0,2 g, 0,6 g et 1 g de carboxyméthylcellulose pure.

a) **Avec le soluté de chlorhydrate de quinine :** le jury choisit l'échantillon renfermant la concentration la plus élevée en carboxyméthylcellulose sodique (1 p. cent), mais fait remarquer que l'effet de masquage de l'amertume est moins évident que celui enregistré avec la gomme arabique.

b) **Avec le sirop de chlorhydrate de quinine :** la concentration optimum de carboxyméthylcellulose sodique est 0,6 g / 100 g de sirop (30 g de solution de CMC à 2 p. cent). L'effet de « couverture » de l'amertume de la quinine est plus net dans le cas du sirop que dans le cas du soluté, mais on peut faire la même remarque que ci-dessus.

C - UTILISATION DE LA METHYLCELLULOSE :

La solution de départ de méthylcellulose est réalisée par dispersion de 1 g de méthylcellulose dans 99 g d'eau permutée (concentration = 1 p. cent). On constitue une gamme analogue à celle réalisée pour la carboxyméthylcellulose sodique, c'est-à-dire : 0,1 g, 0,3 g et 0,5 g de méthylcellulose pure pour 100 g d'échantillon (10 g, 30 g et 50 g de solution de méthylcellulose pour 100 g de prise d'essai).

a) **Résultat obtenu avec le soluté de quinine :** le meilleur résultat est enregistré avec la concentration de 0,50 g de méthylcellulose pure / 100 g de soluté.

b) **Avec le sirop de chlorhydrate de quinine :** ici également, la concentration de 0,5 g de méthylcellulose pure / 100 g de sirop donne le meilleur masquage de l'amertume dans la gamme proposée.

Comme pour la carboxyméthylcellulose, on peut dire que la méthylcellulose ne possède pas les mêmes caractères que la gomme arabique, au point de vue « couverture » du goût amer de la quinine.

— *Comparaison entre les caractères de la gomme arabique, d'une part, et de la carboxyméthylcellulose et méthylcellulose d'autre part :*

© The Author.All rights reserved

— Si l'on fait les calculs de viscosité correspondant aux trois polymères que nous venons de passer en revue, on obtient :

• **Pour la gomme arabique** : échantillon renfermant 36 g de gomme pure / 100 g de sirop :

- viscosité égale à : 470 centipoises environ.

• **Pour la carboxyméthylcellulose sodique** : échantillon renfermant 0,6 g de carboxyméthylcellulose sodique pure / 100 g de sirop :

- viscosité égale à : 556 centipoises.

• **Pour la méthylcellulose** : échantillon renfermant 0,5 g de méthylcellulose pure / 100 g de sirop de quinine :

- viscosité égale à : 100 centipoises environ.

• **Remarque** : pour le carboxyméthylcellulose et pour la méthylcellulose, les calculs de viscosité ont été établis à partir de valeurs choisies dans la portion rectiligne des courbes (rhéogrammes), là où les molécules sont toutes dirigées dans le sens de la direction d'écoulement (la courbe d'écoulement devient alors assimilable à une ligne droite).

Si l'on compare les valeurs de viscosité relatives à la gomme arabique et à la carboxyméthylcellulose sodique, on constate qu'elles sont sensiblement égales. Ces deux polymères devraient donc donner, à quelque chose près, le même pouvoir masquant vis-à-vis de l'amertume du chlorhydrate de quinine.

Or il n'en est rien, bien au contraire. Car paradoxalement, la carboxyméthylcellulose et la méthylcellulose totalement dépourvues de goût et d'odeur sont unanimement rejetées par l'ensemble des membres du jury de dégustation, à cause de l'impression désagréable ressentie lors du contact des échantillons renfermant ces polymères avec la cavité buccale, alors que les échantillons contenant de la gomme arabique qui possède un goût et une odeur spécifiques, sont mieux tolérés par les personnes du jury.

La viscosité n'est donc pas à considérer seule. La notion de texture du polymère joue aussi un grand rôle et participe au phénomène général d'acceptation ou de refus de la part des personnes ayant mission de déguster.

Il est un fait que la gomme arabique, substance dite Newtonienne, s'écoule de manière uniforme et s'étale de façon à former un film, lorsqu'on la verse sur une surface lisse et plane, alors que la carboxyméthylcellulose et la méthylcellulose, substances dites pseudoplastiques, s'écoulent en paquets, à la manière d'une crème. Elles ne forment pas de film lorsqu'on les étale sur une surface plane. De là, réside également la difficulté à augmenter la concentration de la solution de départ de carboxyméthylcellulose ou de méthylcellulose.

En augmentant la concentration du polymère, on augmente conjointement la viscosité, mais on arrive à un état de semi-gel, qui en limite les applications dans le cas présent. De plus, il y a des conditions de pH et de température à respecter si l'on veut préserver les caractères propres de ces deux polymères.

D - UTILISATION DE LA POLYVINYLPYRROLIDONE :

La solution de départ préparée à la concentration de 35 p. cent dans de l'eau permutée montre une viscosité de valeur très peu élevée si on la compare à celle de la gomme arabique préparée à une concentration sensiblement équivalente (viscosité égale à 190 centipoises environ pour la PVP, contre 340 centipoises environ pour la gomme arabique).

Bien que substance newtonienne, la polyvinylpyrrolidone dénuée de goût et d'odeur, n'a pas été appréciée par le jury lors des essais préliminaires, ce qui l'a fait abandonner d'emblée.

2) Incorporation de solutions salines à faibles concentrations :

Par solutions salines, on entend : solution aqueuse de chlorure de sodium codex.

On prépare une solution aqueuse à la concentration de 10 p. cent en chlorure de sodium (p/p).

On opère sur le soluté et sur le sirop de chlorhydrate de quinine. On réalise une gamme, en concentrations molaires :

• **sur le soluté** : 1/2000, 1/1000, 1/900, 1/800, 1/700, 1/600 de mole de NaCl pur,

• **sur le sirop** : en concentrations molaires : 1/10000, 1/5000, 1/4000, 1/3000, 1/2000, 1/1000, 1/900, 1/800, 1/700, 1/600 et 1/500 de mole de NaCl.

Résultats obtenus :

a) **sur le soluté aqueux de chlorhydrate de quinine** : meilleur abaissement du seuil de l'amertume pour une concentration molaire de 1/900 de mole de chlorure de sodium.

b) **sur le sirop** : on observe, au cours de l'augmentation de concentration molaire de NaCl, une élévation sensible et continue du seuil de l'amertume avec un maximum ressenti pour une concentration de 1/800 de mole de chlorure de sodium,

© The Author.All rights reserved

puis le seuil de l'amertume baisse brusquement pour les concentrations : 1/700 de mole de NaCl et 1/600 de mole, où l'amertume ressentie est à son seuil le plus bas.
Puis la concentration molaire augmentant encore, on assiste pour une concentration de 1/500 de mode de NaCl, à une inversion du phénomène : l'amertume qui avait été bien atténuée, se démasque à nouveau. De plus, à cette réapparition de l'amertume primitive se surajoute une saveur salée très nette qui renforce celle-ci.
Donc, on constate que la plage d'efficacité du chlorure de sodium est assez réduite : la dose ayant une action bénéfique sur l'amertume est comprise dans un intervalle de 1/2500 de mole de NaCl environ, ce qui réduit considérablement le domaine d'application.

3) Modification de la tension superficielle du milieu :

Dans nos travaux préliminaires, lors de l'aromatisation du sirop de chlorhydrate de quinine par des huiles essentielles d'agrumes, il avait été nécessaire d'incorporer de manière concomitante un agent de solubilisation, en l'occurrence un oléate de polyoxyéthylène glycol (« Olépal III »). Cet agent solvatant réalise une modification de la tension superficielle du milieu, et nous avons voulu savoir si cette variation de tensio-activité avait une action directe sur la perception de l'amertume du chlorhydrate de quinine.
Pour ce faire, nous avons utilisé un agent tensio-actif plus commode d'emploi que l' « Olépal III » : le stéarate 1540.
Nous avons mené les essais conjointement sur le soluté aqueux et sur le sirop de chlorhydrate de quinine (à 5 p. mille).

Résultats obtenus :

Nous avons réalisé une solution aqueuse concentrée de stéarate 1540 au taux de 10 p. cent (p/p), que nous avons incorporée dans le soluté et dans le sirop de manière à réaliser une gamme s'étageant de 5 p. cent à 40 p. cent de solution aqueuse de stéarate 1540, soit de 0,5 à 4 p. cent en poids de stéarate 1540 pur.
Les résultats les plus nets ont été observés sur le sirop de chlorhydrate de quinine, bien que dans ce cas il soit difficile de préciser des concentrations actives de stéarate 1540 : les résultats obtenus s'inscrivent dans une courbe en dents de scie. Disons que les concentrations optimales en stéarate 1540 sont assez élevées : 3 à 4 p. cent en produit pur, ce qui n'est pas négligeable, car l'on se heurte à des problèmes de solubilisation.

En effet, le sirop de chlorhydrate de quinine étant un milieu saturé, il ne reste pas suffisamment d'eau pour assurer la mise en solution de l'agent tensio-actif que l'on ajoute.

Nous avons utilisé une solution aqueuse concentrée de stéarate 1540 (taux de 10 p. cent). La conséquence est que l'on assiste assez rapidement et sous les conditions de conservation normales (à la température du laboratoire) à un phénomène de « relargage », se traduisant par une séparation de phases : l'agent tensio-actif se sépare de la phase dispersante (sirop) et vient « précipiter » en surface, entraînant à sa suite une cristallisation partielle du chlorhydrate de quinine. On remédie à ce phénomène en diluant l'ensemble de la préparation par 10 p. cent d'eau et en procédant à une agitation à la turbine.

Si nous regardons maintenant les valeurs de la tension superficielle, exprimées en dynes/centimètre, et données par le tensiomètre Lecomte du Noüy (méthode de l'arrachement d'un anneau métallique) après étalonnage, nous pouvons dire que l'addition de stéarate 1540 au sirop de chlorhydrate de quinine, entraîne une diminution très nette de la valeur de la tension superficielle de celui-ci, et ce pour une très faible concentration de tensio-actif (0,5 p. cent de stéarate 1540 pur). Les additions progressives de solution de stéarate 1540 n'entraînent pas une diminution très importante de la tension superficielle : en effet la valeur de celle-ci passe de 46,5 dynes/cm pour une concentration de 0,5 p. cent (p/p) de stéarate 1540 pur, à 43 dynes/cm pour une concentration de 4 p. cent, comme le confirme le tableau ci-dessous :

Eau à 24° C = tension superficielle			= 73,5	dynes/cm
Sirop de chlorhydrate de quinine	=	TS	= 74	dynes/cm
Solution de stéarate 1540 à 10 p. cent	=	TS	= 41	dynes/cm
Sirop + 0,5 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 46,50	dynes/cm
Sirop + 1 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 46,25	dynes/cm
Sirop + 1,5 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 45	dynes/cm
Sirop + 2 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 43,5	dynes/cm
Sirop + 3 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 43,1	dynes/cm
Sirop + 4 p. cent de stéarate 1540	=	TS	= 43	dynes/cm

© The Author.All rights reserved

En conclusion, on peut dire que l'abaissement de tension superficielle due à l'addition d'agent tensio-actif entraîne une légère diminution de l'intensité de l'amertume du sirop de chlorhydrate de quinine, mais l'on ne peut en tirer aucune loi générale, car il est difficile de déterminer avec précision une concentration efficace en stéarate 1540, parmi celles qui sont valables.

Disons que cette concentration optimale se situe dans l'intervalle 3 à 4 p. cent en stéarate 1540.

Ayant passé en revue les techniques de masquage de l'amertume, voyons maintenant l'aromatisation proprement dite :

II - L'AROMATISATION

Nous n'avons pas fait varier à l'infini les techniques d'aromatisation. De nos précédents travaux, nous avons dégagé deux orientations possibles pour l'aromatisation des formes liquides à base de chlorhydrate de quinine : l'aromatisation par les agrumes : orange, citron, mandarine, et l'aromatisation par les sirops de fruits rouges : framboise et cerise, principalement.

Les essais ont été menés de pair sur le soluté et sur le sirop de quinine.

a) **Sur le soluté de chlorhydrate de quinine :**

Le jury a porté son choix sur l'essence soluble d'orange* au taux de 1 p. cent en poids, suivie par ordre décroissant, par l'essence soluble de mandarine** à 3 p. cent, le mélange de concentrés de framboise (2 p. cent) et de cerise (3 p. cent), l'essence soluble d'orange à la concentration de 3 p. cent.

b) **Sur le sirop de chlorhydrate de quinine :**

Les résultats sont évidemment plus significatifs : le jury a désigné le mélange essences solubles orange (1,5 p. cent), mandarine (0,3 p. cent), citron (0,15 p. cent), suivi par le concentré de framboise (2 p. cent) ; et avec le même score : le concentré de cerise (2 p. cent), et enfin l'essence soluble de mandarine (1,5 p. cent).

Mais ce que l'on peut retenir au vu de ces résultats, c'est que pour lutter contre l'amertume, il est toujours nécessaire de passer par le masquage avant de procéder à l'aromatisation.

Ainsi, les résultats obtenus avec le sirop de quinine sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec le soluté, car dans le sirop, le sucre assure un masquage non négligeable grâce à son caractère édulcorant et à l'augmentation de viscosité du milieu, dont il est la cause.

C'est dans le but d'associer techniques de masquage et techniques d'aromatisation que nous avons procédé à une combinaison des méthodes que nous venons de passer en revue. C'est-à-dire que sur une forme galénique donnée, en l'occurrence le sirop de chlorhydrate de quinine à 5 p. mille, nous avons procédé à des modifications de viscosité, de tension superficielle, par l'apport d'éléments dont nous venons de voir le comportement, chacun pour leur compte, au sein de ce même sirop.

A cela, il faut ajouter également l'apport de chlorure de sodium, et la mise en œuvre d'arômes dont nous venons de sélectionner quelques éléments et de définir leur concentration optimum d'emploi.

Il est certain que l'association de tous ces paramètres crée des difficultés d'interprétation, car il est difficile de prévoir à long terme le comportement d'une préparation au sein de laquelle se trouvent intimement mêlés des corps tels que la gomme arabique, le chlorure de sodium, le stéarate 1540, le chlorhydrate de quinine, le saccharose, sans oublier le ou les arômes. Il se produit nécessairement des interactions chimiques qui peuvent conduire à des modifications d'activité pharmacodynamique du principe actif, ce qui est préjudiciable, ou bien à des altérations de goût et d'odeur, ce qui serait contraire au résultat recherché.

Dans certains cas, une incompatibilité brutale entre un ou plusieurs éléments conduit à une modification plus ou moins immédiate de l'aspect de la préparation (opalescence, louche, floculation, précipitation). Il est alors aisé de constater son échec et de modifier ses paramètres. Mais bien souvent, l'incompatibilité se développe au cours du temps et conduit à une dégradation progressive de l'état physique du milieu, si bien que l'on ne peut accorder sa préférence à une technique donnée, au vu de résultats flatteurs de masquage de l'amertume et d'un bon aspect de la préparation, alors que quinze jours plus tard, la même préparation aura évolué dans un sens défavorable.

D'où l'intérêt de mettre en œuvre, dans le cas de préparations jugées acceptables par le pharmacien, des techniques de conservation variées telles que la mise à l'étuve à 37° C, la conservation aux basses températures, l'exposition à la lumière solaire, à l'obscurité, etc.

* Solarome orange.
** Solarome mandarine.

© The Author.All rights reserved

III - ANALYSE DES RÉSULTATS OBTENUS

Nous nous sommes bornés à étudier l'influence que pouvait avoir la combinaison des différentes techniques de masquage et d'aromatisation sur une forme galénique définie : le sirop de chlorhydrate de quinine. Nous laissons de côté le soluté correspondant, puisque nous venons de voir que les résultats étaient plus probants avec le sirop.

• A ce sirop nous avons associé :

un polymère : la gomme arabique, choisie en fonction des qualités exprimées plus haut,

un électrolyte : le chlorure de sodium, dont nous avons vu le mode d'action sur l'amertume,

un tensio-actif : le stéarate 1540, qui possède une petite propriété anti-amer,

un aromatisant : ou un ensemble d'aromatisants, choisi parmi les essences d'agrumes et les concentrés de fruits rouges : framboise et cerise,

essences d'agrumes :
- essences solubles (Solarome) de citron, orange, mandarine (Gattefossé),
- Huiles essentielles concentrées et déterpénées : « Pluressences » citron, orange, mandarine (Gattefossé),

concentrés de fruits rouges :
- Arôme concentré naturel de framboise, renforcé artificiellement.
- Arôme naturel, sans alcool, de cerise, renforcé artificiellement.

Comportement de ces divers arômes vis-à-vis du milieu où ils sont incorporés :

• **Essences solubles** (Solarome) : On pourrait craindre une incompatibilité entre la gomme arabique et l'alcool éthylique à 70° servant à solubiliser l'huile essentielle de citron, d'orange ou de mandarine. En fait, les faibles concentrations d'essences solubles utilisées (inférieures à 5 p. cent) expliquent la parfaite tolérance existant entre la gomme et ces essences solubles. On ne constate l'apparition d'aucun louche dans le milieu. Il est possible que le stéarate 1540 joue un rôle favorable dans le cas présent.

Au point de vue technique, l'incorporation de l'essence soluble au sein du sirop se fait, sans précaution préalable, en fin d'opération. Cette incorporation est suivie d'une vive agitation à la turbine.

• **« Pluressences » :** Ces huiles essentielles nécessitent l'utilisation d'un agent de dispersion. Dans le cas présent, le stéarate 1540 joue parfaitement ce rôle. De plus, le pouvoir émulsif de la gomme arabique n'est pas négligeable et participe aussi à la mise en solution des Pluressences. Cependant, pour éviter tout effet de « relargage » du tensio-actif, il est nécessaire d'incorporer de manière concomitante une petite quantité d'eau permutée.

Il est à noter que le « relargage » du tensio-actif entraîne bien entendu celui de la Pluressence qu'il est chargé de disperser au sein du milieu.

Au point de vue mode opératoire, on peut utiliser deux techniques différentes :

• Si l'on incorpore le stéarate 1540 sous forme de solution aqueuse à 10 p. cent :

On prépare une dispersion de la Pluressence au sein de la solution de tensio-actif en respectant le rapport 10/1 (10 volumes de tensio-actif pour 1 volume de Pluressence). On ajoute ensuite le sirop renfermant le principe actif, la gomme arabique et le chlorure de sodium. On procède en même temps à une vive agitation (à la turbine) pour assurer une dispersion homogène de l'huile essentielle au sein de la préparation. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que l'on opère à la température du laboratoire.

• Si l'on veut utiliser le stéarate 1540 dans sa forme d'origine : Il se présente sous la forme d'une masse cireuse, dont le point de fusion se situe entre 45 et 50° C. La fusion doit rester effective pour permettre l'incorporation de la Pluressence. Le sirop doit être porté également à cette température de 50° C et ajouté à l'ensemble : huile essentielle - stéarate 1540. L'agitation doit être poursuivie jusqu'au refroidissement de l'ensemble.

Au point de vue efficacité de ces deux méthodes, on peut dire que la première conduit dans les 48 heures à un « relargage » de l'ensemble tensio-actif - Pluressence, bien que le stéarate 1540 soit apporté sous forme de solution aqueuse.

Il est nécessaire d'incorporer à la préparation de l'eau permutée dans la proportion de 5 à 10 p. cent, pour assurer une bonne homogénéité de l'ensemble et une bonne stabilité dans le temps.

La deuxième méthode, quoique plus délicate à mettre en œuvre, se traduit également par un « relargage » du stéarate 1540 et de la Pluressence, mais l'apparition de celui-ci se fait plus tardivement que dans le cas précédent : ce n'est qu'au quatrième jour que l'on note une opalescence en surface, conduisant 24 heures plus tard à une phase distincte.

© The Author.All rights reserved

N°	GOMME ARABIQUE	CHLORURE DE SODIUM (p. cent)	STEARATE P.E.G. 1540 (p. cent)	SIROP DE CHLORHYDRATE DE QUININE (p. cent)	AROMATISANTS
1	Solution à 33 % = 30 % (→ 9,9 % gomme pure)	0,09	3 + eau = 10	56,71	Pluressence orange = **0,2 %**
2	30 % de solution	0,09	2 + eau = 7	55,91	Concentré framboise = **3 %** Concentré cerise = **2 %** } **5 %**
3	25 % solution (→ 8,25 % gomme pure)	0,09	3 + eau = 10	60,31	Solarôme orange = **0,5 %** Solarôme citron = **0,5 %** Solarôme mandarine = **0,6 %** } **1,6 %**
4	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	60,76	Pluressence orange = **0,15 %**
5	30 % solution	0,09	3 + eau = 10	56,71	Pluressence orange = **0,06 %** Pluressence citron = **0,06 %** Pluressence mandarine = **0,08 %** } **0,2 %**
6	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	60,81	Pluressence orange = **0,1 %**
7	25 % solution	0,09	3 + eau = 10	59,91	Solarôme orange = **2 %**
8	25 % solution	0,09	3 + eau = 10	60,41	Solarôme orange = **1,5 %**
9	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	57,91	Concentré framboise = **3 %**

© The Author.All rights reserved

10	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	57,91	Concentré cerise = **3** %
11	25 % Solution	0,09	3 + eau = 10	60,91	Solarôme orange = **1** %
12	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	60,81	Pluressence citron = **0,05** % Pluressence mandarine = **0,05** % } **0,1** %
13	25 % Solution	0,09	2 + eau = 7	64,41	Essence soluble citron = **1** % Essence soluble mandarine = **0,5** % } **1,5** %
14	25 % Solution	0,09	2 + eau = 7	65,11	Solarôme citron = **0,25** % Solarôme orange = **0,25** % Solarôme mandarine = **0,3** % } **0,8** %
15	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	60,81	Pluressence orange = **0,03** % Pluressence citron = **0,03** % Pluressence mandarine = **0,04** % } **0,1** %
16	25 % Solution	0,09	1 + eau = 5	68,41	Solarôme orange = **0,5** %
17	25 % Solution	0,09	2 + eau = 7	64,41	Solarôme citron = **1,5** %
18	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	58,41	Concentré cerise = **2,5** %
19	30 % solution	0,09	2 + eau = 7	58,41	Concentré framboise = **2,5** %

© The Author. All rights reserved

L'accélération du phénomène peut être effectuée si l'on soumet la préparation à des variations de température (étuve à 37°, température ambiante, chambre froide à + 4°, etc.). On peut pallier à cet inconvénient du relargage par l'addition d'eau permutée, mais à une concentration de 5 à 10 p. cent seulement. (Dans le cas précédent, en plus des 5 à 10 p. cent d'eau, il fallait tenir compte de la dilution du stéarate 1540).

Notre préférence ira à cette deuxième méthode, pour les essais d'aromatisation qui vont suivre :

- **Concentrés de fruits rouges :** Il n'existe pas de problèmes particuliers pour l'incorporation des sirops de framboise ou de cerise au sirop de chlorhydrate de quinine. La seule précaution consiste à assurer une bonne agitation de l'ensemble afin d'obtenir une parfaite homogénéité de teinte au sein de la préparation.

Nous présentons les résultats d'aromatisation obtenus sous forme de tableaux, correspondant aux trois types d'arômes utilisés : essences solubles d'agrumes, « Pluressences » d'agrumes, concentrés de fruits rouges : framboise et cerise.

Pour chaque essai réalisé, nous précisons la formule de la préparation en pourcentage, étant bien entendu que nous raisonnons en poids/poids.

Les résultats sont classés par ordre décroissant, selon leur appréciation par le jury de dégustation, et compte tenu de la stabilité des préparations

IV - CONCLUSION

En conclusion nous pouvons dire que la juxtaposition d'éléments de nature chimique différente entraîne, par réactions réciproques, des modifications de comportement : ainsi, tel composé qui s'était montré efficace vis-à-vis du masquage de l'amertume de la quinine lorsqu'il agissait seul, pourra perdre cette propriété lors de son association avec d'autres éléments.

Il peut y avoir synergie d'action ou antagonisme. En fait, on constate un tout. La dégustation ne permet pas de définir avec exactitude la part prise par chaque élément dans la lutte contre l'amertume. D'où la nécessité d'étudier chaque paramètre de manière très précise afin d'en saisir toute la portée et de prévoir les conséquences d'une combinaison de deux, puis de trois paramètres.

Nous nous sommes limités ici à l'étude de la viscosité, de la tension superficielle, du rôle joué par le chlorure de sodium. Mais, d'autres paramètres interviennent inévitablement, tels que le pH, qui varie nécessairement, ne serait-ce que par la mise en jeu d'aromatisants à caractère nettement acide, comme les concentrés de fruits rouges (framboise, cerise).

Or, il est reconnu qu'un excès d'acidité renforce l'amertume. Il est donc nécessaire de parvenir à un certain équilibre entre tous les paramètres qui conditionnent une sensation aussi complexe que la sensation gustative.

We are planning experimentally to decrease, and even suppress completely the bitter taste of a medically active substance : Quinine chlorohydrate, incorporated in two types of medicament to be taken orally : The solute and the syrup type.

Our previous work on the elimination of bitterness has enabled us to see three different possible ways of disguising it :

1) Modify the viscosity of the medium

2) Add low concentration saline solutions

3) Modify surface tension

Two of these techniques follow the main principles of Eastland and Short. The third principle is a new one which we want to introduce here.

We can say that the mixing of different chemical compounds produces, by inter-reactions, some modifications of properties : Consequently, a compound which has been efficiently disguising the bitterness of quinine when on its own, might loose this property when associated with other compounds.

© The Author.All rights reserved

Apport de la viscosimétrie à l'étude de la cinétique chimique au sein d'hydrogels à base de Carbopol

Professeur J.-C. Etter, Ecole de pharmacie (Lausanne)

La prédiction du délai de péremption d'une préparation médicamenteuse exige une étude approfondie de sa stabilité. On s'efforce de réduire la durée nécessaire pour établir une date limite en effectuant des essais de vieillissement accéléré.

Pour simplifier, on peut considérer trois catégories de préparations :

1) Celles qui se comportent comme des **systèmes homogènes** du point de vue de la cinétique chimique, par exemple les solutions aqueuses dont la concentration en principe actif est $\leqslant$ à 0,01 m.
2) Celles qui se rapprochent de la première catégorie et que je dénomme **systèmes quasi-homogènes,** par exemple les solutions aqueuses, pharmaceutiques, dont la concentration en principe actif est nettement supérieure à 0,01 m, et à la limite les pseudo-solutions du type micellaire.
3) Celles enfin qui doivent être considérées comme des **systèmes hétérogènes,** tels que les systèmes dispersés dont le degré de dispersion n'est ni moléculaire ou ionique, ni micellaire, par exemple les onguents, les émulsions, les comprimés, etc.

Jusqu'à un certain point, on peut établir l'ordre des réactions qui se déroulent en phase homogène et leur appliquer l'équation d'Arrhénius

$$\left(\log K = \log A - \frac{E}{2{,}303\,R} \cdot \frac{1}{T}\right)$$

à condition de respecter quelques paramètres tels que :

— choix d'une concentration idoine en substance médicamenteuse
— maintien du pH initial par l'emploi de systèmes-tampon judicieusement choisis
— travail dans des enceintes thermostatées à différentes températures (T_1, T_2, T_3)
— détermination, voire estimation, de l'activité des ions présents à l'aide du calcul de la force ionique.

Souvent la rigueur d'une méthode physico-chimique doit céder le pas à l'approximation d'une technique galénique, car les problèmes posés au pharmacien diffèrent de ceux que le chimiste est appelé à résoudre.

Les hydrogels

De nombreux polymères naturels, semi-synthétiques ou synthétiques minéraux ou organiques, permettent de gélifier une phase aqueuse et il est intéressant de savoir jusqu'à quel point on est en droit d'assimiler les hydrogels aux systèmes homogènes, éventuellement aux quasi-homogènes.

* Présentée lors du colloque, 15 septembre 1970, Saint-Priest.

© The Author.All rights reserved

Activité et force ionique

Au sein d'une phase aqueuse, la relation entre l'activité et la concentration d'une substance dissociable peut être démontrée par l'exemple suivant :

	$[CH_3COOH]$	$[CH_3COO^-]$	calcul du pH d'un tampon acétate — sans tenir compte des activités $pK_a + \log \frac{[Ac^-]}{[HAc]} = pH$		en tenant compte des activités $pK_a + \log \frac{(Ac^-)}{(HAc)} = pH$	
sol. :						
1)	1 n	1 n	0	4,76	0,25	4,51
2)	0,1 n	0,1 n	0	4,76	0,12	4,64
3)	0,01 n	0,01 n	0	4,76	0,045	4,71
4)	0,001 n	0,001 n	0	4,76	0,017	4,74
			[ ] symbolise les concentrations		( ) symbolise les activités	

en sachant que $pK_a = 4,76$ et en appliquant une formule de Debye-Hückel

$$pH = pK_a + \log \frac{[Ac^-]}{[HAc]} + \log f_{Ac^-}$$

$$\log f = - \frac{A \; z^+ \; z^- \; \sqrt{u}}{1 + \sqrt{u}} \quad \text{où } A = 0,5$$

u représente la force ionique, notion introduite par Lewis et Randell, qui s'exprime par la demi-somme des termes obtenus en multipliant les concentrations de chaque ion, exprimées en modalité, par le carré de leur valence, soit

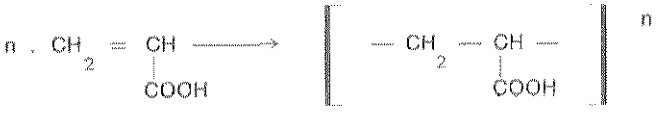
$$u = \frac{1}{2} \sum_{1}^{i} c_i \, z_i^2$$

Les valeurs déterminées **expérimentalement** au pH-mètre correspondent à celles qui sont calculées en tenant compte des activités et non des concentrations. Il est possible, en travaillant par « approche », d'ajouter des quantités aliquotes de NaCl aux trois dernières solutions, pour augmenter leur force ionique et pour obtenir 4 solutions possédant chacune le même pH, soit 4,51.

Lorsque l'on effectue une étude cinétique chimique, par exemple d'un alcaloïde tel que la pilocarpine ou d'un anesthésique local tel que la procaïne, on s'efforce de travailler avec des solutions aqueuses possédant chacune la même force ionique.

Les polyélectrolytes

Les polymères ioniques, auxquels se rattachent les CARBOPOL, sont actuellement désignés par le terme de « polyélectrolytes », qui souligne leurs caractères concomitants de macromolécule et de substance électriquement chargée. Les différents CARBOPOL son obtenus principalement par copolymérisation de l'acide acrylique



mais si le fabricant est fort discret sur leur constitution exacte, nous savons qu'ils sont plus complexes que ne le laisse entrevoir l'équation ci-dessus.

© The Author.All rights reserved

Mise au point d'une préparation à base de polyélectrolytes

Le pharmacien qui aborde, dans le cadre d'un laboratoire de développement galénique, l'étude de la stabilité d'une substance médicamenteuse au sein d'un hydrogel carbopolique peut connaître, par une recherche bibliographique, les constantes qui régissent la cinétique chimique de nombreux principes actifs, dissous dans une phase homogène. Si ces constantes sont encore inconnues, il devra les établir par une étude préalable en solution aqueuse, ceci dans des conditions précises de pH, de température, de force ionique, etc. En possession de ces constantes, il peut adopter deux attitudes extrêmes :

— l'adjonction de 0,5 à 1 % de Carbopol à une phase aqueuse, suivie de sa « neutralisation », permet de gélifier celle-ci, donc d'obtenir un gel de belle tenue. La faible teneur en agent gélifiant, qui correspond à une perte en eau égale ou inférieure à 1 pour cent, ne doit pas modifier les constantes qui régissent la décomposition du principe actif, par exemple son hydrolyse. — Par conséquent, le galénicien confectionne son gel et ne sacrifie pas aux dieux physico-chimistes.

ou

— le polyélectrolyte qu'est le Carbopol, déjà à faible concentration, peut modifier non seulement la structure de l'eau, mais la force ionique de la phase aqueuse. Or, certains admettent qu'il existe une relation linéaire entre le log de la constante de vitesse et la racine carrée de la force ionique. — Par conséquent, le galénicien va étudier sérieusement cette influence du polyélectrolye et se perdre dans un labyrinthe où aujourd'hui le fil d'Ariane est concrétisé par quelques techniques rhéologiques.

Si vous estimez que la première attitude du galénicien en cause est la meilleure, alors ma conférence se termine ici et je vous remercie de votre attention. Mais, si vous préférez la deuxième démarche, alors vous m'autorisez à prolonger cet exposé.

Influence des électrolytes

Soucieux de maintenir le pH initial au cours des essais de vieillissement à l'accéléré, le galénicien qui envisage de tamponner un gel à base de CARBOPOL se heurte à une difficulté sérieuse : ces gélifiants sont incompatibles avec les électrolytes qui provoquent une baisse considérable de la consistance de leurs gels.

De nombreux auteurs (Fischer [1], Bauer [2] et Wiberley [3], Ory [4] et Steiger) ont abordé l'étude rhéologique des CARBOPOL, dont les dispersions présentent un comportement non newtonien dans un large domaine de concentration. Il est relativement aisé de mettre en évidence ces chutes de viscosité de structure, dues surtout aux électrolytes monovalents (les bi- et trivalents précipitent ces polymères), à l'aide d'un viscosimètre tel que le Rhéomat 15.

Cependant, on peut procéder différemment, en se limitant à des plages de concentration en CARBOPOL où leur comportement est pratiquement newtonien (état limite cher à M. Mahler).

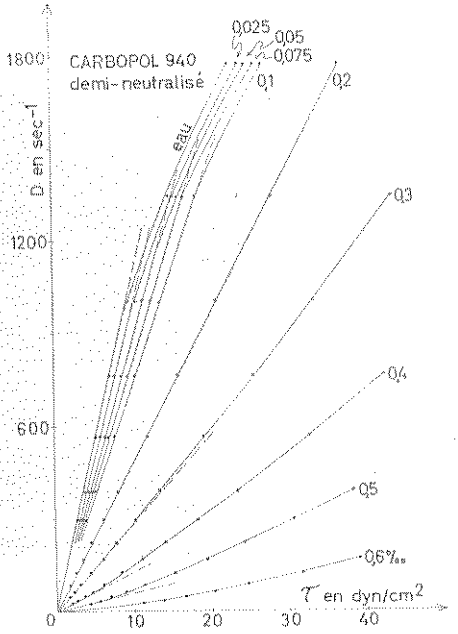


Fig. 1

Ainsi, dans les limites précisées dans le rhéogramme de la figure 1, une dispersion demi-neutralisée de CARBOPOL 940 à 0,03 % n'est pseudo-plastique que pour D supérieur à 300 sec^{-1}.

© The Author.All rights reserved

Cette manière d'opérer fournit des renseignements qui permettent de mieux suivre les interactions macromoléculaires.

Rappelons succinctement quelques définitions :

— connaissant la viscosité η d'une dispersion à concentration c et la viscosité η_o du milieu de dispersion (toutes deux pratiquement newtoniennes), on peut définir une viscosité spécifique η_{sp} et une viscosité réduite η_{red} telles que

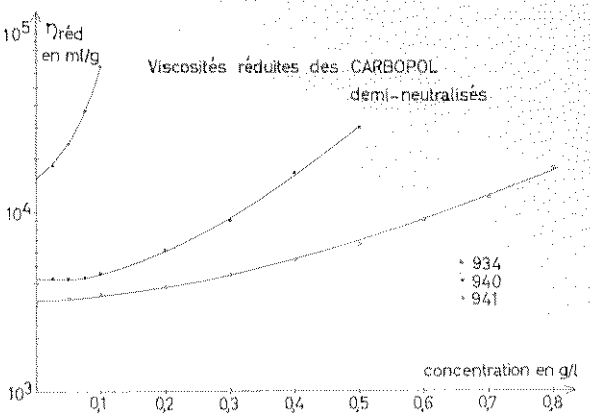
$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_o}{\eta_o} \quad \text{et} \quad \eta_{red} = \frac{\eta - \eta_o}{\eta_o} \cdot \frac{1}{c} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

La viscosité réduite, extrapolée pour c tendant vers zéro devient la viscosité intrinsèque désignée par $[\eta]$, cette dernière grandeur étant l'expression des propriétés physico-chimiques d'une macromolécule sans interaction avec ses voisines, c'est-à-dire à dilution infinie.

Fréquemment, la η_{red} s'exprime en ml/g.

Lorsque, sur un graphique, on porte en ordonnées la viscosité réduite et sa concentration en abcisses, on obtient les courbes suivantes :

Fig. 2



L'axe des ordonnées est logarithmique, ce qui signifie que la viscosité réduite croît de manière exceptionnellement rapide par rapport à la concentration. On est loin d'une relation tendant à la linéarité, preuve des interactions très fortes entre les macromolécules du polymère.

L'influence d'un électrolyte (par ex. du NaCl) sur les dispersions de CARBOPOL peut être étudiée à l'aide de la viscosité intrinsèque et de la variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère.

A partir d'un gel de CARBOPOL 940 exactement demi-neutralisé, on prépare quatre séries dont la teneur en NaCl est connue et comprenant chacune 5 dilutions du polymère. On remarque, sur la figure 3, que les interactions entre les macromolécules sont diminuées par la présence d'un électrolyte, cause de la baisse de la consistance des gels aux concentrations usuelles.

Dans le cadre de notre conférence, nous n'irons pas au-delà de cette modeste constatation.

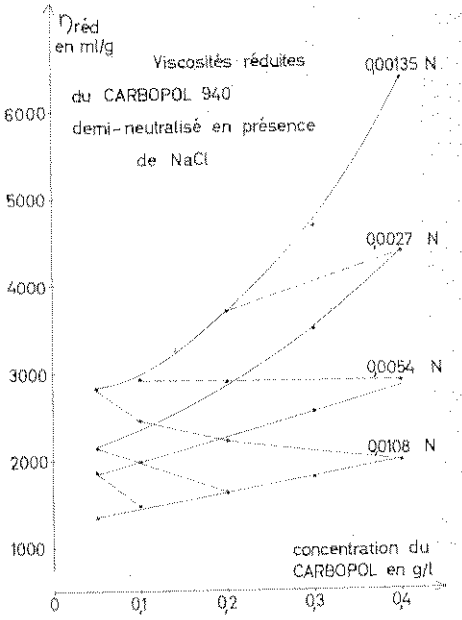


Figure 3

© The Author.All rights reserved

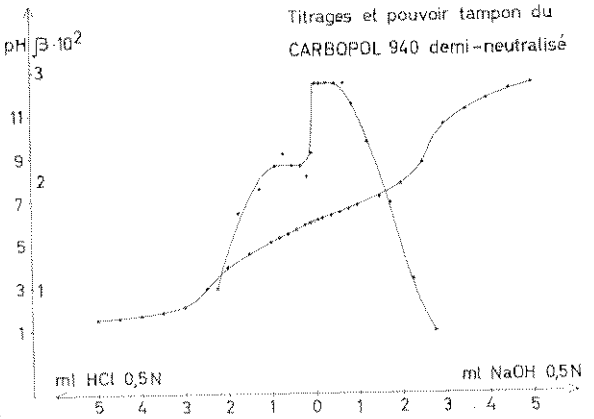
Pouvoir-tampon des CARBOPOL

Puisque les CARBOPOL sont sensibles à la présence d'électrolytes, on ne peut guère leur ajouter des systèmes-tampons formés d'un acide faible et d'un sel de cet acide.

Par ailleurs, dans les cinétiques d'hydrolyse, il faut disposer d'un milieu dont le pH est maintenu constant par adjonction d'un tampon idoine.

Si l'on détermine le pouvoir-tampon des CARBOPOL en espérant obtenir des résultats qui permettent d'utiliser ces polymères à la fois comme gélifiants et comme substances-tampon, on est comblé. En effet, ainsi que le montre la figure 4, le

Figure 4



pouvoir-tampon du CARBOPOL est réel puisqu'il vaut environ la moitié de celui d'un tampon acétate de même normalité. Le pouvoir-tampon β est défini selon Martin[5] et coll., par l'expression $\beta = \frac{\Delta B}{\Delta pH}$ où ΔB est le nombre d'équivalent-grammes ajoutés par litre de solution tampon.

Comportement des CARBOPOL à une température supérieure à la normale

La consistance des gels de CARBOPOL n'est pratiquement pas modifiée lorsqu'on les porte aux températures exigées par les essais de vieillissement accéléré.

Poids moléculaires des CARBOPOL

Par des titrages potentiométriques et conductimétriques, on détermine les poids équivalents des CARBOPOL ; le poids équivalent peut se définir comme étant le « poids moléculaire » d'une unité monomérique ; expérimentalement 73,5 pour le 934
74 940
73 941

alors que la B. F. Goodrich Chemical Company indique 75, approximation suffisante si l'on tient compte de l'humidité du produit à la livraison (supérieur à 72, donc présence de ramifications).

Il faut déterminer maintenant le P. M. du copolymère : Bueche et Harding[6] ont publié une méthode originale pour déterminer le P. M. de polymères linéaires où l'on étudie le comportement rhéologique des polymères linéaires en pelotes statistiques selon leur expression. Ces auteurs tiennent compte des forces de rotation, de compression et de dilatation exercées sur le polymère par la contrainte de cisaillement τ ; ils prouvent que la chute de viscosité n'est pas seulement fonction du gradient de vitesse D, mais aussi d'un temps de relaxation Θ. Celui-ci est un paramètre moléculaire directement proportionnel au P. M. Leur relation fondamentale s'exprime comme suit :

© The Author.All rights reserved

$$\Theta \text{ en sec.} = \frac{12\,\eta_0}{\pi^2 \text{ v. k. T}}$$

η_0 est le coefficient de viscosité pour un gradient de vitesse nul
v est le nombre de molécules du polymère par unité de volume
k est la constante de Boizmann (1,3805 . 10^{-16} erg/degré)
T est la température absolue

$$\text{Le P.M. ou } M_\eta = \frac{\pi^2 \text{ A k T c . } \Theta}{12\,\eta_0}$$

A est le nombre d'Avogadro (6,0226 . 10^{23} $mole^{-1}$)
c est la concentration en g/ml

La théorie prédit qu'en portant η/η_0 en ordonnées et log (Θ.D) en abcisses on obtient toujours la même courbe. Cette courbe universelle, établie expérimentalement par Bueche, est leur courbe standard. Elle permet de calculer le temps de relaxation Θ d'une dispersion d'un polymère de P.M. inconnu. Pour ce faire, on trace à la même échelle sur un papier transparent la courbe η/η_0 en fonction de log D du polymère à l'étude. En superposant cette courbe à la courbe standard et en opérant une translation horizontale, on détermine log Θ.

Courbes de Bueche

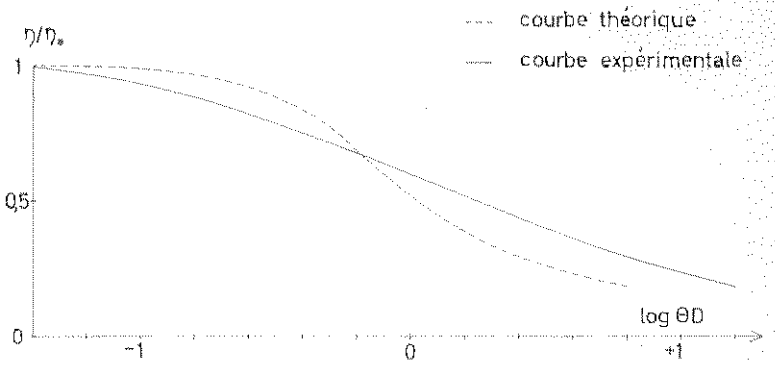


Figure 5

Limitations de cette méthode. — Cette méthode ne s'applique qu'à des dispersions concentrées (au minimum 20 % en polymère), les dispersions plus diluées exigeant l'introduction d'un facteur de correction. De nombreux essais ont été nécessaires pour que M. Testa trouve un liquide dans lequel les CARBOPOL présentent, à haute concentration (20 % P/V), un comportement pseudoplastique **sans** seuil d'écoulement.

C'est l'acide propionique additionné de 0,7 % d'eau qui a donné toute satisfaction. Les suspensions de CARBOPOL ont été homogénéisées avec un mixer Brookfield pendant 1 minute à raison de 60 000 cisaillements par minute.

Compte tenu des limitations de la méthode (consultez l'ouvrage de Moore [7]), et en particulier du degré inconnu de ramification, nous estimons que le PM viscosimétrique des CARBOPOL est de l'ordre de plusieurs dizaines de millions.

A l'aide de ce PM approché, on tente d'estimer leur force ionique et l'on obtient des valeurs de γ aberrantes, de l'ordre de 5000, qui n'ont aucune signification. Puisque la formule de Lewis et Randell est inapplicable aux CARBOPOL, force est de rechercher une autre solution. Celle-ci représente un travail d'approche, nullement exempt de critiques, mais chaque galénicien a trop l'habitude des compromis pour s'en offusquer.

Force ionique des CARBOPOL

Considérons à nouveau la figure 2. — L'axe des ordonnées est logarithmique ; la viscosité réduite croît de façon extraordinairement rapide et, comme nous l'avons

© The Author.All rights reserved

déjà mentionné, on est loin d'une relation tendant vers la linéarité parce que les interactions entre les macromolécules du polymère sont très fortes. Pour diminuer ces interactions, on peut recourir à l'incompatibilité des CARBOPOL en présence d'électrolytes, ce que l'on obtient en ajoutant différentes quantités de NaCl.

Sous certaines réserves, la constante de la force ionique se traduit par la linéarité (voir N 0,0108 par ex.), en d'autres termes, la force ionique du CARBOPOL est négligeable par rapport à celle du NaCl.

Nous remarquons que les concentrations supérieures à 0,005N en NaCl sont telles que la relation viscosimétrique apparaît linéaire. Pour des concentrations plus faibles, 0,002N et moins, la relation est d'un ordre élevé.

Nous adoptons alors un compromis, en choisissant une normalité **initiale** en NaCl de 0,003N, suffisante pour supprimer la majorité des interactions, insuffisante pour donner une relation linéaire.

Nous confectionnons quatre dispersions de CARBOPOL 940, exactement demi-neutralisé, dont les concentrations respectives sont 0,1 o/oo, 0,2 o/oo, 0,3 o/oo et 0,04 o/oo.

Nous désignons par δ le pourcentage de la force ionique réelle du CARBOPOL par rapport à sa force ionique théorique qui est égale à 100 (soit 0,0027N = normalité de —COONa à 0,4 o/oo). Pour des δ de 10 en 10 % entre 0 et 80 %, nous calculons 9 fois la force ionique de la dispersion qui contient 0,4 o/oo de CARBOPOL et 0,003 éq. g/l de NaCl.

En d'autres termes, la force ionique **théorique** est calculée directement à partir de la normalité en groupes —COONa. La force ionique **réelle** étant une fraction de cette force théorique, nous opérons une série de suppositions où cette force ionique réelle serait successivement le 10 %, le 20 %, le 30 %, etc., de la force ionique théorique.

Pour chaque supposition, nous effectuons une série « isoionique » par additions adéquates de NaCl en supplément de la quantité initiale (voir fig. 6).

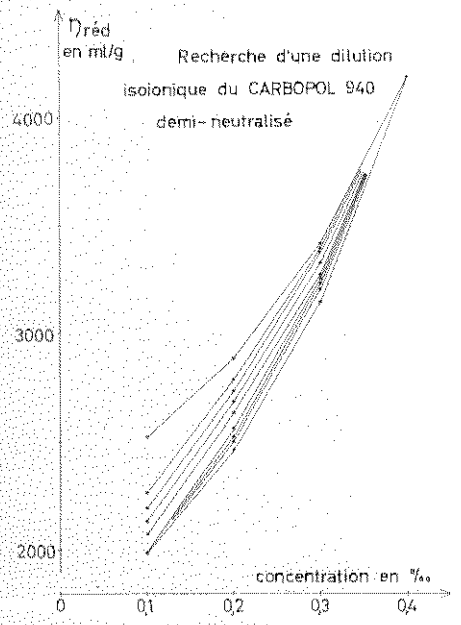


Figure 6

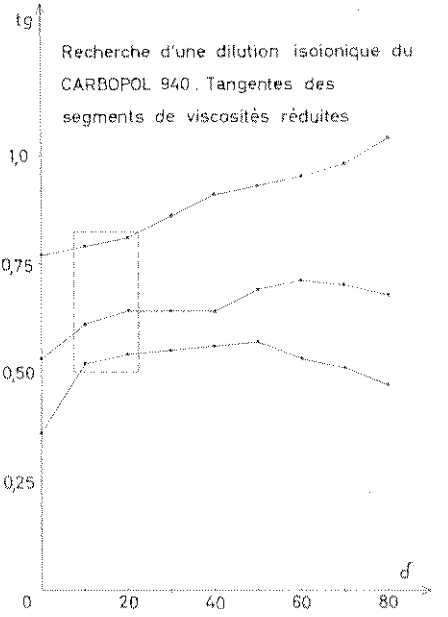


Figure 7

Nous remarquons que la linéarité n'est pas parfaitement réalisée. Pourtant la relation tend vers la linéarité pour s'en éloigner. Un calcul des tangentes (fig. 7), pour les segments de droite reliant les points voisins, permet de préciser où la courbe s'approche au maximum de la linéarité. Nous en déduisons que la force ionique du CARBOPOL 940, du moins aux faibles concentrations, n'atteint que le 10 à 20 % de celle que l'on calculerait à partir de la normalité en groupes —COONa.

Ce résultat approximatif est encourageant pour entreprendre les études de cinétique chimique.

© The Author.All rights reserved

Rappel : neutralisé $\neq$ neutre. — Le pH d'une dispersion de CARBOPOL 940, demi-neutralisé, est voisin de 7.

Notion d'isoionie : en physiologie, deux solutions sont qualifiées d'isoioniques lorsqu'elles contiennent les mêmes ions aux mêmes concentrations respectives.

en chimie-physique, deux solutions sont qualifiées d'isoioniques lorsqu'elles possèdent la même force ionique.

Cinétique de la procaïne au sein d'hydrogels de CARBOPOL

Sans entrer dans le détail, nous pouvons préciser que nous retrouvons, au sein de ces hydrogels, les constantes A (de fréquence) et E (d'activation) de la loi d'Arrhénius, telles que nous les déterminons dans des solutions aqueuses, dépourvues de polyélectrolytes, et en bon accord avec celles de plusieurs auteurs (Schmid, Willi, Müller et Speiser).

Exemple : $E_a = (12{,}7 \pm 2{,}2)$ Kcal/mole pour l'hydrolyse de la procaïne salifiée par du CARBOPOL dans un gel.

En plus, nous avons le plaisir de mettre en évidence une modification de k (constante de vitesse) dans le sens d'une diminution, de moitié environ, de la vitesse d'hydrolyse.

En résumé, la première attitude désinvolte du galénicien aurait été payante, puisque la durée de vie de la procaïne au sein de notre polyélectrolyte est quasi doublée par rapport à sa durée dans une solution aqueuse.

Il ne me reste plus qu'à vous prier de m'excuser de vous avoir imposé la deuxième démarche, truffée de « manigances » eu égard à la recherche d'une force ionique acceptable.

1. 2. 3. FISCHER W.H., BAUER W.H. et WIBERLEY S.E. Yield stresses and flow properties of carboxypolymethylene water systems. Trans. Soc. Rheoloy, **5**, 221 (1961).

4. ORY A.M. Ueber die rheologischen Eigenschaften einiger Schleimstoffe und deren Mischungen. Thèse, EPF Zürich, 1962.

5. MARTIN A.N., SWARBRICK J. et CAMMARATA A. Physical pharmacy. Lea and Febiger, Philadelphia, 1969.

6. BUECHE F. et HARDING S.W. A new absolute molecular weight method for linear polymers. J. Polymer Sci., **32**, 177 (1958).

7. MOORE W.J. Chimie-physique. Dunod, Paris, 1965.

© The Author.All rights reserved

Etude de la stabilité d'une lipase d'origine fongique en fonction des excipients et des conditions de conservation

J.-M. AIACHE, P. MANDON, F. CHARBONNE, P. FEBVRE
Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand

[illegible]

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La lipase

C'est une lipase d'origine fongique obtenue à partir d'une culture de Rhizopus arrhizus Var Delemar. La culture est réalisée sur un milieu liquide à base de farine de maïs hydrolysée, de carbonate de sodium et de sulfate d'ammonium.

Après fermentation de 40 à 45 heures, le jus est concentré et la lipase brute est précipitée puis purifiée (1).

Elle se présente sous forme d'une poudre amorphe de couleur grisâtre. Elle est très soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool et les solvants organiques.

Les excipients

Ont été utilisés :

- Le lactose codex.
- L'excipient F.P. 11 ou Lactoglobuline-lactose * : c'est une fraction azoto-glucidique, extraite du lait de vache, stérilisée et atomisée. Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche pratiquement inodore, hygroscopique, en grande partie soluble dans l'eau. Sa composition analytique est la suivante : lactose anhydre 70 à 75 %, matières azotées 10 à 15 %.
- Le dioxyde de silicium : connu sous le nom commercial d'Aerosil **. Deux types ont été choisis :

Aerosil P 200 : dioxyde de silicium pur standard. Il se présente sous forme d'une poudre blanche de faible densité apparente avec des particules d'une extrême finesse. Il est très hydrophile, possède un pouvoir d'absorption d'eau élevé mais est insoluble dans tous les solvants sauf les liquides fortement alcalins.

Aerosil R 972 : dioxyde de silicium rendu hydrophobe par fixation des groupements méthyl à sa surface. Il possède les mêmes caractères que le précédent mais est très hydrophobe.

Préparation des gélules

La formule générale des gélules est la suivante :

Lipase	: 7 500 U.
Excipient q.s.p.	: 1 gélule n° 1

soit :

Lactose Excipient FP 11	: 30 à 35 %
Aérosil P 200	: 3 %
Aérosil R 972	: 8 %

* FP 11 : Nom déposé : GATTEFOSSÉ, Lyon.

** Aérosil : Nom déposé : DEGUSSA, Francfort.

© The Author.All rights reserved

Le mélange des poudres est réalisé au mélangeur cubique durant 15 minutes. Puis les gélules sont remplies rapidement avec le gélulier manuel.

Conditions de conservation

Les gélules ainsi préparées sont enfermées dans des flacons en verre blanc, de 150 ml, fermés ou non par une capsule de bakélite.

Chaque lot ainsi conditionné est fractionné et placé pendant 365 jours dans des conditions de stockage différentes, déjà préconisées par d'autres auteurs (2-3) :

1) Température du laboratoire et lumière (A) (20 à 25°)

2) Température du laboratoire et obscurité (B) (18 à 23°)

3) Etuve sèche à 45° (C)

4) Alternance étuve sèche 45° et salle de plein air (15 jours dans chaque) (D)

5) Etuve à 37° avec 70 % d'humidité (E)

6) Alternance étuve humide à 37° et salle de plein air (F)

7) Salle de plein air (G) : variations importantes de température.

Chaque lot mis dans ces conditions de conservation est lui-même subdivisé en deux fractions : la première est conservée dans un flacon fermé et la seconde dans un flacon identique mais ouvert

Evaluation de l'activité de la lipase

L'activité de la lipase est suivie par évaluation de son activité lipolytique (4).

Pour cela on titre par de la soude 0,1 N à pH constant (7,5), les acides gras libérés par action de la lipase sur une émulsion d'huile d'olive stabilisée par de l'alcool polivinylique. Ce dosage est réalisé de façon entièrement automatique par un combi-titreur Méthrom (*). Cet appareil est composé d'un pH mètre et d'une microburette commandé par un bloc électronique relié au pH mètre : ainsi toute modification du pH du milieu réactionnel déterminée par l'électrode de verre est compensé par une addition de liqueur neutralisante déversée par le microbec de la burette qui plonge dans l'émulsion.

La quantité de soude ajoutée au milieu pour maintenir le pH pendant un temps fixé donne une idée de l'activité de la lipase.

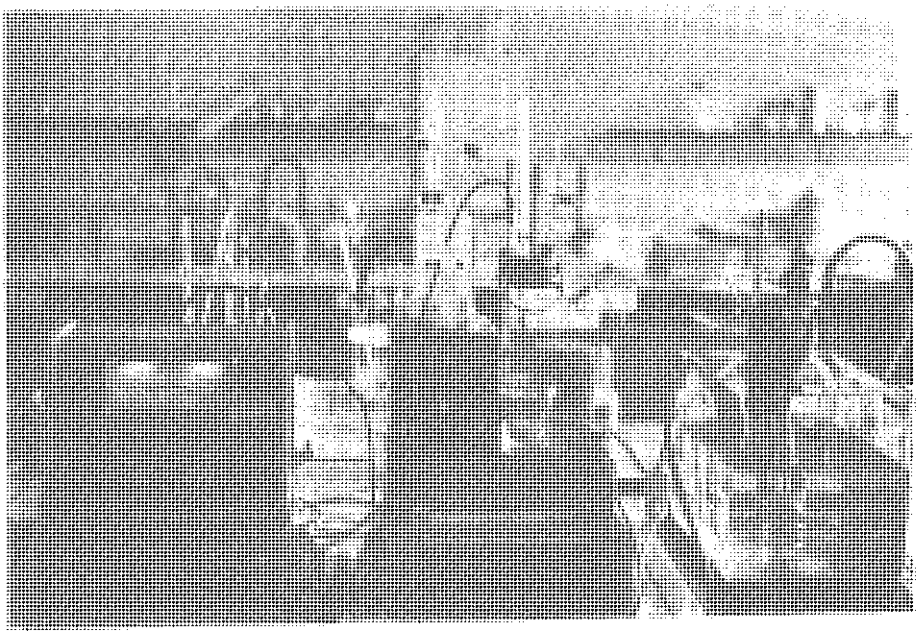
- Réactifs utilisés :
  solution à 3 % d'alcool polyvinylique
  solution de $Ca\ Cl_2$ 0,1 M
  solution de Na OH 0,1 N
  solution d'albumine bovine à 10 %

- Mode opératoire

Préparation de l'émulsion d'huile d'olive : A 50 ml de la solution d'alcool polyvinylique on ajoute 50 ml d'huile d'olive neutralisée et 25 ml d'eau distillée. On émulsionne ce mélange 2 minutes à l'ultraturax puis on le filtre immédiatement sur toile pour éliminer les bulles d'air qui, en se dégageant, feraient casser l'émulsion.

Préparation de la solution enzymatique : les gélules contenant la lipase pure ou les mélanges lipase + excipients sont ouvertes et leur contenu versé dans un

* Ets SOFRANIE, Paris.



© The Author.All rights reserved

ballon jaugé de 200 ml de façon à obtenir une solution à 0,5 g/l d'enzyme.

Les mélanges contenant un excipient soluble donnent une bonne solution. Il n'en est pas de même avec les aérosils qui, insolubles, provoquent la formation d'une suspension peu stable. De plus ces produits ont tendance à retenir adsorbée une fraction de l'enzyme, l'inactivant aussi, ce qui fausse partiellement les résultats.

- Dosage proprement dit :

Dans la cellule de l'appareil, on met dans l'ordre :

l'émulsion d'huile d'olive	7,5 ml
solution de Cl_2Ca	5 ml
solution d'albumine bovine	2 ml
eau distillée à 37°	74,5 ml

La température du mélange est maintenue à 37° par un bain-marie.

On ajuste le pH à 7,5, puis on ajoute la solution enzymatique à doser, l'appareil étant en régulation automatique on déclenche aussitôt le chronomètre. Toutes les 30 secondes, on note le nombre de ml de soude 0,1 N utilisés.

On laisse agir ainsi l'enzyme pendant 6 à 8 minutes environ, puis on trace une courbe en portant en ordonnées le temps en seconde et en abcisses le nombre de micromoles de soude utilisées (au moins 100 micromoles entre la 3e et la 6e minute). Cette courbe comprend une partie où les points sont pratiquement alignés.

A partir de cette portion, on calcule sur un intervalle de temps de 2 à 3 minutes, le nombre de micromoles de soude utilisées en une minute pour neutraliser les acides gras libérés par la quantité d'enzymes mise en œuvre.

L'unité de lipase est alors définie comme étant la quantité d'enzymes qui dans les conditions du dosage décrit libère en une minute une quantité d'acide gras pouvant neutraliser exactement une micromole de soude. La lipase de Rhizopus Arrhizus utilisée doit titrer au minimum 45 000 u/g.

Les déterminations sont réalisées lors de la préparation des gélules puis périodiquement au cours de l'année, tous les mois, sur des prélèvements correspondant aux différents lots.

RESULTATS

Les résultats sont réunis dans le tableau 1.

Pour la clarté des résultats seules sont indiquées les diminutions en pourcentage de l'activité de la lipase après 12 mois.

DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA LIPASE APRÈS 12 MOIS (en pourcentage) en fonction de l'excipient et conditions de stockage

Conditions de stockage	Lipase pure	+ Lactose	+ FP 11*	+ Aérosil P 200	+ R 972 Aérosil
Labo lumière					
Flacons fermés (a_1)	5,8	5,1	11,7	43,1	28,6
Flacons ouverts (a_2)	17,1	29,5	30,2	40,9	29,4
Labo obscurité					
Flacons fermés (b_1)	4,2	4,9	8,7	11,9	24,7
Flacons ouverts (b_2)	18,3	14,7	31,8	20,7	54,5
Etuve sèche 45°					
Flacons fermés (c_1)	39,1	52,1	55,8	55,1	59,9
Flacons ouverts (c_2)	46,4	49	50,5	54	42,3
Alternance étuve sèche 45° salle de plein air					
Flacons fermés (d_1)	79,9	53,3	54,9	49,1	47
Flacons ouverts (d_2)	84,6	49,3	39,6	47	42
Etuve humide 37°					
Flacons fermés (e_1)	47,6	14,3	46,20	35	46,3
Flacons ouverts (e_2)	67,7	39,7	53,3	48	36,9
Alternance étuve humide 37° salle de plein air					
Flacons fermés (f_1)	52,8	37,7	28	47,5	46,3
Flacons ouverts (f_2)	58,6	42,3	40,6	51,6	48,1
Salle de plein air					
Flacons fermés (g_1)	20,6	8,19	14,0	26,8	45,2
Flacons ouverts (g_2)	37,0	33,8	20,9	26,4	54,5

* Excipient FP 11, Gattefossé Ets. Dans les conditions les plus rigoureuses de stockage, alternance étuve 37° et plein air, l'excipient FP 11 assure sensiblement la moilleure conservation de la Lipase.

© The Author.All rights reserved

DISCUSSION

Ces résultats nécessitent quelques commentaires :

• Les gélules contenant de la lipase pure (tableau 1, colonne 1) présentent une assez bonne conservation : en effet, la diminution de l'activité enzymatique est relativement faible, surtout lorsque les gélules sont conservées **en flacons fermés à la température du laboratoire, à la lumière et même à l'obscurité** : il n'y a pratiquement pas de différence entre ces deux conditions.

En flacons ouverts, les taux d'abaissement sont plus élevés mais restent cependant inférieurs à 20 %. Lorsqu'on ouvre une gélule de lipase pure, l'examen visuel montre, après 12 mois de conservation, qu'en flacons fermés la poudre ne s'est pas agglomérée et sa teinte a peu évolué.

Alors qu'en flacons ouverts la poudre a la forme cylindrique facilement friable de teinte plus foncée.

Mais par contre, conservée dans les mêmes conditions mais avec des excipients l'activité de la lipase s'abaisse plus notablement quel que soit l'excipient choisi : les mêmes résultats étant obtenus avec le lactose Codex ou l'excipient FP 11. L'aspect de la poudre des gélules est sensiblement identique à celui observé avec la lipase pure.

• **A l'étuve sèche à 45°**, la dégradation de la lipase pure est plus marquée (F.F. : 39,1 % F.O. / 46,4 %). Mais cette diminution de titre est à nouveau inférieure à celle observée avec les gélules contenant le mélange lipase + excipient. Dans ce cas, paradoxalement d'ailleurs, ce sont les gélules contenues en flacons fermés qui présentent toutes ces diminutions plus importantes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à cette température l'eau de constitution des gélules est libérée mais ne pouvant s'évaporer, accélère la dégradation de l'enzyme (3).

Les pourcentages d'abaissement les plus importants sont obtenus avec les deux types d'aérosil. Avec le lactose ou le F.P. 11, ces taux sont assez voisins. A l'examen, le contenu de toutes gélules se présente sous forme d'une poudre non agglomérée de teinte plus foncée et à l'œil, il est difficile de différencier la poudre des gélules des flacons fermés ou ouverts.

• **A l'étuve sèche à 45°, en alternance avec la salle de plein air**, la lipase pure se dégrade considérablement (F.F. 79,9 %, F.O. 84,6 %) les variations de températures étant très importantes.

Par contre, la lipase accompagnée de différents excipients conserve une grande partie de son activité puisque les taux d'abaissement sont très voisins de ceux observés à l'étuve sèche à 45°. Comme précédemment d'ailleurs, ce sont les gélules des flacons fermés qui ont des pourcentages d'abaissement plus marqués.

• **A l'étuve humide à 37°**, la lipase pure se dégrade sensiblement mais à un taux moindre qu'en étuve sèche à 45° en alternance avec la salle de plein air. Elle se présente dans la gélule sous forme d'un cylindre assez dur presque noir, d'aspect calciné. Additionné de lactose et conservé en flacons fermés, la lipase ne présente qu'un abaissement d'activité de 14,3 %. L'aspect du mélange est pratiquement inchangé. Avec les autres excipients et conservé en flacons fermés ou ouverts, les pourcentages d'abaissement sont voisins de ceux obtenus avec la lipase pure.

Cependant avec le F.P. 11 ou l'Aérosil hydrophobe comme excipient la dégradation de l'enzyme est moins marquée en flacons ouverts qu'en flacons fermés. Ce serait peut-être dû à la formation d'une croûte épaisse à la surface du cylindre de poudre, croûte qui protégerait ainsi l'intérieur du mélange.

• **Dans l'étuve humide en alternance avec la salle de plein air**, la diminution de l'activité de la lipase pure est assez marquée et se trouve être très voisine de celle observée en étuve humide seule (F.F. 52,8 %, F.O. 58,5 %). Cependant avec le F.P. 11 comme excipient, la dégradation est très atténuée (F.F. 28 %, F.O. 40,6 %) tout comme avec le lactose à un taux moindre toutefois (F.F. 37,7 %, F.O. 42,3 %).

• Enfin **conservée en salle de plein air**, la lipase semble résister aux variations de température, très nombreuses. Le pourcentage de diminution d'activité est presque pour tous les mélanges bien inférieur à ceux observés dans les autres conditions de conservaton.

La lipase pure présente un taux d'abaissement de 20,6 % en flacons fermés et 37 % en flacons ouverts, alors qu'avec F.P. 11 ce taux n'est plus que de 14,0 % en flacons fermés et de 20,9 % en flacons ouverts. Avec le lactose ces taux sont de 8,1 % en flacons fermés et de 33,8 % en flacons ouverts.

Du point de vue aspect, la lipase pure ou additionnée de F.P. 11 ou de lactose n'est pas agglomérée et sa teinte est peu modifiée si les gélules ont été maintenues en flacons fermés. En flacons ouverts, les mélanges sont compacts et leur teinte est plus foncée.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de cette étude expérimentale nous permettent de tirer quelques conclusions :

• Ainsi, à la température du laboratoire et à la lumière ou à l'obscurité la lipase

© The Author.All rights reserved

semble mieux se conserver lorsqu'elle est pure non accompagnée d'excipients (non divisée).

- Par contre dans les autres conditions de conservation la lipase pure se dégrade assez vite et de façon notable.

- En présence de l'excipient F.P. 11 ou de lactose la diminution de l'activité de la lipase est moins marquée. Ces mélanges sont donc intéressants dans ces conditions de conservation.

- L'addition à la lipase de dioxyde de silice normale ou hydrophobe ne semble pas améliorer la stabilité de l'enzyme. Au contraire, ces produits très fins, très divisés retiennent une partie de la lipase lors de la mise en solution pour le dosage, faussant partiellement les résultats en diminuant son activité.

- Les résultats montrent d'autre part que la conservation en flacons fermés est légèrement meilleure que celle en flacons ouverts, toutes les autres conditions étant identiques. Toutefois ces différences sont peu marquées et même à l'étuve sèche les gélules en flacons fermés sont plus dégradées.

REFERENCES

1. LABOUREUR P., LABROUSSE M. Lipase de Rhizopus Arrhizus. Obtention et propriétés de l'enzyme pur. Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2179.

2. DELONCA H., PUECH A., SEGURA G., YOUAKIM Y. Influence des excipients et des conditions de stockage sur la conservation des médicaments. I. Cas des comprimés à base d'acide acétylsalicylique. J. Pharm. Belg., 1969, 24, 243.

3. DELONCA H., PUECH A., SEGURA G., YOUAKIN Y. II. Cas des gélules à base d'acide acétylsalicylique. J. Pharm. Belg., 1969, 24, 317.

4. LABOUREUR P., LABROUSSE M. Lipase de Rhizopus Arrhizus. Obtention, purification et propriétés de la lipase de Rhizopus Arrhizus var. Delemar. Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 747.

The use of enzymes in human therapy is not recent, and the difficulties in their preparation so that they remain stable in galenic forms are well known. On the other hand, some enzymes of fungic origins have been put on the pharmaceutic market, thus enabling galenists and clinicians to have easily at their disposal a large quantity of those substances which, moreover, are stable.

That is why we thought it would be interesting to study the influence of the excipients and storage conditions on a fungic lipase.

These gelules contain either pure lipase or a mixture of lipase and excipients. These mixtures are divided into several batches, each one being put in different storage conditions.

CONCLUSIONS

At room temperature, in light or darkness, the lipase seems to keep better when it is pure, with no added excipient (non divided).

However (either continuously in a drying cupboard at 45° C or alternating with an open air room ; or continuously in a moisturizing cupboard or alternating with an open air cupboard ; or simply continuously in an open air cupboard), the pure lipase breaks down quickly.

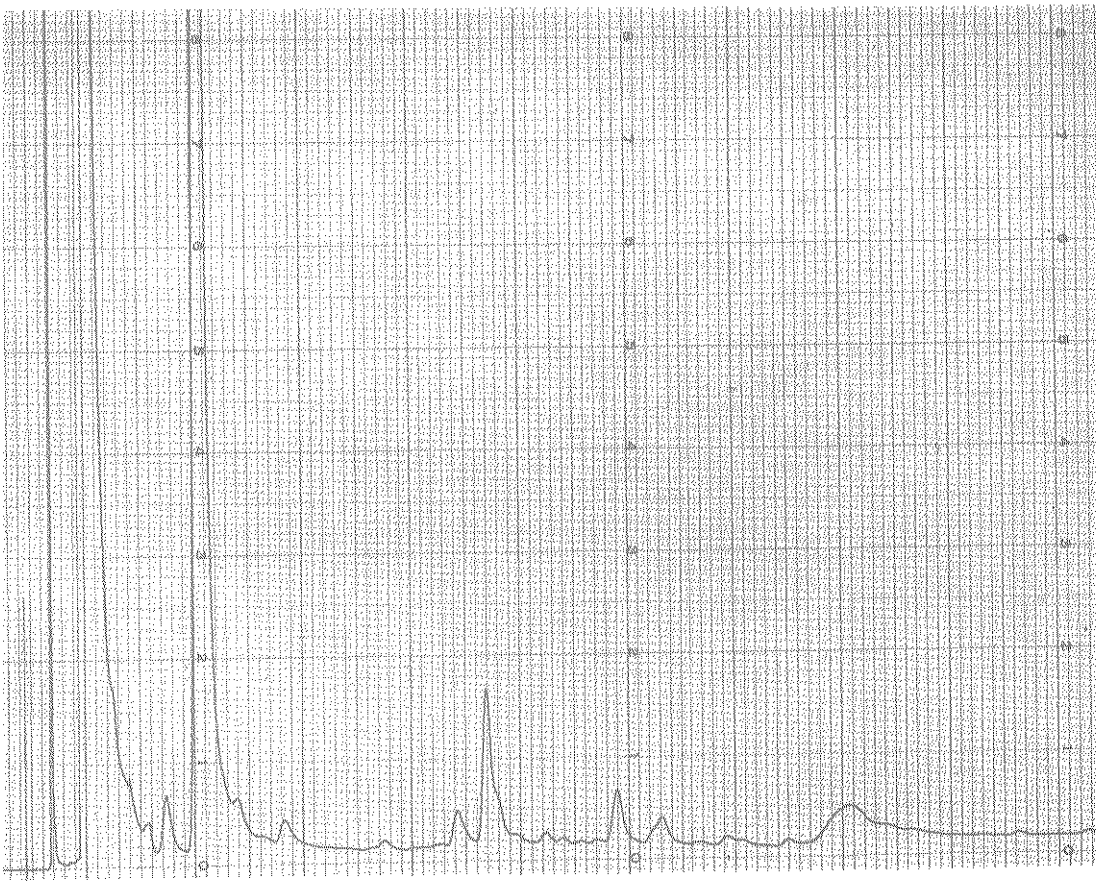
In the presence of F.P. 11 excipient or of lactose, the fall in activity of the lipase is less noticeable. These mixtures are therefore useful under these storage conditions.

— The addition to the lipase of normal or hydrophobic silica does not seem to improve its stability.

— On the other hand, these results show that storage in closed flasks is slightly better than in open flasks, all other conditions being identical.

© The Author.All rights reserved

IMAGE DE LA CHIMIE AROMATIQUE



SOLAROMES

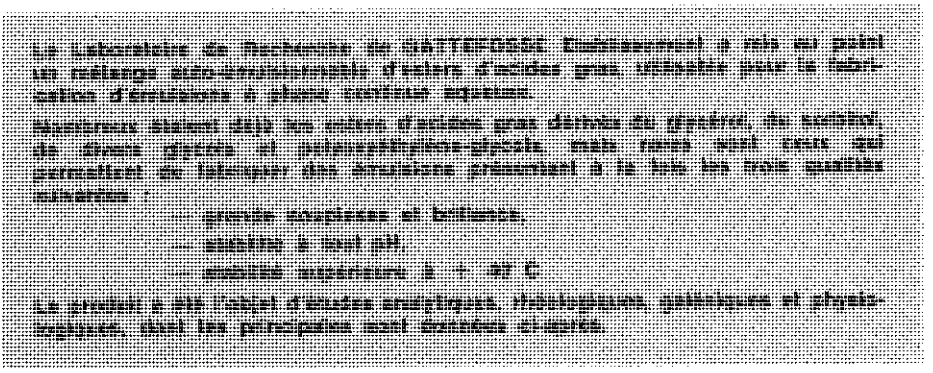
ESSENCES SOLUBLES

CITRON / ORANGE / MANDARINE / MENTHE

© The Author.All rights reserved

Etude galénique, analytique et toxicologique d'une base d'excipient : SEDEFOS

Laboratoire d'applications de Gattefossé Ets



Spécifications générales :

Le produit est un palmito-stéarate de glycols obtenu par estérification d'acides palmitique et stéarique par un groupe de glycols sous des conditions définies de température et de temps.

Le produit obtenu est additionné d'un dérivé phosphorique d'alcools gras appartenant à la famille des émulsionnants anioniques acides, dérivé qui permet l'auto-émulsionnabilité du palmito-stéarate.

Le produit est une masse cireuse, de couleur blanc crème, présentant une très faible odeur sui-generis.

- **Spécifications physiques :**
- Point de fusion : 43 / 48°
- pH d'une dispersion à 10 p. cent dans l'eau : 5,5 / 6,5

- **Solubilités**

Alcool	:	soluble avec trouble
Ether	:	soluble avec trouble
Huile végétale	:	insoluble
Huile minérale	:	insoluble
Eau	:	dispersable à chaud

- **Spécifications chimiques :**
- Indice d'acide : inférieur à 6
- Acidité libre : inférieure à 3 p. cent (exprimée en acide stéarique)
- Indice de saponification : 105 / 120
- Indice d'iode : inférieur à 3

© The Author.All rights reserved

Applications pharmaceutiques et cosmétiques :

La possibilité du produit de former en présence d'eau des gels stéariques brillants, onctueux et stables à la chaleur, permet des applications pharmaceutiques et cosmétiques : le produit est préconisé pour la préparation d'émulsions, pommades émulsionnées et crèmes à phase continue aqueuse

- **Formule type de préparation émulsionnée :**

16	SEDEFOS
3	LABRAFIL M 2130 CS
12	HUILE DE PARAFFINE FLUIDE
3	GLYCÉRINE
0,1	CONSERVATEUR (dehydroacétate de sodium)
63,9	EAU PERMUTÉE
100	

Mode opératoire :

Chauffer tous les constituants mélangés à + 70° C. Refroidir ensuite sous agitation lente mais constante. Passer dans un affineur et attendre un mûrissement qui s'effectue en quelques heures.

Contrôle :

Aspect : Emulsion blanche lisse et molle.
Cadre : 70° 24 δ donnant à 62° : 18 et à 38° : 17
pH : 6 (obtenu sur une dilution dans l'eau purifiée).
Dureté D Mahler : 15
Entre-lames : Bon
Etude de stabilité à l'étuve
Après un jour de conservation à l'étuve à + 50° C une légère rupture d'émulsion apparaît à la base du flacon.
Après un séjour de un mois à l'étuve à + 40° C la préparation apparaît totalement stable.

Les doses d'emploi préconisées pour la préparation des émulsions type pommades émulsionnées et crèmes, sont de 15 à 20 p. cent.

- **Examen du taux maximum de Lanoline dans la phase grasse :**

FORMULE DE BASE :

18	SEDEFOS	pH : 6,3 à 6,8.
12	HUILE DE VASELINE	
3	GLYCÉRINE	
1	CONSERVATEUR : FONDIX G	
	Q.S. p. cent EAU PERMUTÉE	

A cette formule a été ajoutée de la LANOLINE DÉSODORISÉE à des concentrations variables. Les diverses formules ont été appréciées sous l'angle rhéologique et examinées du point de vue stabilité à l'étuve.

Pourcentage de Lanoline	Dureté	Stabilité à l'étuve à 40° pendant 1 mois	Stabilité à l'étuve à 50° pendant 1 semaine
5	—	Bon	Bon
10	—	Bon	Bon
15	3,60	Bon	Bon
20	8,10	Bon	Bon
25	33,50	Bon	léger exsudat
30	27	Bon	léger exsudat
35	48	Bon	léger exsudat

Conclusion :

Les formules renfermant plus de 20 p. cent de LANOLINE deviennent très dures, et leur stabilité est médiocre. Le taux de 15 p. cent représente la valeur maximale pour la formule considérée.

© The Author.All rights reserved

Examen du pH compatible

FORMULE DE BASE :

18	SEDEFOS	
4	LABRAFIL M 2130 CS	
12	HUILE DE VASELINE FLUIDE	pH : 6
3	GLYCÉRINE	
1	CONSERVATEUR : FONDIX G	
	Q.S. p. cent EAU PERMUTÉE	

% de Na OH $\frac{N}{10}$	pH	Stabilité à l'étuve à 40° pendant 1 mois
0	6	stable
5	7,9	stable
10	9,1	stable
15	9,3	stable
20	9,8	stable
% d'acide acétique pur	**pH**	**Stabilité à l'étuve à 40° pendant 1 mois**
5	2,9	rupture émulsion
% d'acide acétique $\frac{N}{10}$	**pH**	**Stabilité à l'étuve à 40° pendant 1 mois**
5	5,2	stable
10	5	stable
15	4,8	stable
20	4,6	stable

CONCLUSION :

Les émulsions au SEDEFOS sont stables à + 40° pendant un mois, quelle que soit la valeur du pH : de 4 à 9.

Comportement des principes actifs pharmaceutiques et cosmétiques :

Les principes actifs thérapeutiques, dermopharmaceutiques et cosmétiques, ont été appréciés dans leur comportement vis-à-vis d'une formule d'émulsion réalisée avec SEDEFOS.

Les formules retenues ont été vérifiées valables dans leur stabilité à l'étuve à + 40°, leur consistance et leur aspect organoleptique.

Dans tous les cas, les formules ont été réalisées avec 18 p. cent de SEDEFOS, et les émulsions obtenues apparaissent comme des crèmes dites molles, souples, et utilisables en tubes.

PRINCIPES ACTIFS	DOSE p. cent	CONSERVATEUR	pH
Huile de Calendula	5		6,5
Extrait placentaire	1		6,5
Acétate d'Hydrocortisone	0,1	Mélange Déhydroacétate de Sodium et Acide Sorbique	4,9
Allantoïne et Lactalbumine	0,2 / 2	Fondix G	7,2
Dihydroxy-acétone	4	Fondix G	7,5
Acide Alphacétoglutarique	3	Fondix G	2,2 (cassé)
Hydroxyde de Bismuth	2	Mélange Métoxyde sodé et Acide sorbique	6
Méthocarbamol	10		7,1
Salicylate de Glycol	5		6,3

© The Author.All rights reserved

Etudes physiologiques * :

• Etude de la tolérance cutanée et oculaire :

Le produit ayant servi à la réalisation de l'essai nous a été adressé par les Etablissements GATTEFOSSE, sous forme d'une émulsion à 35 % dans l'eau distillée, et il provenait du lot n° 4 (Septembre 1971).

Sur cet échantillon, nous avons procédé, chez le lapin, aux essais de tolérance locale suivants :

1) TEST D'IRRITATION PRIMAIRE sur la peau normale et scarifiée ;
2) TEST D'IRRITATION OCULAIRE ;
3) TEST DE TOLERANCE CUTANEE, par application itératives.

Ces tests ont été effectués selon le protocole décit au Journal Officiel du 21/4/71, et les atteintes évaluées selon les barèmes fixés sur ce même protocole.

I - ESSAI DE TOLÉRANCE CUTANÉE CHEZ LE LAPIN

L'essai a été pratiqué sur des lapins de race Néo-Zélandaise femelles, pesant de 2,5 à 3 kg.

Parmi l'ensemble des lapins en notre possession, nous avons choisi les animaux présentant une fourrure peu dense, ce fait signifiant généralement une repousse des poils peu importante.

La veille de l'application du produit, 24 lapines ont été épilées au moyen d'une tondeuse électrique et par application d'une crème dépilatoire à base de sulfure de Baryum, de savon, de talc et d'amidon.

Le jour de l'essai, seuls les animaux présentant un aspect de la peau impeccable ont été retenus. Sur les 11 lapins choisis, 10 subirent le test d'irritation primaire par application pendant 24 heures du produit à tester, sur des zones d'environ 3 cm² de peau normale et de peau scarifiée (3 traits effectués au vaccino-style sans saignement).

L'émulsion de SEDEFOS 75 a été appliquée à la dose d'environ 200 mg par application, et maintenue en contact avec la peau par des adhésifs spéciaux « patch-test » (sparadrap non allergique. Ces « patch-test » ont été eux-mêmes maintenus par des bandes de sparadrap faisant entièrement le tour du tronc de l'animal.

Après apposition des « patch-test », les animaux ont été maintenus pendant 24 heures en cages à contention, à la suite de quoi les patch-test ont été enlevés et la lecture effectuée.

Les animaux ont été alors remis en cage, et une seconde lecture a été pratiquée 48 heures après, soit 72 heures après l'application.

Les lectures à 24 et 72 heures ont été effectuées selon l'échelle décrite au Journal Officiel.

Les résultats dans le tableau suivant.

TEST CUTANÉ D'IRRITATION PRIMAIRE CHEZ LE LAPIN

(selon la méthode officielle - J.O. du 21-4-71)

PRODUIT TESTÉ : SEDEFOS
APPLICATION : Sur 6 lapins de race Néo-Zélandaise

EVALUATION DE L'IRRITATION						
LAPIN N°	ZONE	24 HEURES		72 HEURES		TOTAL
		Erythème	Oedème	Erythème	Oedème	Er. + œd.
116	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	0	0	0	0	
118	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	0	0	0	0	
119	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	0	0	0	0	
120	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	1	0	0	0	1
121	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	0	0	0	0	
122	Zone normale	0	0	0	0	
	Zone scarifiée	0	0	0	0	
				TOTAL (X)	=	1

Indice d'irritation primaire cutanée (X/24)

0,04 **NON IRRITANT**

Non irritant < 0,5
Légèrement irritant (0,5 - 2)
Moyennement irritant (2 - 5)
Sévèrement irritant (5 - 8)

* Travail du Centre de recherches et essais biologiques des Oncins (IFFA-CREDO).

© The Author.All rights reserved

II - TEST D'IRRITATION OCULAIRE CHEZ LE LAPIN

Le test d'irritation oculaire chez le lapin a été réalisé selon le protocole figurant au Journal Officiel du 21/4/71.

Ce test a été effectué chez 16 lapines de souche Néo-Zélandaise, pesant 3 kg environ, et présentant un état impeccable de la cornée, de l'iris et de la conjonctive, pour les deux yeux.

Sur chaque lapin, une perle représentant environ 50 mg de crème a été appliquée dans le sac conjonctival gauche, l'œil droit servant de témoin.

Les animaux furent maintenus pendant 16 à 18 heures en cages de contention puis les yeux furent essuyés. Une lecture selon l'échelle figurant au protocole fut effectuée aux temps 24 heures et 48 heures, après l'application du produit.

Les sommes des atteintes de la cornée, de l'iris et de la conjonctive de chaque animal dans chaque lot, permettent d'aboutir par lot à une moyenne générale.

Nous avons arbitrairement classé les produits comme suit :

MOYENNE GENERALE	CLASS. DU PRODUIT
0 à 10	Pas irritant
10 à 30	Peu irritant
30 à 60	Irritant
60 à 110	Sévèrement irritant

Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-après.

TEST D'IRRITATION OCULAIRE CHEZ LE LAPIN

PRODUIT TESTÉ : SEDEFOS (Crème à 35 %)

APPLICATION : Sur 6 lapins, de race Néo-Zélandaise (Albinos)

EVALUATION DE L'ATTEINTE A : 24 heures

		1	2	3	4	5	6	
CORNÉE	A - Degré d'opacité (0 - 4)	0	0	0	0	0	0	Moyenne ↓
	B - Surface (1 - 4)							
	A × B × 5 (Max. 80)							0
IRIS	Degré de congestion (0 - 2)	0	0	0	0	0	0	Moyenne ↓
	× 5 (Max 10)							0
CONJONCTIVE	A - Larmoiement (0 - 3)	0	0	0	0	0	0	Moyenne ↓
	B - Chemosis (0 - 4)	0	0	0	0	0	0	
	C - Rougissement palpébral (0 - 3)	0	0	0	0	0	0	
	TOTAL (A + B + C) × 2 (Max 20)							0
TOTAL PAR LAPIN (Max 110)		0	0	0	0	0	0	

MOYENNE GÉNÉRALE : 0

Conclusion : Aucun pouvoir irritant sur la muqueuse oculaire.

© The Author.All rights reserved

III - TEST DE TOLÉRANCE CUTANÉE PAR APPLICATIONS ITÉRATIVES

Ce test consiste à appliquer quotidiennement, pendant 3 mois consécutifs sur la peau de 3 lapins, environ 2 g/kg du matériau à tester en les répartissant sur une surface d'environ 80 cm^2.

Le produit est appliqué sur le dos et les flancs des animaux, préalablement tondus, de façon à ce que la substance pénètre totalement. Les animaux sont régulièrement tondus au cours de l'essai (une à 2 fois par semaine).

En cours de traitement, on note les modifications pouvant intervenir dans l'aspect de la peau (érythème, œdème, épaisseur, acanthose, repousse des poils), ainsi que l'évolution pondérale des animaux.

L'essai a été mené sur 3 lapins $\overset{O}{+}$ de souche Néo-Zélandaise. Les observations retenues lors de l'essai mené avec le produit SEDEFOS, sont les suivantes :

1) **Irritation de la peau**

L'application, pendant 13 semaines, n'a pas fait apparaître d'érythème ou d'œdème chez aucun des 3 lapins traités.

2) **Toxicité générale**

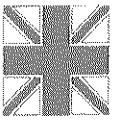
L'administration, par voie cutanée, de 2 g/kg de SEDEFOS n'a provoqué aucun phénomène d'ordre toxique : évolution pondérale et consommation de nourriture normales.

3) **Etat de la peau**

Au cours du traitement, la repousse des poils a toujours été normale. En fin de traitement, l'état macroscopique de la peau était satisfaisant : aucun épaississement (acanthose).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les essais aigu et chronique de tolérance cutanée d'une part, et l'essai d'irritation oculaire d'autre part, pratiqués chez le lapin de race Néo-Zélandaise, ont montré la très bonne tolérance du SEDEFOS permettant son utilisation en cosmétique et dans les préparations pharmaceutiques à usage local.



The GATTEFOSSE Research Laboratory has developped a self-emulsifying mixture of fatty acid esters, for use in continous aqueous emulsion manufacture.

There were already many fatty acid ester derivatives of glycerol, sorbitol and several glycols and polyoxyethylene glycols, few however allowed emulsion production simultaneously possessing the following properties :

— great smoothness and shiny.

— stable at any pH.

— stable at 40° C.

This product has been the object analytical, rheological, galenical and physiological studies.

© The Author.All rights reserved

L'uveton *

Antisolaire anti-érythèmateux

Laboratoire d'applications de Gattefossé Ets

Le rayonnement solaire peut être décomposé dans son action sur l'épiderme par les différents filtres antisolaires, et en règle générale, les produits antisolaires sont étudiés, choisis et appliqués dans la mesure où ils arrêtent les rayonnements ultra-violets érythématogènes mais laissent passer les rayonnements nécessaires à la pigmentation.

Il est admis, d'ailleurs, qu'il n'existe pas une séparation tranche entre ces deux types, disons de rayonnement, une bonne pigmentation nécessitant entre les rayonnements infra-rouge, les rayonnements ultra-violet bénéfiques et érythématogènes.

Il nous a semblé qu'une place importante était laissée à une substance utilisée dans les produits cosmétiques ou pharmaceutiques, susceptibles de s'opposer de façon plus totale aux rayonnements ultra-violets ; une telle substance devrait avoir des qualités toutefois pour les peaux fragiles.

L'UVETON est présenté lui comme cette substance nouvelle, filtre de protection solaire, facteur anti-érythème.

1) Etude physico-chimique :

L'UVETON est une solution dans le salicylate de menthyle d'un agent filtrant photochromique, lequel présente les propriétés physico-chimiques suivantes :

Le filtre photochromique est une poudre cristalline gris-clair, inodore, se décomposant à + 150° et présentée à l'abri de la lumière.

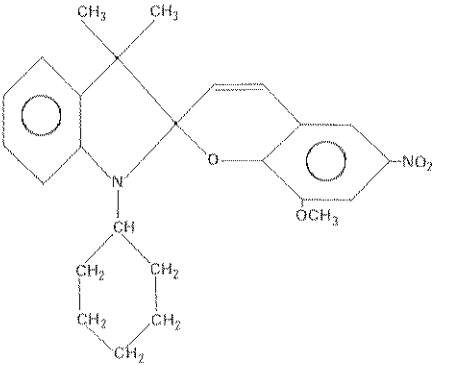
Elle est soluble à 20° C dans : huile de paraffine, alcool éthylique, éthylène glycol, toluène, salicylate de menthyle.

Elle est insoluble mais dispersable dans l'eau.

Sa masse moléculaire est de 418,5, tandis que sa formule développée est la suivante :

Sa définition chimique est :

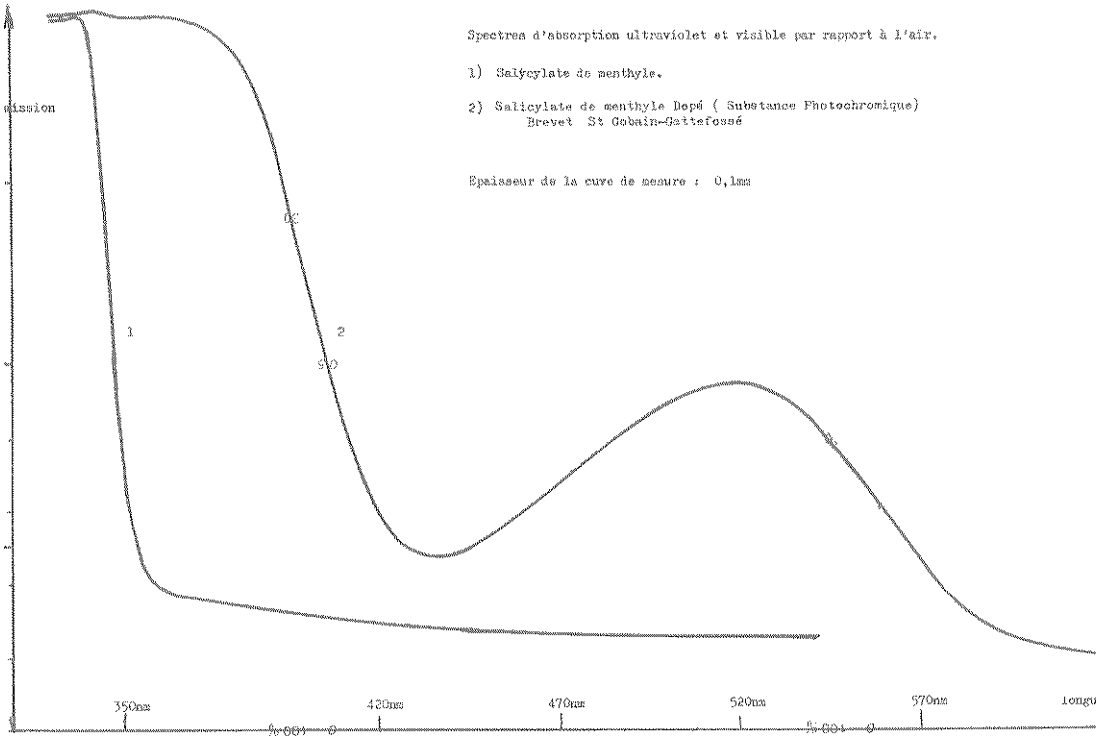
Cyclohexyl-1, diméthyl-3, 3, indoline-2, spiro-2', nitro-6', méthoxy-8' benzo (d) pyrane.



Les spectres d'absorption ultra-violette et visible, par rapport à l'air sont les suivants :

* Gattefossé Ets.

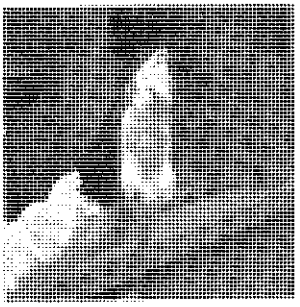
© The Author.All rights reserved

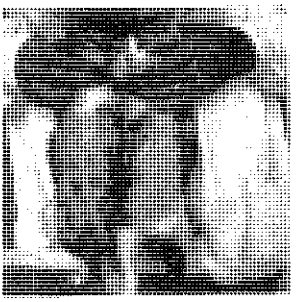


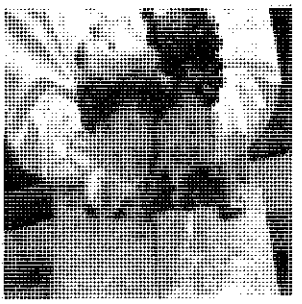
2) Etude physiologique :

Le filtre photochromique a subi une série d'essais de tolérance cutanée chez l'animal d'abord, puis chez quelques individus.

L'expérimentation chez l'animal faisait appel à une solution de 10 g p. mille de filtre photochromique dans le salicylate de menthyle. Les animaux essayés ont été successivement le rat, le chat et le cobaye.







Parallèlement a été essayée une crème contenant ce même filtre photochromique. Au terme des applications les examens macroscopiques et histologiques ne signalent aucune lésion, ni de type inflammatoire, ni nécrotique.

L'auteur des expérimentations souligne néanmoins que l'application de filtre photochromique en solution concentrée dans le salicylate de menthyle, produit chez quelques animaux l'apparition d'une sorte de crasse cutanée.

Les vérifications faites ensuite chez l'homme confirment une absence de toxicité aux doses usuelles d'utilisation préconisées.

© The Author.All rights reserved

3) Etude d'applications

lait antisolaire
ANTI-ÉRYTHÉMATEUX

10	Téfose 70
5	Huile de vaseline fluide
0,15	Conservateur
79,65	Eau Permutée
5	UVETON
0,20	Parfum 4199

huile antisolaire
ANTI-ÉRYTHÉMATEUSE

10	Végétol huileux Sureau 4144
10	Huile de noyaux
10	Palmitate d'Isopropyle
54	Huile de vaseline fluide
6	UVETON
Q.S.	Colorant

crème antisolaire
ANTI-ÉRYTHÉMATEUSE

15	Tésal
3	Labrafil M 2130 CS
5	Calenfil 3646
0,15	Conservateur
71,65	Eau permutée
5	UVETON
0,2	Parfum 3565

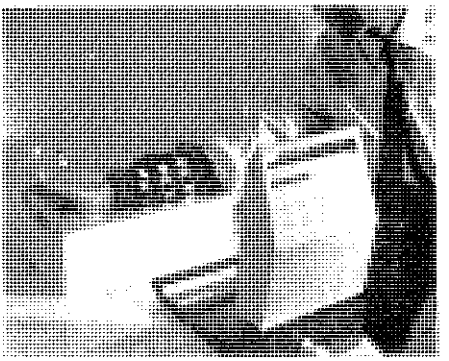
ESSAIS D'APPLICATION :

L'efficacité et la tolérance cutanée chez l'homme ont été vérifiées après application des préparations sus-mentionnées sous l'irradiation d'une lampe type Höhensonne 222 (U.V. 280 à 400 nm et I.R. 800 à 1 150 nm).

La protection obtenue à l'aide de ces préparations a été démontrée par rapport à une plage témoin.

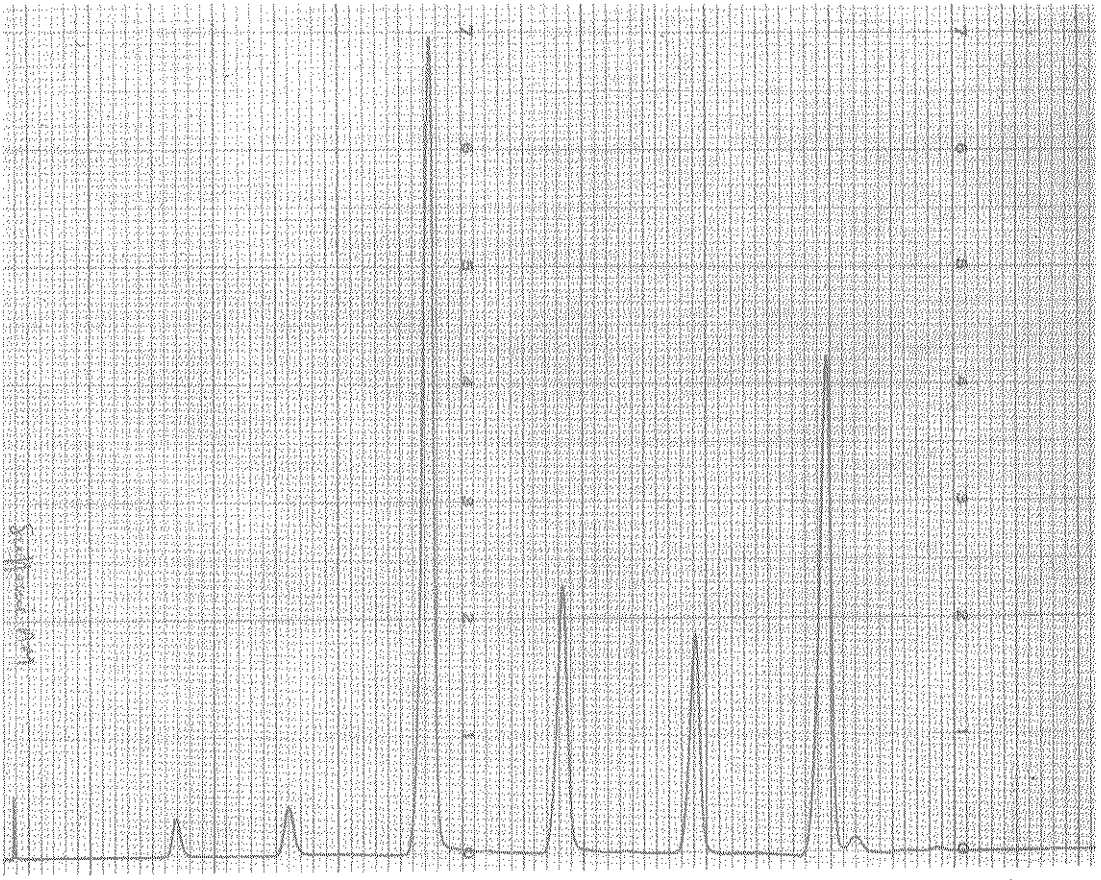
L'effet rayonnant provoqué par le filtre photochromique rend compte de façon visible, quasi instantanée, de la protection réelle du tégument.

Enfin apparaît une pigmentation moins rapidement cependant que celle provoquée par des substances peu protectrices ou même sensibilisantes.



© The Author.All rights reserved

IMAGE DE LA CHIMIE ORGANIQUE



SUPPOCIRE

EXCIPIENT POUR SUPPOSITOIRE

CONSTANTES ANALYTIQUES - PERFORMANCES TECHNOLOGIQUES

TOLERANCE RECTALE

SUPPOCIRE + LABRAFIL A HAUT POUVOIR D'ABSORPTION

© The Author.All rights reserved

Point de fusion des corps gras

Analyse statistique des résultats de deux méthodes

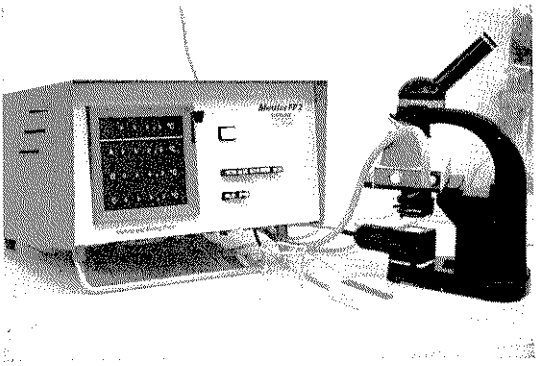
par M. Lucien WAGINAIRE
Laboratoire de Contrôle Ets Gattefossé

Dans le bulletin technique numéro 6 de notre Société nous avons exposé l'acquisition par notre laboratoire de contrôle d'un appareil destiné à la mesure du point de fusion. Nous nous sommes proposé de rapprocher la mesure du point de fusion des corps gras, et partant leur nature, avec celle du point de fusion d'autres et de mélanges de corps gras à l'aide de cet appareil et parallèlement à l'aide de la méthode classique du tube en U.

L'ensemble de ces mesures a porté sur 16 produits différents et représente 1032 déterminations pour étudier les méthodes.

Ce volume de résultats nous a paru suffisant pour permettre l'analyse statistique de ces valeurs et pour essayer de tirer les enseignements relatifs à la précision et à l'efficacité des deux méthodes utilisées.

METHODE DE MESURE PAR APPAREIL FP2 METTLER



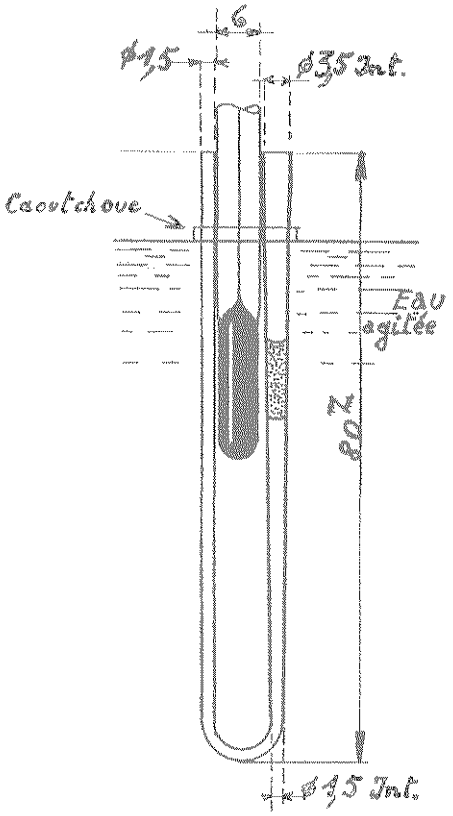
Cet appareil se compose d'une platine chauffante montée sur microscope permettant l'observation visuelle de l'échantillon sous lumière polarisée. La platine est reliée au bloc de mesure et asservie à une programmation linéaire de montée en température.

L'affichage numérique du point de fusion se fait par déclenchement manuel au moment de l'extinction totale du champ.

Conditions opératoires

- l'appareil est mis en équilibre entre 6° et 8° C au-dessous du point de fusion théorique du produit examiné,
- l'échantillon est prélevé sur une lame de verre par frottement, sans surépaisseur,
- programmation : 1° C/minute,
- le point de fusion est affiché manuellement à l'extinction totale du champ du microscope,
- résultats appréciés à ± 0,1° C.

© The Author.All rights reserved



MÉTHODE DU TUBE EN U

L'échantillon du produit à examiner est introduit dans un tube capillaire en U placé au contact du bulbe d'un thermomètre de précision (mercure, 1/10° C) ; le système est introduit dans un bain d'eau chauffé jusqu'à glissement de l'échantillon.

Conditions opératoires

- l'échantillon est prélevé à l'aide d'un trocart et se présente sous la forme d'un vermicelle de 1 cm de long et de 3 mm de diamètre,
- l'échantillon est introduit dans la branche conique du tube en U jusqu'à coincement (sans forcer),
- le tube est alors fixé au bulbe du thermomètre et le système immergé dans l'eau du bain préalablement porté à une température **inférieure** de 6° à 8° C à celle du point de fusion théorique du produit examiné,
- après mise en route de l'agitation, on règle la montée en température à environ 1° C/minute,
- on note la température dès que l'échantillon commence à glisser,
- résultats appréciés à ± 0,1° C.

RÉSULTATS

Dans le tableau ci-dessous nous n'avons consigné que les résultats obtenus pour les produits sur lesquels le plus grand nombre de déterminations avait été réalisé afin que les moyennes obtenues soient les plus significatives possible.
Les points de fusion indiqués dans les colonnes (2) et (3) indiquent donc la **moyenne** des points de fusion pour différents lots d'un même produit.
Nous avons également classé les produits sélectionnés en deux catégories distinctes :
1) **les esters** : il a été considéré comme ester tous les produits obtenus par estérification d'un ou plusieurs acides gras sur un alcool ou un polyol,

ESTERS

	MOYENNE DES POINTS DE FUSION (en ° C)				VALEURS EXTREMES DES POINTS DE FUSION (en ° C)			
Produit (1)	Méthode FP 2 (2)	Méthode tube en U (3)	Différence (4)	% (5)	Méthode FP 2 (6)	Ecart (7)	Méthode tube en U (8)	Ecart (9)
A	56,6	56,0	+ 0,6	1,07	55,6 / 57,1	1,5	55,2 / 56,2	1,0
B	45,8	46,3	— 0,5	1,09	44,7 / 47,0	2,3	45,9 / 47,0	1,1
C	56,1	56,5	— 0,4	0,71	55,5 / 56,6	1,1	56,0 / 58,0	2,0
D	49,1	50,9	— 1,8	3,66	48,0 / 50,0	2,0	50,5 / 51,3	0,8
E	54,0	53,7	+ 0,3	0,56	52,5 / 55,8	3,3	52,7 / 54,3	1,6
F	46,6	47,5	— 0,9	1.93	46,0 / 47,6	1,6	46,5 / 48,0	1,5
G	40,7	41,2	— 0,5	1,23	39,7 / 41,3	1,6	41,0 / 41,6	0,6
H	48,9	49,7	— 0,8	1,64	47,6 / 49,5	1,9	49,2 / 50,5	1,3
I	49,3	51,0	— 1,7	1,42	47,3/ 51,3	4,0	50,5 / 51,8	1,3
J	45,0	44,7	+ 0,3	0,67	44,2 / 45,7	1,5	43,8 / 45,0	1,2
K	50,5	51,1	— 0,6	1,19	50,0 / 52,7	2,7	50,4 / 51,5	1,1
L	48,5	49,5	— 1,0	2,06	47,4 / 49,2	1,8	48,7 / 50,0	1,3
moyenne générale	49,26	49,84	— 0,58	1,18	Ecart moyen	2°, 11	Ecart moyen	1°, 23

© The Author.All rights reserved

2) **les mélanges** : c'est-à-dire :

a) soit un mélange d'esters

b) soit un mélange d'esters et de cires

c) soit un mélange d'esters et de produits tensio-actifs (savons, alkylsulfates, condensats d'oxyde d'éthylène, etc...)

Cette distinction a été faite pour examiner la fusion de produits dont la composition peut être considérée comme simple ou tout au moins dont les composants appartiennent à une même famille chimique par opposition aux mélanges dont les éléments, bien qu'appartenant tous à la famille des corps gras, représentent des composés chimiques de nature et de structure très différentes.

MÉLANGES :

	MOYENNE DES POINTS DE FUSION (en ° C)				VALEURS EXTREMES DES POINTS DE FUSION (en ° C)			
Produit (1)	Méthode FP 2 (2)	Méthode tube en U (3)	Différence (4)	% (5)	Méthode FP 2 (6)	Ecart (7)	Méthode tube en U (8)	Ecart (9)
M	44,9	45,2	— 0,3	0,67	43,4 / 45,8	2,4	44,2 / 46,0	1,8
N	49,7	50,4	— 0,7	1,41	48,3 / 50,6	2,3	49,8 / 51,0	1,2
O	59,9	60,6	— 0,7	1,17	56,3 / 61,6	5,3	59,5 / 61,3	1,8
P	44,1	45,7	— 1,6	3,62	42,9 / 46,0	3,1	44,5 / 46,4	1,9
Q	45,0	45,7	— 0,7	1,56	44,0 / 46,2	2,2	45,3 / 46,8	1,5
R	51,4	52,5	— 1,1	2,14	50,6 / 52,1	1,5	51,9 / 53,5	1,6
S	54,4	55,5	— 1,1	2,02	51,0 / 56,2	5,2	54,0 / 58,0	4,0
T	49,1	51,2	— 2,1	4,28	47,2 / 51,3	4,1	50,0 / 52,0	2,0
U	56,3	57,2	— 0,9	1,60	54,1 / 57,5	3,4	57,0 / 57,5	0,5
V	42,5	43,2	— 0,7	1.65	41,4 / 44,1	2,7	41,0 / 44,3	2,3
W	55,2	55,3	— 0,1	0,18	54,1 / 56,5	2,4	54,0 / 56,3	2,3
X	46,8	48,2	— 1,4	2,99	46,0 / 49,4	3,4	47,5 / 48,5	1,0
moyenne générale	49,94	50,89	— 0,95	1,90	Ecart moyen	3°, 17	Ecart moyen	1°, 83

CONCLUSIONS

— 1 En examinant les résultats dans leur ensemble, on peut noter que :

Quelle que soit la méthode utilisée, les variations sont plus faibles pour les esters que pour les mélanges.

En effet, l'écart moyen maximum sur les mesures effectuées sur les esters est de 2,1° C et 1,2° C, alors qu'il passe à 3,2° C et 1,8° C pour les mélanges.

Ces variations s'expliquent facilement par le polymorphisme plus grand présenté par les mélanges dont on sait que la plage de fusion augmente généralement avec le nombre et la disparité des constituants.

— 2 Si on examine maintenant les résultats en fonction de la méthode utilisée on note que les points de fusion obtenus par la méthode FP 2 par l'appareil de METTLER sont dans la plupart des cas **inférieurs**, pour un même produit, aux valeurs obtenues par la méthode du tube en U.

La différence moyenne sur l'ensemble des esters est de — 0,58° C, soit en valeur relative 1,18 %, et celle de l'ensemble des mélanges de — 0,95° C, soit 1,90 %.

Nous pensons, bien qu'il soit difficile d'en faire la preuve, que les différences observées soient dues :

— d'une part, aux forces de frottement non négligeables qui retardent le glissement de l'échantillon dans la méthode du tube en U,

— d'autre part, à l'influence de la viscosité du produit proche de sa fusion qui souvent, se présente sous l'aspect d'un corps plus ou moins pâteux. Cette viscosité pouvant également retarder le glissement de l'échantillon.

© The Author.All rights reserved

— 3 Enfin si on considère les écarts maximum sur les résultats obtenus à l'aide de chacune des méthodes, il apparaît que dans la plupart des cas, les écarts sont plus importants pour les déterminations effectuées à l'aide de l'appareil METTLER.

Ces imprécisions sont probablement dues à la difficulté d'appréciation visuelle de la fusion finale. En effet, en plus des différences que nous avons notées pour un même produit selon la forme, la quantité, la position de l'échantillon sur la platine, la fusion se présente sous la forme d'un phénomène continu, le produit passant pas plusieurs étapes successives telles que début de fusion, fusion franche et fusion totale, sans limites bien définies.

Au contraire, dans la méhode du tube en U, l'apparition du glissement est une appréciation plus ponctuelle et très limitée dans le temps.

— 4 L'utilisation de l'appareil METTLER FP 2 pour la mesure du point de fusion des corps gras grâce à l'observation visuelle **en continu** du phénomène de fusion permet de mieux comprendre, s'il en était besoin, le comportement des corps gras à la chaleur et surtout de concrétiser la notion de plage ou zone de fusion qui caractérise ces produits.

Par contre, si on se limite à la notion « classique » de point de fusion l'appareil reste imprécis dans sa mesure finale.

Néanmoins, il semble que les résultats d'ensemble sur un produit donné ne doivent être très éloignés du point de fusion théorique, s'il en existe un, car cette méthode permet d'éliminer l'influence des facteurs rhéologiques tels que force de frottement et viscosité.

Ce sont ces facteurs qui semblent responsables des valeurs plus élevées obtenues par la méthode du tube en U qui néanmoins, s'avère plus généralisée et qui a le mérite d'être plus reproductible.

Cette méthode à notre avis, permet d'obtenir un vrai point de glissement plutôt qu'un véritable point de fusion.

Cette étude nous a permis d'affirmer notre conviction : dans le domaine bien particulier des corps gras il serait souhaitable d'abandonner la notion, à notre avis trop rigoureuse, de point de fusion qui, par définition, s'applique à la mesure d'un phénomène brusque de changement d'état, au profit d'une notion plus nuancée de plage ou zone de fusion qui correspond mieux dans la pratique, au comportement habituel des corps gras.

For two and a half years, we have been determining the melting-points of esters and mixtures of fats by using an FP 2 METTLER apparatus and, at the same time, the now classical U-tube method. Both these methods have been carried out on 66 different products, with 1050 melting-point determinations per method.

Whatever method was used, the variations were smaller with esters than with mixtures.

The melting-points obtained by the method using a METTLER apparatus are in most cases inferior, for the same product, to those found with the U-tube method.

The average difference for the esters is — 0.58° C.

The variations are even greater when a METTLER apparatus is used. Those imprecisions are probably due to the difficulty of visual verification of the final melting.

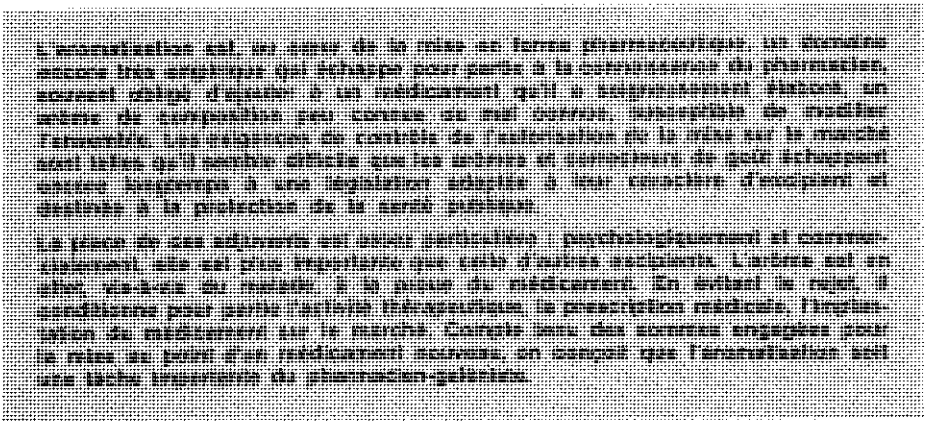
The use of a METTLER FP 2 apparatus for measuring the melting-points of fats allows us, with the help of continuous visual observation of the melting phenomenon, to understand better the behaviour of fat towards heat and, above all, puts in a concrete form the notion of zone or range of melting which characterizes these products.

But however, by remaining within the limit of the « classical » notion of melting-point, the apparatus remains inaccurate in its final measurement.

© The Author.All rights reserved

Intérêt de la chromatographie en phase gazeuse du « Head-Space » * pour l'étude d'arômes utilisés en pharmacie **

Communication de Madame J. WELBY
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de Paris.
Journée galénique de Saint-Rémy-de-Provence - Mai 1970



Les formes médicamenteuses aromatisées sont essentiellement celles destinées à la voie orale et elles sont soit liquides : solutés buvables, potions, sirops, gouttes,.. soit solides : poudres, saccharures granulés, comprimés à sucer, tablettes... On parfume aussi certaines formes destinées à l'usage externe telles que pommades et poudres.

Les arômes à la disposition du galéniste sont très variés : certains sont d'**origine naturelle** et les plus employés sont alors les agrumes (orange, citron, pamplemousse, mandarine...). Les fruits rouges (framboise, fraise, cassis, groseille...), la menthe, la vanille, la réglisse et le caramel. Dans la plupart des cas, on utilise des « compositions » qui correspondent à des arômes naturels renforcés naturellement (par exemple arôme de fraise additionné d'arôme de framboise). D'autres arômes au contraire sont d'**origine synthétique** et sont composés soit d'un seul produit (vanilline, eucalyptol), soit d'un mélange plus ou moins complexe. Enfin, s'inscrivant entre les deux catégories précédentes, il existe aussi des arômes naturels renforcés par des produits synthétiques.

Pour tous ces arômes, les fabricants mettent à la disposition de l'industrie pharmaceutique **différentes présentations (formes d'utilisation)** qui résultent à la fois de la nature de la matière première, naturelle ou synthétique, des traitements nécessaires à l'obtention d'un produit manipulable et suffisamment concentré, et de la forme pharmaceutique à laquelle elles ont à être incorporées. Ainsi emploie-t-on volontiers un jus de fruit concentré comme agglutinant d'un saccharure granulé, tandis qu'un

* Cette expression anglo-saxonne est difficile à traduire. Il s'agit de l'atmosphère qui, dans un récipient clos, se trouve au-dessus du produit aromatique et qui contient par conséquent les substances volatiles qui constituent l'arôme.

** Ce travail a été réalisé avec l'aide de l'Association pour la recherche et le développement de la Pharmacopée, en collaboration avec MM. F. HAUTBOUT, LUONG T.T., F. PUISIEUX et A. LE HIR. Il a fait l'objet d'une publication détaillée aux Annales Pharmaceutiques Françaises, 1970.

© The Author.All rights reserved

arôme pulvérulent s'incorpore aisément à une poudre.

A côté de l'empirisme qui souvent préside à la préparation et à l'utilisation des arômes s'est développée une autre voie, scientifique celle-là, tendant pour sa part à la connaissance physico-chimique approfondie des arômes naturels et, d'une façon plus pratique à la possibilité d'un contrôle sur ce type de matières premières, contrôle en rapport avec leur nature et leur usage.

Actuellement dans l'industrie, ce dernier point est généralement résolu en effectuant une série d'essais physico-chimiques classiques. La liste suivante en indique un certain nombre, les uns d'application générale, les autres propres à un type d'arôme déterminé.

Citons la densité, le pH, l'indice de réfraction, les cendres, le résidu sec, le pouvoir rotatoire, le point d'ébullition, les solubilités, le degré alcoolique, l'humidité, le dosage des aldéhydes totaux, la recherche de l'arsenic et des métaux lourds, la caractérisation des supports et des conservateurs éventuellement présents.

De plus, le médicament terminé est soumis à un essai de non-toxicité globale où l'arôme intervient pour sa part.

Ces essais permettent de conclure dans une certaine mesure à l'identité et à la constance d'une fourniture, mais ils n'ont qu'un rapport incertain avec l'odeur proprement dite constituée par la fraction volatile de l'arôme et élément important de son efficacité.

Pour la connaissance de cette partie volatile, diverses méthodes peuvent être employées. La plupart comportent trois phases qui d'ailleurs sont souvent imbriquées : une **concentration** de l'arôme qui s'effectue le plus souvent par distillation, par extraction ou par entraînement au moyen d'un gaz tel que l'azote ; un **fractionnement** éventuel faisant appel soit à la distillation fractionnée, soit à la chromatographie, soit à certaines réactions chimiques ; enfin une phase d'**identification** s'effectuant le plus souvent par des méthodes physiques telles que la spectroscopie infra-rouge ou ultra-violette, la spectrométrie de masse, la chromatographie sur couche mince et surtout la chromatographie en phase gazeuse.

A côté de ces méthodes plus ou moins complexes comportant plusieurs phases et s'appliquant en fait à d'autres composants que ceux de la seule fraction volatile, figure une technique plus simple dite du « Head-space » et qui consiste à étudier exclusivement la fraction volatile d'un arôme par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique a été utilisée pour résoudre différents problèmes : pour l'analyse de l'arôme de chou, pour l'étude de la formation des produits volatils de la framboise, pour la caractérisation de l'arôme de produits divers : aliments (pommes, ananas, oignons), boissons (café, cognac), fumée de cigares et de cigarettes ; pour l'appréciation de la qualité d'arômes d'orange. Bassette s'est servi de la même méthode pour l'analyse de solutions très diluées (de l'ordre de quelques p.p.m.) de composés carbonylés, d'esters et d'alcools.

Kepner l'a appliquée à la détermination quantitative de produits volatils dans des solutions aqueuses. Enfin Nawar a étudié l'influence de différents facteurs sur la composition quantitative du « Head-space » de différentes solutions. La concentration d'un produit volatil dans le « Head-space » est évidemment liée à la fois à la pression de vapeur du produit, à la température, à la nature du solvant, à la solubilité du composé dans le solvant et à la présence de sels ou de sucres dans le milieu liquide.

La méthode du head-space présente un certain nombre d'avantages évidents : étude de la seule fraction volatile ; absence de solvants susceptibles d'apporter les impuretés ; étude du produit en l'état ; réalisation possible à la température ambiante et rapidité d'exécution. Il était intéressant, après avoir mis au point un mode opératoire bien défini, de chercher à en évaluer l'intérêt dans le domaine du contrôle des arômes utilisés dans l'industrie pharmaceutique.

Sans insister sur la description de la méthode, nous indiquerons qu'elle a été appliquée à des arômes couramment utilisés dans l'industrie pharmaceutique, et, pour chacun d'eux, à différente formes d'utilisation.

Il s'agissait :

— de produits relativement peu riches en principes aromatiques (jus, extraits, teintures, alcoolatures).

— de produits très riches en principes aromatiques (arômes artificiels, essences).

— de fruits frais.

Notons toutefois qu'une part prépondérante de nos expériences a été faite sur la framboise. Ce fruit a été retenu en raison de son utilisation fréquente en aromatisation pharmaceutique. C'est le plus employé des fruits rouges. Il est très apprécié des enfants et c'est un bon correcteur de goût associable à une forte quantité de sucre.

A titre d'exemple, voici les résultats fournis par ce fruit.

Les chromatogrammes fournis par l'analyse du head-space de framboise fraîche

© The Author.All rights reserved

et de sept jus du commerce se montrent qualitativement très voisins. La quantité d'éthanol est en revanche très inférieure dans le head-space du fruit frais.

Une analyse du head-space a également été pratiquée sur deux jus d'âge différent correspondant à un mode de fabrication identique : elle n'a pas montré de différence significative.

En revanche, les jus renforcés ainsi que les arômes artificiels de framboise donnent un chromatogramme différent, présentant deux pics supplémentaires nettement différenciés.

Quant aux produits artificiels, leurs chromatogrammes sont nettement différents et varient d'un produit commercial à l'autre. L'influence de différents facteurs a également été envisagée :

— température de prélèvement ;

— dilution de l'aromatisant ;

— relargage par différents électrolytes.

Des résultats obtenus se dégagent notamment les conclusions suivantes :

— La chromatographie du head-space dans les conditions retenues, c'est-à-dire permettant la séparation des pics les plus volatils, ne permet de déceler qu'un nombre limité de composants de l'arôme total. Dans le cas de la framboise, par exemple, il n'y a que cinq pics majeurs.

— Des fruits différents ont un « head-space » de composition voisine. Celui des fruits rouges renferme presque toujours de l'acétaldéhyde, de l'acétate de méthyle ou formiate d'éthyle, de l'acétate d'éthyle, du méthanol et de l'éthanol. Celui des agrumes renferme presque toujours de l'α pinène, du β pinène et du limonène.

— L'analyse du head-space peut être un élément intéressant dans le contrôle des produits utilisés pour l'aromatisation des médicaments. Elle présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, applicable aussi bien aux formes liquides que solides et relativement sensible.

Il est possible comme nous l'avons vu, de déceler la présence de substances étrangères (méthanol) dans un jus de framboise et il est possible aussi de détecter la présence de produits utilisés pour « renforcer » certains arômes. Cette sensibilité peut d'ailleurs être augmentée en opérant en présence d'électrolytes ou à température supérieure à la température ordinaire. Enfin, s'effectuant en l'absence de solvants et normalement à la température ordinaire la méthode décrite présente l'intérêt de n'altérer en rien la composition du produit. Il faut noter toutefois qu'en raison de la composition analogue du head-space de certains fruits différents une telle détermination est insuffisante en soi. Elle doit obligatoirement être associée à d'autres essais portant sur la partie fixe du produit.

© The Author.All rights reserved

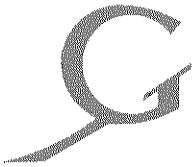


IMAGE DE LA CHIMIE ORGANIQUE

LABRAFILS

GLYCERIDES POLYOXYETHYLENES

ANTIBIOTHERAPIE - HORMONOTHERAPIE - VACCINOTHERAPIE

VOIE ORALE / RECTALE / O.R.L. / I.M. / EXTERNE

© The Author.All rights reserved

Absorption rectale de l'erythromycine

Effet de la nature de l'excipient et de la présence de tensio-actifs

Action éminemment favorable du Labrafil M 2130 CS

Extrait de publication de :
Lidia F. SARAIVA de PAIVA
L. Silva CARVALHO e Manuela A. REGO
Revue Portugaise de Pharmacie
Vol. XXI 1971 Avril-Juin, n° 2

L'administration rectale de l'erythromycine présente un intérêt majeur étrange lorsque cet antibiotique et ses dérivés peuvent par elle passer être mal supportés, alors inactivés et par voie intramusculaire être irritants.

MÉTHODE

L'expérimentation est menée sur 273 femmes, auxquelles est administré un suppositoire titrant 250 mg d'erythromycine base.

Des prélèvements sanguins sont effectués 30 minutes, 1, 2 et 5 heures après l'administration.

Parallèlement des essais sont entrepris pour évaluer l'effet cumulatif selon le schéma suivant :

— Administration de deux capsules d'erythromycine, une à temps 0 et une à la sixième heure.

— Administration d'un suppositoire toutes les six heures à la 12e, 18e et 24e heure le premier jour de l'expérience, et à la 6e et 12e heure le second jour de l'expérience.

L'erythromycine est dosée dans le sang par méthode microbiologique vis-à-vis de Sarcina lutea ATCC 9341 selon Stanley Bell et coll. avec quelques modifications. Tous les essais ont été entrepris sur des lots supérieurs ou égaux à dix personnes.

PRINCIPAUX EXCIPIENTS ETUDIÉS

— Excipients pour suppositoires

Massa estarinum (C + BB) (2 p. / 1 p.)

Massa G 37/39 M

Suppocire C

Polyoxyéthylène glycol 1500 + 6000 (1 p. / 2 p.)

© The Author.All rights reserved

— **Adjuvants**

Laurylsulfate de sodium	0,5 p. cent
Deoxycholate de sodium	0,02 p. cent
Hyaluronidase	500 unités par suppositoire
Labrafil M 2130 CS	20 à 50 p. cent

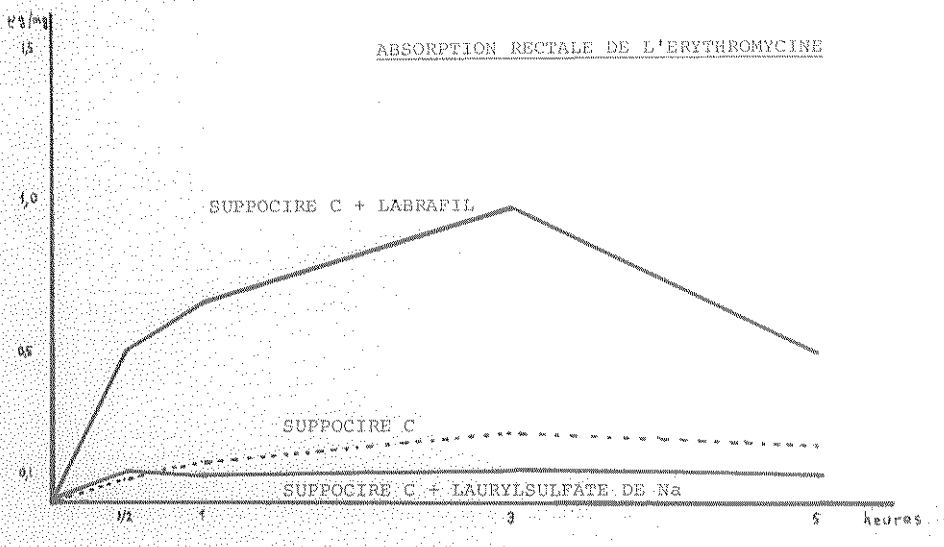
RÉSULTATS

Parmi les nombreux résultats obtenus avec les 24 formules de suppositoires étudiées, nous isolons ceux relatifs à la performance du Suppocire C.

Le Suppocire C assure un taux d'erythromycine sanguine plus élevé que le mélange de polyoxyéthylène glycol.

L'addition de laurylsulfate au Suppocire C diminue le taux d'erythromycine sanguine.

L'addition de Labrafil M 2130 CS au Suppocire C assure une plus rapide et plus importante absorption de l'erythromycine, à la condition que la quantité de Labrafil soit de 50 p. cent de l'excipient.



L'effet favorable du Labrafil M 2130 CS est significativement plus élevé que celui obtenu par l'ajout de hyaluronidase ou déoxycholate de sodium.

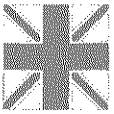
Dans quelques cas une réaction inflammatoire très fugace fut observée : un anesthésique type benzocaïne, lidocaïne ou amylocaïne peut être ajouté, et dans ce cas on note une meilleure absorption. L'évaluation de l'effet cumulatif ne montre aucune différence significative.

© The Author.All rights reserved

CONCLUSION

Des études antérieures, notamment celles des Professeurs Bost et Ruckebusch vis-à-vis de l'esérine ou de l'ion salicylate, et celle du Docteur Bertrand vis-à-vis de la tétracycline, avaient souligné l'importance de la nature de l'excipient.

Le Labrafil M 2130 CS qui se mélange parfaitement avec les types de Suppocire, apporte à l'excipient peut-être une discrète tensio-activité, surtout une hydrophilie qui quoique discrète est uniformément répartie dans les structures des triglycérides et glycides de l'excipient : l'amphiphilie obtenue semble favorable à la cession de l'antibiotique et à sa diffusion, voire sa résorption.



The rectal administration of erythromycine is particularly interesting when taking into account the fact that this antibiotic and its derivatives can be badly tolerated when taken orally, and even inactived, and act as an irritant when taken intramuscularly.

273 women were used in the experiment, each being administred a suppository of 250 mg of erythromycine base.

Blood samples were taken at 30 minutes, 1 hour, 2 hours and 5 hours intervals after the drug was taken.

Quantitative analysis of erythromycine in the blood was done by microbiological means using Sarcina lutea ATCC 9341.

Amongst the numerous results obtained with the 24 suppository formulas studied, we have selected the performance of C Suppocire.

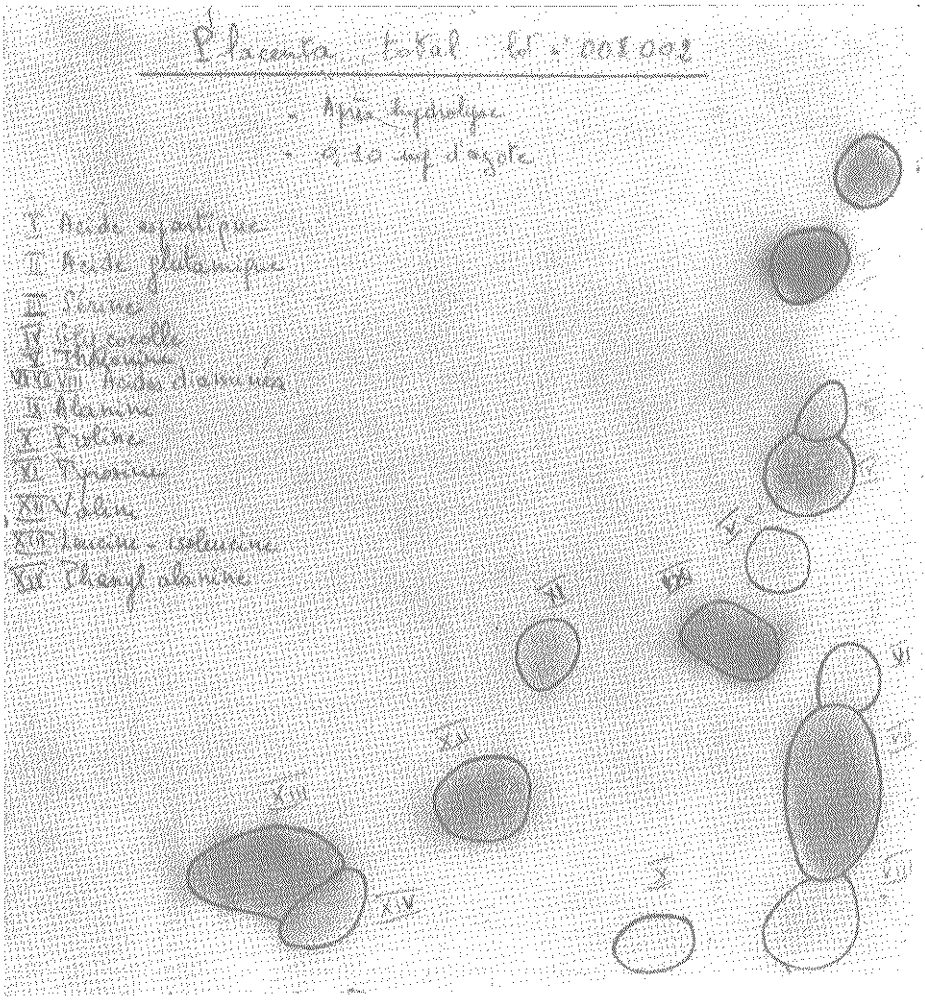
C Suppocire provides a higher blood erythromycine level than the polyoxyethylene glycol mixture.

Adding laurylsulphate to C Suppocire lowers the blood erythromycine level. Adding Labrafil M 2130 CS to C Suppocire increases the rate and degree of erythromycine absorbtion, on condition that the quantity of Labrafil is 50 % that of the excipient. The favourable effect of Labrafil M 2130 CS is significantly higher than that obtained by adding hyaluronidasee or sodium dioxycholate.

Extract of a publication by : Lidia F. SARAIVA de PAIVA, L. Silva CARVALHO e Manuela A. REGO, Portuguese Pharmacie Revue, vol. XXI 1971, April-June, n° 2.

© The Author.All rights reserved

IMAGE DE LA CHIMIE BIOLOGIQUE



EXTRAITS D'ORGANES

INSTITUT MERIEUX - GATTEFOSSE ETS

EXTRAITS PLACENTAIRES

LIQUIDE AMNIOTIQUE - SERUM - ALBUMINE

© The Author.All rights reserved

Influence de l'excipient sur l'absorption du salicylate de glycol administré en pommades par voie cutanée et par voie rectale *

P. FEBVRE, J.-M. AIACHE, P. JABOT, P. ARMOIRY
Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand

S'inscrivant dans une série d'études sur les phénomènes d'absorption des médicaments, les auteurs ont étudié des pommades émulsionnées en phase continue aqueuse ou huileuse titrant :

— 7,5 % de salicylate de glycol pour les applications épicutanées

— et 15 % de salicylate de glycol pour les applications rectales.

Les excipients utilisés étaient constitués de :

— Stéarate de glycol rendu auto-émulsionnable par un alkylsulfate de sodium (SEDETOL 61),

— un stéarate de polyoxyéthylène glycol (GELOT 64),

— ou un stéarate de propylène glycol rendu auto-émulsionnable par un savon d'amine (TESAL),

— tandis qu'un excipient constitué d'acide stéarique, de cire et de paraffine, en particulier, représentait la formule à phase continue huileuse (LIPIDINE).

L'administration par voie cutanée est réalisée chez le rat albinos dans des conditions très précises d'application, la quantité de médicament éliminée dans l'urine est évaluée par le dosage de l'acide salicylique total, 6, 12 et 24 heures après l'application épicutanée.

L'administration des pommades par voie rectale est effectuée chez le lapin à raison de 2 ml de pommade par animal, tandis que 3 à 4 heures après l'administration, la salicylémie était évaluée in vivo, en continu, au moyen d'une auto-analyseur.

Il est possible de classer les excipients en fonction de la quantité de traceur éliminé après l'administration. Pour les pommades dermiques, l'élimination était la plus importante dans le cas d'utilisation du SEDETOL, et la moins importante dans le cas d'utilisation du TESAL, GELOT 64 et LIPIDINE s'inscrivant dans une zone intermédiaire.

* Compte rendu des séances de la Société de Biologie, tome 164, nos 8 et 9, 1970, p. 1700.

© The Author.All rights reserved

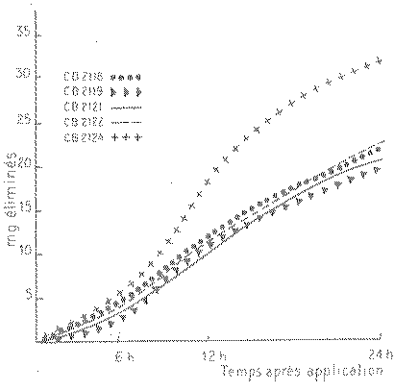


Figure 1

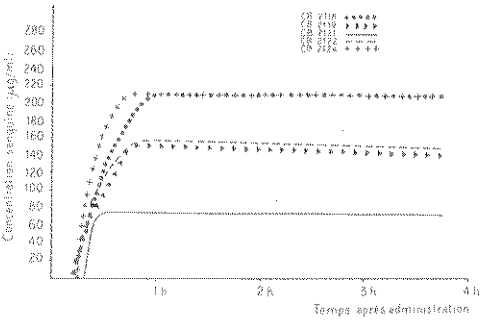


Figure 2

CB 2118 : GELOT 64 CB 2119 : ESTER COMPLEXE	CB 2121 : TESAL CB 2122 : LIPIDINE	CB 2124 : SEDETOL 61

Dans le cas de l'administration des pommades rectales, c'est encore la préparation à base de SEDETOL qui donne les taux les plus importants d'acide salicylique, le TESAL donne également les taux les plus faibles, tandis que GELOT 64 et LIPIDINE s'inscrivent aussi dans une zone intermédiaire.

En rapprochant ces résultats de ceux obtenus par les mêmes auteurs avec ces mêmes excipients, mais renfermant comme traceur le glycéryl-gaïacol, on constate que c'est toujours l'excipient émulsionné à base de SEDETOL qui donne un taux d'élimination le plus important : il semblerait que le laurylsulfate de sodium utilisé comme agent émulsionnant favorise l'absorption des deux tracteurs glycéryl-gaïacol et salicylate de glycol.

La solubilité propre des traceurs est un élément important : la plus grande liposolubilité du salicylate de glycol se traduit par un passage beaucoup plus grand à travers la peau, environ cinq fois plus élevé que pour le glycéryl-gaïacol.

En conclusion, l'absorption du principe actif dépend de deux facteurs : de la constitution de l'excipient et en particulier de la nature de l'agent émulsionné, et de la solubilité propre du principe actif.

© The Author.All rights reserved

Hygiène bactériologique du matériel, des locaux du personnel en industrie cosmétique

Mme L. COIGNERAI-DEVILLERS *

Conférence présentée aux Journées Galéniques
de Saint-Rémy-de-Provence - Octobre 1971

Une prise de conscience de plus en plus aiguë de l'importance des phénomènes d'allergie consécutifs à l'emploi de produits cosmétiques a conduit les industriels à étudier des hypothèses dans lesquelles les substances allergisantes seraient éliminées du marché, ce qui nécessite l'emploi des conservateurs généralement utilisés pour limiter ou détruire la flore microbienne.

Les populations microbiennes que l'on peut dénombrer dans les divers cosmétiques y sont introduites, soit par les matières premières, soit par les processus de fabrication, les manipulations, le matériel, le conditionnement ou le milieu ambiant. Il est donc indispensable, avant de se priver du secours des conservateurs, de mettre soigneusement au point la réduction, ou la suppression de ces apports microbiens en étudiant :

- l'emploi de matières premières pauvres en germes microbiens ou fongiques
- l'hygiéne bactériologique minutieuse du matériel
- la réduction des délais en cours de fabrication, surtout lorsque le produit risque de demeurer aux températures critiques (de 15° à 45°) favorisant les développements microbiens
- la réduction ou la suppression des contacts avec l'air des ateliers, ou le travail en atmosphère désinfectée ou stérile
- le conditionnement stérile ou du moins aussi aseptique que possible
- la conservation du matériel de conditionnement, pots, tubes, flacons, boîtes dans des conditions excluant toute pollution extérieure
- l'utilisation de papiers ou d'emballages protégés contre les développements microbiens ou fongiques
- la surveillance de l'hygiène du personnel
- In fine, il ne faut pas négliger les facteurs climatiques pendant la période de commercialisation (température et humidité) et s'assurer par des tests bien choisis que le produit peut résister aux plus dégradants.

L'exposé qui nous a été confié se propose de passer en revue les problèmes de la contamination par le matériel, le personnel et le milieu ambiant.

Il nous a paru nécessaire de faire au préalable un rapide tour d'horizon des principaux germes ou groupes de germes de souillure que l'expérience nous a permis de détecter dans les produits cosmétiques, soumis à notre contrôle.

Nous essaierons d'en préciser les sources les plus ordinaires et de décrire les dégâts dont ils sont responsables. Et, pour finir, de passer en revue l'arsenal des remèdes et palliatifs propres à assurer aux produits cosmétiques une conservation sans défaut.

* Laboratoire de Bactériologie Alimentaire et Industrielle, 8, rue Beautreillis, Paris-4e.

© The Author.All rights reserved

I. Groupes de germes ayant des origines communes

Eaux : germes intestinaux - hommes et animaux coliformes

Escherichia coli
E. intermedium (canalisations)
Aerobacter aerogenes
Pseudomonas (plus de 500 espèces)
Leuconostoc mesenteroïdes

Air : Bacillus subtilis

Proteus vulgaris
Staphylocoques
Moisissures
Levures
Ferments lactiques divers

II. Groupes de germes produisant des dégâts analogues

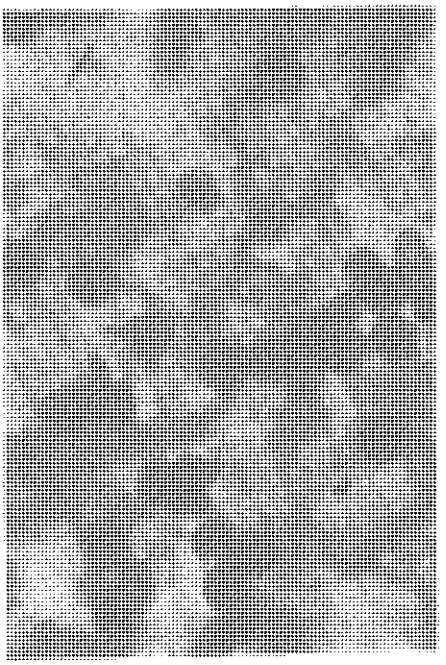
Germes producteurs d'hydrogène sulfuré, notamment en utilisant la cystéine — s'il se trouve aussi du fer : production de sulfures de fer noircissant (cas des conserves de crustacés)

Citrobacter
Proteus vulgaris
Clostridium sulfito-réducteurs aérobies et anaérobies
Décarboxylants actifs

La majorité des germes décompose les glucides en produisant CO_2

Bacillus subtilis
Moisissures
Levures

Présence de levures dans un produit cosmétique



III. Germes responsables de dermites

tous les staphylocoques

Moisissures : certains penicillium produisent une toxine affectant le système nerveux (travaux japonais au Congrès de Mycologie de Paris - Juin 1971)

Certains Trichophyton sont très Keratinolytiques. Certains Candida sont protéolytiques et cette protéolyse prépare le terrain pour le développement des staphylocoques

Levures

IV. Germes détériorant l'aspect

- gonflement des conditionnements : Levures, Moisissures, Bacillus Subtilis
- provoquant une odeur : Pseudomonas - Candida
- donnant une coloration verte : Pseudomonas aeruginosa
- donnant des taches colorées : Moisissures, Serratia Marcescens - B. prodigiosus
- liquéfiant le produit : grand nombre de germes protéolytiques, Escherichia coli
- cassant l'émulsion : très nombreux germes banaux de l'air : en particulier Leuconostoc
- formant des glaires : Leuconostoc

V. Germes utilisant les citrates

Pseudomonas
Serratia
Enterobacter
Salmonelles
Klebsiellas

VI. Germes protéolysant ou gélatinolysant

Serratia
Proteus
Enterobacteries
Pseudomonas

VII. Germes acidifiant le milieu par formation d'acide pyruvique, acétyl-acétique, propionique, succinique, lactique

Proteus
Citrobacter
Escherichia

ou l'alcalinisant

Alcaligenes
Proteus
Clostridium
Klebsiella

Ceci dépend de l'aliment trouvé par le germe dans le milieu considéré.

De toutes façons, la modification du milieu par les métabolites microbiens provoque le développement de germes jusque-là restés en sommeil faute d'un terrain favorable.

© The Author.All rights reserved

Par exemple dans les sols (Domange et Mangenot)

1re vague : Bacillus megathérium

2e vague : Pseudomonas, induite par la libération dans le milieu d'acide β oxybutyrique résultant de l'autolyse de B. magathérium.

De même les Candida protéolytiques préparent le terrain pour le développement de Staphylococcus aureus.

On conçoit donc aisément la nécessité de ne laisser pénétrer dans les produits cosmétiques qu'une flore réduite au minimum.

Comme on peut le constater, ces germes, d'espèces très diverses, sont pour la majorité, très répandus dans la nature, et, par voie de conséquence, on les trouvera très fréquemment dans les locaux de fabrication. Ils risquent également d'être apportés par les matières premières si celles-ci ont été préparées sans souci d'hygiène bactériologique. Dans ce domaine, les préoccupations des fabricants et de leurs fournisseurs sont donc identiques et liées puisque l'utilisateur est en droit d'exiger des produits de base ne lui créant aucun problème d'ordre bactériologique.

Mais le processus de fabrication lui-même est également une cause très importante de pollutions microbiennes et fongiques si l'on ne garde bien présent à l'esprit que n'importe quel élément de la chaîne de fabrication risque de devenir, à un moment donné, un vecteur de contamination et que la propreté bactériologique se situe sur un plan totalement différent de la propreté apparente « ménagère ». Telle machine, propre en apparence, peut héberger une flore invisible, source d'accidents graves.

Nous ne citerons ici que les cas les plus fréquemment rencontrés :

Cuves, containers, conges, etc.

Leurs parois, ouvertes à l'air libre ou sous la protection souvent illusoire de couvercles peu hermétiques, récoltent toutes les poussières voltigeant dans l'air, auxquelles sont accrochés de très nombreux germes microbiens et des levures et moisissures encore plus nombreuses.

Les homogénéiseurs

La finesse de leurs canalisations, les cannelures de leurs têtes de broyage, rendent le nettoyage et la désinfection très délicats à assurer de façon parfaite.

Sur les fines particules retenues, les microbes peuvent pulluler de façon considérable, notamment lorsque ces appareils sont arrêtés pendant des temps assez longs, comme week-ends et vacances.

Ce qui explique le grand nombre d'accidents du « lundi matin » les premières « venues » entraînant avec elles ces populations indésirables.

Les canalisations

Leurs points bas, leurs coudes où la circulation est moins active, les portions en contact avec des éléments de l'usine à température élevée qui jouent alors le rôle d'étuve, préparent de véritables bouillons de culture.

Les adoucisseurs d'eau

Les boues déposées sur les résines échangeuses d'ions sont elles aussi des bouillons de culture, notamment en ce qui concerne Escherichia Coli, Leuconostoc et les Moisissures.

Les filtres et pasteurisateurs

Ceux-ci aux multiples plaques ne peuvent être efficacement désinfectés qu'au cours d'un démontage total.

L'air

C'est un vecteur d'innombrables germes qui varient avec les époques de l'année.

Septembre et juin sont favorables aux Levures. L'environnement est également une source, souvent difficile à mettre en évidence, de contaminations anormales. Citons :

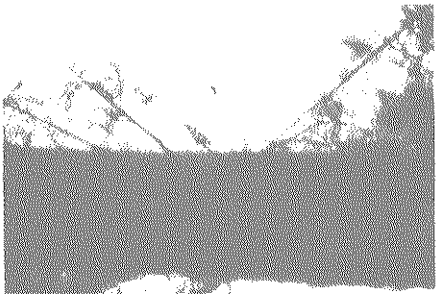
— les farines folles issues des moulins, très riches en moisissures et levures
— les poussières de dépôts de plantes, de légumes, de produits pulvérulents (poudres de riz, talc, etc.)
— les laiteries qui peuvent disperser ferments lactiques et Leuconostoc
— les Staphylocoques rencontrés souvent en très grand nombre dans l'air des agglomérations urbaines.
— Enfin Bacillus Subtilis, hôte habituel de l'air, dont le développement peut, dans certaines circonstances, atteindre une densité extraordinaire.

Le conditionnement

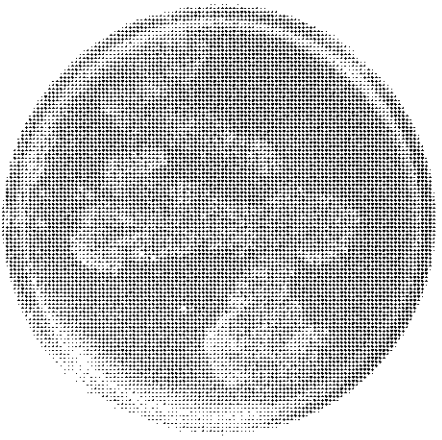
En règle générale les **conditionnements** plastiques, conservés dans de bonnes conditions d'hygiène sont très peu souillés de germes. La verrerie peut avoir été contaminée si elle est emballée sans précautions ; dans ce cas, le lavage doit en être étroitement surveillé sur le plan bactériologique afin d'éviter des souillures supplémentaires dues aux bains de lavage.

Les papiers et cartons peuvent introduire des moisissures.

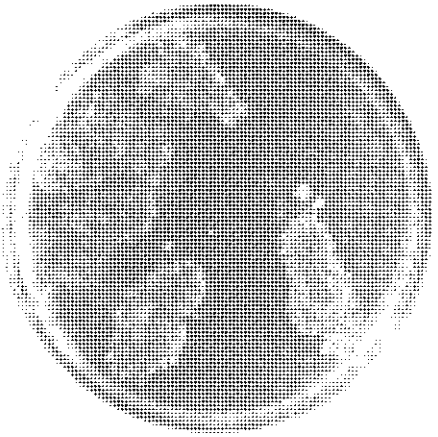
© The Author.All rights reserved



Vue au microscope d'un fragment de patte d'araignée : on remarquera autour des poils l'enchevêtrement de filaments de moisissures transportées



Colonies microbiennes développées autour d'un cheveu déposé sur un milieu de culture et l'engaînant totalement



Développement microbien sur des empreintes de doigts malpropres appliqués sur un milieu de culture

Les insectes et araignées

Leurs pattes peuvent déposer sur les machines, les plans de travail, les germes microbiens qu'elles auront récoltés dans les endroits malpropres où pullulent ces animaux : poubelles, canalisations souillées. On détruira donc les cafards, fréquents dans les ateliers, ou les araignées dont les poils peuvent supporter des filaments de moisissures déposès ensuite dans les cuves et sur les machines.

Les rats :

dont la présence peut se détecter par la recherche de leurs poils, telle que la demande la Food and Drugs Administration (filth-test). Dans ce cas on doit penser à des contaminations par leurs urines ou leurs déjections.

Le personnel

L'hygiène bactériologique du personnel doit être rigoureuse et le travail ne peut être autorisé qu'en vêtements propres et lavables, distincts des vêtements de ville toujours souillés.

Le port d'une coiffure est obligatoire, les cheveux, même bien tenus, étant toujours très riches en poussières génératrices de contaminations microbiennes. Il faut souligner que la mode actuelle des cheveux longs est difficilement compatible avec une coiffure assurant une protection efficace.

Les mains des ouvriers peuvent transmettre un grand nombre de germes

— germes d'origine intestinale : il est absolument indispensable d'exiger le savonnage des mains après passage aux toilettes et avant la reprise du travail.

— Staphylocoques : hôtes du nez et de la gorge, pouvant souiller les mains quand on se mouche, quand on éternue ou tousse, ou quand on porte à sa bouche un petit instrument de travail tel que cuiller ou cornet.

Dans certains cas le port d'un masque sur le nez et la bouche peut s'avérer indispensable. Il en va de même pour l'examen bactériologique régulier des sécrétions buccales et nasales des ouvriers, afin d'éliminer et de traiter les porteurs de germes dangereux pour certaines industries pharmaceutiques ou alimentaires par exemple.

LUTTE CONTRE LES CONTAMINATIONS

Ayant énuméré les sources principales de contaminations dans les industries, voyons maintenant les moyens que l'on peut mettre en œuvre sans nuire à la qualité des produits ou sans contrevenir à la législation.

© The Author.All rights reserved

La température

L'ébullition à 100° C si l'on ne peut utiliser les températures de stérilisation, donne dans nombre de cas une garantie suffisante.

La vapeur

L'usage de lances à vapeur permet une désinfection très efficace des surfaces et des canalisations.

Les rinçages à la soude et à l'acide assurent également une bonne désinfection, notamment pour les canalisations, à condition qu'elles soient en métal inoxydable.

Les ammoniums quaternaires

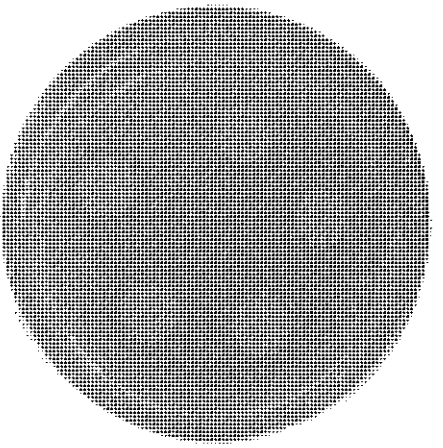
Ils ont une action souvent sélective sur les germes ; il conviendra donc de s'assurer, par des tests appropriés, qu'ils détruisent bien la flore spécifique de l'usine.

Le formol

Il demeure un désinfectant de choix, soit que l'on utilise ses solutions aqueuses, soit que l'on recourt au formol gazeux qui assure une désinfection totale lorsqu'il est correctement dispersé par des appareils perfectionnés tels que les Fumigators GONIN par exemple.

Les conservateurs

Certains produits pharmaceutiques, les cosmétiques, peuvent recourir à l'emploi de conservateurs ; encore convient-il de vérifier qu'ils sont réellement efficaces et correctement utilisés dans le produit précis qu'ils doivent protéger. On rencontre souvent en industrie des flores « sauvages » infiniment plus résistantes que les souches de collection sur lesquelles sont faits les essais de ces produits.



Des disques imprégnés du produit à tester ont été déposés sur une gélose ensemencée de la flore à détruire. Selon l'efficacité du produit la zone de protection dans laquelle les microbes ne peuvent se développer est plus ou moins large

L'emploi de papiers et de cartons « protégés » assure un conditionnement durable et efficace.

Le contrôle régulier de :

— la propreté bactériologique des machines,
— de la qualité bactériologique des matières premières, des produits en cours de fabrication, de conservation, des eaux adoucies,
— de l'hygiène du personnel et en particulier de la propreté bactériologique des mains,

donne l'assurance que les consignes établies ont été respectées et que l'on peut commercialiser un produit qui répondra à la qualité dont sa marque est le garant.

The microbial population found in different cosmetics originates from either the basic material, the manufacturing process itself, handling, material, packaging, or the environment. Hence, it is indispensible before making use of preservatives to carefully reduce or eliminate these sources of microbes by studying :

— *the use of basic materials with low microbes and fungal counts.*
— *material highly bacteriologically hygienic.*
— *minimisation of delays during manufacture, especially when the product is at critical temperatures (between 15° C and 45° C) which favour microbes development.*
— *the reduction or elimination of contacts with the air of the plant, or working in desinfected or sterilised atmosphere.*
— *packing sterilised or at least as aseptic as possible.*
— *the stocking of packing material, pots, tubes, flasks and boxes in pollution free conditions.*
— *the use of paper and wrapping, material which have been treated against microbe or fungal attack.*
— *supervision of the hygiene of the personnel.*
— *finally, the climatic factors during the commercialisation period (temperature and humidity) must not be neglected. Carefully selected tests must be used to ascertain that the product can resist the most destructive climatic conditions.*

© The Author.All rights reserved

Thymus vulgaris L « Chémotaxonomie et Biogénèse monoterpénique »

ANALYSE DE THESE

Thèse de Doctorat en Pharmacie présentée à la Faculté de Pharmacie de Montpellier par Jean PASSET

Mesurer rapidement l'importance de cette thèse est une gageure. L'auteur y traite non seulement de la chémotaxonomie et de la biogenèse monoterpénique que le genre Thymus Vulgaris illustre parfaitement, mais elle rappelle aussi la pharmacologie du thym, et fait état de la composition chimique de toutes les essences examinées.

Il nous paraît cependant opportun de rappeler avec l'auteur et M. le Professeur GRANGER, président du jury de cette thèse, que ce végétal constitue un excellent matériel d'étude pour le botaniste, le généticien, l'écologiste, le chimiste et le pharmacologue.

Si les caractères botaniques ne permettent pas les distinctions que fait le chimiste en précisant les chémotypes, il restera au biochimiste et à l'enzymologiste, de parfaire cette suite de réactions qui conduisent aux résultats que nous connaissons aujourd'hui grâce à cette étude poursuivie avec opiniâtreté par l'équipe de M. le Professeur GRANGER (depuis 1963 des études sont en cours).

Enfin nous retenons les six chémotypes proposés, et peut-être un septième annoncé par l'auteur :

1. **Chémotype géraniol**
   85 à 93 % de géraniol et acétate de géranyle.
2. **Chémotype linalol**
   90 à 98 % de linalol et acétate de linalyle.
3. **Chémotype α-terpinéol**
   90 à 96 % d'α-terpinéol et acétate α-terpényle.
4. **Chémotype carvacrol**
   75 à 80 % de carvacrol, γ-terpinène et p. cymène.
5. **Chémotype thymol**
   50 à 65 % de thymol, γ-terpinène et p. cymène.
6. **Chémotype trans-thuyanol-4 terpinéol-4**
   60 à 65 % des deux composés, 10 à 15 % de cis-myrcénol-8.

Félicitons l'auteur de la persévérance avec laquelle il a conduit ses études, et du style dans lequel il expose par le menu la suite des travaux qu'il a entrepris.

Les bibliothèques de tous ceux qui s'intéressent aux essences doivent s'enrichir de cet important et sérieux travail que nous devons à l'équipe dynamique animée par M. le Professeur GRANGER.

Photo M. PAULET

© The Author.All rights reserved

ANALYSE DE THESE

Aromatisation des formes sèches par diverses préparations galéniques à base de citron

Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
Grenoble - 1971
Marie-France COSTE-JALLAIS

S'appuyant sur une large bibliographie, l'auteur mena une expérimentation sur l'aromatisation des granulés et des comprimés à l'aide de diverses formes galéniques à base de citron : alcoolés, essences, jus, Pluressences et Pulvessences *.

Dans le temps, la stabilité des préparations obtenues a été appréciée par examen chromatographique en phase gazeuse et par l'intervention d'un jury de dégustation.

Les formules choisies ont été retenues sous l'angle non pas du masquage du goût ou de l'odeur, mais de la stricte aromatisation.

L'expérimentation a permis de déterminer les doses d'emploi de chacune des formes galéniques à base de l'arôme citron, arôme retenu pour la faveur que lui accorde le public, mais aussi par la relative difficulté de son utilisation.

Il a été également possible de déterminer l'influence du mode de fabrication, à savoir : granulation par voie sèche ou par voie humide, addition d'essences avant ou après séchage du granulé ; les échantillons ont été conservés en flacons ou sacs plastique au réfrigérateur ou à la température du laboratoire.

Les contrôles de stabilité ont été effectués tous les trois mois, six mois et douze mois, comparativement à un produit frais. Il nous paraît opportun de souligner certains aspects de ce travail, par exemple :

— d'une façon générale la mention de la répartition des goûts dans le monde,
— la définition des termes utilisés dans les techniques d'aromatisation,
— un tableau schématique des aromatisations,
— les méthodes d'extraction et d'analyse des agrumes dans une forme galénique,
— les problèmes que pose l'appréciation du goût et l'importance du jury de dégustation.

En conclusion, l'auteur admet la possibilité d'utilisation d'emballages en plastique, insiste sur la nécessité de conserver les produits à la plus basse température possible, conseille de faire sécher les granulés très rapidement si la teneur en citron est forte, mais lentement si cette teneur est faible, donne sa préférence à la granulation par voie sèche, préfère Pluressence, alcoolé (Solarome), huile essentielle ou association jus + essence ou pulvessence et jus, constate que les altérations apparaissent après six à douze mois, et souligne que ces altérations correspondent à une diminution du rapport Géranial / Néral, deux isomères du Citral.

* Gattefossé Ets.

© The Author.All rights reserved

ANALYSE DE THESE

Les émulsions Etude du H.L.B. critique d'une huile de vaseline

Thèse de Docteur en Pharmacie
par Monique SEILLER

Mme M. SEILLER a soutenu brillamment une thèse d'Etat de Docteur en Pharmacie devant « l'Unité d'Enseignement et de Recherches des mécanismes d'action des médicaments et des toxiques » de l'Université René Descartes de Paris.

Le travail très important qu'a poursuivi Mme SEILLER depuis plusieurs années avait pour objet d'éclairer les phénomènes groupés par Griffin sous l'expression H.L.B. (hydrophilic-lipophilic-balance) et en rapport direct avec la fabrication des émulsions et des dispersions.

Peu de pharmaciens, d'ingénieurs chimistes ou de cosmétologues connaissent parfaitement ces notions qui ont été conçues par Griffin et étudiées par Kawakami, Moor et Bell, Davies, en France par Marillier et Rimlinger.

Cette caractéristique d'hydrophilie ou de lipophilie n'est pas nouvelle, et l'échelle H.L.B. a été souvent interprétée comme une appréciation relative de l'hydrophilie ou la lipophilie d'un corps. Un H.L.B. de 15 correspond à un émulsionnant pour dispersion cosmétique en phase aqueuse, alors qu'un autre ayant un H.L.B. de 4 représente un émulsionnant pour phase continue huileuse. Cependant, cette interprétation approximative ne correspond pas à ce qu'a voulu l'auteur, qui, étudiant les dérivés de l'oxyde d'éthylène, pensait pouvoir établir une loi générale en fonction du nombre de molécules d'oxyde d'éthylène, et de la longueur de la chaîne lipophile des corps doués de propriétés émulsionnantes.

Ces relations pouvaient-elles s'appliquer à tous les constituants utilisés en cosmétique ou en pharmacie lors de l'établissement d'une formule, ou fallait-il les restreindre au champ limité des dérivés de Sorbitol polyoxyéthylénés ou non ?

Les applications étant très vastes, il paraissait utile d'en sérier certaines. Nous sommes reconnaissants à Mme SEILLER d'avoir précisé l'étude du H.L.B. critique d'une huile de vaseline. Son travail permet de relier toutes les méthodes présentées avant elle, et rend compte des rapports souvent assez différents entre le H.L.B. expérimental et le H.L.B. théorique.

De nombreux graphes illustrent son travail, dans lesquels l'abcisse représente le H.L.B. et l'ordonnée l'un des caractères de l'émulsion obtenue, par exemple :

— le diamètre des particules,
— la stabilité des émulsions à la centrifugation,
— la viscosité des préparations,
— l'aspect macroscpique des émulsions.

Nous ne saurions mieux mesurer la portée de ces notions de H.L.B. que Mme SEILLER qui conclut :

« les problèmes posés par la préparation des émulsions ne sont pas résolus par les notions de H.L.B. ou de H.L.B. critique.

L'intérêt de ces deux notions dans la formulation des émulsions est indiscutable. Il ne fait aucun doute que la connaissance du H.L.B. des surfactifs et celle du H.L.B. critique des huiles facilite le choix des émulsionnants..... Les résultats acquis dans ce travail montrent toutefois que la notion de H.L.B. critique a une portée moins générale que ne le laissait prévoir Griffin ».

Félicitons vivement Mme SEILLER d'avoir mené à bien cet important travail, et d'avoir su délimiter par des techniques précises la portée du système H.L.B. proposé par Griffin.

© The Author.All rights reserved

ANALYSE DE THESE

Contrôle in vitro des formes solides retard

Thèse de Doctorat en Pharmacie
U.E.R. des sciences pharmaceutiques et biologiques - Grenoble 1971
Charles JEANNIN

S'il est difficile de donner en quelques mots une idée ou un résumé de ce très important travail, par contre il nous paraît possible d'en dégager les grandes lignes : l'auteur a étudié un protocole et un appareillage susceptibles en milieu industriel d'effectuer le contrôle in vitro de deux formes solides retard à savoir, des comprimés et des granulés.

Le principe actif utilisé comme traceur se présente sous forme insoluble : la sulfamerazine, et sous forme soluble : la sulfamerazine sodique.

Les granulés ou les comprimés fabriqués ont fait appel dans leur formule à un agent retard : le palmitostéarate de glycérol (PRECIROL), dont a été apprécié l'effet sur la dissolution des comprimés et des granulés.

Ont été examinés en particulier : l'influence de la granulation et de la compression, de la nature du principe actif et de l'ajout du Précirol vis-à-vis de la dissolution dans l'eau, et vis-à-vis de l'influence du pH, de l'activité d'une lipase, de l'abaissement de la tension superficielle et de la modification de la viscosité.

L'auteur conclut sa thèse au stade ultime sur cette phrase de M. Fréjacques :

« Théorie et empirisme doivent aller de pair, la part de ce dernier allant d'ailleurs sans cesse en s'amenuisant ».

(Deuxième sujet : **Formes solides orales, formulation et activité)**

© The Author.All rights reserved

Colloque du 15 septembre 1970

Physique et technologie des masses pour suppositoires

Le polymorphisme des acides gras et de leurs esters (glycérides en particulier) a pour conséquence, tant qu'un équilibre stable n'est pas atteint, une possible évolution de l'état cristallin au cours du temps. Bien connus des techniciens spécialistes de l'industrie des corps gras (margariniers entre autres) ces phénomènes sont moins familiers aux organiciens et aux pharmaciens des diverses disciplines.

Il a paru important aux Etablissements GATTEFOSSÉ de placer ces notions sur la cristallographie et le polymorphisme des corps gras en introduction à une étude de la technologie mise en œuvre dans la fabrication des suppositoires.

Ils ont pour cela fait appel à deux spécialistes :

— M. NAUDET, Professeur à la Faculté des sciences de Marseille,

— M. PERRON, Directeur d'institut au C.N.R.S., groupe des laboratoires de Thiais,

qui ont accepté de présenter à un auditoire pharmaceutique l'état actuel de nos connaissances dans ce domaine.

La liaison entre la physique des corps gras et l'industrie pharmaceutique est restée au niveau des techniques fines de laboratoires. Les difficultés auxquelles se heurte le galéniste lorsqu'il faut choisir, en fonction d'une formule, d'un appareillage, de normes diverses, la masse glycéridique la plus parfaitement adaptée, se sont concrétisées pour chacun des auditeurs.

Le « comportement de certaines substances médicamenteuses dans quelques hydrogels du point de vue cinétique chimique », traité par M. le Professeur J.-C. ETTER, de l'Ecole de Pharmacie de Lausanne, a montré combien la manipulation de ces macromolécules était délicate et combien les travaux de mise au point nécessitaient de connaissances physiques.

Cette étude, faisant également appel aux techniques rhéologiques, a souligné l'in-

© The Author.All rights reserved

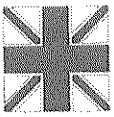
térêt de ces dernières dans la recherche de stabilité des hydrogels.

Bien que les données rhéologiques proposées par M. E. MAHLER aient apporté des éclaircissements sur le comportement des triglycérides à l'état dispersé, il reste néanmoins de nombreux points d'interrogation qui feront l'objet d'études ultérieures. M. E. MAHLER, à l'aide de la dilatométrie à température constante, a suivi les variations apparentes de masse volumique de l'acide stéarique.

M. DERBESY, Attaché de recherche au C.N.R.S. (laboratoire de Chimie des Corps Gras de la Faculté des Sciences de Marseille), a présenté des observations relatives à « l'influence de la structure du glycol sur le polymorphisme de certains palmito-glycides ».

MM. les Professeurs de Galénique des Facultés de Pharmacie, ainsi que de nombreux Pharmaciens d'industrie, responsables de la galénique, ont participé activement à ces travaux.

Le compte rendu de ce colloque fera l'objet de deux publications, les deux premières conférences constituant une introduction scientifique à la technologie des suppositoires.



The polymorphism of fatty acids and their esters (particularly glycerides) results in a possible changing of their crystalline state with time, as long as an equilibrium state is not attained.

Two specialists :

— Mr Naudet, Professor at the Faculté des Sciences de Marseille,

— Mr Perron, Director of the C.N.R.S. Institute, Thiais laboratory group,

have presented to an assembly of pharmacologists the present state of our knowledge in this field.

The importance of the physical chemistry of fatty acids to the pharmaceutical industry is still at the micro technique stage in the laboratory. The difficulties against which the galenist comes up when he has to select the most suitable glycerine mass for a given formula, equipment, and various standards, have become concrete for each member of the assembly.

The « Behaviour of certain medically active substances in several hydrogels from the point of view of chemical kinetics », treated by the Professor J. C. Etter of the Ecole de Pharmacie de Lausanne, has shown how delicate the manipulation of these macromolecules is.

© The Author.All rights reserved

LE CENTRE DE RECHERCHE D'AROMATISATION

La deuxième Table Ronde de l'Aromatisation, organisée par Mme le Professeur Vérain, chaire de Galénique de la Faculté de pharmacie de Grenoble, s'est tenue le 14 septembre 1971 à Grenoble ; l'intérêt manifesté par les participants a confirmé la validité des objectifs proposés par Mme Vérain lors de la première réunion de 1970.

Les chaires de Galénique des Unités de Recherches de Dijon, Grenoble, Lille, Lyon, Nantes, étaient réprésentées, ainsi que les Industries pharmaceutiques et les Fournisseurs de ces dernières.

Ce nouvel échange a permis de circonscrire les buts que s'est assigné le Centre de Recherche d'Aromatisation :

a) constituer une plaque tournante grâce à laquelle des informations bibliographiques pourront être diffusées, ainsi qu'un certain nombre de problèmes formulés par l'industrie pharmaceutique et l'industrie alimentaire.

b) favoriser la coordination des travaux de spécialistes en répartissant entre chaque laboratoire spécialisé les questions soulevées, afin d'éviter la surcharge de certains et l'oubli des autres.

c) faciliter les relations entre des organismes similaires mais étrangers, en vue d'harmoniser le plus possible le vocabulaire et d'inciter à de plus nombreux échanges.

Ce Centre de Recherche d'Aromatisation, association type Loi 1901 représentant ainsi une zone de plus libre échange, a tenu son assemblée générale et a reconduit pour l'année 1971-1972 le bureau fondateur, constitué de :

Président : Mme le Professeur Vérain, chaire de Galénique de Grenoble

Secrétaire : M. H.M. Gattefossé, Industriel, 33, cours Eugénie, Lyon 3e

Trésorier : M. J. Rochat, Docteur en Pharmacie, Faculté de Grenoble.

Les cotisations 1971-1972 ont été déterminées :

— pour les personnes physiques à 30 F

— pour les personnes morales à 100 F

(C.C.P. 61-44 L Grenoble - M. Rochat, Trésorier).

Au cours des échanges qui ont suivi, M. le Professeur Rouzet et son Assistant M. Drouet, de la Faculté de Pharmacie de Nantes, ont présenté l'appareillage avec lequel ils étudient la constitution d'une essence de citron, et les résultats auxquels ils sont parvenus.

M. le Professeur Traisnel et son Assistant M. Basquin, de la Faculté de Pharmacie de Lille, ont rapporté les études qu'ils poursuivent sur la perméabilité des emballages plastiques. Ce résumé paraîtra dans « Produits et Problèmes Pharmaceutiques ».

Mme le Professeur Vérain et M. Bienvenu ont commenté les observations qu'ils ont faites sur la correction des amers.

Enfin, l'étude d'un vocabulaire adapté aux arômes et à l'aromatisation en général a été poursuivie en séance de travail et fera l'objet de nouvelles lectures avant toute publication.

© The Author.All rights reserved

JOURNÉES GALÉNIQUES

de

Saint-Rémy-de-Provence

21-22 mai 1971

Les journées traditionnelles de St-Rémy-de-Provence réunissaient cette année Professeurs des Facultés de Pharmacie et Pharmaciens chefs de laboratoires (Direction scientifique, laboratoire de galénique, atelier fabrication).

Cet électisme permet la confrontation des expérimentations et observations personnelles sur le thème : « Le Suppositoire, ses aspects technologique et physiologique ».

Après un rappel par **B.R. GUILLOT** des travaux effectués pour ou par les Ets GATTEFOSSÉ, depuis une quinzaine d'années, de la micropénétrométrie à la thermométrie différentielle, de l'absorption rectale de l'ésérine aux essais d'absorption des médicaments, trois exposés devaient former la charpente des débats :

a) **la prescription médicale** des suppositoires.

M. le Professeur **J. COTTE** rapporte les conditions et modalités de la prescription des suppositoires en milieu hospitalier.

C'est au niveau des infirmières et du personnel chargé des « petites thérapeutiques » que se situe la prescription pour des produits en nombre limité (sédatifs et aspirine surtout), mais consommés de façon importante et continue.

Le médecin trop souvent ignore ou néglige la voie rectale, laquelle peut être jugée non fiable, irrégulière, incertaine (défécation).

Glanum

© The Author.All rights reserved

La discussion qui suit souligne l'importance des rectioles et autres formes galéniques, et engage à une prospective technologique.

b) Une étude originale sur **l'absorption de certains triglycérides** par voie colitique et caecale chez le lapin est rapportée par **M. le professeur BACQUES.**

Dans des conditions rigoureuses d'expérience, chez le lapin, l'absorption et la cinétique d'absorption de certains glycérides est étudiée à l'aide soit de traceur fluorescent, soit d'iode 131 ou mieux du carbone 14.

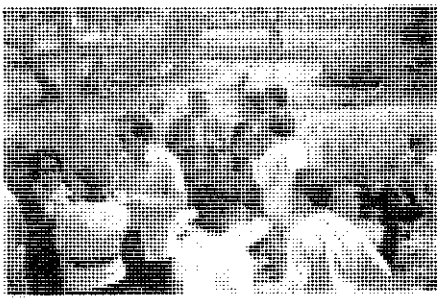
L'absorption est rapide, totale, sans participation enzymatique, meilleure pour les produits saturés. Les travaux continuent avec d'autres molécules de glycérides et d'autres sujets d'expérience, afin d'isoler les conditions optimales et les mécanismes de l'absorption de ces produits proposés par les Ets GATTEFOSSÉ.

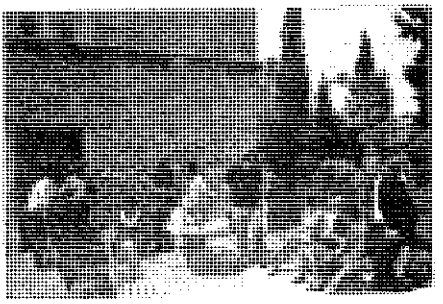
c) **La galénique et la technologie** des suppositoires est présentée par **A. LOMBARD.**

Après l'énoncé des données physico-chimiques fondamentales (cristallisation, émulsion, point de fusion, courbe de solidification, anomalies de surface, etc.), sont examinés les facteurs et conditions du choix des excipients sous l'angle des médicaments (classés en trois familles : poudres, essences, extraits), et sous l'angle des machines et matériels de production.

Les interventions principales des participants concernent l'utilisation des laques insolubles comme colorant, les tensio-actifs dans les bases de suppositoires, la médiocrité des P.E.G., la micronisation des poudres, etc. La confrontation permanente concrète entre les problèmes de laboratoire et d'atelier et les travaux sur la physique des corps gras, confère à l'exposé de A. LOMBARD une forme séduisante « d'enseignement ».

M. NERI donna lecture de l'exposé de M. CASADIO (auteur du livre « Technologia Farmaceutica) relatif à la thermodynamique des suppositoires.





© The Author.All rights reserved

XVe JOURNÉE DE L'AROMATIQUE

23 mai 1970 — Château de Lourmarin (Vaucluse)

La XVe Journée de l'Aromatique s'est déroulée dans le cadre enchanteur du château de Lourmarin, dont les pierres vibraient sous les chauds rayons printaniers.

Accueillis par Mme Lisle, conservatrice, M. et Mme Jean Varille, des Ets Vibert/Pétrole Hahn, M. et Mme Gattefossé et leurs collaborateurs, les participants, universitaires, pharmaciens et industriels, ont échangé leurs informations et leurs travaux avec un intérêt marqué.

M. le Professeur GRANGER, de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, rappelle la genèse des études qu'il poursuit depuis 1962 avec M. PASSET et avec les concours successifs de Mme KERDILES et de Mlle PINED, sur les chémotypes de Thymus vulgaris L.

M. PASSET présente l'état actuel de ces recherches dans un exposé extrêmement concis, illustré par de nombreux clichés.

Il indique tout d'abord que la prospection systématique entreprise en France par le Laboratoire de Chimie organique pharmaceutique et, en Catalogne espagnole, en collaboration avec M. le Professeur ADZET, de la Faculté de Pharmacie de Barcelone, met en relief la grande diversité des essences, se traduisant notamment par des écarts importants du pouvoir rotatoire, allant le + 19° à — 63°.

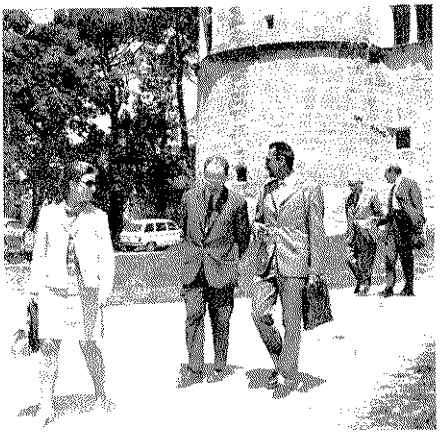
L'identification de tous les constituants majeurs, isolés à l'état pur, parmi lesquels un composé peu connu, le thuyanol-4, et un composé jamais encore signalé dans le règne végétal, le myrcénol, dont la structure a été établie, a permis d'aborder l'analyse des essences individuelles des plantes. La recherche des formes limites a conduit à définir six chémotypes parfaitement tranchés, qui gardent leur personnalité même après transplantation, et qui peuvent coexister, avec de nombreuses formes intermédiaires, dans le même habitat.

Les conditions écologiques paraissent n'avoir qu'une influence restreinte sur ces chémotypes infraspécifiques, qui semblent être surtout sous la dépendance de facteurs génétiques.

A la fin de son exposé, M. PASSET conclut en montrant que la découverte de ces chémotypes autorise à concevoir une certaine filiation entre les constituants de Thymus vulgaris L., et d'émettre des hypothèses concernant les voies enzymatiques de la biogenèse monoterpénique.

Cette présentation a fait l'objet de nombreux échanges sur lesquels nous ne pouvons revenir, mais dont l'intérêt est évident.

M. HUET, Chef de la Section Huiles Essentielles et Arômes de l'Institut Français de Recherches Fruitières, a présenté des observations relatives aux essais de transplantation de Bergamotiers provenant du Centre IFAC de Guinée, au Mali, sur le haut plateau du Foutadjalon. La saison



© The Author.All rights reserved

des pluies (à partir de juin jusqu'en décembre) et une saison sèche de janvier à mai, sont peu propices au développement de ces agrumes, dont la production en essence est différente de celle des bergamotiers de Guinée ou de Côte-d'Ivoire (faible teneur en esters — 20 à 30 p. cent — des qualités organoleptiques médiocres).

M. SCHWOB, qui a lui-même créé le Centre de Guinée, et a suivi les productions de cette station, insiste sur l'importance des problèmes de biochimie végétale que soulèvent ces remarques.

M. P. ROVESTI, de l'Istituto di Ricerche Sui Derivati Vegetali de Milan, rappelant les limites géographiques des plantations de bergamotiers en Sicile, signale combien cette région est spécifique tant au point de vue du sol, que du point de vue climatique (ensoleillement, pluies, etc.). Les nombreuses tentatives d'implantations qui ont été déjà faites dans les régions les plus diverses n'ont eu jusqu'à présent que peu de succès.

A son tour Maître OLLIER a réussi à présenter un déjeuner auquel il a mêlé agréablement les saveurs de Provence, les arômes des crus du pays, le thym, la sarriette, et bien d'autres encore, concrétisant ainsi les impressions suggérées par nos conférenciers.

M. PEYRON, Directeur de Recherches (Lautier, Grasse), a rapporté le résultat des études qu'il poursuit sur l'Immortelle.

La composition de cette herbe de la Saint-Jean est fort complexe ; grâce à la chromatographie gazeuse, il a réussi à séparer nombre de constituants. Cette Hélichrysum Stoechas de Provence est différente des Hélichrysum angustifolium et italicum que M. P. ROVESTI a lui-même étudiées et qui ont fait l'objet de publications. Bien que les emplois en parfumerie, voire en liquoristerie, soient restreints, il est fort utile de voir se préciser la composition de ces essences.

A son tour, le Docteur P. ROVESTI a évoqué les études qui l'ont conduit en 1937 à s'occuper du Thymus vulgaris en Italie.

Le carvacrol ayant un pouvoir bactéricide important, il était utile de rechercher les essences les plus riches en ce constituant.

Bien avant la lettre, il a reconnu analytiquement ce que l'on dénomme aujourd'hui les chémotypes de Thymus vulgaris, et il a fixé son choix sur les clones de Sicile (Awola) qui, par distillation, produisaient l'essence la plus riche en carvacrol. Ce long travail d'approche lui a permis de faire un inventaire géographique des chémotypes des Thymus que l'on trouve en Italie.

M. ROVESTI commente aussi ses études sur l'Hélichrysum angustifolium qui est utilisée en herboristerie et qui, selon les zones climatiques, produit des essences de caractères différenciées. C'est aussi, pour lui, l'occasion de signaler l'importance des facteurs écologiques dans les productions d'essences, facteur qui vient se coupler avec ceux qu'apportent les spécifications génétiques de chaque plante.

Cette journée a été clôturée par un exposé de M. le Professeur NETIEN, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, sur la culture des tissus végétaux. Utilisant les techniques bactériologiques, il aseptise une fraction d'un tissu végétal de la flore saprophyte (par l'eau de Javel). Il plonge ce lambeau aseptisé dans un milieu de culture gélosé adéquat.

Dans des étuves à 24° C, avec un cycle de 8 heures de luminosité et 8 heures d'obscurité, le Professeur NETIEN a réussi à obtenir des bourgeonnements de tissus quelque peu anarchiques, mais abondants.

Cependant, il a constaté que les alcaloïdes de la plante donneuse disparaissent rapidement, et si certains sont encore présents, c'est en quantité faible. Ces études se poursuivent avec la collaboration de biochimistes enzymologues ; peut-être sera-t-il possible de reproduire les principes essentiels de ces plantes...

A la demande de M. GATTEFOSSE, M. NETIEN présente aussi son Institut de Chimie Végétale, qui, inauguré il y a quelques mois seulement, présentera pour les chercheurs comme pour les industriels un intérêt certain dans ce domaine de la Chimie Végétale.

M. GATTEFOSSE, remerciant les conférenciers, propose que les prochaines assises, la XVIe Journée de l'Aromatique, se déroulent le 8 mai 1971.

Le compte rendu détaillé de cette journée fera l'objet de publications particulières, et paraîtra également dans le RIVISTA ITALIANA.

© The Author.All rights reserved

XVIe JOURNÉE DE L'AROMATIQUE

8 mai 1971 — Château de Lourmarin (Vaucluse)

La XVIe Journée de l'Aromatique réunissait, sous le patronage de M. le Ministre Délégué auprès du Premier Ministre, chargé de la Protection de la Nature et de l'Environnement, autour de M. P. GEOUFFRE DE LA PRADELLE, Correspondant de l'Institut, Président de la Fondation de Lourmarin - Laurent Vibert, et de l'Académie des Sciences, Agriculture, Arts et Belles Lettres d'Aix-en-Provence, de nombreux professeurs, chercheurs et utilisateurs venus d'horizons divers. Tous s'intéressent tant aux façons culturales qu'aux compositions et utilisations des plantes aromatiques et médicinales.

M. Marcel GATTEFOSSE, Président-Directeur Général des Ets GATTEFOSSE, et ses collaborateurs, ainsi que M. Jean VARILLE, Vice-Président-Directeur Général des Ets F. VIBERT / PETROLE HAHN, et ses collaborateurs, accueillaient leurs hôtes sur la terrasse du château baigné de soleil.

Les Professeurs et Assistants des Facultés de Paris, Lyon, Grenoble, Montpellier, Barcelone, ainsi que leur collègue de l'Académie des Sciences de Bulgarie, le Pro-

Professeur IVANOFF (à gauche)
H.-M. Gattefossé

© The Author.All rights reserved

fesseur IVANOFF, ont pu librement traiter de leurs recherches avec les industriels fabricants d'huiles essentielles et les spécialistes des cultures et du commerce des drogues végétales.

Les exposés et communications paraîtront dans les revues professionnelles. Nous les avons regroupés en fonction de leurs traits communs :

A - Les activités du Centre National d'Expérimentation de Milly-la-Forêt, présentées par M. MAGHAMI, Ingénieur Agricole, attaché au Syndicat national des plantes médicinales aromatiques et industrielles conduisent à proposer aux agriculteurs des espèces acclimatées en France, et des techniques culturales précises, notamment dans le choix des désherbants modernes.

— Les plantations arboricoles en Côte-d'Ivoire, ayant pour objet la production d'agrumes, ont été présentées par M. HUET, chef de la section « Huiles Essentielles et Arômes » de l'Institut de recherches fruitières. De nombreuses diapositives ont montré l'effort réalisé pour la production d'essences d'agrumes et de dérivés. Les plantations actuelles ne représentent actuellement qu'une faible partie du marché des agrumes ; en sera-t-il ainsi en 1980 ?

B - Le règne végétal est riche des variétés dont l'inventaire botanique est déjà avancé. Par contre, la composition des huiles essentielles extraites de ces végétaux est un constant sujet de recherche.

— M. le Professeur Michel PARIS, de la Faculté de Pharmacie de Paris, et Mlle Geneviève CLAIR, ont étudié l'essence de Sarriette de Perse, dont la composition s'avère différente de celle de la Sarriette dite de Provence, ou de la Sarriette Montana. Les techniques chromatographiques étudiées comparativement par les auteurs révèlent l'intérêt d'une nouvelle façon d'extraire les huiles essentielles de la plante.

— L'étude de la Sarriette des Montagnes (de Montpellier) par MM. PAULET et FELISAZ, paraîtra dans la revue « PARFUMS, COSMETIQUES, SAVONS DE FRANCE » et des comparaisons pourront être établies avec la composition de l'essence de Sarriette de Perse.

— M. Tomas ADZET, de la Faculté de Barcelone, et M. PASSET, de la Faculté de Montpellier, ont étudié le « Galamintha menthifolia », qui, lui aussi, présente des analogies avec les Sarriettes, au moins par ses qualités organoleptiques.

— M. L. PEYRON, Directeur de Recherches (LAUTIER, Grasse), Mlle BROUA et Mme ROUBAUD ont apporté les résultats des études qu'ils ont poursuivies sur le « Lantana des Comores », espèce que l'on trouve en Europe, mais qui développe sous les climats tropicaux une végétation luxuriante.

— L'essence de Rose, telle que la présentait M. le Professeur D. IVANOFF de l'Académie des Sciences de Sofia (Bulgarie), représente un vaste champ d'étude pour le chimiste, tant sa composition est complexe, et c'est dans le détail de ces réactions spécifiques que nous a conduit l'auteur.

C - La biogenèse des monoterpènes bicycliques, étude que poursuit depuis plusieurs années M. le Professeur GRANGER et M. PASSET de la Faculté de Pharmacie de Montpellier, était illustrée par un très bel exposé de Mlle ARBOUSSET qui complète et corrobore les données fournies par le thymus vulgaris.

D - L'étude des transformations in vitro des terpènes a fait l'objet d'une communication de M. G. VASSILIEV, Docteur-Ingénieur. Ces modifications sont très différentes de celles que l'on observe dans le milieu végétal, où les réactions enzymatiques sont plus fines que les techniques de laboratoire.

E - Enfin, l'application des huiles essentielles à l'aromatisation des sirops amers a été l'objet d'une communication de M. BIENVENU, qui, sous la direction de Mme VERAIN, Professeur de Galénique à la Faculté de Grenoble, poursuit une étude fort intéressante sur les facteurs physiques et chimiques pouvant modifier cette amertume.

Cette longue journée, fort heureusement coupée par le déjeuner aux aromates provençaux servi au Foyer Rural de Lourmarin par l'Hôtel OLLIER, d'ancienne réputation, a permis à chacun des convives d'évoquer les problèmes qui les concernent plus particulièrement.

M. le Président de La Pradelle, soulignant l'intérêt de cette relation Université-Industrie, s'est plu à rappeler la vocation de la Fondation de Lourmarin.

La XVIIe Journée de l'Aromatique se poursuivra à la Fondation de Lourmarin le samedi 6 mai 1972.

© The Author.All rights reserved

5e SEMAINE DE DERMOPHARMACOLOGIE
organisée par le CENTRE EUROPÉEN DE DERMOPHARMACOLOGIE

Lyon 18-22 janvier 1971

Le thème choisi : fibroprotéines dermo-épidermiques (kératines, collagène, élastine) a été traité tant sur le plan de la structure physico-chimique par M. COMTE (Centre Technique du Cuir) que sur le plan de la biogénèse par M. le Professeur LOUISOT, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Les métabolismes dans lesquels intervient le soufre a fait l'objet de commentaires très précis de MM. ZWINGELSTEIN et JOUANNETEAU, de la Faculté des Sciences (Chimie Biologique). M. le Professeur THIERS et Mme DIVRY, présentant les structures des mucopolysaccharides, ont rappelé aux congressistes l'importance biologique de cette famille de composés dans la physiologie cutanée.

M. le Professeur MOULIN a présenté, à l'aide de nombreuses diapositives et micro-photographies, la question des hyperkératoses observées en pathologie humaine. M. le Professeur BONADEO de Milan a étudié la pharmacologie d'un principe actif « l'Echinacine B », extrait de l'Echinacéa angusti-folia, ayant un effet antihyaluronidasique favorisant les processus cicatriciels. Le Docteur TUREK, des Laboratoires Vicks-International, a présenté les résultats obtenus par la digestion du stratum corneum humain par une protéase. Le Docteur FAYOLLE a, de son côté, brossé un large tableau des thérapeutiques kératolytiques et a ouvert ainsi la discussion sur les préparations qui peuvent être utilisées en Cosmétique à cet effet.

Pour compléter ce vaste tour d'horizon, M. le Professeur JEAN-BLAIN, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, a traité de la formation de la laine et du pelage des carnivores, M. L. CLARET, Ingénieur-Chimiste, présentant à son tour les techniques et traitements des fourrures. La visite de l'élevage des Oncins en Beaujolais a permis la connaissance d'un centre d'élevage d'animaux de laboratoire « germ free » et de juger des soins apportés aujourd'hui aux contrôles physiologiques in vivo.

M. CALAS, des Laboratoires Chauvin-Blache, remplaçant M. MASSA, a présenté un dossier très complet sur la Lanoline purifiée utilisée comme excipient dermatologique et ophtalmique.

Les deux journées réservées aux Actualités Dermopharmacologiques ont permis de traiter de nombreux problèmes relatifs aux contrôles. Le dosage des phosphatases alcalines, des enzymes, la recherche des acides aminés présents dans des préparations cosmétiques ont été commentés par Mmes BERNARD et CHAMBAZ, assistantes de M. le Professeur Agrégé Jean COTTE ; M. BONIFAY, du département « Produits Biologiques GEO », apportant son point de vue sur le dosage de la trypsine et de l'alphachymotrypsine. M. le Docteur PROSERPIO, expert cosmé-

© The Author.All rights reserved

tologue italien, animant les échanges au cours de la présentation des préparations cosmétiques ayant un effet « Peeling » par Mme G. CALMET, a donné également son point de vue sur la cosmétique fonctionnelle et a suscité un large dialogue entre Dermatologues, Pharmaciens, Cosmétologues et Esthéticiennes, assistant à ces journées.

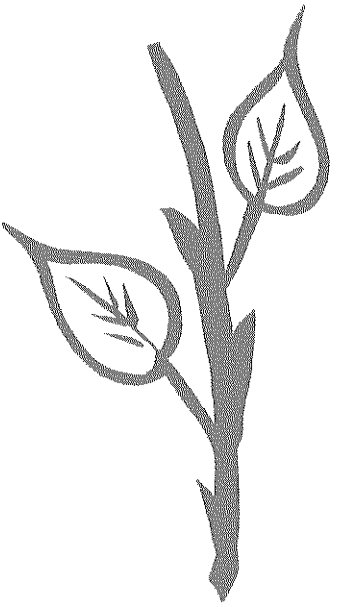
Mme le Docteur DIVRY, assistante de MM. les Professeurs THIERS et COTTE, a commenté les récentes acquisitions se rapportant à l'enzymologie cutanée et a signalé les études parues à ce sujet dans la Littérature.

M. le Professeur THIERS a rappelé que les vitamines étaient souvent des coenzymes, d'où leur intérêt en thérapeutique ou en cosmétique, à condition toutefois qu'un certain nombre d'indications soient respectées.

Enfin, Mme Chantal DE VELNA, esthéticienne, a présenté les techniques d'institut servant aux traitements de Peeling, et M. A. LOMBARD a rappelé quelles étaient les bases physico-chimiques sur lesquelles repose la structure des émulsions largement employées en Cosmétique.

M. le Professeur THIERS a proposé les thèmes d'étude de la 6e Semaine (17/21 janvier 1972) : « Peaux et sénescence - croissance du poil ». Une journée sera réservée à la présentation de courtes communications ayant trait soit à la Dermopharmacologie proprement dite, soit à des sujets relevant de la Dermatologie : la couperose par exemple. Au cours de l'année 1972 des études seront entreprises à plusieurs niveaux afin que des observations concrètes soient apportées.

Ces journées se sont déroulées dans les salles du laboratoire de Botanique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, mises à la disposition du Centre Européen de Dermopharmacologie par M. le Professeur NETIEN.



La Parfumerie Moderne

N° 66 - LXIe ANNEE - 1971

Charité - 69 - LYON - 2e - Dépôt légal, 2e trimestre 1972, N° 738

© The Author.All rights reserved

Gattefossé
ETABLISSEMENTS