

**CONTRIBUTION A LA DETERMINATION
DE PARAMETRES PHYSICOCHEMISTIQUES
DE DERIVES ARSENIQUES DU MELARSEN**

T H E S E

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 28 Septembre 1992

par

Jean-Christophe COUTURIER

né le 9 Mars 1966 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur PENICAUT	PRESIDENT
Monsieur le Professeur NICOLAS	JUGE
Monsieur le Docteur FORRAT	JUGE
Mademoiselle CLEDAT, <i>Maître de Conférences</i>	JUGE

U N I V E R S I T E D E L I M O G E S

F A C U L T E D E P H A R M A C I E

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**

- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A Monsieur le Professeur Bernard PENICAUT
Professeur de Chimie Analytique,

Nous vous remercions d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de notre thèse.

Nous vous adressons nos remerciements pour nous avoir accueilli dans votre laboratoire et pour avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous avons été très sensible à la grande disponibilité que vous avez toujours manifesté à notre égard et à vos précieux conseils.

Veillez accepter l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Albert NICOLAS
Professeur de bactériologie-Virologie-Parasitologie,

C'est pour nous un grand honneur que de vous voir participer à notre jury de thèse.

Nous vous exprimons ici toute notre gratitude.

A Mademoiselle Dominique CLEDAT,
Maître de Conférences de Chimie Analytique,

Nous vous remercions pour l'aide, les conseils, la patience dont vous avez su faire preuve et pour votre présence dans notre jury de thèse.

A Monsieur Christian FORRAT,
Docteur en Médecine,

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous vous exprimons ici nos sincères remerciements.

A Monsieur le Dr J.P. RAYNAUD,
Directeur Scientifique (honoraire) des Laboratoires Rhône-Mérieux

qui est à l'origine de ce travail, et à ses collaborateurs, notamment le Dr FLOC'H, qui ont aimablement mis à notre disposition les produits et renseignements qui nous ont été nécessaires.

A Monsieur P. VIGNOLES,
Maître de Conférences d'Informatique

à qui va toute notre reconnaissance pour l'aide déterminante qu'il a apportée à la réalisation de ce travail.

A ma femme
A toute ma famille,

Je dédie ce travail, pour le soutien qu'elles ont su m'apporter tout au long de mes études.

Je remercie Mademoiselle Annie COEFFE pour le soin qu'elle a apporté à la présentation matérielle de ce travail.

PLAN

INTRODUCTION

LES DERIVES ORGANIQUES DE L'ARSENIC

MODE D'ACTION DES DERIVES AROMATIQUES
DE L'ARSENIC TRIVALENT

PHARMACOCINETIQUE DES DERIVES ARSENICAUX

DETERMINATION DU pK_a PAR POTENTIOMETRIE

DETERMINATION DU pK_a PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE

CONCLUSION

ANNEXE 1

ANNEXE 2

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

La trypanosomose africaine est une des endémies majeures dans de nombreux pays africains et elle fait l'objet d'une grande attention de la part de l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.).

Du fait de la situation économique assez précaire en Afrique, il est difficile d'établir des programmes de lutte efficaces. Le premier élément pour un meilleur contrôle de cette affection est constitué par l'élaboration de médicaments trypanocides satisfaisants. Le choix actuel est relativement limité et principalement basé sur des médicaments arsenicaux.

Il nous a paru intéressant dans cette étude de rechercher des caractères physicochimiques de dérivés du Mèlarsen. Ceci contribuera modestement à la connaissance de leur pharmacocinétique et donc de leur managements thérapeutiques.

Après un bref rappel sur les médicaments trypanocides arsenicaux, nous avons tenté de déterminer le pK_a de deux dérivés du Mèlarsen par potentiométrie, puis nous avons essayé de confirmer ces résultats pour un des dérivés par chromatographie.

LES DERIVES ORGANIQUES DE L'ARSENIC

1. Généralités

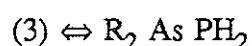
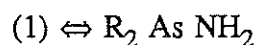
L'arsenic appartient à la troisième famille des métalloïdes, qui comprend l'azote, le phosphore, l'arsenic, l'antimoine, le bismuth (1).

Les premiers termes de cette troisième famille d'éléments et tout particulièrement l'arsenic donnent, avec l'hydrogène, des hydrures du type de l'ammoniac NH_3 .

La substitution de l'hydrogène par des radicaux carbonés, dans la formule de l'ammoniac, fournit toute une série de corps constituant le groupe des amines ; nous retrouvons le même fait avec l'hydruire de l'arsenic et aux amines peuvent être comparées les arsénines.

D'autre part, de même que l'azote fournit des dérivés dans lesquels celui-ci est pentavalent, l'arsenic est pentavalent dans de nombreux composés oxygénés.

Les dérivés chlorés des arsénines cycliques ou acycliques ont été utilisés comme gaz de combat pour leurs propriétés toxiques et sternutatoires. De plus, ils entrent dans la préparation de nombreux composés arsenicaux organiques tels les arsénoamines (1), arsénoazoïques (2), arsénophosphines (3) ou phosphoarsénoïques (4) de formules :



L'arsenic élément donne des combinaisons avec le soufre dont les plus notables sont :

- Réalgar As_2S_4 (rouge)
- Orpiment As_2S_3 (jaune)

Cependant, il existe aussi un sulfure As_2S_5 qui peut être obtenu à partir des

dérivés de l'arsenic pentavalent.

L'affinité de l'arsenic pour l'ion sulfure se manifeste par l'insolubilité des sulfures As_2S_3 et As_2S_5 et la formation des ions thioarsénite ($As_3S_3^{--}$) et thioarséniat (AsS_4^{--}) comparables aux arsénites et arséniates tout comme celle des éléments de la même famille (Antimoine, Bismuth).

	Primaires	Secondaires	Tertiaires
<u>Dérivés trivalents</u> - Non oxygénés - Non soufrés	Analogues aux diazoïques : $R-As=As-R$ arsénoïques	Analogues aux hydrazines : $R_2>As-As<R_2$ $R=CH_3$:cacodyle	Analogues aux amines: $\begin{array}{c} R \\ \diagdown \\ R'-As \\ \diagup \\ R'' \end{array}$ arsénines
- Oxygénés	$R-As=O$ arsénones (gr.arsénoso)	$R_2>As-O-As<R_2$ Oxyde d'arsénine secondaire	
- Soufrés	$R-As<(S-R)^2$ thioarsolannes cycliques ou non		
<u>Dérivés pentavalents</u>	$R-AsO_2$ Arsones $R-As \begin{array}{l} /OH \\ =O \\ \backslash OH \end{array}$ Acides arsoniques $\begin{array}{c} R \\ \\ \text{---} \text{O} \text{---} \text{As} \text{---} \text{O} \text{---} \\ \quad \\ \text{---} \text{O} \text{---} \quad \text{---} \text{O} \text{---} \end{array}$ Spiroarsorannes	$\begin{array}{c} R \\ \diagdown \\ R'-As=O \\ \diagup \\ R'' \\ \\ OH \end{array}$ Acides arsiniques	$\begin{array}{c} R \\ \diagdown \\ R'-As=O \\ \diagup \\ R'' \end{array}$ Oxyde d'arsénine tertiaire

L'activité antiparasitaire des dérivés de l'arsenic est principalement attribuable à son affinité pour le soufre des fonctions thiols des molécules biologiques.

Il en est de même pour les dérivés mercuriels largement utilisés autrefois dans la lutte antisyphilitique.

2. Les dérivés arseniés trypanocides

Les dérivés oxygénés de l'arsenic ont une grande importance en thérapeutique. Ils ont été employés au départ comme antisyphilitiques et comme trypanocides. Leurs applications antisyphilitiques ont été abandonnées depuis l'apparition de la pénicilline et des autres antibiotiques en raison de la toxicité bien moindre de ces derniers.

Au début de ce siècle, les premières observations de l'action destructrice d'un composé arsénical sur les trypanosomes semblent devoir être attribuées à LAVERSAN et MESNIL qui constatèrent l'activité trypanocide de l'anhydride arsénieux sur des souris infectées mais cette activité ne pouvait être séparée d'une très grande toxicité pour l'animal traité.

THOMAS montra que l'anilarsinate de sodium avait une activité trypanocide et une toxicité plus faible.

EHRLICH s'attacha à démontrer l'intérêt des composés organoarsénicaux dans le traitement de la maladie du sommeil et prépara toute une série de ces dérivés. Ses recherches aboutissent à la découverte du Salvarsan® et de ses propriétés thérapeutiques.

La difficulté du problème réside dans la préparation de composés ayant une activité maximale contre les parasites, liée à une nocivité aussi réduite que possible pour l'homme. Il fallait donc obtenir des composés dont le rapport de la dose curative à la dose maxima tolérée (voisine de la dose toxique) soit aussi faible que possible. Ce rapport est appelé indice chimio-thérapeutique.

Les dérivés alkylés de l'arsenic n'ont aucune marge entre la dose toxique et la dose curative.

Ce sont seulement les composés dans lesquels l'atome d'arsenic est attaché à un noyau benzénique qui présentent une importance pratique.

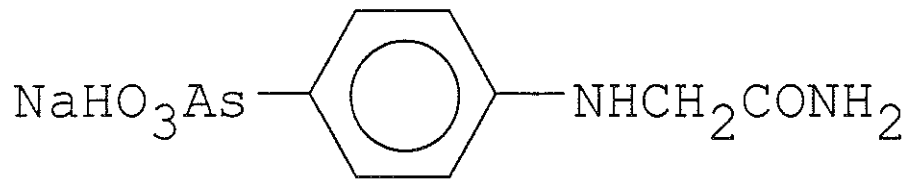
Les composés arsenicaux peuvent être divisés en 4 groupes :

- le Tryparsamide et ses composés
- les séries des Arsphénamines et oxophénarsines

- le Butarsen
- les séries du Mèlarsen

2.1. Le tryparsamide et ses composés

Leur première description est due à JACOBS et HEIDEBERGER en 1919:



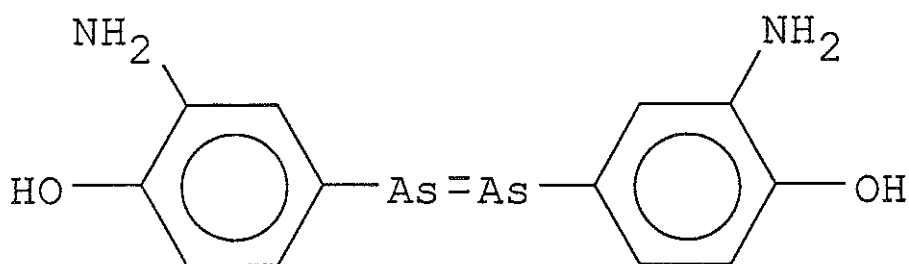
Le tryparsamide et ses composés ont une activité thérapeutique modérée mais intéressante par le fait que leur action s'exerce sur les infections du système nerveux central et du cerveau.

La principale toxicité se révèle par un risque de cécité (AMAUROSE).

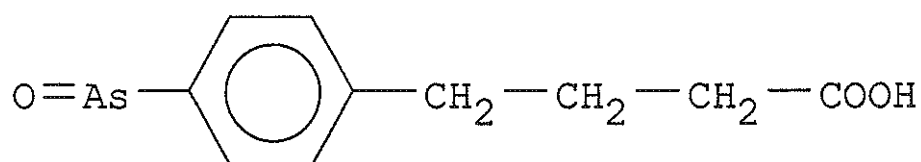
Nous pourrions citer dans ce groupe l'anilarsinate de sodium ou Atoxyl® qui fut le premier composé organique essayé avec succès.

2.2. Les séries de l'Arsphénamine et de l'Oxophénarsine

Ces séries, dont l'Arsphénamine ou Salvarsan est le premier composé synthétisé par EHRLICH, n'ont plus qu'une importance historique.



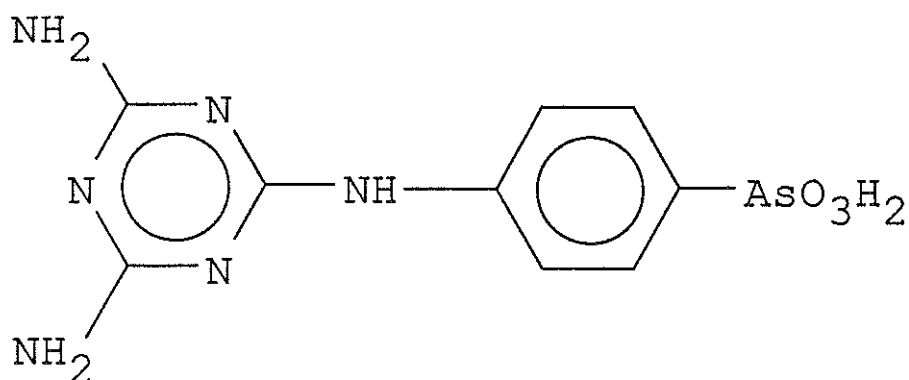
2.3. Butarsen ou acide γ -(p. arsénosophényl) butyrique. Il fut synthétisé par DOAK en 1940 et son activité fut étudiée par EAGLE.



Il présente une activité sur les trypanosomes résistants aux autres dérivés arsenicaux. Mais il n'a aucune action lorsque le système nerveux central est atteint. Il n'agit pas non plus sur *T. cruzi*. Son utilisation thérapeutique reste extrêmement limitée.

2.4. La série des dérivés du Mélarzen

En 1941, A.H. FRIEDHEIM a synthétisé le Mélarzen®, acide mélaminyl-phénylarsonique ou acide 4(4,6-diamino, 1,3,5-triazin-2-yl amino) phénylarsonique.

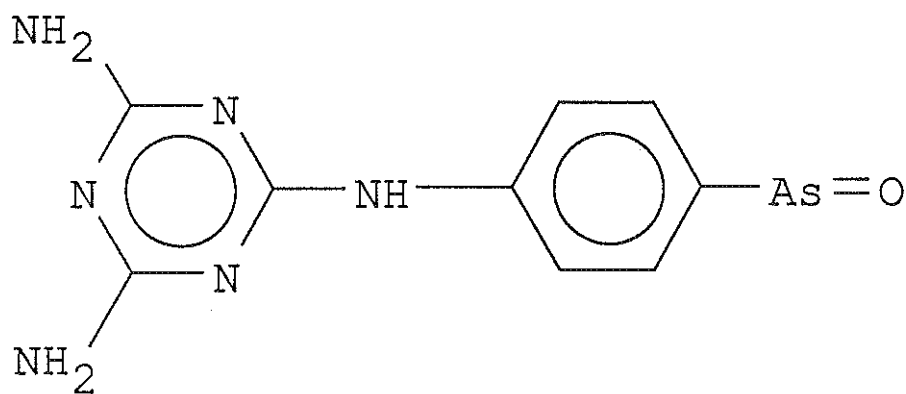


Expérimentalement, au laboratoire, le Mélarsen est huit fois plus actif que le tryparsamide et a un coefficient thérapeutique trois fois supérieur. De plus sa durée d'action trypanocide est plus longue que celle du tryparsamide.

Malheureusement, ce composé provoque un nombre considérable d'échecs et de décès, ainsi que des complications non mortelles, telles que des érythrodermies arsenicales et des ictères.

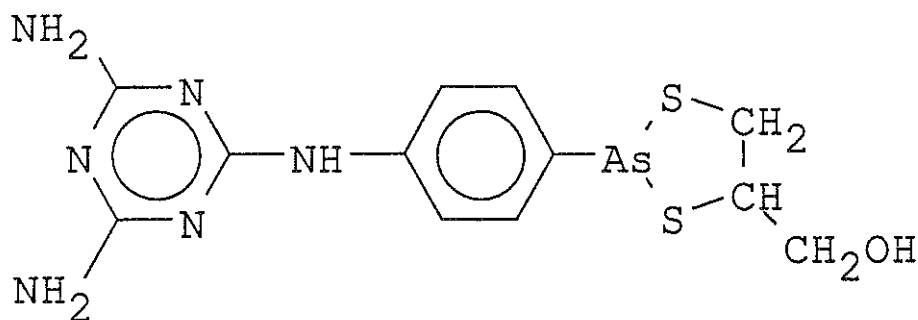
C'est pourquoi FRIDHEIM chercha de nouveaux composés. Ainsi furent synthétisés :

- l'arsénone de l'acide mélaminyl-phénylarsonique appelé Mélarsenoxyde®, dont l'administration provoque moins d'accidents et d'échecs sans pour autant les effacer totalement.



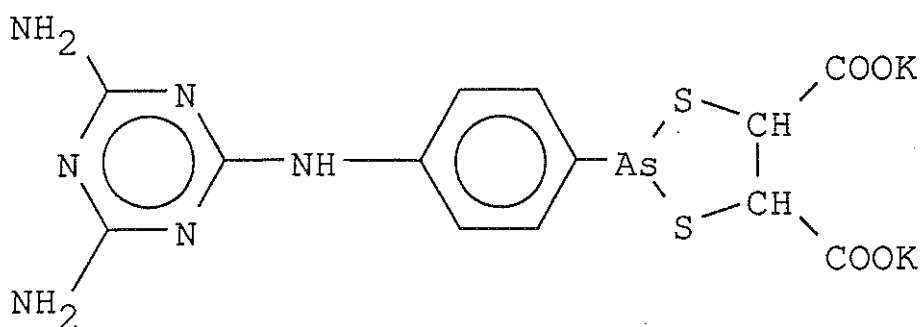
• le Melarsoprol (Mel B, Arsobal®) qui résulte de la condensation du Mélar-sen-oxyde avec le BAL (British Anti lewisite).

Du fait de la présence du BAL, sa toxicité est fortement diminuée. Mais il est insoluble dans l'eau et ne peut être administré que par voie intraveineuse en solution dans le propylèneglycol.



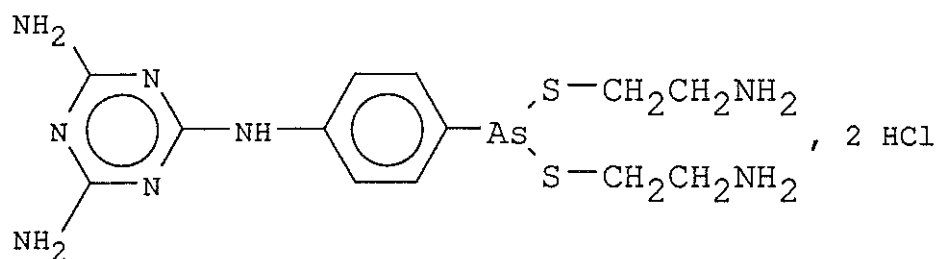
• le Mélarsonyl potassique (Mel W, Trimélar-san®).

Le Mel W est un produit soluble dans l'eau, administrable par voie intramusculaire. Il a une activité semblable à celle du Mel B.



Les Laboratoires Rhône-Mérieux étudient actuellement un composé, le RM 340, dans lequel chacun des atomes de soufre fixés sur l'arsenic est lié à un radical éthylène porteur d'un groupement amine. Cette molécule possède ainsi 2 fonctions amines primaires aliphatiques en plus des 2 fonctions amines primaires du noyau mélar-sen. Elle s'hydrolyse

en solution et *in situ* libèrerait le mélarsonoxyde actif. Bien qu'elle ait reçu la D.C.I. "mélarsoimine" (présentée sous forme de dichlorhydrate), nous le désignerons ici sous son code de fabrication qui était sa seule appellation usuelle lorsqu'elle nous fut confiée.



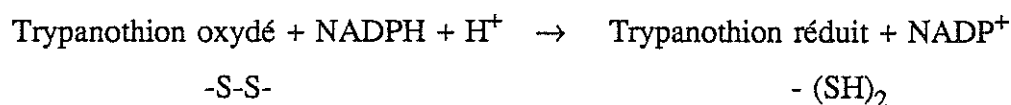
Dichlorhydrate de Mélarsoimine (RM 340)

Le trypanothion disulfure (T(S)₂) est maintenu dans la cellule sous la forme réduite (dihydrotrypanothion T(SH)) par l'intervention d'une flavoprotéine NADPH-dépendante, la trypanothion réductase.

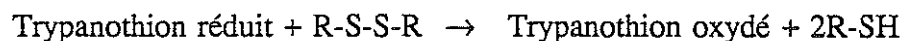
HENDERSON *et al.* [5*] ont proposé les mécanismes suivants pour la réduction du GSSG et les autres disulfures.

Réaction 1

Trypanothion disulfure réductase



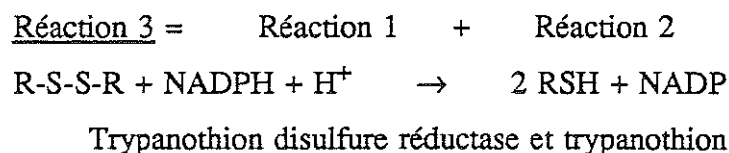
Réaction 2



Réaction non enzymatique

Le Trypanothion est donc bien un co-facteur de la réaction enzymatique. Il agit de façon catalytique.

La réaction globale est donc :



Bien que la trypanothion disulfure réductase et la glutathion disulfure réductase humaine aient une grande similitude, elles diffèrent en ce que leurs substrats sont spécifiques et distincts : le trypanothion disulfure n'est pas le substrat de la glutathion réductase et inversement, ce qui est très intéressant en thérapeutique.

Le rôle du trypanothion chez les trypanosomes est semblable à celui du glutathion des autres cellules, notamment pour le maintien de l'équilibre redox des fonctions thiols et l'élimination des peroxydes (3).

De nombreuses études ont démontré que les dérivés arsenicaux trivalents forment des complexes plus stables avec des molécules comprenant les fonctions dithiols qu'avec celles comprenant une seule fonction thiol. Le dihydrotrypanothion est donc un excellent candidat pour réagir avec eux.

Les composés aromatiques de l'arsenic trivalent agissent sur le trypanothion réduit en formant un complexe stable. Ce complexe inhibe la trypanothion disulfure réductase si bien que le trypanothion réduit ne peut plus réagir avec le glutathion oxydé, d'où l'effondrement du taux de GSH, et la variation de la proportion du GSH/GSSG dans les cellules des Trypanosomes leur est fatal par l'accumulation corrélative des peroxydes [6*].

Ceci a été démontré par FAIRLAMB *et al.* [7*] et illustré par l'action du Mèlarsen-oxyde dans le traitement du dernier stade de la maladie du sommeil. La forme dithiol du trypanothion forme un complexe stable avec le Mèlarsen-oxyde, le Mel T, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

PHARMACOCINETIQUE DES DERIVES ARSENICAUX

On entend par pharmacocinétique "le sort que le médicament subit dans l'organisme". Elle comprend l'étude de l'absorption, de la répartition, de la bio-transformation (ou métabolisme) et de l'élimination.

Les pharmacocinétiques des dérivés arsenicaux ont été très peu étudiées chez l'homme mais il semble qu'une part significative de la dose injectée soit retrouvée dans le système nerveux central [8*].

Les résultats suivants sont dûs aux travaux de PLACIDI [9*] qui a étudié les voies et la cinétique d'excrétion de 10 dérivés arsenicaux chez le rat. PLACIDI a classé ces dérivés en 3 classes.

1er groupe : dérivés de l'acide amino-4-phénylarsonique (Tryparsamide, Orsanine, Mélarsen, Acétarsol).

Il s'agit de composés qui s'éliminent rapidement (élimination globale en 24 heures comprise entre 77 et 89 %) et essentiellement par voie urinaire (excrétion biliaire relative comprise entre 2 et 7 %).

Tous ces composés sont caractérisés par le groupement arsonique $-\text{AsO}_3\text{H}_2$ (arsenic pentavalent) qui confère à ces substances une forte polarité. A l'exception du Mélarsen leur poids moléculaire est élevé.

2ème groupe : Mélarsen-oxyde, Mélarsoprol, Arsthinéol.

L'élimination est fortement ralentie (élimination globale en 24 heures comprises entre 40 et 52 %) ; l'excrétion est essentiellement biliaire.

Ces trois drogues sont caractérisées par une plus forte hydrophobie (remplacement du groupe $-\text{AsO}_3\text{H}_2$ pentavalent par un groupement fonctionnel trivalent

As = O ou un cycle dithiaarsolannique.

La lenteur de leur élimination jointe à leur caractère peu polaire plaident en faveur d'une biotransformation préalable à l'élimination. L'élimination très importante par la bile suggère la formation des conjugués polaires à poids moléculaire élevé. Dans le cas du Mèlarsen-oxyde dont le comportement est très différent de celui du Mèlarsen, il est peu probable que sa réduction soit une voie prépondérante.

3ème groupe : la Diphilarsonne et le Mèlarsonyl.

Ces molécules constituent des cas particuliers:

Diphilarsonne : l'élimination est rapide et à peu près également répartie dans la bile et les urines. Ce composé est fortement polaire (deux groupements - AsO_3H_2). Il représente la duplication moléculaire de l'acide amino-4-phénylarsonique sur une chaîne à 2 atomes de carbone, particularité structurale qui, en accroissant le poids moléculaire, explique un passage biliaire près de vingt fois plus important.

Mèlarsonyl : il s'agit d'un dérivé fortement polaire (2 groupements COOH) à poids moléculaire élevé, caractères structuraux favorables à une facile élimination biliaire.

Les études de pharmacocinétique reposent sur le dosage direct après minéralisation de l'élément As, soit par polarographie, soit par absorption atomique. Ceci traduit la pharmacocinétique de la molécule administrée dans la mesure où son métabolisme n'amène aucun retour de l'As au stade d'anion minéral.

La forte proportion de substance éliminée à l'état d'organoarsénié laisse à penser que tel doit être le cas. Mais il serait souhaitable de disposer d'une méthode de dosage plus spécifique de la molécule ou de ses métabolites organoarséniés. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) serait toute indiquée pour cela mais son emploi suppose une extraction préliminaire de la molécule ou de ses métabolites alors que les méthodes de dosage direct de l'élément As suppriment cette étape préliminaire.

Nous nous sommes intéressés aux méthodes d'extraction dans le cas particulier du Mèlarsen-oxyde et accessoirement du RM 340 et dans cette optique nous avons essayé de

déterminer certaines paramètres physicochimiques susceptibles d'intervenir dans le processus d'extraction en vue de pouvoir mettre au point l'étape d'extraction préliminaire à son dosage *in vivo*.

Les deux paramètres les plus couramment envisagés sont la constante d'acidité et le paramètre de lipophilie mesuré par un coefficient de partage eau-phase organique.

Comme en fait actuellement il est généralement plus commode de procéder par des extractions sur phase solide qu'en véritable partage liquide-liquide, il semble plus intéressant d'adopter comme paramètre de lipophilie une fonction du facteur de capacité en chromatographie en phase inverse que le résultat de mesure effective de partage entre l'eau et un solvant d'extraction. Cette façon de procéder a aussi l'avantage de donner des résultats dont la corrélation a bien été établie avec le coefficient de partage P eau-octanol usuellement considéré dans les études de relation structure activité. L'existence de tables de constantes fragmentales pour le calcul de ce coefficient P permet aussi d'envisager un recoupement théorique avec les résultats expérimentaux. En outre, l'étude de la lipophilie par chromatographie est susceptible d'aider à la mise au point d'une technique chromatographique de séparation et de dosage.

L'emploi de phases mobiles ayant différents pH permet également de déterminer les constantes d'acidité par voie chromatographique, mais dans la mesure où le titrage direct est possible et permet une détermination directe des pKa, nous avons utilisé aussi les titrages potentiométriques. Il nous a paru intéressant de comparer les résultats de ces 2 méthodes dans le cas du Méarsen-oxyde.

DETERMINATION DES pK_a PAR POTENTIOMETRIE

1. Rappel théorique

La théorie de BRØNSTED-LOWRY (1923) sur l'ionisation des bases et des acides est la plus largement acceptée et la plus utilisée.

Le concept développé par cette théorie définit un acide comme étant une substance qui peut donner un ion hydrogène (qui sera solvaté). Inversement une base est une substance qui peut accepter un ion hydrogène (réaction de protonation).

BRØNSTED (1923) [10*] fut le premier à montrer l'intérêt d'exprimer les tendances à l'ionisation des acides et des bases sur une même échelle.

Pour les acides le processus d'ionisation est donné par :



et la constante d'ionisation K_A par

$$K_A^T = \frac{(H^+) (A^-)}{(HA)} \quad (1)$$

où () représente l'activité de chaque espèce ionisée (en mole l⁻¹).

Pour les bases, l'ionisation est



et

$$K_A^T = \frac{(H^+) (B)}{(BH^+)} \quad (2)$$

Les constantes figurant dans les équations (1) et (2) sont des constantes d'ionisation thermodynamiques, dépendant de la température et de l'enthalpie libre de

protonation. Un autre type de constante plus fréquemment utilisée est la constante d'ionisation en concentration, K_a^c , que nous écrivons par la suite simplement K_a , qui est définie pour les molécules acides par :

$$K_a^c = \frac{(H^+) [A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

dans laquelle les crochets [] symbolisent les concentrations molaires de chaque espèce ionisée, en principe directement mesurables. L'équation (3) est généralement utilisée sous la forme suivante, dans laquelle pK_a est l'opposé du logarithme de la constante d'ionisation :

$$pK_a = pH + \log [HA]/[A^-]$$

Pour les molécules basiques, l'expression correspondante est

$$K_a^c = \frac{(H^+) [B]}{[BH^+]} \quad (4)$$

ou
$$pK_a = pH + \log [BH^+]/[B]$$

La différence entre les constantes thermodynamiques et en concentrations est que les activités doivent être prises en compte dans le calcul de la constante thermodynamique. Ces activités dépendent de l'attraction des ions les uns pour les autres aussi bien que de l'hydratation incomplète des ions en solution trop concentrées. A de très basses concentrations les interactions deviennent très faibles. A une dilution infinie, les activités deviennent égales aux concentrations molaires en sorte que les constantes d'ionisation des concentrations sont alors numériquement égales aux constantes thermodynamiques.

Pour des concentrations pas trop élevées, les activités peuvent être reliées aux molarités par des formules classiques tirées de la théorie de DEBYE et HUCKEL.

Selon cette théorie, assez bien vérifiée par l'expérience, à faibles concentrations ioniques, les rapports des activités aux concentrations, dits "coefficients d'activités", dépendent des charges des ions considérés et d'une fonction globale de la richesse de la solution en ions, la force ionique I définie par :

$$I = 1/2 \sum z_i^2 \cdot C_i$$

où z_i est la charge de l'ion i (en unités électroniques), C_i sa molarité, la somme étant étendue à tous les ions présentés.

Les équations (3) et (4) peuvent être utilisées si les constantes sont déterminées dans des solutions de concentrations inférieures à 0,01 molaire. Il faut noter que les activités des espèces neutres (molécules) ne diffèrent pas de façon appréciable des concentrations quelles que soient les dilutions. Le pH, aisément déterminé se rapproche plus de l'activité des ions hydrogène que de leur concentration, bien que ces termes ne diffèrent pas beaucoup entre pH 2 et pH 10, si les solutions ont une assez faible concentration en sels neutres.

L'intérêt principal du pK_a est d'exprimer numériquement les forces des acides (ou des bases) : plus l'acide est fort, plus le pK_a est bas. Plus une base est forte, plus son pK_a est haut.

Ses valeurs peuvent être prévues avec une assez bonne approximation à partir de tables incrémentales selon les méthodes de PERRIN et al (1981) [11*].

2. Méthodologie

Quand un acide est dissous dans l'eau, il s'ionise selon l'équation (1). L'addition d'ions OH^- que peut apporter une base forte totalement ionisée modifie cet équilibre en se combinant avec les H^+ produits lors de l'ionisation. Cette réaction perturbe largement le pourcentage des produits neutres et ionisés. L'équation (3) montre que les valeurs du pK_a de l'acide peuvent être calculées si les pH sont mesurés dans les conditions d'une ionisation partielle, car le rapport $[HA]/[A^-]$ est connu à partir du degré de neutralisation. La courbe de titration $pH = f(\text{pourcentage ionisé})$ a une forme sigmoïde dont le point d'inflexion, centre de symétrie, correspondant à une demi-neutralisation, a les coordonnées (50 %, $pH = pK_a$).

La méthode la plus aisée pour déterminer les constantes d'ionisation est ainsi le "titrage potentiométrique". Cette méthode nécessite la mesure du pH de la solution étudiée en utilisant une chaîne électrochimique de mesure terminée par deux demi cellules, appelées

communément "électrodes". Une des demi-cellules est limitée par une membrane sensible aux ions hydrogène c'est-à-dire dont le potentiel de jonction change quand la concentration en ion hydrogène à l'une de ses faces change. L'autre demi-cellule appelée "électrode de référence" est limitée par une zone de jonction dont le potentiel reste constant quelle que soit la concentration en ions H^+ de la solution étudiée. Les électrodes de chaque demi-cellule sont en fait toutes deux des électrodes de référence. La différence de potentiel entre elles est une fonction de l'activité de l'ion hydrogène H^+ dans la solution située entre les deux demi-cellules. Le système "d'électrodes" le plus utilisé est une "électrode de verre" à jonction membranaire sensible aux ions H^+ en combinaison avec une électrode au calomel utilisée comme "électrode de référence".

L'électrode de verre est constituée d'un bulbe d'un verre spécial à paroi fine, rempli d'un tampon phosphate de pH 7, contenant des ions chlorures dans laquelle plonge une petite électrode de référence par exemple à argent chlorure d'argent. Ce circuit est complété par une demi-cellule au calomel dont la jonction est une zone poreuse imprégnée d'une solution concentrée de chlorure de potassium. La différence de potentiel entre les faces interne et externe de la membrane de verre varie linéairement avec le pH de la solution extérieure.

Cependant, dans les zones de pH élevées (> 10), le potentiel devient sensible aux cations métalliques alcalins, particulièrement les ions sodium, ce qui conduit à des pH mesurés inférieurs aux pH réels ; ceci est dû à un effet d'échange d'ions dans la membrane de verre. La différence de potentiel ΔE aux bornes de la chaîne électrochimique de mesure est

$$\Delta E = E_{\text{ref}} - E_{\text{verre}}$$

où E_{ref} est le potentiel fixe de l'électrode de référence

et E_{verre} est celui de l'électrode de verre, incluant celui de la jonction membranaire.

Par suite de la sensibilité de sa membrane aux ions H^+ , E_{verre} dépend en effet du pH selon une relation du type de celle de NERNST :

$$E_{\text{verre}} = E_0 - \frac{1}{2,303} \frac{RT}{F} \text{pH} \quad (5)$$

d'où, compte tenu des valeurs numériques des constantes et de la température absolue T

$$pH = \frac{\Delta E - E_{ref}}{0,059} + \frac{E_0}{0,059} \quad (6)$$

à 25 °C.

E_0 n'étant pas connu a priori et le coefficient de l'équation $E_{verre} = f(pH)$ n'étant pas toujours exactement conforme à celui de l'équation de NERNST (0,059), il est nécessaire d'étalonner l'électrode avant utilisation avec deux tampons de pH connus. Dans des conditions normales d'emploi, l'utilisation des électrodes de verre et au calomel dans des solutions maintenues à température constante est possible sans réétalonner tout au long d'une journée. Bien que cette méthode d'étalonnage apporte une précision de mesure suffisante, on peut améliorer cette précision en sélectionnant deux solutions de référence dont les valeurs de pH encadrent celles qui forment la portion centrale de la courbe de titrage.

Le potentiel de l'électrode de verre ne s'ajuste pas instantanément à la valeur d'équilibre avec le pH de la solution étudiée. Il est difficile de définir un temps de réponse d'une électrode de verre entre 20 et 25 °C, car le temps normal dépend du type de l'épaisseur et de la surface du verre utilisé pour former la membrane. Les électrodes miniatures et les électrodes de haute résistance ont des réponses plus lentes que les autres types. En général le temps normal ne doit pas excéder 8 mn pour atteindre l'équilibre des valeurs de pH, à condition que les solutions soient à la même température. Le pH enregistré est normalement stabilisé à plus ou moins 0,002 unité de pH de la valeur attendue pendant une période de 8 mn. Il en résulte que les titrages potentiométriques ne doivent pas être faite trop rapidement.

Cependant à 15 °C ou moins, la résistance de la membrane croît, et la réponse devient plus lente.

Il faut noter que la troisième décimale n'a pas grande signification dans la mesure des pH, bien que BATES et al. (1950) [12*] aient démontré que l'erreur de mesure peut être dans certaines conditions inférieure à 0,007 unité de pH. Ceci est dû principalement à l'imprécision du potentiel de la jonction de l'électrode dite "de référence".

Comme nous l'avons vu précédemment, un bon contrôle de la température est nécessaire pour avoir des résultats significatifs. La pièce où l'on titre ne doit pas présenter de courants d'air, ne doit pas varier en température tout au long de la journée et pour des raisons d'isolement électrique, le taux d'humidité relative ne doit pas être trop élevé. Le récipient où l'on titre doit se trouver dans un bain thermostaté à température convenable.

Il est particulièrement important que l'appareillage soit situé en dehors des rayons du soleil car non seulement l'électrode de verre est sensible à la lumière vive, mais encore on doit craindre que celle-ci n'échauffe tout ou partie de la chaîne de mesure, ce qui est une grande source d'erreur. L'action de la lumière sur l'électrode de verre est due à la photosensibilité de la cellule d'argent à l'intérieur de l'électrode de verre et à une sensibilité directe de la membrane de verre. La lumière pourrait causer une différence de 0,05 unité de pH entre une lecture à l'obscurité (MILWARD 1969, PERRIN and SAYCE 1966) [13, 14*]. Il faut donc, pour avoir des résultats convenables et reproductibles, une pièce sans fenêtre, maintenue à une température de 20 à 25 °C (± 2 °C) et artificiellement éclairée de manière indirecte.

L'électrode de verre quand elle n'est pas utilisée doit être rangée en immergeant le bulbe dans l'eau. La demi-cellule de calomel sera mieux conservée si elle est immergée dans la même solution que celle de sa jonction, en général une solution de chlorure de potassium 3,5 ou 3,8 M.

Compte tenu de la théorie de DEBYE-HUCKEL précédemment citée, le maintien des coefficients d'activité à des valeurs constantes, au cours des titrages, en dépit des variations des charges des espèces présentes, nécessite que l'espèce à titrer soit à faible concentration et que la force ionique soit essentiellement due à des ions indifférents en concentrations nettement plus élevées et maintenues constantes. On ne peut cependant tracer avec précision les courbes de titrages de substances trop diluées. Aussi ALBERT et SERJEANT [15*] recommandent-ils que les substances à titrer soient en concentrations de l'ordre de 0,01 M car à ces concentrations les effets de l'activité sont réduits. La force ionique d'une solution 0,01 M d'une substance monovalente, à mi-neutralisation, est 0,005. Cependant s'il est nécessaire d'obtenir des pH assez hauts ou assez bas, la force ionique y

sera forcément plus élevée. Dans ce cas la constance de la force ionique est obtenue (approximativement) en ajoutant du chlorure de potassium de manière que la solution et le réactif titrant soient par exemple 0,01 M en ce sel.

Le dispositif de titrage peut être manuel ou automatique et nous avons noté que les affusions de réactif ne doivent pas être trop rapides. La détermination pratique des pK_a à partir des courbes de titrage est en principe simple lorsqu'il n'y a qu'une fonction acide ou basique puisqu'il s'agit de mesurer l'ordonnée (pH) du point de demi-neutralisation. Si la molécule étudiée en possède plusieurs, la succession et la superposition partielle des différents équilibres de protonation rend quasiment indispensable le recours à une analyse informatique de la courbe de titrage, pour laquelle divers programmes ont été proposés. Nous avons utilisé celui de MARTELL et MOTEKAITIS. (programme "pKas").

L'ajustement des constantes d'équilibre qu'effectue ce programme procède par recherche d'une valeur minimale de la somme des carrés des écarts entre les pH expérimentaux et ceux que prévoit le système des équations d'équilibres en modifiant les valeurs des constantes qui y sont introduites. Il procède par itérations à partir de valeurs d'essai automatiquement choisies à partir des données expérimentales (Volumes de titrant versé, pH) en fonction de l'ensemble des équilibres considérés. Des affinements sont possibles, par exemple en corrigeant légèrement les concentrations de départ si de faibles erreurs ont pu être faites sur leurs valeurs.

Le programme "pKas" ne traite que le cas du titrage d'une base protonée (éventuellement polyprotonée), mise en solution en présence d'un excès d'acide fort, à l'aide d'une base forte. Le choix préalable de l'ensemble des équilibres de protonation est déterminant et peut ne pas s'imposer avec évidence dans le cas de molécules complexes polyfonctionnelles.

3. Travaux personnels et résultats

3.1. Matériels et méthodes

Réactifs

- Mélarsen-oxyde (Mel 4) : Rhône-Mérieux
- "RM 340" : Rhône-Mérieux
- KCl : réf. Prolabo n° 26724
- H₂SO₄ 0,1 N : réf. Prolabo n° 20621
- NaOH 0,1 N : réf. Prolabo n° 28252
- H₂O bi-distillée en silice.

Matériels

Le dosage est effectué à l'aide d'un titrateur électronique TT processeur (Tacussel) équipé d'une électrode de verre/calomel qui est étalonné à l'aide de solutions tampons SCHOTT de pH 4 (hydrogénophthalate de potassium) et 7 (phosphate monopotassique/phosphate disodique).

Préparation des solutions de Mel 4

Solution aqueuse environ $5 \cdot 10^{-3}$ M acidifiée par de l'acide sulfurique 0,1 N de manière à y réaliser une molarité totale en H⁺ égale à $16 \cdot 10^{-3}$ M c'est-à-dire excédant ce qui est nécessaire pour neutraliser 3 fonctions basiques par molécule.

Préparation des solutions de RM 340

Solution aqueuse environ $5 \cdot 10^{-3}$ M acidifiée par de l'acide sulfurique 0,1 N de manière à y réaliser, compte-tenu de HCl combiné à la mélarsomine, une molarité totale en H⁺ égale à $22 \cdot 10^{-3}$ M, c'est-à-dire excédant celle qui est nécessaire pour neutraliser 4 fonctions basiques par molécule.

Pour les deux solutions la force ionique est maintenue sensiblement constante et égale à 0,01 par addition de chlorure de potassium à la concentration de 0,01 M.

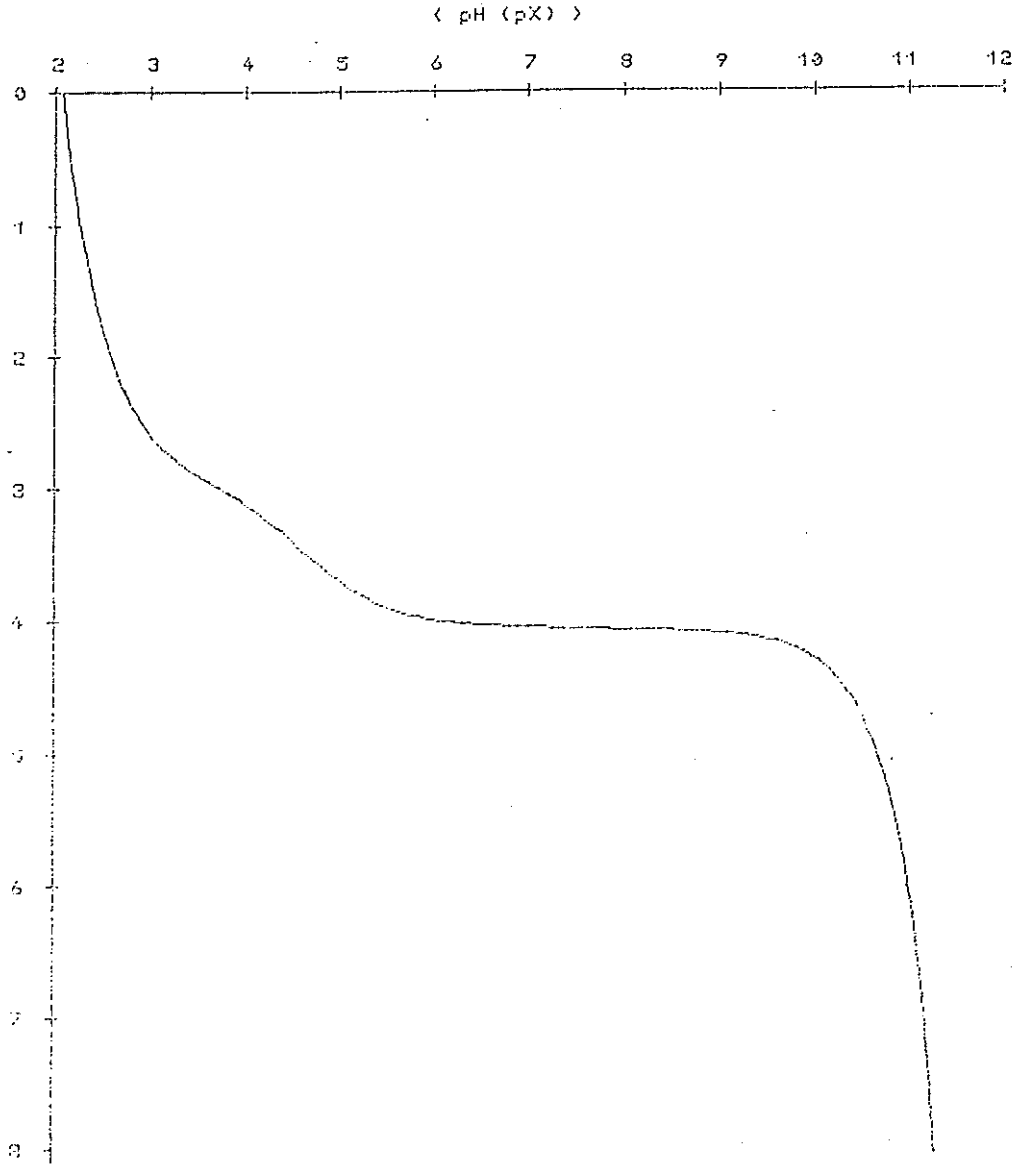
3.2. Titration du Mélar-sen-oxyde

Un exemple de courbe de titration (courbe directe et courbe dérivée) est donné ci-après. Nous avons effectué 4 titrations et à partir de chacune plusieurs exploitations par le programme pK_{as} en modifiant le nombre des points pris en compte, qui peut aller jusqu'à 191. Les résultats des ajustements les meilleurs figurent dans le tableau suivant.

MELARSEN OXYDE	pKa1	±	pKA2	±	sigma
	2,5510	0,0840	4,7440	0,0270	12,350
	2,7403	0,1017	4,9733	0,1001	13,225
	2,6570	0,1221	4,8960	0,0504	15,000
	2,6270	0,1229	4,8911	0,0505	16,400
	2,5220	0,0530	4,7590	0,0230	7,036
	2,6459	0,0360	4,8319	0,0126	4,790
	2,5835	0,0472	4,9263	0,1000	2,275
	2,5588	0,0363	4,8978	0,0510	9,460
moyenne	2,6107	0,0754	4,8649	0,0518	
écart-type	0,0710	0,0370	0,0803	0,0330	

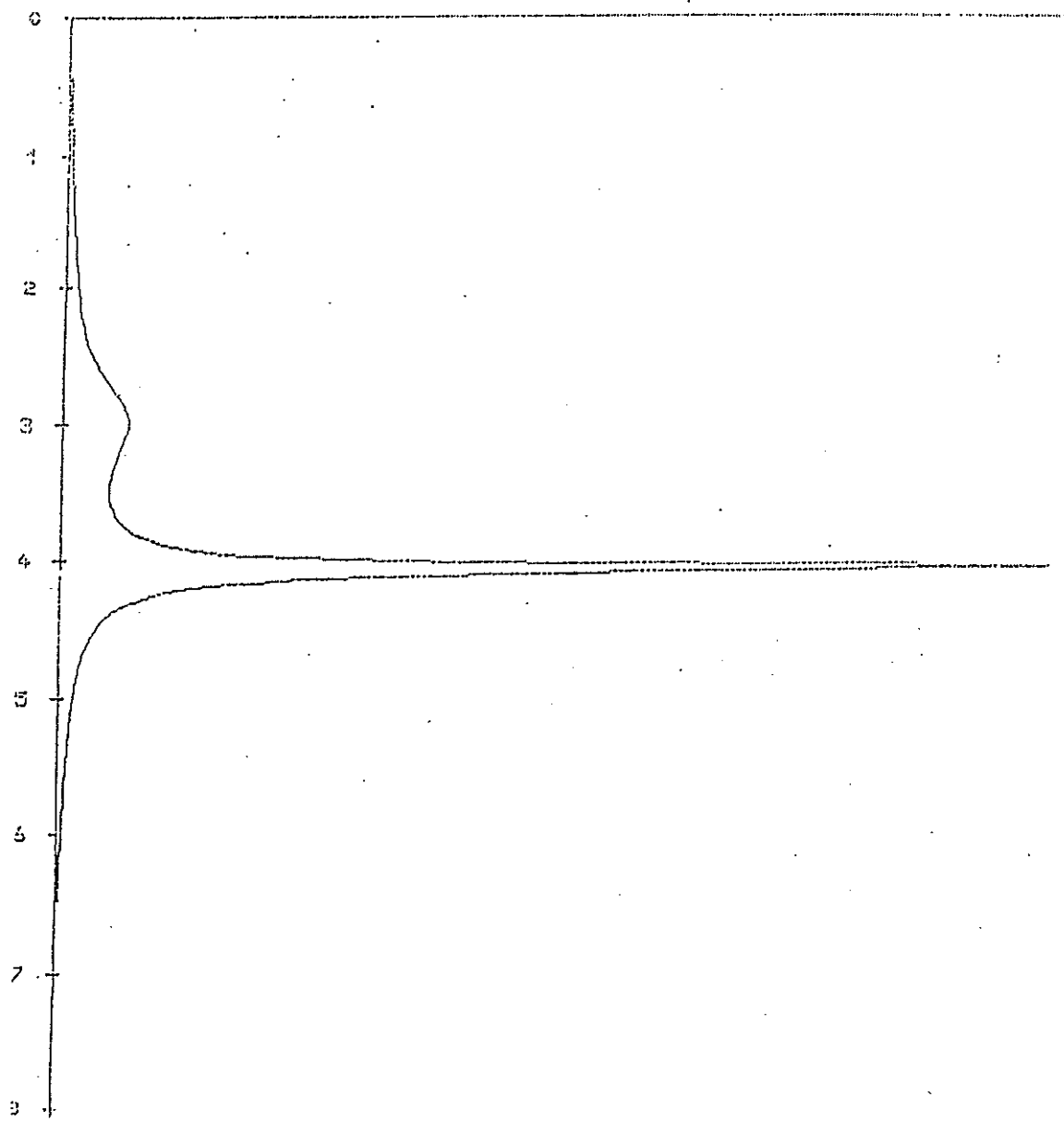
Les moyennes indiquées sont les moyennes authentiques et écarts-types des pK_a . Nous ne suivons pas ici les recommandations de PERRIN et coll., car la façon de procéder qu'ils préconisent conduit à des résultats différents selon que l'on considère K_a ou $1/K_a$, choix qu'en réalité aucune raison valable n'impose.

***** TACUSSEL * TT - PROCESSEUR *****



***** TACUSSEL * TT - PROCESSEUR *****

< DERIVEE >



3.3. Titrage du RM 340

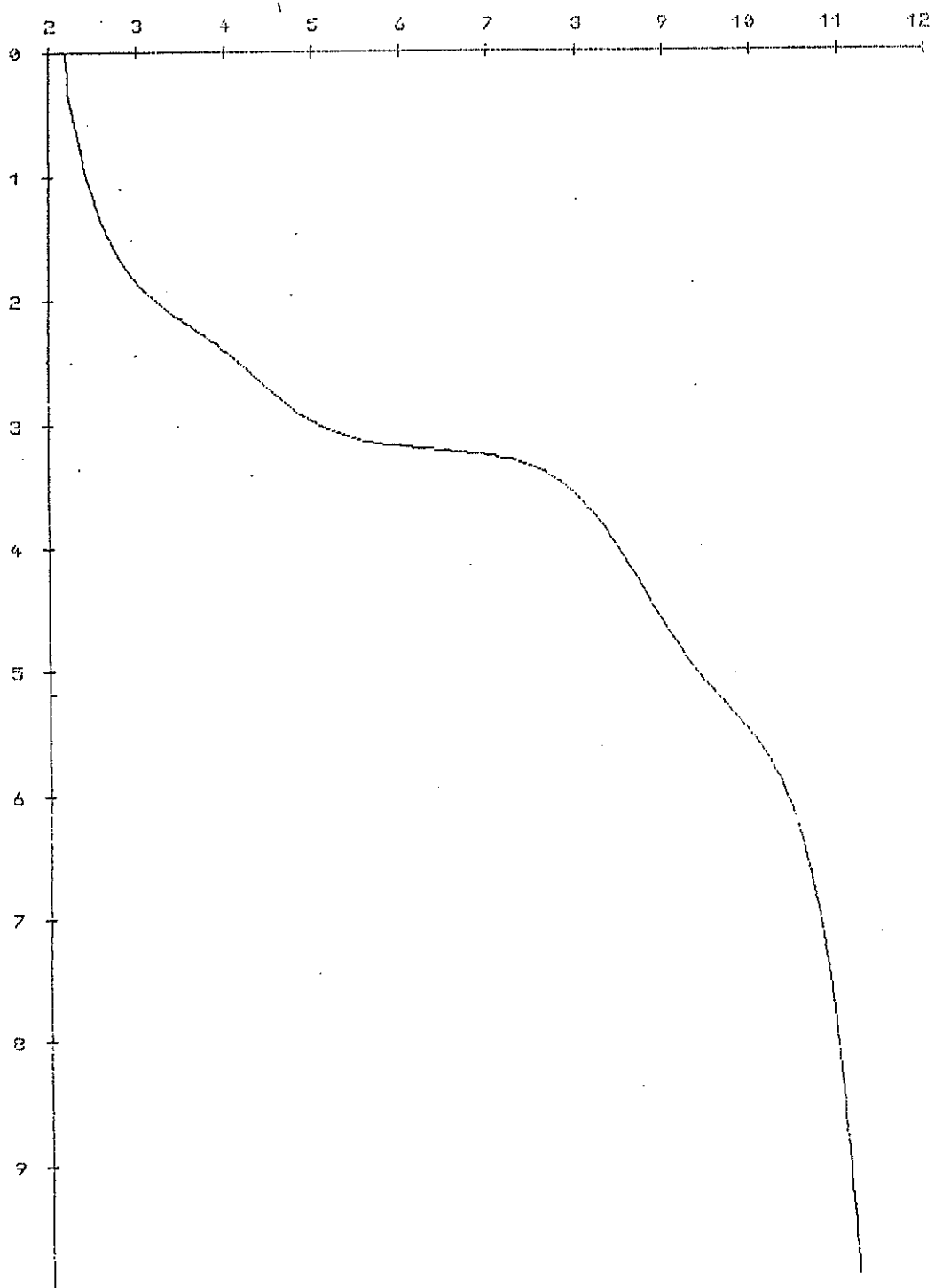
Le premier des tableaux qui suivent présente les résultats des ajustements les meilleurs obtenus en faisant l'hypothèse de 4 fonctions basiques protonées en présence d'un excès d'acide.

A titre de comparaison le second tableau donne les résultats obtenus en ne supposant que 3 fonctions basiques protonées, ce qui est contraire à la réalité. On observe que les valeurs trouvés pour les pK_a homologues sont sensiblement différentes et que les écarts résiduels sigma sont sensiblement plus importants.

RM340	pKa1	+-	pKa2	+-	pKa3	+-	pKa4	+-	sigma
	2,2156	0,0114	4,4984	0,0125	8,4868	0,0287	8,9555	0,0515	6,269
	2,0564	0,0150	4,4833	0,0335	8,4071	0,0265	8,9345	0,0488	6,239
	1,9383	0,3760	4,4889	0,0137	8,3721	0,0175	9,0041	0,0583	8,902
	1,9688	0,0458	4,3726	0,0248	8,3865	0,0280	9,1103	0,0255	9,079
	1,9653	0,0453	4,5716	0,0869	8,5533	0,0269	9,2532	0,0172	14,860
	2,1148	0,0310	4,5726	0,0885	8,5441	0,0306	9,2771	0,0141	13,700
moyenne	2,0432		4,4979		8,4583		9,0891		
Ecart-type	0,1074		0,0735		0,0805		0,1495		

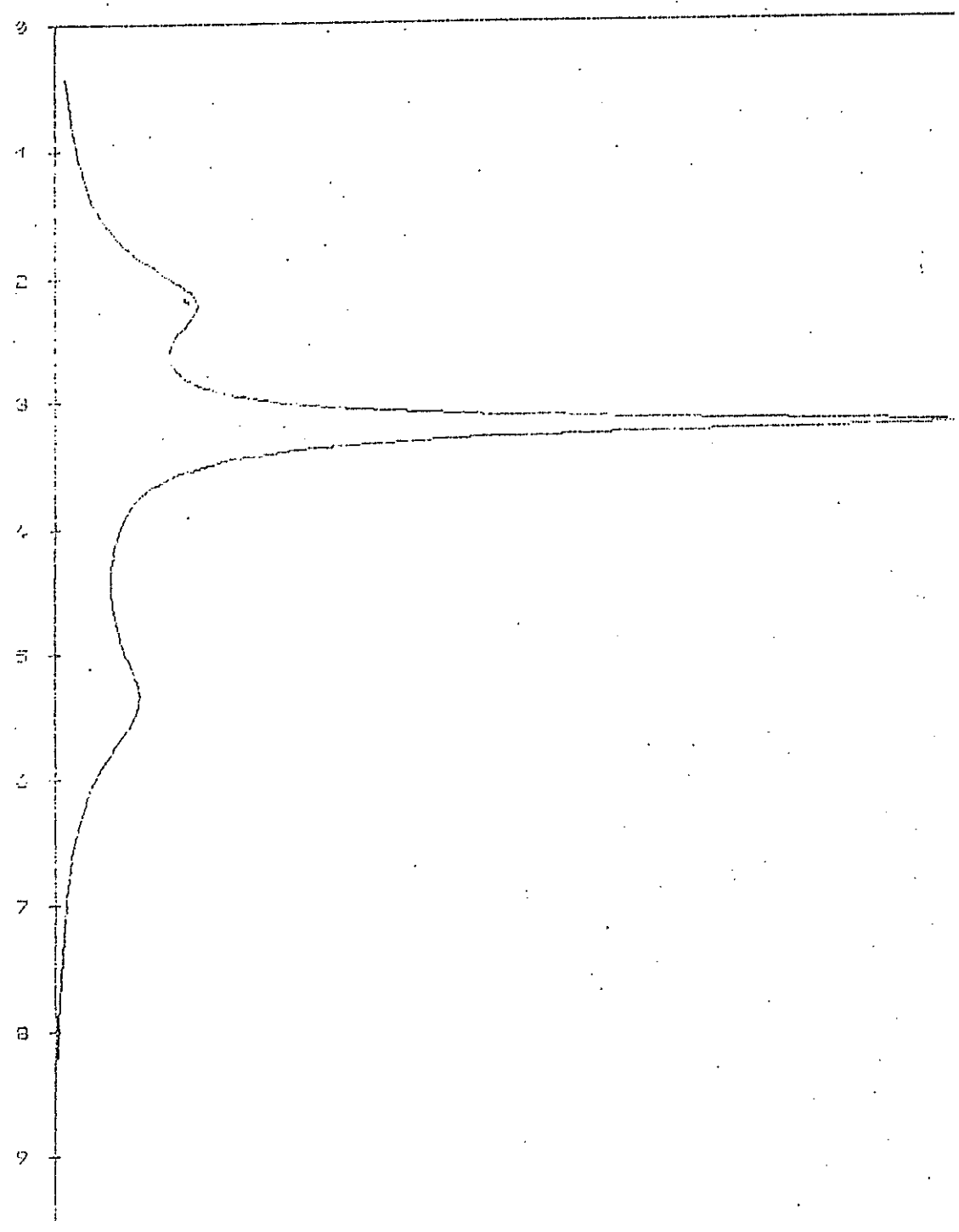
	pKa2	+-	pKa3	+-	pKa4	+-	sigma
	4,9161	0,2407	9,0146	0,0862	9,6247	0,1606	38,920
	4,8793	0,2770	9,0424	0,0662	9,0608	0,1526	35,985
	4,7450	0,2057	9,1097	0,0683	9,5220	0,1673	114,000
moyenne	4,8468		9,0556		9,4025		
Ecart-type	0,0901		0,0489		0,3003		

440.7

 $\langle \text{pH} (\text{pX}) \rangle$  $\langle \text{ml} \rangle$

***** TACUSSEL < TT - PROCESSEUR *****

< DERIVEE >



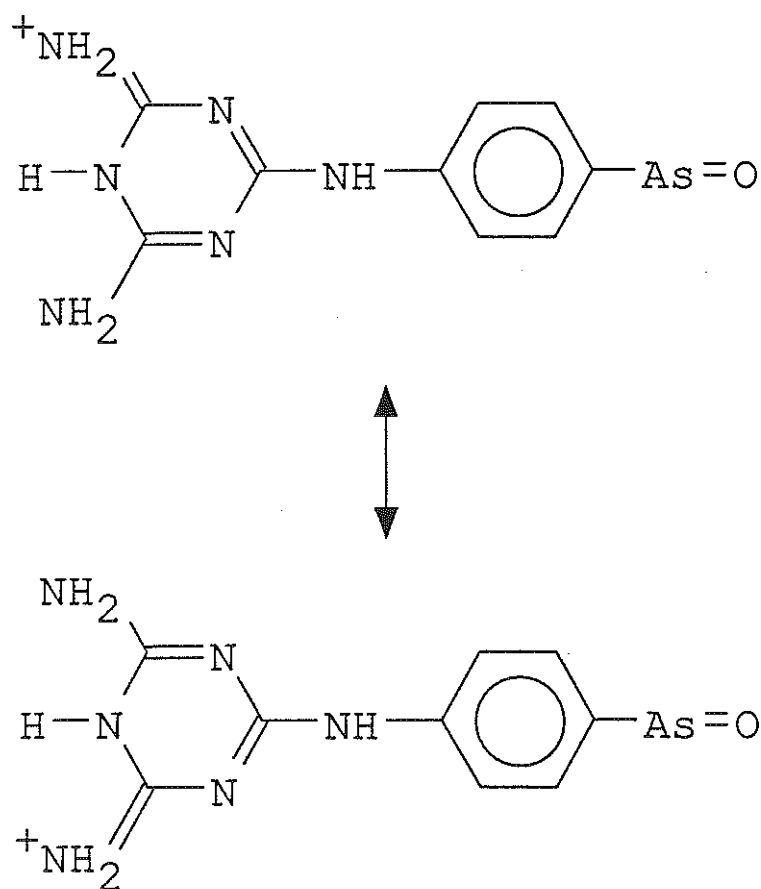
< 5.5 >

3.4. Discussion

3.4.1. Dans le cas du Mèlarsen-oxyde

Les deux premiers pK_a pourraient être considérés comme correspondant aux fonctions aminées primaires portées par le noyau triazine. En réalité selon PERRIN et coll. [11*], lorsqu'un groupe amine est fixé sur un hétérocycle azoté, la protonation s'effectue d'abord sur l'azote intra-cyclique car la stabilisation par résonance de la forme imine du cation est la plus importante.

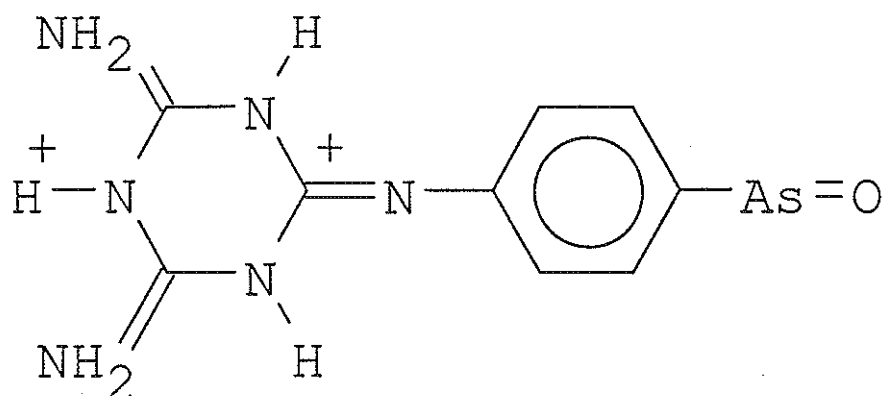
Par suite, la première forme protonée du mèlarsen-oxyde doit donc être regardée comme constituée des tautomères :



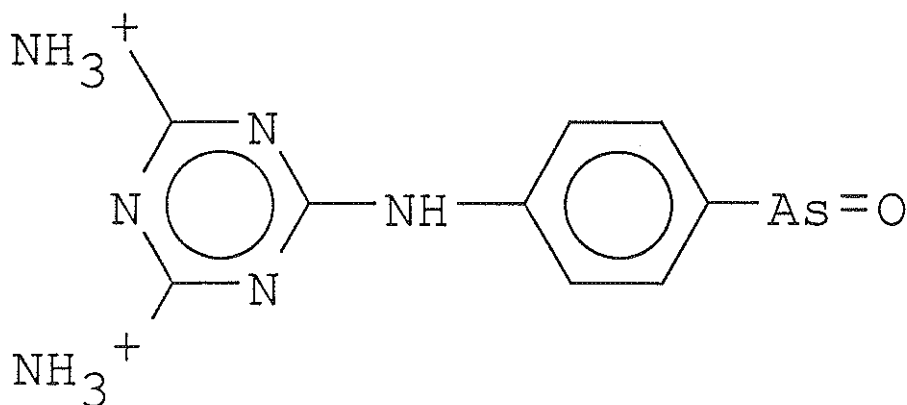
où le proton a été supposé fixé dans l'axe de symétrie du noyau triazine (et non sur un groupement NH_2 donnant NH_3^+).

L'un des deux autres azotes de ce noyau étant déjà supposé porteur d'un H dû à une seconde forme imine insolite, il semble dès lors naturel de fixer le second proton sur le dernier azote triazinique.

La difficulté vient du choix de la liaison C-N à iminer au préalable. Il semble peu probable que ce soit possible pour l'une des fonctions aminées primaires car elles participent au domaine de résonance de la première forme protonée. Mais de ce fait ce domaine de résonance est quand même modifié et on ne peut plus guère proposer un site de protonation que sur un argument de symétrie ce qui, en éloignant au maximum les charges positives, donnerai la structure suivante :



On peut dès lors imaginer pour cet ion une tautomérie ramenant à une disposition plus familière des protons :



Le choix entre les deux structures peut sans doute se faire sur la base de la comparaison des spectres ultra-violet des 3 formes.

Une troisième protonation qu'on pourrait envisager sur l'azote qui relie les deux cycles paraît peu probable, donc trop faible pour être décelable sur une courbe de titrage et nous ne l'avons pas envisagée.

La fonction acide phénylarsénieux que l'on peut attendre d'une hydrolyse du groupement arsénoxyde en milieu alcalin n'est pas décelée dans les conditions du titrage. Nous verrons cependant qu'elle se manifeste de façon certaine, mais difficile à interpréter dans les déterminations faites par CLHP.

3.4.2. Dans le cas de la mélarsomine

Les pK_{a1} et pK_{a2} sont un peu plus faibles que dans celui du mélarsen-oxyde (2,04 contre 2,61, 4,50 contre 4,86), ce qui peut provenir d'une différence d'effet inducteur sensible au niveau du noyau triazine et vraisemblablement dû aux charges lointaines préalablement fixées sur les NH_2 aliphatiques beaucoup plus basiques ($pK_{a3} = 8,46$ et $pK_{a4} = 9,09$), dont les forces sont elles-mêmes différenciées par l'effet statistique classique. Etant donné que la différence entre les valeurs expérimentales est très proche de celle que donne la théorie, nous en ferons ici un bref rappel.

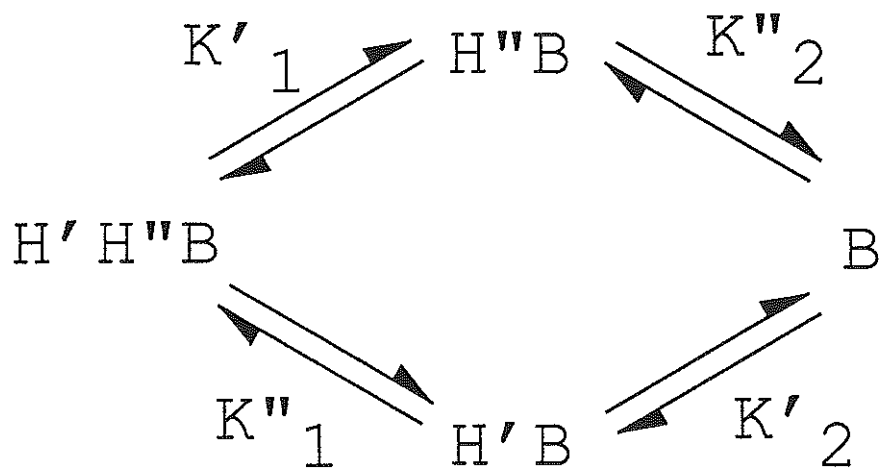
Pour un acide diprotique tel que H_2B^{++} on définit les constantes d'acidité successives

K_{a1} pour l'équilibre $H_2B^{++} \rightleftharpoons HB^+ + H^+$ et

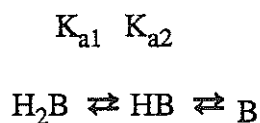
K_{a2} pour l'équilibre $HB^+ \rightleftharpoons H + B$.

Supposons que les fonctions à caractère acide soient semblables et distantes l'une de l'autre de telle sorte que leurs ionisations respectives soient sans effet mutuel. Pour les distinguer sans alourdir l'écriture ni perdre de généralités, nous écrirons l'acide H' H" B et omettrons les charges.

Les constantes d'ionisation successives des deux sites acides seront définies de la façon naturelle par le schéma réactionnel suivant :



qui est en fait sous-jacent au schéma



L'équilibre global $H_2B \rightleftharpoons B$

a pour constante $K_1' K_2'' = K_1'' K_2' = K_{a1} K_{a2}$

Il est clair que lorsque dans la suite H_2B, HB, B , on considère la forme amphotère HB , celle-ci comprend les deux formes tautomères $H'B$ et $H''B$ en équilibre l'une avec l'autre. Leurs proportions sont égales par suite de la symétrie des deux processus d'ionisation, que traduisent les équations :

$$K_1' = K_1'' = K_1 \quad K_2' = K_2'' = K_2$$

ainsi :

$$K_{a1} = \frac{(H^+) [HB]}{[H_2B]} = \frac{(H^+) ([H'B] + [H''B])}{[H_2B]} = K_1' + K_1'' = 2K_1 \quad (7)$$

$$K_{a2} = \frac{(H^+) [B]}{[HB]} = \frac{(H^+) [B]}{[H'B] + [H''B]} = \frac{K_2' K_2''}{K_2' + K_2''} = \frac{K_2}{2} \quad (8)$$

Par suite $K_{a1} = 4 K_{a2}$

d'où $pK_{a1} = pK_{a2} + 0,602$ (9)

Le facteur 4 est parfois dit un "facteur statistique" [17*].

Selon RICCI J.E. [18*] la courbe de titrage d'un tel diacide est parfaitement identique à celle d'un acide monoprotique de masse moléculaire moitié et constante de dissociation $K_1/2$. On voit qu'en réalité l'étude minutieuse de la courbe que seul autorise son traitement informatique permet de reconnaître l'existence des deux fonctions acide en les distinguant et d'établir leur symétrie (évidemment attendu dans le cas de la mélarsoimine) par conformité à la théorie de l'écart et leurs pK_a .

DETERMINATION DES pK_a PAR CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1. Rappel théorique

1.1. Intérêt du coefficient de partage P eau/n-octanol

Depuis les travaux de MEYER et OVERTON, il est devenu évident que la distribution non spécifique d'une molécule au sein des tissus joue un rôle prépondérant dans la détermination de son activité biologique [19*] et que cette distribution dépend fortement de son aptitude à subir des transferts passifs entre compartiments aqueux et lipidiques. La balance des caractères hydrophile et hydrophobe d'une substance est donc une composante essentielle de son activité pharmacologique. Le caractère hydrophobe (dit aussi lipophilie) d'une molécule qui est généralement exprimé par le coefficient de partage, P_{oct} , entre l'eau et le n-octanol est ainsi un des plus importants paramètres à prendre en considération dans l'analyse quantitative des relations structure-activité (QSAR, abréviation de l'anglais Quantitative Structure Activity Relationship) [20*].

Ce coefficient traduit le rapport des solubilités d'un soluté dans la phase organique non polaire octanol et dans l'eau :

$$P_{oct} = \frac{C_{oct}}{C_{eau}} \quad (10)$$

P_{oct} : coefficient de partage

C_{oct} : concentration du soluté dans l'octanol.

C_{eau} : concentration du soluté dans la phase aqueuse.

Selon HANSCH [21*] et LEO [22*], le choix du n-octanol pour la définition de ce paramètre permet de bien représenter le rapport des affinités des composés chimiques pour les compartiments hydriques et lipidiques des systèmes biologiques. Il donne aussi une mesure de la capacité d'un composé à traverser les membranes cellulaires, barrières lipidiques entre les phases extra- et intra-cellulaires aqueuses et notamment aux sites d'absorption. Il

représente en réalité l'énergie thermodynamique nécessaire au processus de distribution (14) entre les deux types de phases (formule (11) ci-après).

1.2. Calcul du coefficient de partage P

On peut calculer les coefficients de partage. HANSCH et LEO [21*], [22*] ont démontré que les logarithmes des coefficients de partage sont une propriété moléculaire additive et constitutive, comme le volume molaire, la réfraction molaire et les constantes σ de HAMMETT. Dans ce contexte, "additive" signifie que le coefficient de partage peut être calculé par simple addition d'incrémentes relatifs aux structures moléculaires partielles, et "constitutive" signifie que les valeurs des incrémentes dépendent de la position relative et de l'environnement des structures partielles.

HANSCH définit une constante hydrophobe π qui traduit l'effet sur la lipophilie d'un substituant par rapport au substituant hydrogène. La précision de son modèle dépend de la connaissance du coefficient de partage pour une molécule parente, ainsi que des valeurs de π des substituants dans ce système déterminé. Ce modèle présente comme défaut de négliger la lipophilie de l'hydrogène. REKKER [23*] a proposé un système utilisant une constante fragmentale hydrophobe f , qui traduit la contribution de substituants et de sous-structures sur la lipophilie totale d'un composé. Le modèle tient compte de la lipophilie de l'hydrogène. Ces deux modèles nécessitent des corrections, notamment pour les interactions électroniques des substituants. Les corrections sont apportées par des constantes de HAMMETT ou des moments dipolaires [24*]. L'expression de l'effet stérique dans ces calculs fut longtemps un problème : ce sont la constante stérique de TAFT E_s et le volume molaire qui sont employés [24*].

Pour le calcul des coefficients de partage, il faut donc connaître l'apport de chaque élément structural. Or tous les éléments structuraux ne figurent pas dans les tables. Il est donc encore souvent nécessaire de déterminer les coefficients de partage de manière expérimentale.

1.3. Détermination expérimentale des coefficients de partage

Classiquement, cette détermination se fait à l'aide de l'ampoule à décanter. Or l'équilibre de répartition du soluté entre les deux phases ne se réalise que très lentement, ce qui fait que des mesures sont assez fastidieuses et difficilement reproductibles.

En outre, ce coefficient de partage est très sensible à la température, à la pureté des solutés et à la force ionique des tampons aqueux. Il peut être influencé aussi par le pH et par la formation de paires d'ions du soluté dans la phase octanol. Une évaluation des sources d'erreur pour la détermination du coefficient de partage a été faite par DEARDEN [25*].

1.4. Intérêt de la chromatographie

Dès les années 1940, MARTIN [26*] et CONSDEN [27*] ont démontré que la chromatographie peut renseigner sur le comportement hydrophobe d'un composé. Si on considère la rétention dans un système chromatographique comme un équilibre dynamique avec une constante d'équilibre K_0 , on peut décrire l'aspect thermodynamique du processus de rétention comme suit :

$$\ln K_0 = \frac{-\Delta G^0}{RT} \quad (11)$$

ΔG^0 : enthalpie libre standard de transfert de la phase mobile à la phase fixe

R : constante des gaz parfaits

T : température absolue

Pour la chromatographie en phase inverse, avec une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire, on définit un facteur de capacité k' dépendant de la constante d'adsorption sur une phase solide ou de la constante de distribution K_0 , entre une phase stationnaire liquide et une phase mobile liquide par la relation :

$$k' = \Psi K_0 \quad (12)$$

Dans le cas de l'adsorption, Ψ est le rapport de phases, défini comme le rapport de la surface de la phase stationnaire au volume de la phase liquide. Dans le cas de la distribution en chromatographie liquide-liquide, Ψ est le rapport entre les volumes de la phase stationnaire et de la phase mobile. De (11) et (12), on déduit :

$$\ln k' = \ln \Psi - \frac{\Delta G^0}{RT} \quad (13)$$

Le facteur de capacité chromatographique dépend donc, comme le coefficient de partage, de la variation de l'enthalpie libre associée au transfert d'une phase à l'autre. k' est donc calculable à partir des temps t_0 et t_r aisément mesurables, t_r étant le temps de rétention du soluté et t_0 celui d'un composé non retenu. Les coefficients de partages D_{app} apparents sont proportionnels aux k' et, dans les développements qui suivent, nous raisonnerons en termes de coefficients de partage.

1.5. Mécanisme de la rétention en CLHP

La rétention en CLHP ne peut pas être expliquée uniquement par les interactions conventionnelles comme l'attraction ionique, la liaison hydrogène ou les forces de VAN DER WAALS.

HORVATH [28*] décrit la rétention par la théorie solvophobe qui est basée sur les effets des solvants sur les équilibres chimiques développés par SINAGOGLU et HALICIOGLU. "La théorie solvophobe" formule la variation de l'enthalpie libre nécessaire pour dissoudre le soluté à partir d'une phase gazeuse hypothétique. Cela comprend deux étapes dont la première est la formation au sein de la phase mobile d'une cavité ayant la même taille que le soluté, ce qui s'accompagne de modifications de la structure du solvant. La deuxième étape correspond à l'introduction du soluté dans la cavité : là, le soluté peut interagir avec les molécules de la phase mobile qui l'entourent par des interactions électrostatiques et des interactions du type VAN DER WAALS. La théorie prédit que le facteur de capacité devrait baisser quand la teneur de la phase en cosolvant organique est forte. Une autre conséquence devrait être que le facteur de capacité baisse quand la constante diélectrique du solvant croît.

HAGGERTY [29*] a démontré l'intérêt de l'utilisation de phases stationnaires hydrocarbonées greffées chimiquement sur de la silice par réactions de silylation. Pour créer un système chromatographique similaire avec système des solvants eau-octanol, on a utilisé des colonnes de silice greffée recouverte d'une couche d'octanol ce qui a permis à MIRRLESS [30*] de trouver une bonne corrélation entre le logarithme du facteur de capacité $\log k'$ et $\log P_{\text{oct}}$. Un des mécanismes de rétention du soluté est la formation de liaison hydrogène entre les groupes polaires du soluté et les groupements hydroxyles de l'octanol. NAHUM et HORVATH [31*] ont montré que l'intervention de liaisons hydrogène dans les interactions du soluté avec la phase stationnaire est possible sur de la silice greffée parce que, même après persilylation de la silice, il existe un certain nombre de groupements hydroxyles qui, pour des raisons stériques ne participent pas à une liaison du type éther. Ces groupements silanols ont un caractère acide qui permettent des interactions dites "silanolophiles" avec les solutés, c'est-à-dire des interactions du type dipôle-dipôle avec des molécules polarisées ou polarisables, ou la formation de liaisons hydrogène avec des accepteurs d'hydrogène ou encore des interactions électrostatiques avec des molécules chargées [32*].

En outre, il faut bien différencier les comportements des composés acides, neutres et basiques. Ces interactions n'interviennent pas pour les composés neutres ou légèrement acides dans les phases mobiles à forte teneur en eau car les groupements silanols y sont fortement hydratés.

Pour les composés capables de former des liaisons hydrogène, on observe un double mécanisme de rétention [31*, 33*] : des interactions hydrophobes lorsque la teneur en eau de la phase mobile est forte et des interactions silanolophiles lorsque la teneur en cosolvant organique est forte.

EL TAYAR et coll. [34*, 35*] observent des courbes en forme de u pour les diagrammes $\log k' = f(\Phi)$ ou Φ représente la fraction volumique du cosolvant organique. Selon ces auteurs, le minimum des courbes est fonction du pH de la phase éluante. En fait, les composés basiques ne peuvent pas être chromatographiés sous leur forme non protonée sur une colonne en silice greffée puisque la silice se dissout à un pH supérieur à 8. EL TAYAR et coll., concluent qu'à des concentrations fortes en méthanol, l'expulsion

hydrophobe est atténuée en raison de l'absence de liaisons hydrogène entre les molécules du solvant comme c'est le cas dans l'eau pure. La non-rétention est due aux interactions polaires entre les molécules du soluté et les molécules du solvant qui les entourent. En outre, pour des concentrations très fortes en méthanol, l'ionisation du soluté baisse en raison de la diminution de la constante diélectrique. Quand la concentration en méthanol décroît, la constante diélectrique croît et l'expulsion hydrophobe devient le mécanisme de rétention prédominant.

Le comportement des composés neutres ou légèrement acides est différent car il ne se produit qu'un seul mécanisme de rétention : il ne se forme pas de liaison hydrogène. DOLAN et SAYDER [36*, 37*] ont montré que pour ce genre de composés, on peut représenter la rétention en fonction de la composition de la phase mobile par la relation linéaire :

$$\log k' = \log k_w - S\Phi \quad (14)$$

$\log k_w$: facteur de capacité extrapolé à 100 % d'eau

S : constante pour une combinaison soluté/phase éluante donnée

Φ : fraction volumique du cosolvant organique.

Plusieurs auteurs ont rapporté des corrélations satisfaisantes obtenues en utilisant les valeurs extrapolées $\log k_w$ au lieu de $\log k'$. EL TAYAR [38*] a réalisé une étude sur 49 composés tels que des toluènes substitués, phénols, nitrobenzènes, chlorobenzènes. Il a utilisé une phase mobile avec 2 % de décylamine qui se combine préférentiellement aux groupements silanols ce qui masque les interactions silanolophiles. Il a obtenu l'équation suivante (les limites de confiance correspondant au seuil de 95 %) :

$$\log k_w = 0,899 (\pm 0,051) \log P_{\text{oct}} + 0,226 (\pm 0,111) \quad (15)$$

n = 49

r = 0,982

s = 0,168

F = 1248

n = nombre de composés

r = coefficient de corrélation

s = déviation standard

F = rapport des variances

Pour la corrélation avec les valeurs de $\log k'$, pour une composition donnée de la phase éluante, il a observé une sous -ou une sur-estimation de la lipophilie pour les composés hydrophiles (polaires). Il a remarqué un comportement différent par rapport au système eau-octanol pour les composés capables de former des liaisons hydrogène intramoléculaires. HAMMERS et Coll. [39*] ont réalisé une étude sur des composés aussi variés que des méthylbenzènes, des arènes polycycliques, des polyphényles, des chlorobenzènes, des chloroanilines et des chlorophénols. Sur l'ensemble des composés étudiés, les composés polaires monosubstitués et les n-alkylbenzènes ont dû être exclus de la corrélation. En utilisant les valeurs de $\log k_w$, ils ont trouvé une relation du type:

$$\log k_w = 1,11 \cdot \log P_{\text{oct}} - 0,28 \quad (16)$$

$n = 36$
 $r = 0,969$
 $s = 0,18$

Le fait d'obtenir une meilleure corrélation pour les valeurs extrapolées est, selon eux, dû à ce que $\log P_{\text{oct}}$ et $\log k_w$ dépendent directement des coefficients d'activité des solutés dans l'eau.

1.6. Cas particuliers des bases

La plus grande partie des substances susceptibles d'avoir des propriétés pharmaceutiques sont des bases, il est donc important de s'y intéresser. Les corrélations entre $\log P_{\text{oct}}$ et $\log k_w$ ont comme défaut de nécessiter plusieurs mesures du temps de rétention afin de pouvoir extrapoler à une concentration théorique de la phase éluante de 100 % en eau. Il n'est pas possible d'utiliser des phases stationnaires en silice greffée à des pH supérieurs à 8 sans les détériorer. D'autre part, la chromatographie des substances ionisées ou partiellement ionisées donne des temps de rétention toujours inférieurs au temps de rétention correspondant à la substance neutre. HAFKENSCHIED [40*] a réalisé une étude sur des composés fortement basiques qui n'ont pas pu être chromatographiés sous leur forme neutre. Il a calculé le facteur de capacité du composé non ionisé à partir de la relation suivante :

$$k' = \frac{k^0}{1 + 10^{(pK_a - pH)_{\text{mob}}}} + \frac{k^+}{1 + 10^{(pH - pK_a)_{\text{mob}}}} \quad (17)$$

k' : facteur de capacité dans les conditions de la phase mobile

k^+ : facteur de capacité de la forme totalement ionisée

k^0 : facteur de capacité de la forme neutre

pK_a : pK_a du soluté

pH : pH de la phase mobile

Ainsi il a obtenu la corrélation suivante entre les logarithmes du coefficient de partage P_{oct}^0 et du facteur de capacité du soluté non ionisé :

$$\log P_{oct}^0 = 0,597 (\pm 0,136) + 1,819 (\pm 0,078) \log k^0 \quad (18)$$

$n = 28$ $r = 0,977$ $s = 0,298$ $F = 543$

Puisque les valeurs de pK_a dans les conditions de la phase mobile ne sont pas faciles à déterminer, HAFKENSCHIED a développé une équation de correction semi-empirique dont la solution ne nécessite que la connaissance des facteurs de capacité k_{mob}^- et k^+ . La détermination de k^+ peut être effectuée à un pH de la phase mobile inférieur au pK_a d'au moins deux unités.

Il existe des phases stationnaires peu sensibles au pH de la phase éluante. C'est le cas pour les résines copolymères à base de polystyrène/divinylbenzène, qui sont stables entre pH 1 à 13 et sur lesquelles on peut réaliser des mesures du temps de rétention des substances basiques sous leur forme neutre. Naturellement ces phases ne présentent aucune interaction par liaisons hydrogène.

MIYAKE [41*] a réalisé une étude sur une telle phase stationnaire. La phase mobile était soit un tampon-acétonitrile, soit un mélange tampon-méthanol. Les mesures ont été réalisées à pH = 2 et pH = 11. Les résultats obtenus l'ont amené à regrouper les composés en fonction de leurs propriétés chromatographiques :

- les composés incapables de former des liaisons hydrogène (regroupant les alkylbenzènes et les benzènes halogénés),
- les composés capables de former des liaisons hydrogène (regroupant les

composés possédant un groupement cyano, nitro, éther, ester ou cétone et les divers alcools benzoïques).

Il a chromatographié les acides benzoïques et les phénols uniquement en milieu acide afin d'éviter leur ionisation en milieu acide ; les anilines, pyridines et les quinoléines ont été, en raison de leur propriété basique, chromatographiées uniquement en milieu alcalin.

Il a ainsi obtenu une très bonne corrélation pour chaque groupe. Les valeurs de la pente étaient toujours du même ordre de grandeur mais par contre les différences étaient grandes pour l'ordonnée à l'origine.

MIYAKE a observé des propriétés inattendues pour certains groupes de solutés. D'une part pour les anilines, qui selon HANSCH [42*] sont considérées comme amphiprotiques, il a observé un comportement chromatographique similaire aux composés accepteurs d'hydrogène. D'autre part, il a observé un comportement amphiprotique similaire à celui des alcools benzyliques pour les pyridines et les quinoléines.

La meilleure corrélation, s'étendant à l'ensemble des composés, établie à l'aide de la relation :

$$\log P_{\text{oct}} = a + b \log k' + c \text{ HB} \quad (19)$$

a, b, c : constantes

HB : variable indicatrice

où HB = 1 pour les composés amphiprotiques à l'exception des anilines, des quinoléines et des pyridines et

où HB = 0 pour les composés non susceptibles de participer à des liaisons hydrogène donneurs ou bien accepteurs d'hydrogène.

Ainsi à pH = 11, pour un mélange eau-méthanol, son traitement de données donne le résultat suivant :

$$\begin{aligned} \log P_{\text{oct}} &= 0,34 (\pm 0,26) + 1,95 (\pm 0,15) \log k' + 0,61 (\pm 0,15) \text{ HB} \\ n &= 37 \qquad r = 0,982 \qquad s = 0,172 \end{aligned} \quad (20)$$

MIYAKE a également fait une étude de k' en fonction du pH de la phase

mobile. Il a ainsi déterminé le pK_a des solutés à partir des courbes obtenues, comme l'avait démontré HORVATH et coll. [43*]. Il préconise de prendre le pH de la solution aqueuse avant l'ajout du cosolvant organique comme état de référence car les résultats correspondent mieux avec ceux obtenus en potentiométrie.

Au Laboratoire de Chimie Analytique de notre Faculté, H. HOJA [44*], et D. CLEDAT [45*] ont montré que l'emploi de colonnes polymères permet de retrouver une corrélation linéaire entre les $\log k'$ et $\log P_{oct}$ calculés ou expérimentaux.

2. Méthodologie

2.1. Théorie "classique"

Le problème de la détermination conjointe des constantes d'acidité et des coefficients de partage est classique et sa solution est bien connue dans les cas élémentaires où les seuls équilibres sont ceux de protonation et de partage d'une base B ou d'ionisation et de partage d'un acide HA.

Rappelons-en le principe.

Le coefficient de partage apparent D_{app} , étant défini comme le rapport des concentrations totales existantes dans les 2 phases en équilibre, il s'écrit dans le cas d'un seul couple acide/base :

$$D_{app} = \frac{[HA]_{orga}}{[HA]_{eau} + [A^-]_{eau}} \quad \text{ou bien} \quad \frac{[B]_{orga}}{[B]_{eau} + [HB^+]_{eau}} \quad (21)$$

selon que le couple conjugué est du type $AH \rightleftharpoons H^+ + A^-$ suivant la loi :

$$K_a = \frac{(H^+) [A^-]}{[HA]} \quad (22)$$

ou $BH^+ \rightleftharpoons H^+ + B$ suivant la loi

$$K_a = \frac{(H^+) [B]}{[HB^+]} \quad (23)$$

Si D est le coefficient de partage de l'espèce moléculaire (HA ou B), la concentration de l'ion en solution s'écrit, selon le cas :

$$[A^-] = [HA] \cdot \frac{K_a}{(H^+)} \quad \text{ou} \quad [HB^+] = [B] \cdot \frac{(H^+)}{K_a} \quad (24)$$

d'où l'on tire aisément :

dans le cas de l'acide HA

$$D_{app} = D \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_a}{(H^+)}} \quad (25)$$

dans celui de la base B

$$D_{app} = D \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_a}} \quad (26)$$

La variation de D_{app} avec le pH suit donc une loi simple, dont la représentation graphique en coordonnées (pH, $\log D_{app}$) présente deux asymptotes, l'une horizontale d'ordonnée $\log D$ correspondant aux pH notablement inférieurs à pK_a dans le cas d'un acide HA, ou supérieurs dans celui d'une base B, l'autre de pente l'autre respectivement égale à -1 et +1.

On montre aisément que l'abscisse du point d'intersection des asymptotes est $pH = pK_a$.

Le problème pratique de la détermination conjointe de pK_a et D se ramène donc à celui de la mesure d'une série de coefficients de partage apparents à un certain nombre de valeurs de pH situés assez loin de part et d'autre du pK_a présumé (mais de telles valeurs ne sont pas toujours accessibles, ce qui complique le problème).

Toutes les techniques expérimentales se prêtant à de telles mesures peuvent être utilisées, notamment les mesures par équilibration à l'ampoule à décanter et les mesures chromatographiques.

Malheureusement, la réalisation de solutions aqueuses ou de phases mobiles de pH déterminés nécessite l'emploi de systèmes tampons qui contiennent des concentrations non négligeables de sels, en sorte que :

- d'une part les activités peuvent différer notablement des concentrations,
- d'autre part il peut se former des paires d'ions éventuellement susceptibles de participer à un partage entre les deux solvants.

Au premier inconvénient il peut en principe être remédié à l'aide d'une correction par le calcul des coefficients d'activité en fonction de la force ionique des solutions aqueuses. Pour des comparaisons au sein de séries de corps, on se contente souvent d'effectuer toutes les mesures à une même force ionique, donc d'utiliser des solutions tampons à force ionique constante quel que soit le pH.

Le second inconvénient est plus gênant, car il demande qu'on tienne compte des équilibres de formation et de partage de paires d'ions. Ceux-ci manifestent souvent leur présence de façon très évidente dans les suites de points expérimentaux (pH, $\log D_{app.}$) correspondant à des milieux assez fortement acides ou basiques. On observe alors que les parties inclinées des courbes expérimentales s'infléchissent vers une asymptote horizontale (rarement observée sur un grand intervalle de pH) et même que leurs pentes maximales s'écartent notablement des valeurs théoriques (+1 et -1).

Cette difficulté a été notamment rencontrée par MAUGEIN [46*] dans la détermination des pK_a et $\log D$ de benzimidazoles anthelminthiques et nous l'avons nous-même rencontrée dans le cas du Mèlarsen-oxyde.

Aussi allons-nous développer ci-dessous les notions théoriques, permettant sinon de résoudre complètement ce problème, au moins de le circonscrire. Nous traiterons ici seulement le cas d'une base B, considérée comme monovalente. C'est approximativement le

cas du Mélar-sen-oxyde, dont le second pK_{a2} est assez faible (de l'ordre de 5) pour que la première fonction basique (mesurée par pK_{a1}) puisse être regardée comme de force négligeable. Par contre nous envisagerons un ensemble d'équilibres assez complet.

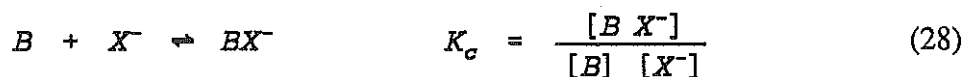
2.2. Théorie plus approfondie

Envisageons le cas d'une base B susceptible de participer aux équilibres suivants en solutions aqueuses :

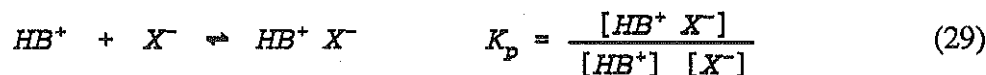
Equilibre de protonation



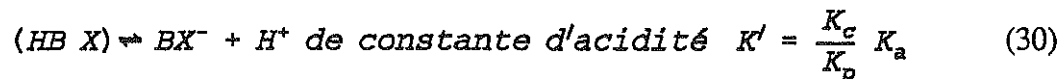
Equilibre de formation de complexe avec X^-



Equilibre de formation d'une paire d'ions



Remarque : (La coexistence des 2e et 3e équilibres correspond à une possibilité de déprotonation de la paire d'ions :



Les équilibres de partages à envisager portent sur les espèces électriquement neutres, c'est-à-dire B et HBX.

$$D = \frac{[B]_{orga}}{[B]_{eau}} \quad D_p = \frac{[HBX]_{orga}}{[HBX]_{eau}} \quad (31)$$

Dans ces conditions, le coefficient de partage apparent s'écrit :

$$D_{app} = \frac{[B]_{orga} + [HBX]_{orga}}{[B]_{eau} + [HB^+]_{eau} + [HBX]_{eau} + [BX^-]_{eau}} \quad (32)$$

En tenant compte des diverses lois d'action de masse et après simplification et réarrangement, D_{app} s'écrit encore :

$$D_{app} = \frac{D + D_p K_p [X^-] (H^+)/K_a}{1 + K_c [X^-] + (1 + K_p [X^-]) (H^+)/K_a} \quad (33)$$

Notons que s'il y avait plusieurs types d'anions présents X_i^- susceptibles de participer à des équilibres analogues à ceux auxquels prennent part les ions X^- , nous aurions une expression de la forme :

$$D_{app} = \frac{D + (\sum_i D_{p_i} K_{p_i} [X_i^-]) (H^+)/K_a}{1 + \sum_i K_{c_i} [X_i^-] + (1 + \sum_i K_{p_i} [X_i^-]) H^+/K_a} \quad (34)$$

On ne restreint donc pas la généralité du calcul en considérant un seul type d'ion X^- .

En posant $h = (H^+)/K_a$, l'expression ci-dessus est de la forme :

$$D_{app} = \frac{ah + b}{a'h + b'} \quad (35)$$

a , a' , b et b' étant des constantes ou fonctions de $[X^-]$ seul.

Si l'on pose : $u = -\log h$ (soit $u = \text{pH} - \text{p}K_a$), $v = \log D_{app}$,

elle s'écrit :

$$10^v = \frac{a \cdot 10^{-u} + b}{a' \cdot 10^{-u} + b'} \quad (36)$$

Posons $\alpha = \log a$, $\beta = \log b$, $\alpha' = \log a'$, $\beta' = \log b'$. La fonction devient :

$$10^v = 10^{\beta - \beta'} \frac{10^{-u + \alpha - \beta} + 1}{10^{-u + \alpha' - \beta'} + 1} \quad (37)$$

Si l'on pose

$$s = \frac{(\alpha' - \beta') + (\alpha - \beta)}{2} \quad d = \frac{(\alpha' - \beta') - (\alpha - \beta)}{2} \quad (38)$$

et $t = u - s = \text{pH} - \text{pK}_a - s$

elle s'écrit enfin, puisque $\alpha' - \beta' = s + d$, $\alpha - \beta = s - d$

$$10^v = 10^{\beta - \beta'} \cdot \frac{10^{-t-d} + 1}{10^{-t+d} + 1} \quad (39)$$

soit encore, en posant

$$z = v + \beta' - \beta + d \quad (= v + \frac{\beta' - \beta}{2} + \frac{\alpha' - \alpha}{2}) \quad (40)$$

$$10^z = \frac{10^{-t-d/2} + 10^{+d/2}}{10^{-t+d/2} + 10^{-d/2}} \quad (41)$$

Mise sous forme logarithmique, la fonction devient donc :

$$z = \log \frac{10^{-t-d/2} + 10^{+d/2}}{10^{-t+d/2} + 10^{-d/2}} \quad (42)$$

La fonction $z = f(t)$ est antisymétrique car si $t \rightarrow t' = -t$:

$$z \rightarrow z' = \log \frac{10^{+t-d/2} + 10^{d/2}}{10^{+t+d/2} + 10^{-d/2}} = \log \frac{10^{-d/2} + 10^{-t+d/2}}{10^{d/2} + 10^{-t-d/2}} = -z \quad (43)$$

Elle admet pour asymptotes horizontales $z = \pm d$ et la tangente en son point d'inflexion ($t = 0$, $z = 0$) a pour pente

$$p = \left(\frac{dz}{dt} \right)_{t=0} = \frac{10^d - 1}{10^d + 1} = \tanh \left(2,303 \frac{d}{2} \right) \quad (44)$$

Par suite les points d'intersection de cette tangente et des deux asymptotes ont pour abscisses t_+ et t_- notées t_{\pm} :

$$t_{\pm} = \pm \frac{d}{p} = \pm d \frac{10^d + 1}{10^d - 1} \quad (45)$$

Dans le cas traité (couple HB^+/B) :

$$a = D_p \cdot K_p \cdot [X^-] \quad a' = 1 + K_p \cdot [X^-]$$

$$b = D \quad b' = 1 + K_c \cdot [X^-]$$

$$s = 1/2 \left\{ \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} + \log \frac{D_p}{D} \cdot K_p \cdot [X^-] \right\} \quad (46)$$

$$d = 1/2 \left\{ \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} - \log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{D} \right\} \quad (47)$$

$$= 1/2 \left\{ \log \frac{D}{1 + K_c [X^-]} - \log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{1 + K_p [X^-]} \right\} \quad (48)$$

Les abscisses des points d'intersection sont tirées de $u_{\pm} = t_{\pm} + s$, ce qui correspond aux pH_{\pm} :

$$\text{pH}_{\pm} = \text{p}K_a + s \pm d \frac{10^d + 1}{10^d - 1} \quad (49)$$

• La différence des ordonnées des asymptotes, ou plus concrètement des points expérimentaux correspondant aux valeurs de pH extrêmes, a pour valeur $2d$.

Les ordonnées $\log D_{\text{app}}$ correspondantes sont :

$$v_+ = \beta - \beta' = \log \frac{D}{1 + K_c \cdot [X^-]} \quad (50)$$

et

$$v_- = \beta - \beta' - 2d = \alpha - \alpha' = \log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{1 + K_p \cdot [X^-]} \quad (51)$$

3 cas "extrêmes" sont à envisager :

• $p > 0, d > 0$, tel que $10^d \gg 1$, et par suite $p \approx 1, u \approx s \pm d$

soit $u_- = \alpha - \beta = s - d$ et $u_+ = \alpha' - \beta' = s + d$,

à u_- correspond :

$$pH_- = pK_a + s - d = pK_a + \log \frac{D_p}{D} \cdot K_p \cdot [X^-] \quad (52)$$

à u_+ correspond :

$$pH_+ = pK_a + s + d = pK_a + \log \frac{1 + K_p \cdot [X^-]}{1 + K_c \cdot [X^-]} \quad (53)$$

Ce cas correspond au cas "normal" où les réactions de complexation et de formation de paire d'ions ne sont pas prépondérantes. La pente du graphe $\log D_{app.} = f(pH)$ est égale à 1 au point d'inflexion.

• $p = 0, d = 0$. Ce cas est sans doute exceptionnel, il correspondrait à l'égalité (fortuite)

$$\frac{D_p}{D} \cdot K_p \cdot [X^-] = \frac{1 + K_p \cdot [X^-]}{1 + K_c \cdot [X^-]} \quad (54)$$

mais peut théoriquement se rencontrer pour la valeur de $[X^-]$ assurant cette égalité.

En cas de formation de paire d'ions, il existe donc une valeur théorique de $[X^-]$ (qui a peu de chances d'être réalisée en pratique) telle que le coefficient de partage apparent ne dépende pas du pH.

• $p < 0, d < 0$, tel que $10^d \ll 1$ et par suite $p \approx -1, u \approx s \mp d$,

les abscisses des points d'intersection seraient inversées par rapport à pK_a :

$$pH_- = pK_a + \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} \quad pH_+ = pK_a + \log \frac{D_p}{D} K_p [X^-] \quad (55)$$

Les cas intermédiaires correspondant à une pente dont la valeur absolue est inférieure à 1, peuvent conduire à un résultat simplifié en considérant le point d'inflexion ($t = 0, z = 0$), auxquels correspondent les valeurs :

$$\begin{aligned} \text{pH}_i &= 1/2 (\text{pH}_+ + \text{pH}_-) = \text{pK}_a + s \\ \log D_{\text{app},i} &= 1/2 (v_+ + v_-) = v_+ - d = v_- + d. \end{aligned}$$

Si l'on observe que :

$$s = -d + \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} \quad (56)$$

on déduit :

$$\text{pH}_i = \text{pK}_a - d + \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} \quad (57)$$

En supposant alors que les deux produits $K_p [X^-]$ et $K_c [X^-]$ sont négligeables devant 1 ou bien de valeurs voisines, on obtient : $\text{pH}_i \approx \text{pK}_a - d$. Cela revient à dire qu'une valeur approchée du pK_a est donnée par l'abscisse du point de concours P avec l'asymptote supérieure de la sécante au point d'inflexion ayant pour pente 1. Cependant, si l'un au moins de ces produits n'est pas négligeable devant 1, l'abscisse du point P est égale à :

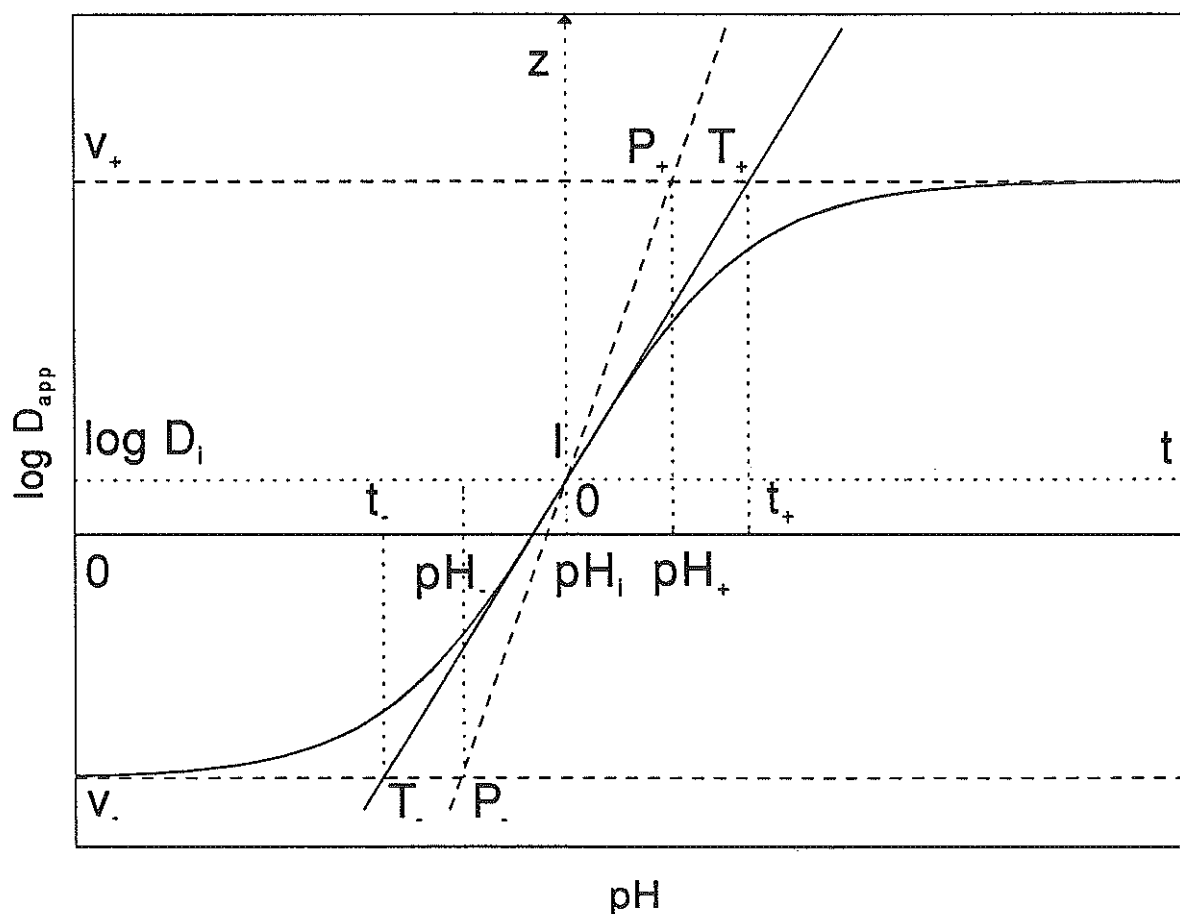
$$\text{pK}_a^* = \text{pK}_a + \log \frac{1 + K_p [X^-]}{1 + K_c [X^-]} \quad (58)$$

qui est en quelque sorte un pK_a apparent.

Dans le cas d'un seul anion susceptible d'entrer en paire d'ions, le calcul algébrique et une simulation numérique montrent qu'il existe un pH auquel toutes les courbes $\log D_{\text{app.}} = f(\text{pH})$ passent par un même point. L'une de ces courbes est l'horizontale correspondant à $d = 0$, c'est-à-dire au cas où l'extraction de la paire d'ions compenserait exactement le défaut d'extraction de la forme moléculaire. (Réciproquement, si l'on traçait les courbes $\log D_{\text{app.}} = f(\text{p}[X^-])$, on verrait qu'il existe un pH auquel toutes les courbes se croisent). De tels croisements de courbes peuvent se rencontrer lors d'essais faits avec des

concentrations en anions différentes.

Il peut être intéressant de comparer 2 courbes ($\text{pH}, \log D_{\text{app.}}$) différant par les produits $K_c [X^-]$, les constantes K_p, K_a et D étant les mêmes. L'écart entre les abscisses des points d'intersection avec les asymptotes horizontales respectives des sécantes de pente 1 passant par les points d'inflexion est égal à celui des valeurs $\log(1 + K_c [X^-])$, c'est-à-dire à l'écart des ordonnées des asymptotes. Cela entraîne que les points d'intersection considérés sont situés sur une même droite de pente 1, qui est ainsi une sécante commune aux points d'inflexion des 2 courbes.



2.3. Applications possibles

On ne peut tirer toutes les constantes D , D_p , K_p , K_c , d'une seule courbe expérimentale $\log D_{app.} = f(pH)$ correspondant à une seule valeur $[X^-]$. En effet, les ordonnées v_- , v_+ des asymptotes, dont les expressions suivent, dépendent chacune de deux constantes inconnues. Il faudrait donc au moins deux valeurs de $[X^-]$, et la complexité des calculs à prévoir peut faire craindre qu'ils ne soient pas très précis. Nous avons cependant vu que certaines approximations peuvent être faites.

• Dans le cas d'une pente p positive, l'ordonnée v de l'asymptote supérieure a pour valeur v_+ :

$$v_+ = \log \frac{D}{1 + K_c [X^-]} \quad (59)$$

S'il n'y a pas de raison de supposer l'existence d'un complexe BX^- , on peut faire l'hypothèse que $K_c = 0$. Alors, $v_+ = \log D$.

L'ordonnée de l'asymptote inférieure est alors v_- :

$$v_- = \log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{1 + K_p \cdot [X^-]} \quad (60)$$

et pour déterminer D_p et K_p , il faut disposer d'au moins 2 courbes obtenues à des concentrations molaires $[X^-]$ différentes.

Si $K_p = 0$, il n'y a pas de 2ème asymptote horizontale et la tangente devient une asymptote de pente 1.

• Au cas d'une pente négative correspondrait l'inversion des significations de v_+ et v_- . Ce cas paraît peu vraisemblable pour un couple HB^+/B .

• La pente de la tangente au point d'inflexion de la courbe $(\log D_{app.}, pH)$, ou plus concrètement la plus forte pente mesurée est égale à :

$$p = \left(\frac{dz}{dt} \right)_{t=0} \quad (61)$$

On a donc les relations réciproques :

$$p = \tanh (2,303 d/2) \quad d = \log \frac{1+p}{1-p} = \frac{2}{2,303} \operatorname{atanh} p \quad (62)$$

qui permettent de vérifier la validité du modèle théorique envisagé. Si l'on admet cette validité, les mesures directes de l'intervalle des asymptotes et de la pente sont redondantes, ce qui sous cette hypothèse permet de suppléer à des insuffisances expérimentales fréquentes.

En effet, il arrive que l'une des asymptotes horizontales ne soit pas traçable avec précision, par exemple parce que la forme moléculaire est instable dans le milieu qui favorise sa formation dans l'équilibre de protonation, soit par suite d'une dégradation, soit par l'effet d'un équilibre acide/base supplémentaire, tel qu'en présentent les molécules amphotères.

L'écart entre les abscisses pH_+ , pH_- , des points d'intersection de la tangente avec les asymptotes est égal à

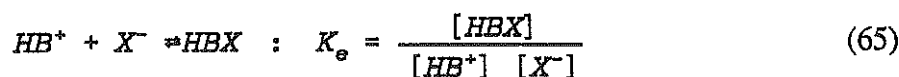
$$\log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{D} - \log \frac{1 + K_p \cdot [X^-]}{1 + K_c \cdot [X^-]} + 2d \frac{10^d + 1}{10^d - 1} \quad (63)$$

Si l'on suppose K_c nul (pas de complexation) et $K_p \cdot [X^-]$ négligeable sans que le soit le produit $D_p \cdot K_p \cdot [X^-]$ (absence de paire d'ions en phase aqueuse, souvent supposée), l'écart des abscisses est

$$\log \frac{D_p \cdot K_p \cdot [X^-]}{D} = \log \frac{K_e \cdot [X^-]}{D} \quad (64)$$

où, K_e serait une constante relative à l'équilibre hétérogène

eau solvant



L'écart entre les ordonnées est alors $v_+ - v_- = \log D - \log K_e [X^-]$,

Avec la constante K_c , l'équation (33) se simplifie en :

$$D_{app} = \frac{D + K_c [X^-] (H^+) / K_a}{1 + (H^+) / K_a} \quad (66)$$

Une telle constante d'équilibre hétérogène peut également s'envisager aussi dans le cas où existerait une complexation en phase aqueuse de B par X^- . On aurait alors : $K_p = 0$ et $K_c \neq 0$ dans les équations précédentes. Ce cas est l'un de ceux envisagés à la fin de la section 2.3.

3. Travaux expérimentaux

3.1 Matériel et méthodes

Réactifs

- Mélarsen-oxyde (Mel 4, fourni par Rhône-Mérieux)
- Acide phosphorique : réf. Prolabo n° 26624
- Acide acétique : réf. Prolabo n° 20104
- Acide borique : réf. Prolabo n° 20185
- Méthanol rectifié au laboratoire en présence de zinc et de potasse
- Eau bi-distillée en silice.
- Acide sulfurique : réf. Prolabo n° 20700
- Hydroxyde de sodium : réf. Prolabo n° 28252

Matériel

Les mesures de pH sont effectuées à l'aide d'un pH-mètre SCHOTT CG 817 équipé d'une électrode combinée verre calomel et étalonné à l'aide de solutions tampons de pH 4 et 7 de SCHOTT.

Les chromatographies ont été faites sur colonne de phase stationnaire copolymère styrène-divinylbenzène PLRP-S 8 μm , 100 \AA , 25 cm x 4,6 mm, à l'aide d'une pompe BISCHOFF 2200 et d'un détecteur U.V. KRATOS 783 réglé à 272 nm. Les temps de rétention sont déterminés par un intégrateur HP 3390A dont le déclenchement est synchronisé

avec l'injection.

Les phases mobiles ont été filtrées sur filtres téflon GELMAN
0,45 μm .

Préparation de la phase mobile

Nous avons fabriqué deux gammes de solutions éluantes hydrométhanoliques à 38 ± 1 p.cent (v/v) de méthanol et de pH différents. Elles sont obtenues par addition à 475 ml du mélange eau : méthanol (600 : 350) de 25 ml de solution aqueuse "tampon".

Dans le premier groupe ces solutions sont des tampons de BRITTON-ROBINSON. Les solvants d'éluion obtenus ont des pH compris entre 1,84 et 9,16.

Dans le second groupe ces solutions sont des mélanges obtenus en ajoutant à 40 ml d'acide sulfurique 0,02 N de faibles volumes d'hydroxyde de sodium 0,2 N. Les solvants d'éluion ont des pH compris entre 2,29 et 9,2.

Les pourcentages de méthanol dans les diverses solutions éluantes ont été contrôlés par oxydimétrie selon une technique dérivée de celle de SEMICHON et FLANZY pour le dosage de l'éthanol. Le méthanol est oxydé pendant 12 heures par un excès de bichromate de potassium en milieu sulfurique, puis l'excès en est titré par une solution de sel de Mohr en présence d'o-phénanthroline ferreuse.

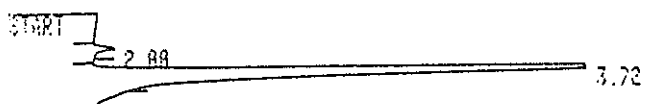
Solution échantillon

Solution méthanolique à $2,49 \cdot 10^{-2}$ de mélarsen-oxyde.

3.2. Résultats

Nous donnons ci-après un exemple des chromatogrammes obtenus.

Le graphique et les tableaux suivants rassemblent les résultats relatifs aux deux types de solutions éluantes et les éléments du calcul de $\log k'$.

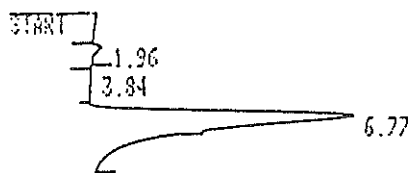


STOP

RUN # 2

AREA%	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
	2.00	205600	D BB	0.353	1.941
	3.72	1.0392E+07	PB	0.577	98.059

TOTAL AREA= 1.0598E+07
MUL FACTOR= 1.0000E+00

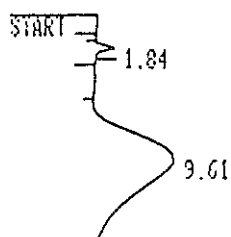


STOP

RUN # 3

AREA%	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
	1.96	135400	D BB	0.481	1.271
	3.84	2577	D BP	0.157	0.024
	6.77	1.0518E+07	PB	1.422	98.705

TOTAL AREA= 1.0656E+07
MUL FACTOR= 1.0000E+00

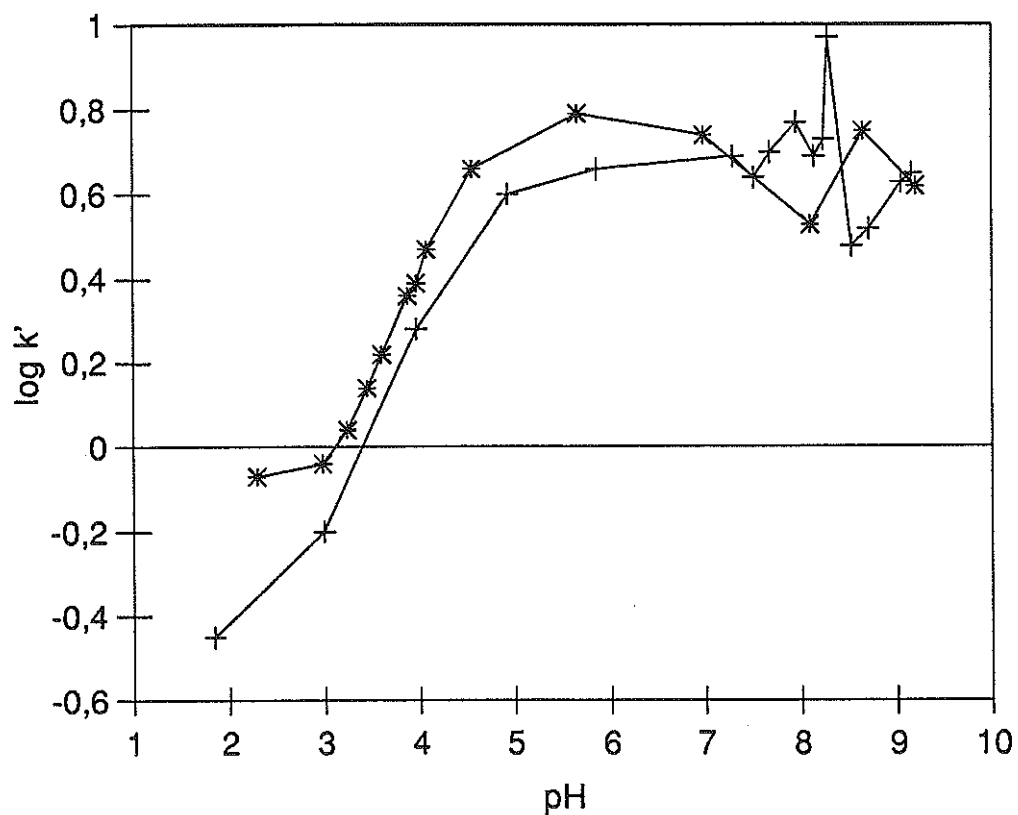


STOP

RUN # 10

AREA%	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
	1.84	201330	D PB	0.412	1.871
	9.61	1.0560E+07	I PH	4.620	98.129

TOTAL AREA= 1.0762E+07
MUL FACTOR= 1.0000E+00



pH	to	tr	k'	log k'
1,84	1,88	2,54	0,351	-0,455
2,99	1,97	3,20	0,624	-0,205
3,98	2,04	5,94	1,912	0,281
4,93	1,93	9,62	3,984	0,600
5,86	1,83	10,27	4,612	0,664
7,29	1,72	10,21	4,936	0,693
7,51	1,71	9,15	4,351	0,639
7,68	1,70	9,04	5,025	0,701
7,95	1,73	8,75	5,843	0,767
8,14	1,72	7,85	4,851	0,686
8,28	1,75	8,11	3,634	0,560
8,53	1,69	6,85	3,053	0,485
9,05	1,72	9,01	4,238	0,627
9,16	1,76	9,68	4,500	0,653

Solvant à tampon de BRITTON-ROBINSON.

pH	t ₀	t _r	k'	log k'
2,29	2,01	3,70	0,8408	-0,0753
2,98	2,03	3,89	0,9163	-0,0380
3,24	2,05	4,30	1,0976	0,0404
3,45	2,02	4,79	1,3713	0,1371
3,60	1,98	5,27	1,6616	0,2205
3,87	1,99	6,56	2,2965	0,3611
3,96	1,98	6,79	2,4293	0,3855
4,07	1,99	7,92	2,9799	0,4742
4,55	1,96	10,93	4,5765	0,6605
5,66	1,87	13,39	6,1604	0,7896
6,98	1,85	12,04	5,5081	0,7410
8,10	1,86	8,17	3,3925	0,5305
8,65	1,88	12,42	5,6064	0,7487
9,20	1,85	9,64	4,2108	0,6244

Solvant contenant des ions sulfates.

Le graphique (pH, log k') précédent montre que, pour chaque ensemble de solutions, les points (pH, log D_{app}) obtenus sur l'intervalle de pH étudié peuvent se regrouper en deux séries:

1. Dans la zone des pH inférieurs ou égaux à 6, on observe que les points (pH, log D_{app}) sont convenablement disposés selon une trajectoire sigmoïdale ascendante.

2. Aux pH plus élevés, il y a une amorce de décroissance de log D_{app} suivie d'une disposition apparemment erratique, mais dont plusieurs points ont été répétés lors d'essais successifs. Il semble donc qu'il y ait à ces pH des phénomènes ne se limitant pas à l'ionisation d'une fonction acide phénylarsénieux dont on attend la formation par hydrolyse du groupe arsénoso. On peut penser à une duplication de la molécule incomplètement hydratée et ionisée, ou à une oxydation en acide arsonique. N'ayant accès à aucun moyen d'effectuer des investigations plus approfondies dans ce domaine, où les déterminations potentiométriques faites ne décèlent que l'existence d'une telle fonction acide, nous l'avons laissé de côté.

Méthode de calcul utilisée.

La détermination des 5 paramètres de l'équation (33), pK_a , K_c , K_p , D et D_p (ou k' et k'_p), n'étant pas possible sans un ensemble de mesures faites à différentes concentrations $[X^-]$, seuls les paramètres pK_a^* , k' et $K_e[X^-]$ correspondant à l'équation simplifiée (56) peuvent être déterminés.

Quelque soit leur nombre, il paraît naturel d'effectuer leur recherche par minimisation de la somme des carrés des écarts entre les $\log k'$ expérimentaux et calculés (ou erreur quadratique). Ce type de calcul est appelé méthode du maximum de vraisemblance ou encore régression non-linéaire. Il consiste en une succession d'approximations effectuées au départ de valeurs d'essai appropriées, c'est-à-dire aussi proches que possibles des valeurs réelles à déterminer.

Le calcul comprend deux stades:

- une recherche préliminaire de valeurs d'essai convenables,
- un affinement par approximations successives.

1. La recherche de valeurs d'essai peut se faire de façon très simple dans le cas des trois paramètres pK_a^* , D (ou k'), $K_e[X^-]$, lorsque sont disponibles des points expérimentaux d'ordonnées proches de celles des asymptotes $\log D$ (ou $\log k'$) et $\log(K_e[X^-])$, donc d'abscisses assez éloignées de celle du point d'inflexion centre de symétrie de la courbe. L'ordonnée de ce dernier étant égale à la moyenne des deux précédentes, son abscisse peut en général être convenablement estimée à partir d'une courbe tracée "au jugé" ou par interpolation entre les points expérimentaux. Il suffit alors de déterminer l'abscisse du point d'ordonnée $-\log D$ de la droite de pente 1 passant par le point d'inflexion ainsi approximativement situé, ce qui donne une valeur approchée du pK_a^* .

Lorsque les éléments de départ ne sont pas aussi aisément accessibles, l'abscisse du point d'inflexion et le demi-écart des asymptotes pourront être calculés en résolvant de façon graphique un système d'équations où figurent les coordonnées de trois points expérimentaux ainsi qu'il est indiqué dans l'annexe 1.

2. L'affinement par approximations successives devrait en principe pouvoir se faire à partir de ces valeurs initiales à l'aide des programmes de régression non linéaire figurant dans les logiciels de traitement mathématique des données, tels que Mathcad, et qui reposent sur des algorithmes classiques tels que ceux de GAUSS-NEWTON ou de MARQUARDT.

En fait les essais que nous avons pu faire de ces logiciels n'ont conduit à aucun résultat, ces programmes semblant incapables de traiter des équations telles que (24), peut-être par suite de la présence d'une inconnue (pK_a^*) en exposant et/ou des ordres de grandeur des données.

Nous avons donc opéré de façon "artisanale" selon un processus plus rudimentaire d'optimisation, qui conduit néanmoins à la minimisation cherchée de l'erreur quadratique. La démarche est très simple à mettre en œuvre à l'aide d'un logiciel de tracé de courbes.

Fixant deux des inconnues à leurs valeurs d'essai, on trace le graphe de l'erreur quadratique calculée en fonction de la troisième, que l'on fait varier dans un intervalle de largeur raisonnable de part et d'autre de sa valeur d'essai. Cet intervalle est modifié (élargi, rétréci ou déplacé) en fonction de l'aspect de la courbe, jusqu'à ce qu'elle y présente un minimum. On fixe alors la valeur de la variable à l'abscisse du minimum, et l'on opère de même avec une seconde inconnue, puis avec la troisième, et ainsi de suite. On affine ainsi à tour de rôle les valeurs des trois inconnues et l'on s'arrête lorsque la convergence est jugée suffisante (erreur quadratique assez faible variant très peu d'un cycle au suivant et/ou affinement insignifiant eu égard à la nature des inconnues).

Cette méthode est évidemment un peu lourde mais elle présente sur une résolution automatique l'avantage d'être constamment contrôlée par l'opérateur qui peut, compte tenu de l'allure des courbes, définir les domaines de variation à explorer de façon plus intelligente qu'un logiciel préprogrammé et gagner ainsi du temps.

Nous avons vérifié que, sur nos ensembles de données, les résultats des

affinements faits en prenant pour variables des fonctions différemment définies des inconnues conduisaient pour celles-ci à des valeurs finales très voisines.

Pour les chromatogrammes effectués à l'aide de phases mobiles contenant le tampon de BRITTON et ROBINSON, on obtient:

$$pK_a^* = 4,208, \quad k' = 4,78, \quad K_e[X^-] = 0,3403$$

Pour les chromatogrammes effectués à l'aide de phases mobiles dont le pH a été fixe à l'aide d'acide sulfurique et d'hydroxyde de sodium, et contenant une concentration fixe d'ions SO_4^{--} , on obtient:

en appliquant aux données la pondération décrite à l'annexe 2 :

$$pK_a^* = 4,326, \quad k' = 6,52, \quad K_e[X^-] = 0,753$$

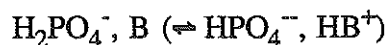
sans application d'une pondération :

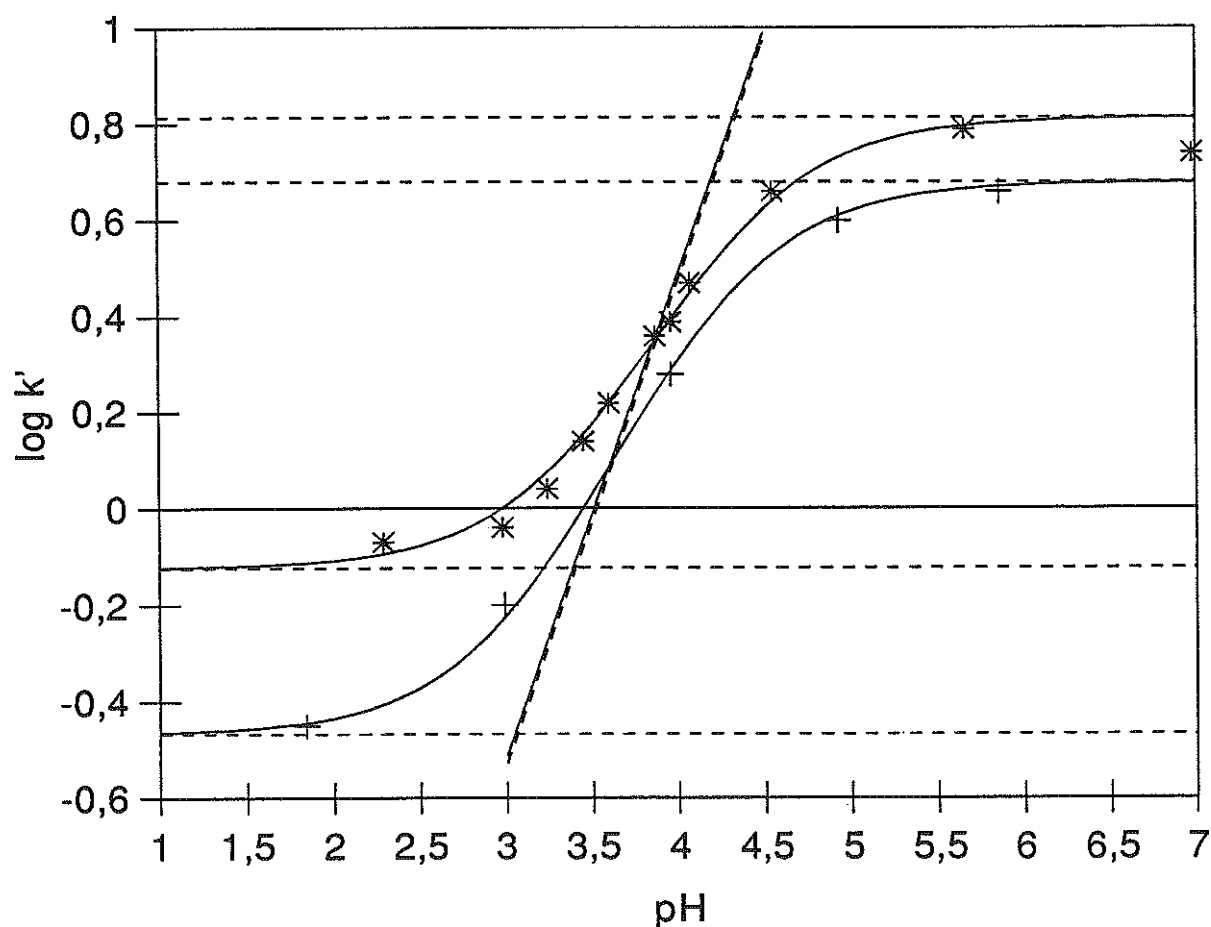
$$pK_a^* = 4,325, \quad k' = 6,55, \quad K_e[X^-] = 0,723.$$

La figure suivante montre la concordance des courbes calculées et des points expérimentaux jusqu'à pH 7 (+: cas du tampon de BRITTON-ROBINSON, *: cas des ions SO_4^{--}).

3.3. Discussion

Le fait que $\log k'$ soit trouvé plus élevé pour les cas du "tampon" à H_2SO_4 que pour celui de BRITTON-ROBINSON montre que les anions de ce dernier complexent la base B non protonée probablement plus que les ions sulfates. Ceci peut être dû aux ions acétates (libérés au-delà de pH 4,6) et surtout aux ions phosphates : $H_2PO_4^-$ (majoritaires au voisinage de pH 5) et HPO_4^{--} (majoritaires au voisinage de pH 7). Ces ions phosphates hydrogénés donneraient les complexes :





Si la colonne était une silice greffée, on s'attendrait à ce que les ions sulfate, s'ils ne complexent pas B, diminuent la rétention par inactivation des groupes silanols résiduels. Mais avec une colonne polymère, cela n'est pas possible. On doit donc admettre que l'écart $\delta = \log D_{\text{sulfate}} - \log D_{\text{BRITTON}}$ représente uniquement l'effet d'une inégale complexation par les ions sulfates et par les ions du tampon de BRITTON-ROBINSON.

Les valeurs pK_a^* indiquées dans les résultats précédents sont notablement inférieures à la valeur pK_{a2} que donne le titrage potentiométrique. Si l'on néglige l'influence d'une constante diélectrique plus faible dans le cas des solutions hydro-méthanoliques (peu important pour un couple HB^+/B) et de forces ioniques différentes, l'écart $pK_a^* - pK_{a2}$ est égal à $\log(1+K_p[X^-]) - \log(1+K_c[X^-])$. Une valeur plus faible que pK_a réel est donc attribuable à l'existence d'un terme $K_c[X^-]$ non négligeable devant 1, alors qu'une valeur plus forte serait attribuable à celle d'un terme $K_p[X^-]$ non négligeable devant 1. On doit donc conclure qu'aussi bien les ions sulfates que ceux du tampon de BRITTON ROBINSON s'associent en solution aux molécules de mélar-sen-oxyde, les seconds un peu plus fortement que les

premiers, ce que traduit la différence entre les $\log k'$, qui est égale à la différence entre les valeurs $\log D_{app}$ limites, ordonnées des asymptotes supérieures des deux courbes. On note enfin que l'effet stabilisateur de D_{app} , dû à l'extraction de la paire d'ions en milieux assez acides masque l'influence de la première fonction acide (qui est la plus faible fonction basique de la molécule), dont nous avons déterminé le pK_{a1} par titrage potentiométrique.

En fait, les développements théoriques précédents étant relatifs au cas d'ions X^- monovalent, leur application aux ions sulfates est critiquable, notamment à propos de la formation de "paires d'ions" extractibles de charge nulle, et cela peut être la cause de la légère distorsion constatée entre la courbe calculée et le point correspondant au solvant à ions sulfates le plus acide. Cependant la charge des ions complexes formés avec la molécule B ne joue aucun rôle théorique et de ce fait, il n'y a pas à craindre d'inadéquation de la théorie relative à la formation des complexes BX^- . C'est ce que semble confirmer la quasi superposition des sécantes de pente 1 passant par les points d'inflexion des courbes interpellant les résultats expérimentaux.

Rappelons ici qu'en revanche, ces mesures par CLHP montrent l'existence d'une fonction acide très faible (sans doute un acide phénylarsénieux) résultant de l'hydrolyse du groupe arsénoso, tout à fait indécélable par titrage potentiométrique. Malheureusement l'apparente irrégularité des mesures de $\log k'$ en milieu alcalin ne nous a pas permis de préciser le pK_a de cette dernière fonction.

Comme les écarts observés entre courbes théoriques et points expérimentaux à $pH > 6$ sont attribuables à l'hydrolyse de ce groupe, il n'affirme pas les conclusions que nous avons tirées de l'observation et des ordonnées des paliers de $\log k'$ aux pH voisins de 5.

CONCLUSION

Nous avons rappelé la structure des médicaments trypanocides arsénicaux dans l'ensemble des organoarséniés.

Nous avons étudié des caractères physicochimiques de la mélarsomine (base du RM 340) et du mélarsen-oxyde susceptibles d'intervenir dans leur séparation analytique et dans la compréhension de leur métabolisme.

Nous avons appliqué les méthodes potentiométriques de détermination de pK_a au RM 340 et au mélarsen-oxyde et grâce à l'exploitation informatique des courbes de titrage, nous avons montré que :

- pour le RM 340, les forces basiques des NH_2 aliphatiques ($pK_{a4} = 9,09$, $pK_{a3} = 8,46$) se situent dans un rapport proche du rapport théorique que doivent présenter des fonctions semblables ne s'influçant aucunement ($\Delta pK_a \approx 0,63$ pour 0,603). Un premier pK_a égal à 2,04 et un autre égal à 4,50 correspondent à la faible basicité du noyau mélamine.

Le site de fixation d'un premier proton peut être assez facilement suggéré mais il est difficile de proposer une structure pour la forme H_2B^{++} .

- pour le mélarsen-oxyde, les fonctions faiblement basiques du noyau mélamine ($pK_{a1} = 2,61$, $pK_{a2} = 4,86$) sont de forces proches de celles de la mélarsomine et cela exclu que l'une des basicités mesurées soit attribuable au groupement arsénone. La présence de celui-ci influe simplement sur les pK_a des fonctions basiques du noyau mélamine, qui apparaissent un peu plus faibles. En revanche, aucune trace de fonction acide due à l'hydrolyse du groupement arsénone n'est décelable dans la courbe de titrage.

Nous avons donc appliqué au mélarsen-oxyde la méthode chromatographique reposant sur l'étude des variations de coefficients de partage (ou $\log K'$) des fonctions du pH.

Cela a permis :

- de mettre en évidence, mais non d'étudier, une ionisation en milieu alcalin dont le mécanisme est sans doute complexe.

- de retrouver l'existence d'une première fonction basique dont le pK_a apparent est un peu plus faible que celui de la fonction correspondante de la mélarsomine.

- de mettre en évidence la formation d'une paire d'ions hydrophobe responsable d'une limitation inférieure de $\log k'$ aux pH acides. N'ayant pu multiplier les essais avec des concentrations ioniques différentes dans la phase mobile, la formation de paire d'ions ne peut être interprétée dans le cas des résultats obtenus que comme se faisant simultanément son extraction au cours d'un équilibre de partage entre les phases fixe et mobile.

- qu'enfin les ensembles de points expérimentaux relatifs aux deux séries de chromatogramme sont en accord avec les développements théoriques élaborés pour leur exploitation.

Ainsi la comparaison des courbes $\log k' = f(\text{pH})$ pour des solvants à tampons BRITTON-ROBINSON et contenant des ions sulfates montre qu'il y a certainement une formation de complexe entre les anions du solvant et la molécule mélarsen-oxyde, ce qui diminue sa lipophilie apparente en milieu neutre ou faiblement alcalin et explique pour partie l'écart entre les pK_{a2} déterminés respectivement par titrimétrie (4,86) et par CLHP (4,21 ou 4,33 selon le milieu).

Nous pouvons regretter de ne pas avoir disposé de suffisamment de temps pour explorer les spectres U.V. qui devrait permettre de mieux comprendre les structures des cations HB^+ et H_2B^{++} dérivés du mélarsen-oxyde et H_4B^{4+} et H_3B^{3+} dérivés de la mélarsomine.

Annexe 1

Pour calculer la pente de la tangente au point d'inflexion et l'abscisse pH_i de celui-ci, on considère la pente de la sécante passant par 2 points P_1, P_2 approximativement symétriques par rapport à lui. Cette pente a pour valeur :

$$\frac{(z_2 - z_1)}{\Delta t} = \frac{-\log(k_2/k_1)}{\Delta \text{pH}} \quad (67)$$

Si les points sont vraiment symétriques par rapport à $t = 0$ (c'est-à-dire à $\text{pH} = \text{pH}_i$), leurs abscisses sont égales à :

$$\pm \frac{\Delta t}{2} \quad (68)$$

et le pH médian égal à :

$$\frac{\text{pH}_1 + \text{pH}_2}{2} \quad (69)$$

correspond à $t = 0$

S'il n'en est pas ainsi, les abscisses de P_1 et P_2 sont :

$$\frac{\Delta t}{2} + \epsilon \quad \text{et} \quad \frac{-\Delta t}{2} + \epsilon \quad (70)$$

Posons :

$$m_1 = 10^{\frac{-\Delta t}{2} + \epsilon} \quad m_2 = 10^{\frac{\Delta t}{2} + \epsilon} \quad \text{et} \quad l = 10^{\frac{d}{2}} \quad (71)$$

Les ordonnées sont respectivement :

$$z_1 = \log \frac{\frac{m_1}{l} + l}{m_1 l + \frac{1}{l}} \quad z_2 = \log \frac{\frac{m_2}{l} + l}{m_2 l + \frac{1}{l}} \quad (72)$$

alors :

$$z_2 - z_1 = -\log \frac{k_2}{k_1} = -\log r \text{ avec } r = \frac{m_2 \cdot l + \frac{1}{l}}{\frac{m_2}{l} + 1} \frac{\frac{m_1}{l} + l}{m_1 l + \frac{1}{l}} \quad (73)$$

m_1 et m_2 sont des fonctions de ε . Après réarrangement, on obtient une équation du 2ème degré en $x = l^2 = 10^{+d}$.

$$l^4 (r \cdot m_1 - m_2) + l^2 (r - 1) (1 + m_1 \cdot m_2) + r m_2 - m_1 = 0. \quad (74)$$

10^d est l'une des solutions de l'équation et c'est une fonction de ε .

Il suffit de 3 points 1, 2, 3 permettant de former 2 couples dont les pH médians sont pH_m , pH'_m pour lever l'indétermination, c'est-à-dire pour déterminer à la fois d et ε , donc pH_i .

On trace $d = f_{12}(\varepsilon + \text{pH}_m)$ pour un couple et $d = f_{13}(\varepsilon + \text{pH}'_m)$ pour le 2ème couple.

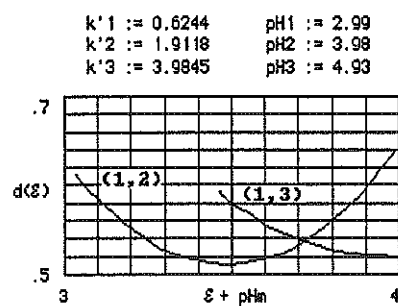
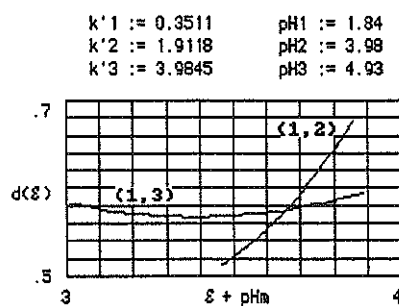
La même valeur de d correspond à 2 valeurs, ε et ε' , telles que :

$$\text{pH}_i = \text{pH}_m + \varepsilon = \text{pH}'_m + \varepsilon'.$$

On détermine donc à la fois pH_i et d , ce qui permet de calculer la pente $p = \tanh(2,30 d/2)$.

De là, on calcule des valeurs approchées de pK_a^* , de $\log D_i$ et des ordonnées d'asymptotes égales à $\log D_i \pm d$.

Les figures ci-dessous présentent les graphes $(d, \text{pH}_m + \varepsilon)$ utilisés pour le choix des valeurs initiales de pK_a^* , D et v à partir de $\log D_i$ et d ainsi qu'il est indiqué à l'annexe 2.



Les valeurs pH_i déterminées sur ces graphiques de façon approximative sont bien concordantes, les valeurs d le sont moins, mais les unes et les autres peuvent servir de point de départ pour l'affinement décrit à l'annexe 2.

Annexe 2

Ajustements des paramètres pK_a^* , $\log D$ et $K_e[X^-]$ par approximation successives.

Pour des raisons de commodité, nous avons mis la fonction cherchée sous la forme :

$$\log k' = g(U, D, pK_a) = \frac{H \frac{10^{pK_a}}{U} + 1}{H 10^{pK_a} + 1} \cdot D \quad (75)$$

avec $H = 10^{-pH}$, $U = D/K_e [X^-]$

Dans l'hypothèse d'un équilibre hétérogène régi par une constante K_e , l'ordonnée V_- de l'asymptote horizontale inférieure est égale à $\log K_e [X^-]$. S'il n'y a pas de complexation de B par $[X^-]$ en solution, celle V_+ , de l'asymptote supérieure est égale à $\log D$, et leur distance est

$$\log \frac{D}{K_e [X^-]} = \log U = 2d \quad (76)$$

d étant la quantité définie par l'équation (47). On prend donc comme valeur initiale de U : 10^{2d} , comme valeur initiale de D : $10^{(\log D_i + d)}$ et comme valeur initiale de pK_a : $pH_1 + d$.

L'optimisation portant alternativement sur les paramètres U , D et pK_a . La fonction d'erreur minimisée est :

$$\Delta(U, D, pK_a) = [\sum_i (\Delta(i))^2 \cdot p(i)]$$

où $\Delta(i) = \log k' \text{ observé} - \log h_i' \text{ calculé}$.

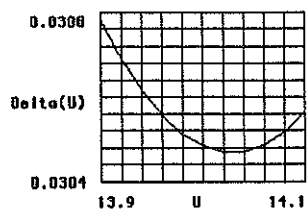
$p(i)$ est un facteur de pondération défini par :

$$p(i) = \frac{S(i)}{\sum_i S(i)} \quad (77)$$

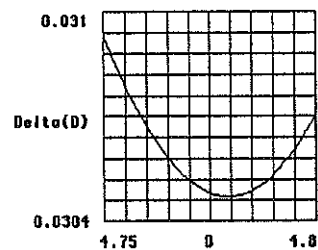
avec $S(i) = [(pJ_i - pH_{i-1}) (pH_{i+1} - pH_i)]^{0,5}$

Les pH_i étant ceux auxquels ont été effectuées les chromatographies. Si les points expérimentaux sont à peu près également espacés dans l'intervalle de pH considéré, la pondération n'est pas effectuée. Le paramètre $K_e [X^-]$ est égal à D/U .

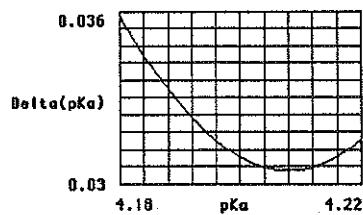
Les figures suivantes montrent un exemple de chacune des recherches d'un minimum à la fin d'un cycle d'itération effectué à l'aide du programme MathCad.



$pKa = 4.208$ $\theta = 4.78$
 $U := 14.02$ $Delta(U) = 0.0304712$



$pKa = 4.208$ $U = 14.02$
 $\theta := 4.78$ $Delta(D) = 0.0304712$



$U = 14.02$ $\theta = 4.78$
 $pKa := 4.208$ $Delta(pKa) = 0.0304712$

BIBLIOGRAPHIE

- [1*] P. LEBEAU et M. M. JANOT
Traité de Pharmacie Chimique, 1956, tome 3, 2206
- [2*] A. FAIRLAMB, G.B. HENDERSON
NATO ASI Series, 1987, H 11, 29
- [3*] V. APOSHIAN, M. APOSHIAN
J. Am. Coll. Toxicol., 1989, 8, n° 7, 1297
- [4*] A. FAIRLAMB, G.B. HENDERSON, A. CERAMI
Proc. Nat. Acad. Sci., 1989, 86, 26
- [5*] G.B. HENDERSON, P. ULRICH, A. FAIRLAMB, A. CERAMI
J. Chem. Soc. (Chem. Comm.), 1986, 593
- [6*] B. ARRICK, O. GRIFFITH, A. CERAMI
J. Exp. Med., 1981, 153, 720
- [7*] A. FAIRLAMB, P BLACKBURN, P. ULRICH
Science, 1985, 227, 1485
- [8*] GOODMAN & GILMAN's
The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8e éd., 1990, Pergamon Press, New York
- [9*] M. PLACIDI
Th. Doct. Pharm., Marseille, 1973, 89 p.
- [10*] J.N. BRONSTED
Recueil Trav. Chim., 1923, 42, 718
- [11*] D.D. PERRIN, B. DEMPSEY, E.P. SERJEANT
pKa Prediction for Organic Acids and Bases, Chapman and Hall ed., 1981, Londres

- [12*] R.G. BATES et al.
J. Res. Natl. Bureau Standards, 1950, **45**, 418
- [13*] A. F. MILWARD
Analyst, Lond., 1969, **94**, 154
- [14*] D.D. PERRIN, I. G. SAYCE
Chem. Ind., 1966, 661
- [15*] A. ALBERT, E. P. SERJEANT
The Determination of Ionization Constants, 3e edition, 1984, Chapman and Hall ed.,
Londres
- [16*] A.E. MARTELL et R.J. MOTEKAITIS
Determination and Use of Stability Constants, VCH Publishers, New-York, 1988
- [17*] E.Q. ADAMS
J.A.C.S. 1916, **38**, 1503.
- [18*] J.E. RICCI
Hydrogen ion concentration, Princeton University Press, Princeton N.J., 1952, 95
- [19*] H. MEYER
Arch. Exp. Pathol. Pharmako., 1899, **42**, 109
- [20*] K. MIYAKE, H. TERADA
J. Chromatogr., 1982, **240**, 9
- [21*] A. LEO, C. HANSCH, D. ELKINS
Chem. Rev., 1971, **71**, 525
- [22*] C. HANSCH, W. DUNN
J. Pharm. Sci., 1972, **61**, 1
- [23*] R. KALISZAN
J. Chromatogr., 1981, **220**, 71

- [24*] R.F. REKKER
The Hydrophobic Fragmental Constant. Its Derivation And Application. A Means of
Characterizing Membrane Systems, Elsevier, Amsterdam, 1977
- [25*] J.C. DEARDEN, G.M. BRESNEN
Quant. Struct. Act. Relat., 1988, 7, 13
- [26*] A.J.P. MARTIN, R.L.M. SYNGE
Biochem. J., 1941, 35, 1359
- [27*] R. CONSDEN, A.H. GORDON, A.J.P. MARTIN
Biochem. J., 1944, 38, 1224
- [28*] W.R. MELANDER, C. HORVATH
" Reversed- Phase Chromatography" dans High-Performance Liquid Chromatography
Advances and Perspectives, Vol. 2., 1980, Ed. C. Horvath, Academic Press, New -
York
- [29*] W.J. HAGGERTY, E.A. MURRILL
Res. Dev., 1974, 25, 30
- [30*] M.S. MIRRLESS, S.J. MOULTON, C.T. MURPHY, P.J. TAYLOR
J. Med. Chem., 1976, 19, 615
- [31*] A. NAHUM, C. HORVATH
J. Chromatogr., 1981, 203, 53
- [32*] S.G. WEBER, W.G. TRAMPOSCH
Anal. Chem., 1983, 55, 1771
- [33*] K.E. BIJ, C. HORVATH, W. R.MELANDER, A. NAHUM
J. Chromatogr., 1981, 203, 65
- [34*] N. EI TAYAR, H. VAN DE WATERBEEMD, B. TESTA
J. Chromatogr., 1985, 320, 293
- [35*] N. EI TAYAR, H. VAN DE WATERBEEMD, B. TESTA
J. Chromatogr., 1985, 320, 305

- [36*] J.W. DOLAN, J.R. DOLAN, L.R. SNYDER
J. Chromatogr., 1979, 165, 31
- [37*] L.R. SNYDER, J.W. DOLAN, J.R. GANT
J. Chromatogr., 1979, 165, 3
- [38*] N. EL TAYAR, H. VAN DE WATERBEEEMD, B. TESTA
Quant. Struct. Act. Relat., 1985, 4, 69
- [39*] W.E. HAMMERS, G.J. MEURS, C.L. DE LIGNY
J. Chromatogr., 1982, 247, 1
- [40*] T. HAFKENSCHIED, E. TOMLINSON
J. Chromatogr., 1984, 292, 305
- [41*] K. MIYAKE, F. KITAURA, H. TERADA
Chem. Pharm. Bull., 1987, 35, 377
- [42*] C. HANSCH, A.J. LEO
Substituent Constants For Correlation Analysis in Chemistry and Biology,
Wiley, New York, 1979, 48
- [43*] C. HORVATH, W.R. MELANDER, I. MOLNAR
Anal. Chem., 1977, 49, 142
- [44*] H. HOJA
Détermination par CLHP de la lipophilie de quelques 2-benzamido-5-nitro-thiazoles
halogénés.
Mémoire de DEA Chimie Fine, Sciences, Nantes, 1991, 21 p.
- [45*] D. CLEDAT
Influence de la structure sur la basicité, la lipophilie et la stabilité de quelques dérivés
du 2-benzamido-5-nitro-thiazole.
Thèse Doct., Sciences, Limoges, 1989, n° 23, 83 p.
- [46*] P. MAUGEIN
Thèse Doct. Sci. Pharm., 1982, Limoges, 242 p.

TABLE DES MATIERES

pages

<u>INTRODUCTION</u>	4
<u>LES DERIVES ORGANIQUES DE L'ARSENIC</u>	5
1. <u>Généralités</u>	5
2. <u>Les dérivés arséniés trypanocides</u>	7
2.1. <u>Le tryparsamide et ses composés</u>	8
2.2. <u>Les séries de l'arsphénamine et de l'oxophénarsine</u>	8
2.3. <u>Butarsen</u>	9
2.4. <u>La série des dérivés au mélarsen</u>	9
<u>MODE D'ACTION DES DERIVES AROMATIQUES DE L'ARSENIC TRIVALENT</u>	13
<u>PHARMACOCINETIQUE DES DERIVES ARSENICAUX</u>	16
<u>DETERMINATION DU PK_a PAR POTENTIOMETRIE</u>	19
1. <u>Rappel théorique</u>	19
2. <u>Méthodologie</u>	21
3. <u>Travaux personnels et résultats</u>	26
3.1. <u>Matériels et méthodes</u>	26
3.2. <u>Titration du mélarsen-oxyde</u>	27
3.3. <u>Titration du RM 340</u>	30
3.4. <u>Discussion</u>	33
3.4.1. <u>Dans le cas du mélarsen-oxyde</u>	33
3.4.2. <u>Dans le cas de la mélarsomine</u>	35

<u>DETERMINATION DU PK_a PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE</u>	38
1. <u>Rappel théorique</u>	38
1.1. <u>Intérêt du coefficient de partage $P_{\text{eau/n-octanol}}$</u>	38
1.2. <u>Calcul du coefficient de partage P</u>	39
1.3. <u>Détermination expérimentale des coefficients de partage</u>	40
1.4. <u>Intérêt de la chromatographie</u>	40
1.5. <u>Mécanismes de la rétention en CLHP</u>	41
1.6. <u>Cas particuliers des bases</u>	44
2. <u>Méthodologie</u>	47
2.1. <u>Théorie classique</u>	47
2.2. <u>Théorie plus approfondie</u>	50
2.3. <u>Applications possibles</u>	57
3. <u>Travaux expérimentaux</u>	59
3.1. <u>Matériels et méthodes</u>	59
3.2. <u>Résultats</u>	60
3.3. <u>Discussion</u>	66
<u>CONCLUSION</u>	69
<u>ANNEXE 1</u>	71
<u>ANNEXE 2</u>	74
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	76
<u>TABLE DES MATIERES</u>	80

COUTURIER (Jean-Christophe). — Contribution à la détermination de paramètres physicochimiques de dérivés arsenicaux du Mèlarsen. — 81 f; ill.; tabl.; 30 cm. [Thèse : Pharm.; Limoges; 1992].

RESUME :

Les médicaments trypanocides n'ont guère évolué depuis des années et restent principalement des dérivés arsenicaux qui sont d'un maniement thérapeutique délicat.

Cette constatation nous a conduit à chercher à préciser quelques caractères physicochimiques des dérivés du Mèlarsen pour essayer de mieux appréhender leur pharmacocinétique.

Nous avons déterminé les pK_a apparents du Mèlarsen-oxyde et de la Mèlarsomine par titrage potentiométrique puis tenté de confirmer ces valeurs pour le Mèlarsen-oxyde par CHLP. La méthode repose sur l'étude des variations de $\log k'$ en fonction du pH des solutions éluantes, la phase fixe étant une phase polymérique PLRPS.

Nous avons ainsi mis en évidence d'une part l'existence d'une fonction très faiblement acide résultant de l'hydrolyse du groupement arsénoxyde, d'autre part la formation avec les anions présents dans la phase mobile de paires d'ions qui interviennent dans le mécanisme de rétention.

MOTS CLES :

- Arsenic.
- Chromatographie Liquide Haute Performance.
- Dérivés arsenicaux.
- Mèlarsen.
- pK_a .
- Potentiométrie.

JURY : Président : Monsieur le Professeur PENICAUT.
Juges : Monsieur le Professeur NICOLAS.
Monsieur le Docteur FORRAT
Mademoiselle CLEDAT, Maître de Conférences.