

## UNIVERSITE DE LIMOGES

### Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

**Développement de méthodes d'analyses permettant le screening de molécules pharmaceutiques à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup>**

**Détermination de constante d'acidité de molécules ionisables par spectrophotométrie UV-visible et par l'analyse des composantes principales**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le (18 février 2014)

par

**Aude GANDON**

Née le 17 décembre 1987, à Bourg-la-Reine

#### EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe CARDOT .....Président

M. Marine STUPFEL ..... Juge

Mme. Dominique CLÉDAT ..... Juge

M. Serge BATTU ..... Juge



## Remerciements

Je remercie Monsieur CARDOT Philippe qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je le remercie également pour m'avoir encadrée, conseillée et guidée lors de mon travail de thèse.

Je remercie Monsieur SOTTY Dominique et Madame STUPFEL Marine pour m'avoir accueillie dans le service de développement analytique de Servier et pour le temps qu'ils m'ont accordée.

Je remercie tous les membres de mon jury pour le temps consacré à ma thèse.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont encadrées et accompagnées tout au long de mes études, lors de mes différents stages.

Elles m'ont notamment permis d'acquérir de nombreuses connaissances, de progresser et de choisir mon orientation professionnelle.

Je remercie tous les enseignants rencontrés lors de mes études, pour les connaissances et le savoir qu'ils m'ont apportés.

Je remercie mes proches pour leur soutien.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagnée et aidée, de près ou de loin, lors de mes études et lors de mon travail de thèse.



DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**  
1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences  
2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN : Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

**PROFESSEURS** :

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>BENEYTOU</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
<b>DESMOULIÈRE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES** :

<b>LACHÂTRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE

**MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)**

<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

## **MAÎTRES DE CONFÉRENCES :**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSÉE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNÈRE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LÉGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>PASCAUD</b> Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

## **PROFESSEUR de LYCEE PROFESSIONNEL :**

<b>ROUMIEUX</b> Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

**ATTACHÉ TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

**MAMMARI** Nour (1/10/13 au 31/08/14)

MICROBIOLOGIE

**VEDRENNE** Nicolas (1/11/13 au 31/08/14)

CHIMIE ANALYTIQUE

## **Droits d'auteurs**

Droits d'auteur réservés.

Toute reproduction sans accord exprès de l'auteur à des fins autres que strictement personnelles est prohibée.



## Table des matières

# CHAPITRE I

## Application analytique de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible :

Détermination de constantes d'activité de molécules ionisées 15

1. INTRODUCTION 16

2. LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE ULTRAVIOLET/VISIBLE 17

2.1. Principes fondamentaux de la spectroscopie UV-visible 17

2.1.1. Propriétés du rayonnement électromagnétique 17

2.1.2. Spectre électromagnétique 17

2.1.3. L'absorption d'un rayonnement 18

2.1.4. Le spectre UV-visible 19

2.1.5. Les transitions électroniques 20

2.2. Les appareils de mesure 21

2.2.1. Les appareils de spectrométrie optique 21

2.2.2. Les appareils de spectrophotométrie d'absorption moléculaire 23

3. CHIMIOMETRIE EN SPECTROMETRIE UV-VISIBLE : L'ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES 25

3.1. Principes de l'ACP 25

3.2. Approche mathématique 27

3.2.1. Les données à analyser 27

3.2.2. Méthode 27

3.2.2.1. Centrage et normalisation de la matrice initiale 27

3.2.2.2. Recherche des composantes principales 28

3.2.3. Propriétés des composantes principales 29

3.2.4. Sélection du nombre k d'axes factoriels à retenir 30

3.2.4.1. Utilisation du critère de Kaiser 30

3.2.4.2. Utilisation du test d'accumulation de variance « scree test » de Catell 31

3.2.5. Interprétation de l'ACP 32

3.2.5.1. La projection des variables 32

3.2.5.2. Le graphique des individus 34

3.2.5.3. Qualité de représentation sur les axes factoriels 35

3.2.5.4. Interprétation 36

3.2.6. Tableau récapitulatif 37

<b>4. EQUILIBRES ACIDE-BASE EN SOLUTION AQUEUSE : pH, pK<sub>a</sub> et solutions tampons</b>	<b><u>38</u></b>
<b>4.1. pH des solutions aqueuses</b>	<b><u>38</u></b>
4.1.1. pH des solutions aqueuses	<u>38</u>
4.1.2. Domaine de validité de l'échelle opérationnelle du pH	<u>38</u>
<b>4.2. Produit ionique de l'eau (K<sub>e</sub>)</b>	<b><u>38</u></b>
<b>4.3. Définitions des acides et des bases</b>	<b><u>39</u></b>
4.3.1. Théorie d'Arrhenius	<u>39</u>
4.3.2. Théorie de Bronsted-Lowry	<u>40</u>
4.3.2.1. Acides et bases conjugués	<u>40</u>
4.3.2.2. Inexistence du proton en solution	<u>41</u>
4.3.2.3. Échange de protons en solution	<u>41</u>
<b>4.4. Force des acides et des bases</b>	<b><u>42</u></b>
4.4.1. Caractère relatif de la force des acides et des bases	<u>42</u>
4.4.1.1. Chiffage de la force des acides : K <sub>a</sub> et pK <sub>a</sub>	<u>43</u>
4.4.1.2. Chiffage de la force des bases K <sub>b</sub> et pK <sub>b</sub>	<u>44</u>
4.4.2. Force relative des acides	<u>45</u>
4.4.3. Prédominance des espèces en fonction du pH	<u>45</u>
<b>4.5. Solution tampon</b>	<b><u>46</u></b>
4.5.1. Intérêt et constitution des solutions tampon : effet tampon	<u>46</u>
4.5.2. Calcul du pH des solutions tampon	<u>46</u>
<b>4.6. Coefficient de Schawrzenbach (α<sub>H</sub>)</b>	<b><u>48</u></b>
4.6.1. Définition	<u>48</u>
4.6.2. Calcul de α <sub>H</sub> pour un diacide H <sub>2</sub> A	<u>48</u>
4.6.3. Calcul de α <sub>H</sub> pour un polyacide quelconque H <sub>n</sub> A	<u>49</u>
4.6.4. Calcul des pourcentages de forme ionisée et de forme moléculaire	<u>49</u>
<b>4.7. Titrages acide-base</b>	<b><u>50</u></b>
4.7.1. Définition	<u>50</u>
4.7.1.1. Titration acide-base	<u>50</u>
4.7.1.2. Point d'équivalence	<u>51</u>
4.7.2. Variation du pH au cours de la neutralisation	<u>51</u>
4.7.2.1. Les deux antagonistes (acide et base) sont forts	<u>51</u>
4.7.2.2. Un des deux antagonistes est faible et l'autre est fort	<u>52</u>
4.7.2.3. L'acide et la base sont faibles	<u>53</u>
<b>5. BILAN</b>	<b><u>56</u></b>

## CHAPITRE II

<b>Développement de méthodes d'analyses permettant de déterminer des constantes d'acidité de molécules pharmaceutiques ionisables en développement à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup></b>	<b><u>15</u></b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b><u>58</u></b>
<b>2. DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ACIDITE PAR L'UTILISATION DU SIRIUS T3<sup>®</sup></b>	<b><u>60</u></b>
<b>3. STRATEGIE</b>	<b><u>63</u></b>
<b>4. PROTOCOLES OPERATOIRES DU PK<sub>a</sub></b>	<b><u>64</u></b>
<b>5. LE pK<sub>a</sub></b>	<b><u>65</u></b>
<b>5.1. Méthodologie</b>	<b><u>65</u></b>
5.1.1. Les pK <sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 2 à 12	<u>65</u>
5.1.2. Les pK <sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 1 à 3 ou de 11 à 13	<u>65</u>
5.1.2.1. Les pK <sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 1 à 3	<u>65</u>
5.1.2.2. Les pK <sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 11 à 13	<u>65</u>
<b>5.2. Retraitement</b>	<b><u>66</u></b>
5.2.1. Systèmes en équilibres	<u>66</u>
5.2.2. L'analyse des composantes principales (PCA)	<u>66</u>
<b>5.3. Résultats et discussion</b>	<b><u>67</u></b>
5.3.1. Validation du protocole de détermination des pK <sub>a</sub> dans la gamme de pH allant de 2 à 12 à 25°C à l'aide de molécules décrites dans la littérature	<u>67</u>
5.3.1.1. Un acide faible : L'acide salicylique	<u>67</u>
5.3.1.2.. Une base faible : Le propranolol	<u>71</u>
5.3.2. Extension de la gamme de pH de 2 à 1 et de 12 à 13 pour le protocole de détermination des pK <sub>a</sub> à 25°C à l'aide d'une molécule Servier : S47693	<u>75</u>
5.3.1.1. Mis en œuvre du protocole de détermination des pK <sub>a</sub> ayant une valeur de pH de 1 à 2 ou de 12 à 13 à 25°C à l'aide de PA connus au sein du laboratoire Servier	<u>78</u>
5.3.2.2. Mis en œuvre du protocole de détermination des pK <sub>a</sub> ayant une valeur de pH de 1 à 2 et de 12 à 13 à 25°C sur la molécule Servier : S47693	<u>80</u>
5.3.2.3. Les différentes espèces à 25°C de la molécule Servier : S47693	<u>81</u>
5.3.3. Mis en œuvre du protocole de détermination des pK <sub>a</sub> ayant une valeur de pH de 1 à 13 à 37°C sur la molécule Servier : S47693	<u>82</u>

<b>5.3.4. Comparaison des valeurs de pK<sub>a</sub> à 25 et 37°C pour la molécule Servier : S47693</b>	<b><u>82</u></b>
<b>6. BILAN</b>	<b><u>83</u></b>
Conclusion	<u>84</u>
Bibliographie	<u>85</u>
Table des illustrations	<u>87</u>
Table des tableaux	<u>89</u>
Table des annexes	<u>90</u>
Annexes	<u>91</u>

## Introduction

L'intérêt porté à la spectroscopie UV-visible a été croissant grâce aux améliorations de l'instrumentation, au développement des fibres optiques permettant de délocaliser la mesure et aux progrès de l'informatique.

Il faut souligner l'importance des méthodes mathématiques et statistiques permettant de visualiser, d'extraire et de traiter l'information dans le développement de la spectroscopie UV-visible. Les débuts de la chimiométrie datent de 1969 lorsque Jurs et ses collaborateurs<sup>1</sup> ont publié des articles concernant l'utilisation d'une méthode, « Linear Learning Machine », permettant de classer des spectres de masse.

La définition de la chimiométrie est la suivante : il s'agit de la discipline qui utilise les mathématiques et les méthodes statistiques pour sélectionner les procédures expérimentales optimales et pour extraire le maximum d'informations des données issues d'analyses chimiques<sup>2</sup>. La chimiométrie regroupe l'ensemble des méthodes de planification des expériences, des méthodes d'extraction de l'information (modélisation, classification et tests d'hypothèses) et des techniques permettant de comprendre des mécanismes chimiques (relation structure / activité des molécules) ou de modéliser un procédé<sup>3,4</sup>.

Ainsi la spectrométrie et la chimiométrie ont prouvé leurs utilités dans des domaines variés tels que l'agriculture, les industries alimentaires<sup>5</sup>, pharmaceutiques et chimiques. Par sa rapidité et par son caractère non destructif, la spectrophotométrie est une méthode de choix pour le screening des principes actifs en développement dans l'industrie pharmaceutique.

La plupart des principes actifs contenus dans les médicaments sont des acides faibles ou des bases faibles qui sont présents en solution sous forme ionisée ou non ionisée. Les molécules non ionisées, plus liposolubles, diffusent plus facilement à travers la membrane cellulaire ; tandis que les molécules ionisées, plus hydrosolubles sont habituellement incapables de pénétrer dans la membrane cellulaire à cause de leur faible solubilité lipidique. Ainsi, la distribution transmembranaire d'un principe actif ionisable est déterminée par sa constante d'acidité ( $pK_a$ )<sup>6</sup>. C'est pourquoi, il est impératif lors du développement pharmaceutique d'un nouveau principe actif de connaître la valeur de sa constante d'acidité.

L'industriel pharmaceutique « Servier » a modernisé la recherche des constantes d'activité de ces nouveaux principes actifs par l'obtention d'un spectrophotomètre UV-visible robotisé et miniaturisé : le Sirius T3<sup>®</sup>. L'objectif de la thèse est de mettre en place des protocoles permettant de déterminer les constantes d'acidité des molécules en phase de développement.

La mise en place de protocole analytique utilisant un spectrophotomètre UV-visible nécessite un ensemble de connaissances pluridisciplinaires. C'est pourquoi le premier chapitre présente successivement :

1- les principes fondamentaux de l'ultraviolet / visible et l'instrumentation spectroscopique,

2- la méthode chimiométrique utilisée au cours de ce travail, à savoir l'analyse en composantes principales, pour extraire l'information présente dans les spectres et permettre de déterminer la valeur des constantes d'activité d'une molécule,

3- les différents équilibres acide-base en solution aqueuse.

Le deuxième chapitre concerne mon travail de recherche dans l'industrie pharmaceutique, département de développement analytique chez Servier. Il consiste à mettre en place des protocoles permettant de déterminer les constantes d'activités des molécules ionisables en développement à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup>. Cet appareil est un spectrophotomètre UV-visible possédant comme détecteur une barrette de diode relié à un ordinateur. Cet ordinateur enregistre les spectres UV-visible durant l'analyse et possède un logiciel utilisant l'analyse des composantes principales pour extraire l'information recherchée, c'est-à-dire les constantes d'ionisation de la molécule analysée. La mise en place de ces protocoles permettra d'optimiser le screening des molécules biologiquement actives en diminuant le temps d'analyse et la quantité nécessaire de ces molécules pour déterminer leurs constantes d'acidité.

# CHAPITRE I

**Application analytique de la spectrophotométrie d'absorption  
moléculaire dans l'ultraviolet et le visible :**

**Détermination de constantes d'activité de molécules ionisées**

# 1. INTRODUCTION

Initialement le terme spectroscopie se référait à une branche scientifique où la lumière (en fait le rayonnement visible) étant composée selon ses différentes longueurs d'onde pour engendrer des spectres, c'est-à-dire des graphiques d'une intensité en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. Au cours du temps, la signification du terme spectroscopie s'est élargie pour inclure des études relatives non seulement à la lumière, mais également aux autres types de rayonnement électromagnétique, tels que les rayons X, le rayonnement ultraviolet, le rayonnement infrarouge, les micro-ondes et les ondes radios<sup>7</sup>.

La spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible est surtout employée en analyse quantitative et est probablement plus utilisée que toute autre méthode dans les laboratoires d'analyses chimiques et médicales du monde entier<sup>8</sup>.

Ce chapitre vise à :

- 1- décrire les principes fondamentaux de la spectroscopie UV-visible,
- 2- présenter l'instrumentation UV-visible,
- 3- expliquer une des méthodes chimométrique, l'analyse des composantes principales, et de décrire les différents équilibres acide-base en solution aqueuse.



## 2. LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE ULTRAVIOLET-VISIBLE<sup>9</sup>

### 2.1. Principes fondamentaux de la spectroscopie UV-visible

#### 2.1.1. Propriétés du rayonnement électromagnétique

La lumière comme toute radiation présente un caractère ondulatoire et un caractère particulaire.

- Caractère ondulatoire

Une onde se caractérise par :

- sa fréquence  $\nu$ , exprimée en Hertz
- sa longueur d'onde  $\lambda$ , exprimée en mètre.

La longueur d'onde  $\lambda$  correspond à la distance parcourue pendant un cycle complet.

La longueur d'onde est reliée à la fréquence par l'équation suivante :

$$\lambda = c / \nu$$

c : vitesse de propagation de la lumière dans le vide ( $2.998.10^8 \text{ m.s}^{-1}$ )

- Caractère particulaire

Les photons rendent compte du caractère particulaire de la lumière. Dans la théorie quantique, un photon transporte une quantité d'énergie finie. Cette quantité d'énergie est reliée à la fréquence  $\nu$  du photon par la relation de Planck :

$$E = h.\nu$$

E : énergie (Joule ou eV)

h : constante de Planck ( $h = 6.624.10^{-34} \text{ J.s}$ )

#### 2.1.2. Spectre électromagnétique

La spectrométrie correspond à l'étude des variations de grandeurs photométriques spectrales ou leurs équivalents énergétiques résultants de l'interaction du rayonnement avec une substance placée sur le faisceau.

Le spectre électromagnétique couvre un domaine extrêmement étendu de longueur d'onde et de fréquence, et donc d'énergie. Il est généralement divisé comme le montre la figure I-1 en diverses régions en fonction de la longueur d'onde des radiations : ainsi on trouve les rayons  $\gamma$  qui sont les plus énergétiques, les rayons X, l'ultra-violet, le visible, l'infrarouge, les micro-ondes et les ondes radio fréquences.

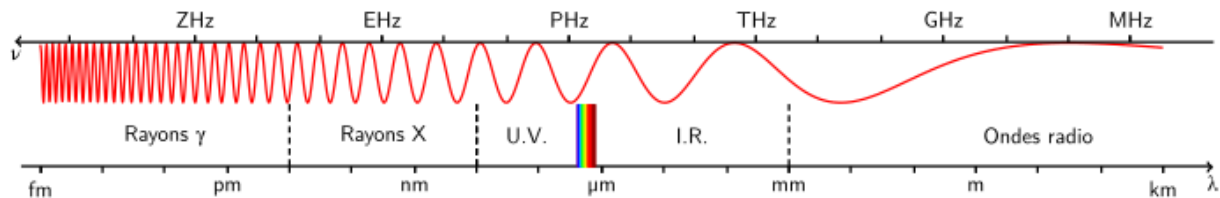


Figure I-1: Domaine spectraux du rayonnement électromagnétique

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire étudie les variations de transmission de radiations électromagnétiques résultant d'une absorption photonique par des molécules absorbantes.

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV/Visible, fait appel à des photons appartenant au domaine UV/Visible :

- pour l'UV :  $\nu = 10^{15} - 10^{17}$  ;  $\lambda = 200 - 400$  nm
- pour le visible:  $\nu = 10^{14} - 10^{15}$  ;  $\lambda = 400 - 800$  nm

### 2.1.3. L'absorption d'un rayonnement

Le terme photométrique signifie que l'on mesure une densité de photons. En spectrophotomètre UV/visible, on sélectionne des photons de fréquence  $\nu_0$  absorbables par la molécule à étudier.

L'absorption de ces photons d'énergie  $E = h \nu_0$  par la molécule n'est possible que si cette énergie correspond à une augmentation de l'énergie moléculaire  $\Delta E$  mise en jeu lors d'une transition permise (quantifiée) de la molécule absorbante. L'énergie mise en jeu par des photons du domaine UV/visible, engendre des transitions électroniques (électrons de liaison) dans la molécule absorbante (figure I-2), telles que  $\Delta E = h \nu_0$ .

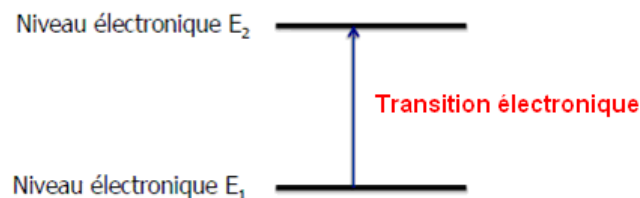


Figure I-2 : Schéma d'une transition électronique

Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité  $I_0$  traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une intensité  $I$  inférieure à  $I_0$ . Le phénomène

d'absorption ne peut être évalué que par le rapport entre l'intensité incidente du faisceau  $I_0$  et l'intensité  $I$  du faisceau transmis dans la même direction (figure I-3).

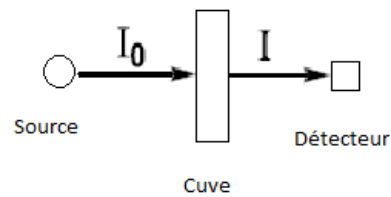


Figure I-3 : Faisceau incident  $I_0$  et faisceau transmis  $I$

La transmission (T) est une mesure quantitative de l'absorption d'une radiation UV/visible à une longueur d'onde donnée par un composé :

$$\% \text{Transmission (T)} = I/I_0 \times 100$$

L'absorbance est une mesure quantitative de l'absorption d'une radiation UV-visible à une longueur d'onde donnée par un composé :

$$\text{Absorbance (A)} = \log (I_0/I)$$

Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible concerne les molécules en solution, et peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. Dans les deux cas, elles font appel à la loi de Beer-Lambert qui établit la relation entre l'absorbance, la concentration et la longueur de la solution de la cuve (1):

Loi de Beer-Lambert:  $A = \epsilon.l.c$

c: concentration ( $\text{mol.litre}^{-1}$ )

l : longueur de solution traversée (cm)

$\epsilon$  : absorptivité molaire ( $\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}.\text{litre}$ )

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation, ...).

#### 2.1.4. Le spectre UV-visible

Le spectre UV-visible d'une molécule en solution se définit comme la variation de l'absorbance en fonction des différentes longueurs d'onde (figure I-4).

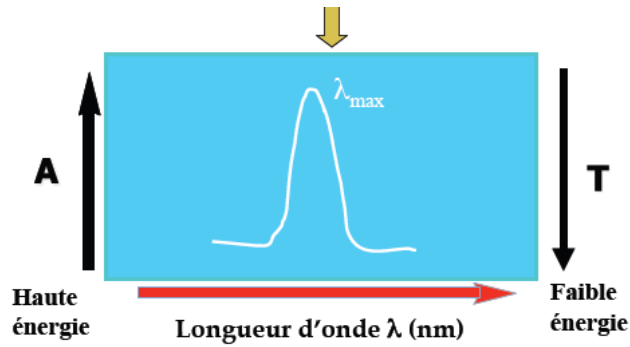


Figure I-4: Spectre UV-visible d'une molécule (4)

Un spectre est enregistré à partir d'une solution donnée, de concentration donnée, disposée en cuve d'une épaisseur donnée. En conséquence, selon la loi de Beer-Lambert, la variation de l'absorbance observable en fonction des longueurs d'onde, à une température fixe, est le reflet de la variation du coefficient d'extinction molaire en fonction des longueurs d'onde.

### 2.1.5. Les transitions électroniques

Le spectre UV-visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient. Les groupements chromophores sont des groupements insaturés covalents responsables de l'absorption.

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires anti-liantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Le figure I-5 ci dessous illustre les transitions électronique pour les orbitales de types  $\sigma$ ,  $\pi$  et  $n$ .

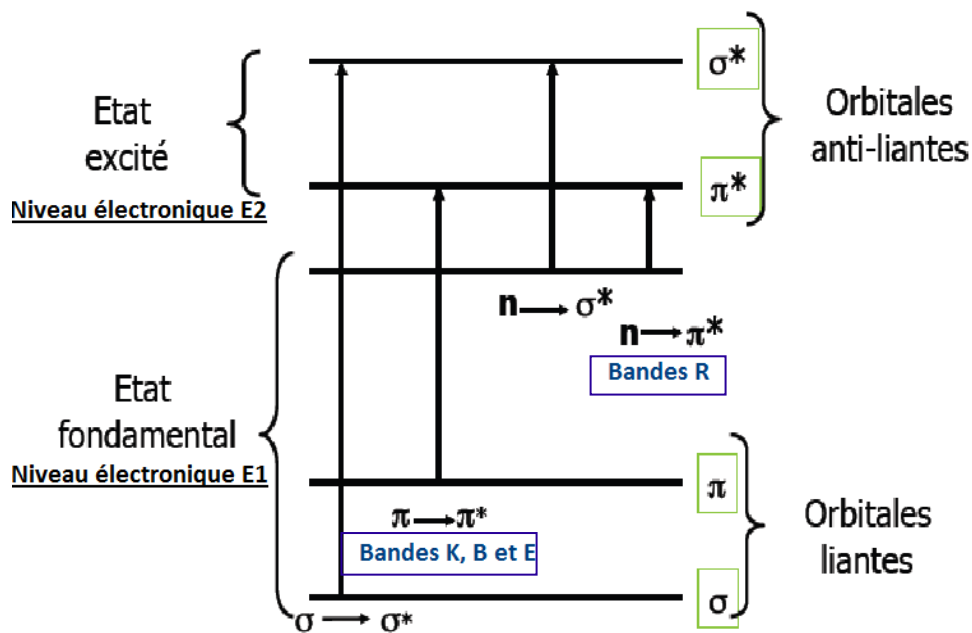


Figure I-5: Principales transitions électroniques

On distingue 4 types d'absorption dans le spectre UV des molécules organiques qui sont représentés dans la figure I-5.

- Bandes R :

Elles sont dues à une transition électronique  $n \rightarrow \pi^*$

Lorsqu'un hétéro-atome, porteur de doublet(s) non apparié(s) n, fait partie d'un système insaturé ou est conjugué avec un tel système, une transition de faible énergie peut se produire : passage d'un électron n non liant dans une orbitale anti-liante  $\pi^*$ .

- Bandes K (Konjugierte) :

Elles sont dues à une transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Elles apparaissent dans les spectres de molécules possédant un système de doubles liaisons conjuguées :  $C=C-C=C$

- Bandes B (Benzoïque) :

Également dues à une transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Elles apparaissent dans les spectres de molécules aromatiques ou hétéro-atomiques

- Bandes E (éthylénique) :

Également dues à une transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

Elles apparaissent dans les spectres de molécules aromatiques substituées par des groupements auxochromes. Les groupements auxochromes sont des groupements liés au cycle aromatique par un hétéro-atome porteur de doublets libres n.

## 2.2. Les appareils de mesure

### 2.2.1. Les appareils de spectrométrie optique<sup>9</sup>

Un spectromètre d'absorption comporte cinq éléments principaux (figure I-6):

- une source de rayonnement continu S ,
- un système de sélection en longueur d'onde ou fréquence M,
- un compartiment pour échantillon e,
- un récepteur R,
- un appareil de mesure AM éventuellement précédé d'un amplificateur A.

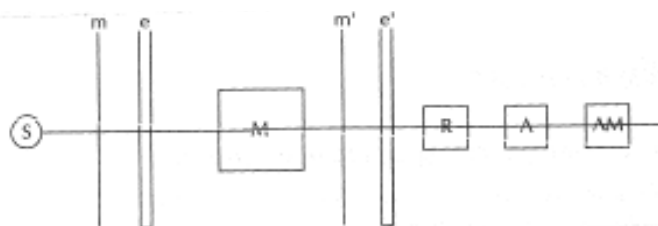


Figure I-6 : Schéma de principe d'un spectromètre d'absorption

- Les matériaux optiques

Dans un spectrophotomètre ou photomètre, les cellules, les fenêtres, les lentilles et les dispositifs de dispersion de la longueur d'onde doivent être transparents aux longueurs d'onde employées. On utilise habituellement de la silice fondue ou du quartz pour l'UV-visible.

- Les sources

Pour les mesures d'absorption, la source doit émettre un rayonnement dont la puissance dans la région 200 à 700nm est suffisante pour rendre aisées la détection et la mesure du signal.

Les sources spectroscopiques sont soit des sources continues (lampe à hydrogène et à deutérium), soit des sources à spectre de raies (laser). Les premières émettent des rayonnements de toutes les longueurs d'onde de la région spectrale où elles sont utilisées. Une source à spectre de raies n'est constituée que de quelques bandes très étroites de rayonnement dont les longueurs d'onde sont connues avec exactitude.

- Les sélecteurs de longueur d'onde

Les appareils de spectroscopie sont habituellement équipés d'un dispositif qui limite le rayonnement utilisé à la bande étroite qui est émise par l'analyte. Ces dispositifs améliorent considérablement la sélectivité et la sensibilité de l'appareil.

- Les détecteurs de rayonnement et les transducteurs

Un détecteur est un dispositif qui signale l'existence d'un phénomène physique. Un transducteur est un détecteur spécial qui transforme des signaux tels que l'intensité lumineuse, le pH, la masse ou la température en signaux électriques qui peuvent ensuite être amplifiés, traités et finalement convertis en des nombres qui sont liés à la valeur du signal de départ. Un transducteur répond aux photons. Son fonctionnement est basé sur l'interaction du rayonnement avec une surface photosensible qui peut émettre ou exciter des électrons.

Il existe quatre détecteurs de photons couramment utilisés en spectroscopie d'absorption moléculaire :

-Tubes photoélectriques

-Tube photomultiplicateurs

Détecteur à barrette diodes : Les photodiodes au silicium ont pris une grande importance au fur et à mesure de leur miniaturisation, on peut en fabriquer plus de

1000 côte à côte sur une petite languette de silicium. Ce détecteur permet de contrôler simultanément toutes les longueurs d'onde car il permet d'effectuer des mesures spectroscopiques à grande vitesse.

-Photodiode au silicium

-Dispositifs à transfert de charge

### 2.2.2. Les appareils de spectrophotométrie d'absorption moléculaire<sup>10</sup>

Les composantes optiques décrites ci-dessus peuvent être assemblées de diverses manières pour donner deux classes d'appareils utilisés pour les mesures d'absorption du rayonnement UV-visible : les photomètres et les spectrophotomètres. Les spectrophotomètres emploient un monochromateur à réseau ou à prisme pour restreindre le rayonnement à une bande étroite. Par contre, les photomètres utilisent à cet effet un filtre d'absorption ou un filtre interférentiel. Les spectrophotomètres présentent l'avantage de pouvoir modifier leur longueur d'onde de manière continue, ce qui fournit des spectres d'absorption complets.

Il existe trois types de spectrophotomètres UV-visible : les instruments à simple faisceau, à double faisceau dans l'espace et à double faisceau dans le temps. A titre d'illustration, nous montrons comment chacun d'eux est employé pour la mesure de transmittance et de l'absorbance.

- Spectromètres à simple faisceau

La figure I-7-a est un schéma d'un appareil à simple faisceau utilisé pour des mesures d'absorption. Il est constitué d'une des sources de rayonnement données , d'un filtre ou d'un monochromateur comme sélecteur d'onde, de cellule appariées qui peuvent être placées alternativement dans le trajet du faisceau de rayonnement, d'un détecteur et d'un amplificateur et d'un dispositif d'affichage.

- Spectromètres à double faisceau

De nombreux photomètre et spectrophotomètres modernes sont à double faisceau. La figure I-7-b représente un appareil à double faisceau dans l'espace, dans lequel deux faisceaux sont formés dans l'espace par un miroir en forme de V (diédrique) appelé un diviseur de faisceau. Un faisceau traverse la solution de référence jusqu'à un photodétecteur tandis que le second traverse l'échantillon jusqu'à un second photodétecteur apparié au premier. Les deux signaux de sortie sont amplifiés et leur rapport est déterminé électroniquement et affiché par le dispositif de lecture.

Le second type d'appareil à double faisceau est illustré par la figure I-7-c. Dans ce cas, les faisceaux sont séparés dans le temps par un miroir à secteurs tournant qui

dirige le faisceau entier alternativement à travers la cellule de référence et la cellule de l'échantillon. Les impulsions de rayonnement sont recombinaées par un autre miroir à secteurs qui transmet une impulsion et réfléchit l'autre vers le détecteur. Comme le montre en vue de face la figure I-7-c, le miroir à secteurs entraîné par un moteur est divisé en quartiers alternativement réfléchissants et transparents. Les parties réfléchissantes sont maintenues à l'aide de cadres métalliques noircies qui interrompent périodiquement le faisceau et l'empêchent d'atteindre le détecteur. Le circuit du détecteur est programmé pour utiliser les intervalles de non exposition à des réglages de courant d'obscurité.

Les appareils à double faisceau offrent l'avantage de compenser la plupart des fluctuations à court terme du signal rayonnant de la source ainsi que la dérive du détecteur et de l'amplificateur. Ils compensent également les importantes variations d'intensité de la source en fonction de la longueur d'onde. En outre, le modèle à double faisceau se prête bien à l'enregistrement en continu des spectres de transmittance ou d'absorbance. Comme on peut s'y attendre, la plupart des appareils enregistreurs actuels pour l'ultraviolet et le visible sont basés sur ce principe.

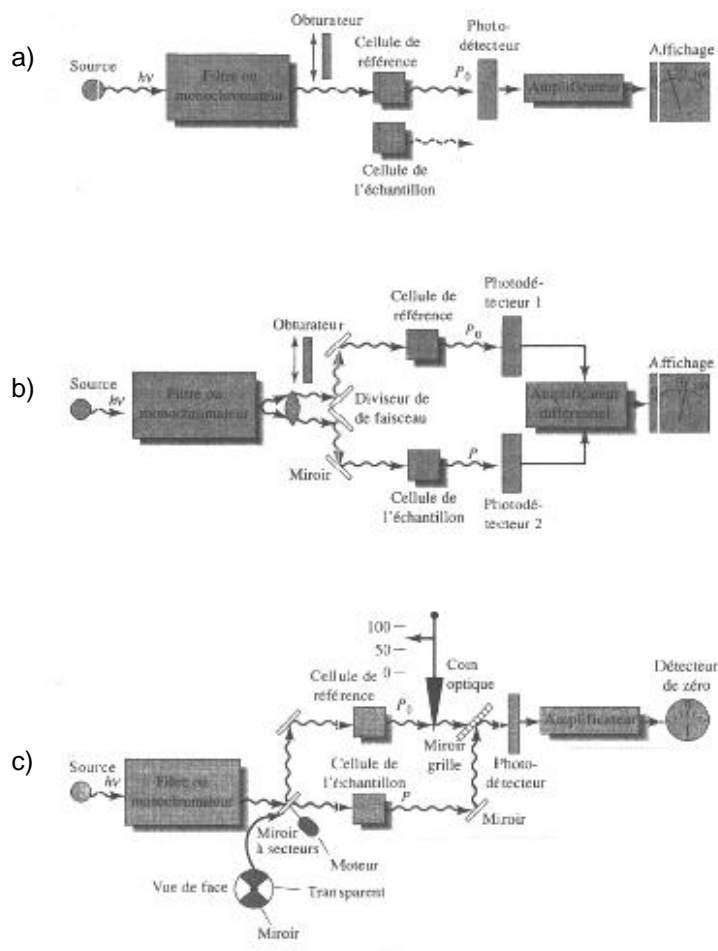


Figure I-7 : Modèle de spectrophotomètres : (a) appareil à simple faisceau ; (b) appareil à double faisceau avec faisceaux séparés dans l'espace ; (c) appareil à double faisceau avec faisceaux séparés dans le temps.



### 3. CHIMIOMETRIE EN SPECTROMETRIE UV-VISIBLE : L'ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES

Après avoir expliqué les principes fondamentaux de la spectroscopie UV-visible, cette partie va s'intéresser à l'information que contiennent les spectres sur les substances étudiées.

La chimiométrie est un outil utilisé afin d'extraire de l'information pertinente et utile à partir de données physico-chimiques mesurées ou connues brutes. Elle est basée sur la construction, puis l'exploration d'un modèle de comportement à l'aide d'outils statistiques.

La statistique descriptive multidimensionnelle est une des méthodes chimiométriques fondée sur un modèle linéaire. Elle permet de traiter simultanément un grand nombre de variables de façon purement descriptive, c'est-à-dire qu'elles ne supposent, à priori, aucun modèle sous-jacent, de type probabiliste<sup>11</sup>.

Les méthodes les plus classiques de la statistique descriptive multidimensionnelle sont des méthodes factorielles. Elles consistent à rechercher des facteurs en nombre restreint et résumant le mieux possible les données considérées.

L'une des méthodes fondamentales en statistique descriptive multidimensionnelle est l'ACP. C'est la méthode qui a été utilisée dans mon étude. Elle consiste à comprimer des données en prenant en compte un grand nombre de variables et un nombre limité d'individus. L'ACP extrait l'information pertinente qui est noyée dans une masse d'informations partiellement redondantes et polluées par toutes sortes d'erreurs<sup>12</sup>.

#### 3.1. Principes de l'ACP<sup>13</sup>

L'objectif de l'ACP est la simplification des données. Il faut choisir la dimension de l'espace de représentation en effectuant un compromis entre deux objectifs contradictoires: prendre un espace de faibles dimensions et conserver une variance expliquée maximale.

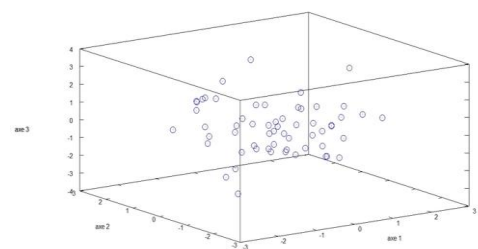


Figure I-8 : Représentation d'un nuage de points de n individus à p dimensions

Pour se faire, il faut projeter un nuage de points de n individus à p dimensions (figure I-8) dans une nouvelle représentation de faible dimension.

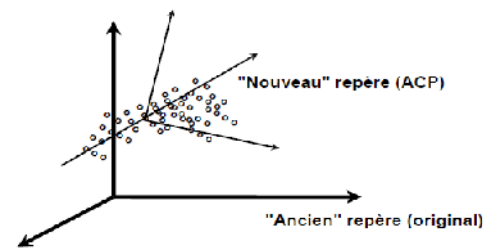
Les différentes étapes de l'ACP :

– Etape 1 :

Le centre de gravité du nuage de points est calculé. Il s'agit du point ayant pour coordonnées les moyennes des coordonnées des individus. Les données sont centrées, ce qui correspond à une transition du repère. Ainsi, l'origine du nouveau repère est le centre de gravité du nuage initial.

– Etape 2 :

Le premier axe principal est la droite passant par l'origine qui approxime le mieux les données, c'est-à-dire, qui exprime le mieux la variance résiduelle. Les composantes suivantes sont déterminées de la même façon (figure I-9).



– Etape 3 :

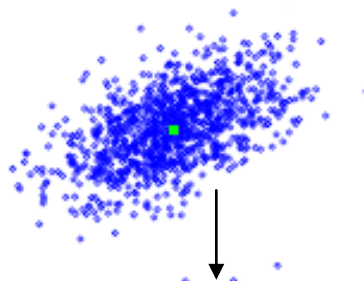
Ensuite, les coordonnées des variables et des individus dans le nouvel espace sont calculées (figure I-9).

Figure I-9: Reconstruction des données

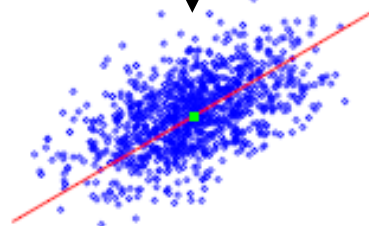
Exemple: Des différentes étapes de l'ACP pour un nuage de points en 2 dimensions

Étape 1 :

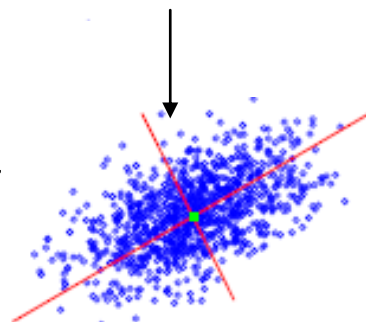
Centrage du nuage



Étape 2.a : Le premier vecteur propre donne l'axe principal



Étape 2.b : Le second vecteur propre est orthogonal



## 3.2. Approche mathématique

### 3.2.1. Les données à analyser<sup>12</sup>

Les données se présentent sous la forme d'une matrice  $X(n,p)$ ; chaque ligne représente un individu et chaque colonne représente une variable.

On considère  $p$  variables notées  $x^1, \dots, x^j, \dots, x^p$ , observées sur  $n$  individus, notés  $1, \dots, i, \dots, n$ . L'observation de la variables  $x^j$  sur l'individu  $i$ , sera notée  $x(i,j)$ .

Soit la matrice  $X(n,p)$ :

	$x^1$	...	$x^j$	...	$x^p$
<b>1</b>	$x(1,1)$	...	$x(1,j)$	...	$x(1,p)$
$\vdots$			$\vdots$		$\vdots$
<b>i</b>	$x(i,1)$	...	$x(i,j)$	...	$x(i,p)$
$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$		$\vdots$
<b>n</b>	$x(1,n)$	...	$x(n,j)$	...	$x(n,p)$

### 3.2.2. Méthode<sup>12</sup>

#### 3.2.2.1. Centrage et normalisation de la matrice initiale

- Centrage

On retranche à chaque individu la moyenne de sa variable correspondante.

$$x_c = x(n,p) - x(1,p)$$

Le centrage des variables ne modifie en rien les résultats de l'ACP. Il permet de faire coïncider le centre de gravité des nuages de points avec l'origine.

- Normalisation (Autoscaling)

On divise chaque donnée centrée par l'écart type de la variable correspondante.

$$x_r = (x(n,p) - x(1,p)) / \sigma_{(1,p)}$$

La normalisation des variables est effectuée après le centrage de ces mêmes variables. Ce processus est facultatif, il est effectué lorsque les données sont hétérogènes (unités différentes), leurs réductions permettent de donner le même poids à toutes les variables dans le calcul des composantes principales.

### 3.2.2.2. Recherche des composantes principales

La recherche d'axes portant le maximum d'inertie équivaut à la construction de nouvelles variables (auxquelles sont associés ces axes) de variance maximale.

- Construction de la matrice M de corrélation

La matrice M de corrélation correspond à la multiplication de la matrice  $X_r$  de départ avec la transposée de la matrice  $X_r$ ,  $X_r^T$ .

$$M = X_r^T \cdot X_r$$

On obtient une matrice carrée, symétrique, et réelle qui est donc diagonalisable dans une base orthonormée.

Remarque : si la matrice est seulement centrée, le processus est le même. La matrice M ne s'appelle pas une matrice de corrélation mais une matrice de variance covariance.

- Diagonalisation de la matrice M de corrélation

$$D = P^T \cdot M \cdot P$$

Cette diagonalisation permet de fournir :

#### 1 - Une matrice V des vecteurs propres

Nous avons un système linéaire  $X_r$  qui ne s'exprime pas facilement (matrice non diagonale) dans un repère donné. Nous trouvons un autre système de vecteurs propres (« eigenvectors ») par rapport à l'ancien repère.

Nous constituons la matrice V qui est la matrice des coordonnées des vecteurs propres dans l'ancien repère.

Soit la matrice V :

	$X_r^1$	...	$X_r^j$	...	$X_r^p$
<b>1</b>	$V_{(1,1)}$	...	$V_{(1,j)}$	...	$V_{(1,p)}$
$\vdots$			$\vdots$		
<b>i</b>	$V_{(i,1)}$	...	$V_{(i,j)}$	...	$V_{(i,p)}$
$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$		
<b>n</b>	$V_{(1,n)}$	...	$V_{(j,n)}$	...	$V_{(n,p)}$

## 2 - Une matrice diagonale D des valeurs propres

La matrice D donne un système linéaire diagonal dans le nouveau système des vecteurs propres plus simple à utiliser. Les éléments diagonaux de la matrice D sont les valeurs propres (eigenvalues). Elles expriment les coefficients multiplicatifs sur chaque nouvelle coordonnée de la matrice D dans la nouvelle base des vecteurs propres.

Soit la matrice D :

	$v^1$	$v^2$	...	$v^p$
1	$\lambda_{(1,1)}$	0	...	0
2	0	$\lambda_{(2,2)}$	...	0
⋮	0	0	...	0
n	0	0	...	$\lambda_{(n,p)}$

### Commentaires :

Les différents calculs permettant d'obtenir les résultats d'une ACP sont effectués par des logiciels spécialisés, utilisant un algorithme approprié.

### 3.2.3. Propriétés des composantes principales<sup>12</sup>

Il faut rechercher le sous espace C séquentiellement axe par axe.

- Axes principaux

On appelle axes principaux d'inertie les axes de direction des vecteurs propres de la matrice V normés à 1. Il y en a p.

Le premier axe recherché est associé à la plus grande valeur propre ( $\lambda_1$ ).

Le deuxième axe recherché est associé à la deuxième valeur propre ( $\lambda_2$ ) et est orthogonal au premier axe. Et ainsi de suite...

Les axes sont associés orthogonalement afin qu'ils soient non corrélés deux à deux.

- Composantes principales

A chaque axe est associée une variable appelée composante principale.

La variance des individus d'une composante principale est égale à l'inertie portée par l'axe principal qui lui est associé. Cette inertie est représentée par les valeurs propres.

La composante  $c^1$  est le vecteur renfermant les coordonnées des projections des individus sur l'axe 1. La composante  $c^2$  est le vecteur renfermant les coordonnées des projections des individus sur l'axe 2. Et ainsi de suite...

### 3.2.4. Sélection du nombre k d'axes factoriels à retenir

La sélection du nombre d'axes à retenir, abordée précédemment, est une étape importante lors d'une ACP. Les critères utilisés sont en général empiriques.

Le nombre maximum de composantes principales qu'il est possible d'extraire d'une matrice de corrélation est égal au nombre de variables dans la matrice. Le pourcentage de variance expliqué par chaque composante décroît systématiquement à mesure que l'on progresse dans le processus d'extraction et peut devenir tout à fait négligeable une fois que les composantes les plus importantes ont été extraites. Ceci nous amène à considérer différents critères qui nous aideront ce qu'il est réellement nécessaire d'extraire.

#### 3.2.4.1. Utilisation du critère de Kaiser<sup>13</sup>

Pour comprendre ce critère, il faut aborder brièvement la notion de variance présente dans les données. Dans le cas d'une matrice de corrélation comme celle que nous étudions, les valeurs apparaissent dans la diagonale correspondant à la variance de chaque variable. Le calcul d'un coefficient de corrélation entraîne toujours une standardisation des variables. Le calcul entraîne une standardisation sur de nouvelles échelles possédant chacune une moyenne de 0.0 et un écart type de 1.0. La variance totale quant à elle correspond à la somme des variances de chaque variance.

#### Exemple :

Le tableau x présente ces valeurs propres pour des données fictives simulant les motivations à acheter une marque de bière.

La variance totale présente dans les données est donc de 7.0 puisqu'il y a sept variables dans la matrice de corrélation.

Tableau I-1 : Répartition des valeurs propres et des pourcentages de variance associées à chacune des composantes principales

Composante	Valeur propre	% de variance	% de variance cumulé
$c^1$	3.3	47	47
$c^2$	2.6	37	85
$c^3$	0.6	8	93
⋮	⋮	⋮	⋮
$c^7$	0.04	0.5	100
Total	7	100	

On constate que la valeur propre de la première composante est de 3.3 ce qui correspond à 47% de la variance totale de 7.0. L'algorithme utilisé en ACP fait en sorte de maximiser la variance expliquée par la première composante. Toujours selon ce même algorithme, la deuxième composante extraite vient expliquer une portion additionnelle de variance, indépendamment de la première, et correspondant à une portion plus faible que la précédente. L'examen du tableau permet de constater que la composante  $c^2$  explique 2.6 unités de variance (sur 7.0), ce qui correspond à 37% de la variance totale. Après avoir extrait deux composantes principales, nous serions en mesure de rendre compte de 85% de la variance initiale des motivations animant le consommateur de bière.

On peut se demander s'il est utile de continuer à extraire d'autres composantes au delà de la deuxième composante. Le critère de Kaiser nous dit justement qu'il n'est pas nécessaire de poursuivre l'extraction puisque la composante  $c^3$  n'expliquerait que 0.6 unité de variance ce qui correspond à moins de variance que celle associée à une variable initiale de la matrice de corrélation. Chaque variable possède 1.0 unité de variance. Selon Kaiser, l'extraction des composantes doit donc s'arrêter dès qu'une valeur propre devient inférieure à 1.0.

#### 3.2.4.2. Utilisation du test d'accumulation de variance : « scree test » de Catell

En 1966, Catell a proposé une méthode graphique pour décider du nombre de composantes à extraire. Le test d'accumulation de variance communément appelé « scree test » demande que l'on trace un graphique illustrant la taille des valeurs propres des différentes composantes en fonction de leur ordre d'extraction.

Le critère de Catell nous amène à arrêter l'extraction des composantes à l'endroit où se manifeste le changement de pente dans le graphique.

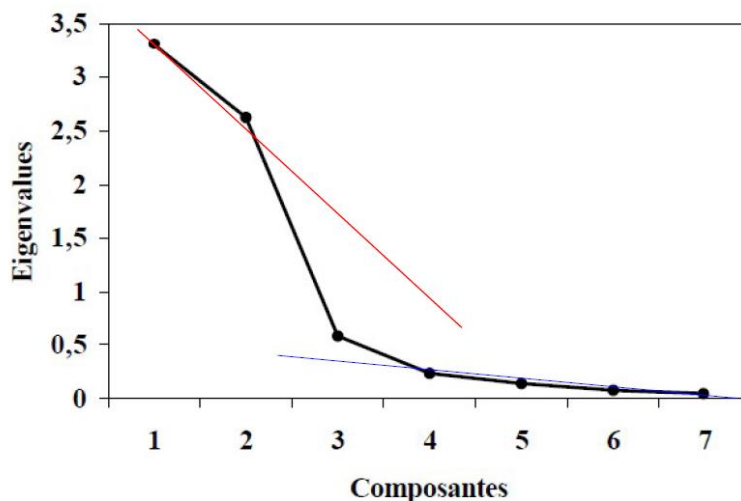


Figure I-10 : Illustration de l'accumulation de variance « scree test » de Cattell

La figure I-10 correspond au test d'accumulation de variance pour nos données fictives. On y constate que la pente change radicalement (droite rouge ci-dessus) avec la composante  $c^3$ . La représentation graphique des variances nous aide à voir que le point  $c^3$  appartient beaucoup plus au segment  $c^3$  à  $c^7$  (droite bleu ci-dessus) qu'au segment  $c^1$  à  $c^3$ .

Selon le critère de Cattell, on devrait donc se limiter à l'extraction des deux premières composantes. Le résultat est identique avec le critère de Kaiser.

### 3.2.5. Interprétation de l'ACP<sup>12</sup>

#### 3.2.5.1. La projection des variables

Les coordonnées des vecteurs dans l'espace des composantes sont appelées les « loading ». La matrice  $V$  qui est la matrice  $C$  représente la matrice des coordonnées des vecteurs propres dans le repère des composantes principales.

Soit la matrice  $C$  :

	$v^1$	$v^2$	...	$v^k$
1	$V_{(1,1)}$	$v_{(1,2)}$		$V_{(1,k)}$
			⋮	
i	$V_{(i,1)}$	$V_{(i,2)}$		$V_{(i,k)}$
			⋮	
n	$V_{(n,1)}$	$V_{(n,2)}$		$V_{(n,k)}$



Pour interpréter le graphique des projections des variables, on sélectionne les variables parfaitement ou bien représentées et on analyse les proximités des variables sélectionnées en termes de corrélation.

- Les variables parfaitement représentées ou bien représentées

En retenant le contenu de la matrice C, les coordonnées de ces projections sont toutes en valeurs absolues inférieures ou égales à 1, c'est-à-dire insérées dans un cercle de rayon unité appelé cercle de corrélations. Considérons, par exemple, le cercle de corrélation dans le plan constitué par deux axes principaux et un variable  $v^1$  sur ce cercle. Elle a pour coordonnées  $v_{(1,1)}$  et  $v_{(2,1)}$ .

Une variable qui se trouve en projection sur le cercle de corrélation est une variable parfaitement déterminée par le plan. Une variable proche du cercle de corrélation est une variable dite « bien représentée » dans le plan. Une variable proche de l'origine du cercle (zone grisée de la figure I-11) est une variable mal représentée.

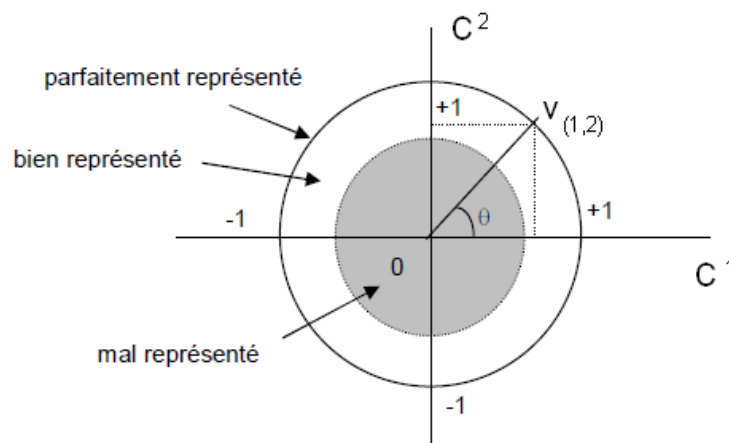


Figure I-11 : Cercle de corrélation

On peut donc conclure que  $v^1$  est parfaitement représenté sur le plan  $(c^1, c^2)$ .

- Les proximité des variables sélectionnées en termes de corrélation

Considérons à présent le plan  $(c^1, c^2)$  avec les quatre variables  $v^1, v^2, v^3, v^4$  situées sur le cercle de corrélation de la façon suivante (figure I-12) :

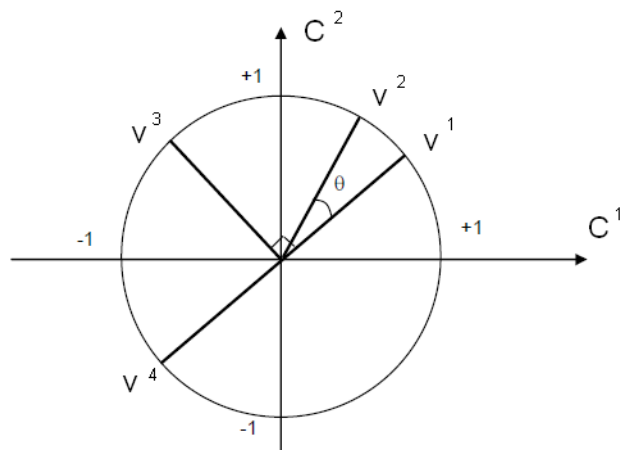


Figure I-12 : Cercle de corrélation

On sait que dans un plan, deux vecteurs forment un angle  $\theta$  dont le cosinus vaut  $r$ .

Pour des variables parfaitement représentées ou bien représentées :

- si l'angle tend vers  $0$  :  $r_{(v1,v2)}$  tend vers  $1$ , les deux variables sont proches,
- si l'angle tend vers  $90^\circ$  ( $= \pi/2$ ),  $r_{(v1,v3)}$  tend vers  $0$ , les deux variables sont complémentaires,
- si l'angle vers  $180$  ( $= \pi$ ),  $r_{(v1,v4)}$  tend vers  $-1$ , les deux variables sont opposées.

### 3.2.5.2. Le graphique des individus

On porte sur les plans factoriels les points dont les coordonnées des individus (scores) sont données par la matrice C (figure I-13).

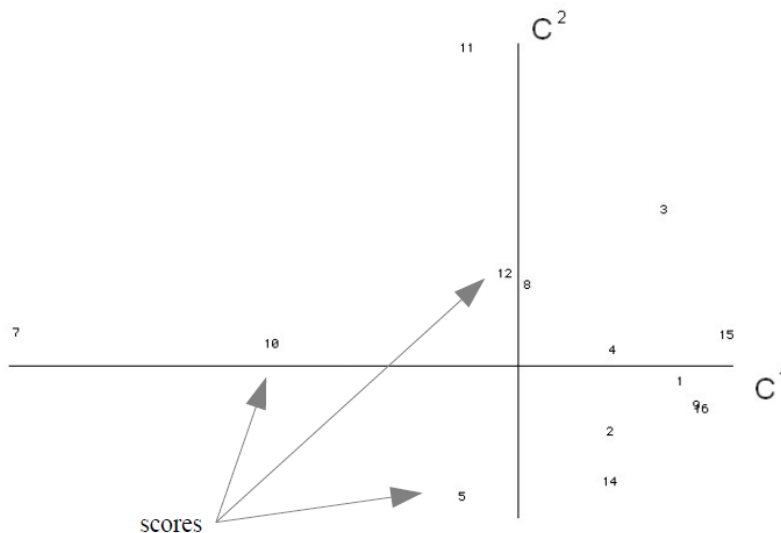


Figure I-13 : Plan factoriel représentant des individus

### 3.2.5.3. Qualité de représentation sur les axes factoriels

Un des points les plus délicats en ACP est d'apprécier la perte d'information engendrée par la réduction de la dimension. La qualité de représentation du nuage dans le sous espace factoriel est exprimée par le pourcentage d'inertie expliqué :

$$\% \text{ d'inertie expliqué} = \frac{\sum_{j=1}^k \lambda_j}{\sum_{j=1}^p \lambda_j}$$

Cette mesure globale doit être complétée par d'autres considérations comme la représentation des individus et des variables dans ce sous espace factoriel. Il peut en effet arriver que les axes retenus, bien que représentant une part importante de l'inertie globale du nuage, ne suffisent pas à expliquer correctement certains individus ou variables : deux individus peuvent être proches en projection sur les axes factoriels retenus tout en étant très éloignés en réalité, si leurs représentations sur ces axes ne sont pas de bonne qualité.

La qualité de représentation d'un individu sur un axe factoriel est mesurée par le cosinus carré de l'angle entre l'axe factoriel et le vecteur. Plus le cosinus est proche de 1, plus le vecteur sera proche de l'axe factoriel et donc sera bien représenté sur cet axe.

Prenons un individu  $i$  représenté dans un plan factoriel par le vecteur  $v^i$  sur la composante principale  $c^1$  (figure I-14).

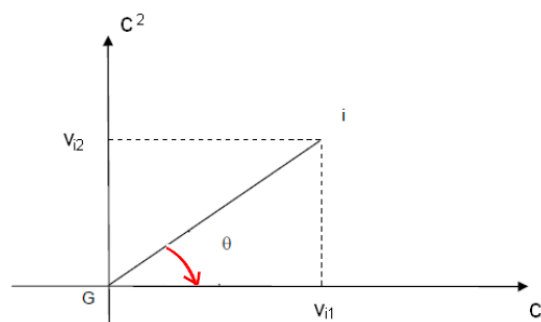


Figure I-14 : Plan factoriel ( $c^1, c^2$ ) représentant un individu  $i$

La qualité de représentation de l'individu  $i$  sur l'axe factoriel  $c^1$  est mesurée par le cosinus carré de l'angle ( $\cos^2 \theta$ ) entre l'axe factoriel  $c^1$  et le vecteur  $v^i$ .

La qualité de représentation d'une variable  $j$  sur le  $k$ -ème vecteur est exprimée par le coefficient de corrélation linéaire  $r(c^k, v^j)$  entre la variable initiale  $v^j$  et la nouvelle variable, composante principale,  $c^k$ . La valeur de cette corrélation sera également très importante pour interpréter les nouveaux axes factoriels en fonction des variables initiales. Le calcul de cette corrélation, non développé dans ce document, montre que :

$$r(c^k, v^j) = \sqrt{\lambda_k} v_{jk}^j \quad \text{où } v_{jk}^j \text{ est la } j\text{-ème coordonnée du vecteur } v_k$$

Ainsi, bien qu'ayant retenu un sous espace factoriel expliquant une part importante de l'inertie totale, il est possible que certaines variables ou individus d'intérêt soient mal représentés dans ce sous espace. Il sera alors intéressant de compléter le sous-espace factoriel en ajoutant des axes factoriels supplémentaires de sorte que ces variables ou individus d'intérêt soient représentés.

#### 3.2.5.4. Interprétation

La méthode la plus naturelle pour interpréter les composantes principales (ou axes factoriels) est de les relier aux variables initiales, en utilisant les corrélations précédemment introduites. Généralement, pour un couple de composantes principales  $c^1$  et  $c^2$ , on représente les corrélations, où chaque variable  $v^j$  est représentée par un point de coordonnées  $(r(c^1, x^j), r(c^2, x^j))$ .

Une fois les composantes interprétées, on représente les individus dans le plan factoriel formé en croisant deux à deux les axes factoriels retenus. Chaque représentation est interprétée en essayant de repérer des groupes d'individus et en donnant à ces groupes une signification en fonction de leur place dans les plans factoriels.

### 3.2.6. Tableau récapitulatif

Le tableau I-2 suivant présente les diverses abréviations et formules des items utilisés dans la partie ci-dessus concernant l'ACP.

Tableaux I.2 : Récapitulatif des abréviations et des formules des items utilisés dans la partie 3 du premier chapitre

Item	Symboles	Formules
Individus	n	
Variables	p	
Matrice	X	
Matrice centrée	$X_c$	$x_r = X_{(n,p)} - X_{(1,p)}$
Matrice centrée et réduite	$X_r$	$x_r = (X_{(n,p)} - X_{(1,p)}) / \sigma_{(1,p)}$
Matrice de corrélation	M	$M = X_r^T * X_r$
Matrice diagonale des valeurs propres	D	$D = P^T * M * P$
Valeurs propres (eigenvalues)	$\lambda$	
Matrice des vecteurs propres	V	
Vecteurs propres (eigenvectors)	v	
Matrice des composantes principales	C	
Composantes principales	c	
Individus dans l'espace des CP (loadings)	j	
Vecteurs dans l'espace des CP (scores)	k	
Coefficients linéaires	r	$r(c^k, v^j) = \sqrt{\lambda_k} v_k^j$

## 4. ÉQUILIBRES ACIDE-BASE EN SOLUTION AQUEUSE : pH, pK<sub>a</sub> et solutions tampon

Cette partie sera consacrée aux équilibres acide-base. Nous nous attacherons surtout à donner les définitions du pK<sub>a</sub> et du pH, leurs significations physiques et le domaine d'utilisation de ces concepts. La définition opérationnelle du pH nécessitant l'utilisation de solutions tampon, nous serons amenés à rappeler quelques-unes de leurs propriétés.

### 4.1. pH des solutions aqueuses<sup>14</sup>

#### 4.1.1. pH des solutions aqueuses

Le pH est défini comme la valeur négative du logarithme décimal de l'activité du proton solvaté (a<sub>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></sub>).

En pratique, sauf indication contraire, on assimile activité et concentration molaire. L'erreur introduite augmente avec la concentration ionique.

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}_3\text{O}^+} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$$

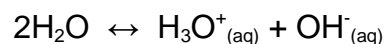
#### 4.1.2. Domaine de validité de l'échelle opérationnelle du pH

Pour que le pH des solutions étudiées garde sa signification physique, à savoir soit en accord avec la définition formelle, il faut que :

- les forces ioniques des solutions soient inférieures à 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> pour que la comparaison de leurs pH à celui des solutions standard ait un sens ;
- les pH soient compris entre 2 et 12.

### 4.2. Produit ionique de l'eau (K<sub>e</sub>)<sup>14</sup>

L'eau, même pure, possède une conductivité résiduelle attribuée à une très faible auto-ionisation selon la réaction :



La constante thermodynamique K<sub>e</sub> de cet équilibre s'appelle le produit ionique de l'eau. Elle est définie par l'expression :

$$K_e = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{OH}^-}}{(a_{\text{H}_2\text{O}})^2}$$

La valeur de la conductivité résiduelle de l'eau pure conduit pour les deux ions aux concentrations :

$$[\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}] = [\text{OH}^-_{(\text{aq})}] = 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1} \text{ à } 25^\circ\text{C}$$

Cette valeur est très faible, il est donc légitime de poser :

$$a_{\text{H}_2\text{O}} = 1$$

et

$$a_{\text{OH}^-} = [\text{OH}^-_{(\text{aq})}]$$

$$a_{\text{H}_3\text{O}^+} = [\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}]$$

En conséquence, le produit ionique de l'eau s'écrit :

$$K_e = [\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}] \cdot [\text{OH}^-_{(\text{aq})}] \quad (\text{II.1})$$

$$K_e = 10^{-14} \quad \text{à } 25^\circ\text{C}$$

Lorsqu'il existe d'autres espèces en solution, l'eau reste bien entendu soumise au phénomène de dissociation chiffré par la constante d'équilibre  $K_e$ . En conséquence, la relation (II.1) est vérifiée quelles que soient les espèces en solution, pourvu que la solution reste diluée. On dit, dans le langage courant, que le produit ionique de l'eau est vérifié.

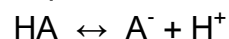
Le produit ionique de l'eau ne dépend que de la température. La dissociation de l'eau augmente avec la température.

## 4.3. Définitions des acides et des bases<sup>14</sup>

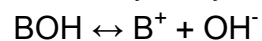
### 4.3.1. Théorie d'Arrhenius

Elle est fondée sur l'ionisation de l'eau :

- un acide HA est une substance qui s'ionise plus ou moins dans l'eau en libérant des protons  $\text{H}^+$  :



- une base BOH est une substance qui s'ionise plus ou moins dans l'eau en libérant des ions hydroxyde  $\text{OH}^-$  :



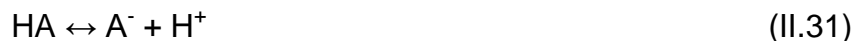
La force des acides et des bases est liée à l'importance de l'ionisation.

L'insuffisance de la loi d'Arrhenius réside dans le fait qu'elle n'est applicable qu'à l'eau. Elle est d'ailleurs quelquefois appelée théorie aqueuse des acides et des bases. Elle ne rend pas compte de la manifestation du caractère acide ou basique dans d'autres solvants.

## 4.3.2. Théorie de Bronsted-Lowry

### 4.3.2.1. Acides et bases conjugués

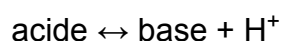
Un acide HA est une substance capable de céder des ions  $H^+$ . C'est un donneur de proton selon l'équilibre :



Une base B est une substance capable de capter un proton. C'est accepteur de de protons selon l'équilibre :



Dans l'équilibre (II.31) HA est un acide mais  $A^-$  est une base. Il suffit pour s'en rendre compte de lire la réaction de droite vers la gauche. De même dans l'équation (II.32), B est la base et  $BH^+$  l'acide. L'acide et la base sont liés par l'équation :



sont appelés acide et base conjugués.

#### Notons :

° qu'en s'ionisant un acide perd un charge positive,

° que la charge d'une espèce n'est pas liée à son caractère acide ou basique. Ainsi, par exemple, l'ion ammonium  $NH_4^+$ , l'acide acétique  $CH_3COOH$ , l'ion hydrogénosulfure  $SH^-$  sont des acides,

° que certaines espèces sont à la fois accepteur et donneur de protons. Ce sont des composés ampholytes ou amphotères. C'est le cas de l'eau qui se comporte comme un acide :



et aussi comme une base :



L'ion  $H_3O^+$  est le cation oxonium. Cet exemple est intéressant car l'on constate qu'avec la théorie d'Arrhenius l'équilibre (5) suffit pour expliquer le caractère amphotère de l'eau, alors que la théorie de Bronsted nécessite les deux équations (5) et (6),

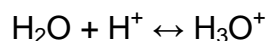
° qu'en toute rigueur des hydroxydes métalliques comme l'hydroxyde de sodium ne sont pas des bases de Bronsted car l'acide conjugué n'existe pas. Par contre ce sont des bases d'Arrhénius.

La définition de Bronsted-Lowry est très générale car il n'est pas fait mention du solvant.



#### 4.3.2.2. Inexistence du proton en solution

Etant donné que le proton est une particule élémentaire de charge positive de très faible rayon, il règne à sa surface un champ électrique intense qui lui confère la possibilité de se fixer sur toute espèce possédant une charge négative. Ainsi dans l'eau, il y a fixation du proton sur la molécule d'eau pour donner le cation oxonium :



On considère à l'heure actuelle que l'ion oxonium est associé vraisemblablement à trois molécules d'eau (figure I-15).

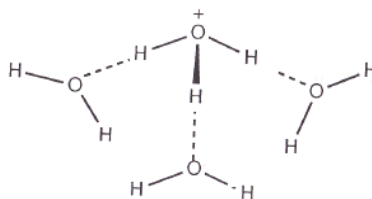


Figure I-15 : Structure du cation oxonium dans l'eau

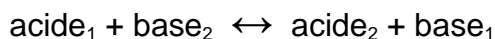
En bref, on peut considérer que le proton dans l'eau existe sous forme de tétrahydrate dont une molécule d'eau est fortement liée.

Dans ce qui suit, nous adapterons la terminologie de Bates en désignant par ion hydrogène le proton solvaté qui sera solubilisé indifféremment  $\text{H}^+_{(\text{aq})}$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ .

#### 4.3.2.3. Échange de protons en solution

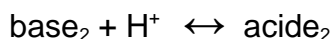
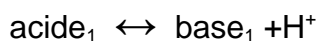
Puisque le proton n'existe pas à l'état libre en solution, il résulte que les équations précédentes (II.31) (II.32) (II.33) et (II.34) sont purement conceptuelles. Par exemple, les acides ne se dissocient pas spontanément selon l'équation (II.31). Il faut, pour que l'acide manifeste ses propriétés, qu'il y ait un accepteur de protons et inversement. Cette conception fait partie intégrante de la théorie de Bronsted-Lowry.

Ainsi, toute réaction doit s'écrire :

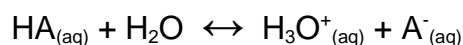


C'est le seul phénomène que l'on puisse observer. Les réactions de ce type sont appelées réaction de protolyse.

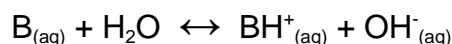
L'équilibre précédent peut être conçu comme résultant de la superposition des deux demi-réactions théoriques :



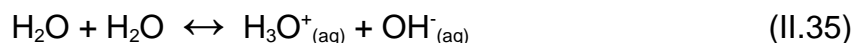
Le solvant peut participer effectivement à l'échange de protons. D'ailleurs, lorsque dans le langage courant, on dit qu'un composé HA est un acide sans mention supplémentaire, on sous entend que dans l'eau se déroule la réaction :



C'est le solvant, la base  $\text{H}_2\text{O}$ , qui révèle ici le caractère acide du composé HA. Il en est de même pour une espèce basique B qui est révélée par le solvant eau qui est un acide selon :



Dans l'équilibre (II.35), une molécule d'eau est une base :



et révèle le caractère acide d'une autre molécule d'eau. Les équations (II.33) et (II.34) sont les deux demi réactions théoriques correspondantes.

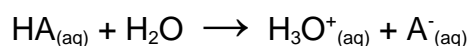
Nous constatons à propos de ces exemples impliquant le solvant eau que celle-ci a une action purement chimique en captant ou en cédant un proton. On dit qu'elle possède un pouvoir prototropique. On peut donc considérer que l'eau joue un triple rôle : un rôle ionisant (pouvoir prototropique), dissociant (force constante diélectrique) et solvatant des différentes espèces. Ce triple rôle n'est pas partagé par tous les solvants. Par exemple, l'acide acétique n'est pratiquement pas dissociant étant donné sa faible constante diélectrique.

## 4.4. Force des acides et des bases<sup>15</sup>

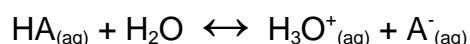
### 4.4.1. Caractère relatif de la force des acides et des bases

Soit l'acide HA dans l'eau qui joue le rôle de base. La force de l'acide est liée à l'importance du transfert de protons :

- l'acide est fort si le transfert est total :



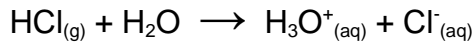
- l'acide est faible si le transfert est partiel :



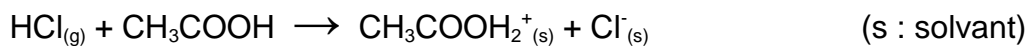
La force d'un acide dépend donc de son aptitude intrinsèque, plus ou moins grande, à donner des protons. Mais ce n'est pas le seul facteur qui joue. En effet, en solution les protons n'existent pas à l'état libre. Ils ne peuvent être que transférés. Il faut donc prendre aussi en compte l'aptitude du solvant à accepter les protons. Ainsi, un acide

peut être fort dans l'eau et faible dans un autre solvant. Un exemple est le gaz chlorhydrique qui est :

- un acide fort dans l'eau, selon la réaction totale :



- un acide faible dans l'acide acétique qui joue le rôle ici de solvant à caractère basique selon l'équilibre :

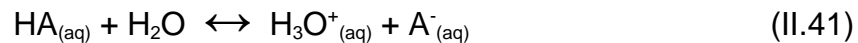


Cet exemple montre sans ambiguïté l'influence du solvant puisque dans les deux cas c'est le même acide qui est en jeu.

### 3.4.1.1. Chiffage de la force des acides : $K_a$ et $pK_a$

L'échange de protons entre deux couples conjugués en solution permet de chiffrer la force relative d'un couple par rapport à un autre. En solution aqueuse, le couple de référence est le couple  $\text{H}_3\text{O}^+ / \text{H}_2\text{O}$ .

La constante thermodynamique de l'équilibre :



est appelée constante de dissociation ou d'acidité de l'acide  $K_a$  :

$$K_a = \frac{a_{\text{A}^-} a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{HA}} a_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (\text{II.42})$$

Usuellement, les solutions considérées sont diluées. Nous avons vu que dans ce cas :  $a_{\text{H}_2\text{O}} = 1$

La réaction (II.41) s'écrit :

$$K_a = \frac{a_{\text{A}^-} a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{HA}}} \quad (\text{II.43})$$

C'est la relation usuelle. Elle ne s'applique qu'aux solutions diluées. La valeur de la constante  $K_a$  ne dépend que de la température; naturellement l'équilibre (II.41) persiste quelle que soit la nature des autres espèces en solution. Seule peut varier la position de cet équilibre. La relation (II.43) reste donc vérifiée quelle que soit la nature des autres solutés, pourvu que la solution reste diluée. La constante de dissociation  $K_{ac}$  exprimée en fonction des concentrations en molalité :

$$K_{ac} = \frac{[A_{aq}^-][H_3O_{aq}^+]}{[HA_{aq}]} \quad (II.44)$$

est appelée constante formelle ou conditionnelle. Elle n'est égale à la constante thermodynamique  $K_a$  qu'en solution très diluée, car ce n'est que dans ces conditions que les activités des ions ne diffèrent pas de leurs concentrations.

L'acidité d'une espèce est d'autant plus forte que la constante  $K_a$  est plus grande.

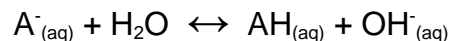
D'un point de vue plus pratique, étant donné le grand domaine des valeurs  $K_a$  rencontrées, on préfère utiliser la fonction logarithmique  $pK_a$  telle que :

$$pK_a = -\log K_a$$

Plus l'acide est fort, plus son  $pK_a$  est faible et inversement.

#### 2.4.1.2. Chiffrage de la force des bases $K_b$ et $pK_b$

Si l'on reprend l'exemple précédent  $A^-$  est une base car :



La constante thermodynamique  $K_b$  de cet équilibre :

$$K_b = \frac{a_{HA} \cdot a_{OH^-}}{a_{A^-} \cdot a_{H_2O}}$$

chiffre la force de la base  $A^-$  dans l'eau. C'est la constante de basicité de la base  $A^-$ .

En solution diluée, on peut écrire légitimement :

$$K_b = \frac{a_{HA} \cdot a_{OH^-}}{a_{A^-}}$$

On préfère également utiliser la notion de  $pK_b$  en posant :

$$pK_b = -\log K_b$$

Remarque : Inutilité de la notion de  $K_b$

$$\boxed{K_a K_b} = \frac{a_H a_A}{a_{HA}} \cdot \frac{a_{HA} a_{OH}}{a_A} = a_H a_{OH} = \boxed{K_e}$$

La connaissance de  $K_a$  d'un acide permet immédiatement le calcul de  $K_b$  de la base conjuguée. Plus l'acide est fort, plus la base conjuguée est faible.

#### 4.4.2. Force relative des acides

Pour différents acides, plus  $K_a$  est grand (ou  $pK_a$  petit), plus la dissociation est importante et plus l'acide est fort.

De l'équation (II.44) on tire que lorsque les concentrations en acide et en base conjuguée sont égales :  $pH = pK_a$ . Il est possible de hiérarchiser la force des différents couples acide-base en plaçant leurs  $pK_a$  sur une échelle de pH. Les  $pK_a$  les plus petits correspondent aux acides les plus forts, et symétriquement, les  $pK_a$  les plus grands correspondent aux bases les plus fortes (figure I-15).

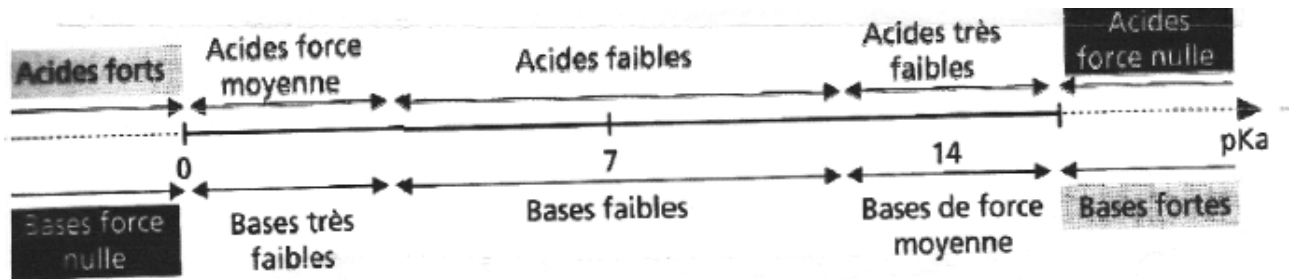


Figure I-16 : Forces des acides et des bases

#### 4.3.3. Prédominance des espèces en fonction du pH

Dans le diagramme précédent, on peut matérialiser la forme prédominante d'un couple  $HA/A^-$  de la manière suivante (figure I-17) :

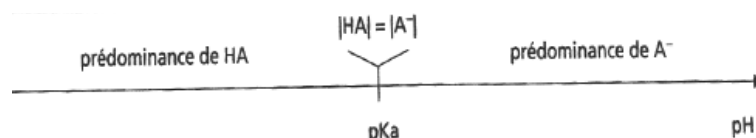


Figure I-17 : Diagramme de prédominance des espèces d'un couple  $HA/A^-$

On peut sur un même diagramme faire figurer autant de couples qu'on désire, ce qui permet de discuter des formes présentes à différents pH.

Par exemple dans le cas de la glycine (acide aminé le plus simple) qui possède deux groupements acido-basiques ( $COOH/COO^-$  :  $pK_{a2} = 2.2$  ;  $NH_3^+/NH_2$  :  $pK_{a1} = 9.8$ ) le diagramme de prédominance des espèces en fonction du pH nous permet de visualiser les espèces présentes aux différents pH (figure I-18).

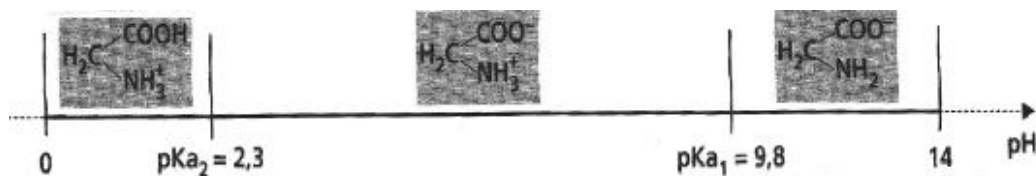


Figure I-18 : Diagramme de prédominance des espèces de la glycérine

## 4.5. Solution tampon

### 4.5.1. Intérêt et constitution des solutions tampon : effet tampon

Dans de nombreuses branches de la chimie en particulier en analyse chimique et biochimique, il est nécessaire de garder le pH d'une solution constante, notamment au cours d'une réaction qui produit ou consomme des protons. Pour atteindre ce but, on utilise une solution tampon.

Les solutions tampon sont des solutions plutôt concentrées d'un acide faible et de sa base conjuguée qui ne participe pas eux-mêmes à la réaction principale. Si des protons sont libérés au cours de celle-ci, ils réagissent avec la base pour augmenter la concentration de l'acide conjugué. Si des protons sont consommés, l'acide faible se dissocie en donnant la base conjuguée.

Lorsque l'on ajoute un acide ou une base faible à une solution tampon, la variation de pH est très faible, en tout cas beaucoup plus faible que lorsque l'on ajoute un acide ou une base au solvant pur. Par exemple, si la solution tampon est constituée en dissolvant  $10^{-2}$  mol d'acide acétique et  $10^{-2}$  mol d'acétate de sodium par  $\text{dm}^3$  de solution ( $K_a = 1.75 \cdot 10^{-5}$ ), on ajoute une solution d'acide chlorhydrique de telle sorte que sa concentration analytique finale soit  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  d'acide chlorhydrique, le pH varie de 4.75 à 4.67. A titre de comparaison, la préparation d'une solution  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  d'acide chlorhydrique à partir de l'eau pure fait varier le pH de 7 à 3. La quasi-constance du pH lorsqu'un acide ou une base est ajoutée à une solution tampon s'appelle l'effet tampon.

### 4.5.2. Calcul du pH des solutions tampon

Ces calculs sont donnés afin de préciser l'origine de l'effet tampon.

Soit une molécule tampon préparée en dissolvant  $C_{\text{HA}}$   $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  d'acide et  $C_{\text{A}}$   $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  de la base conjuguée sous forme de sels de sodium ANa.

Les équations ci-dessous sont obligatoirement vérifiées (pourvu que les solutions soient suffisamment diluées) :

$$[\text{H}^+][\text{A}^-] = K_a [\text{HA}] \quad \text{Constante d'acidité}$$

$$[\text{H}^+][\text{OH}^-] = K_e \quad \text{Produit ionique de l'eau}$$

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{A}^-] \quad \text{Electroneutralité}$$

$$[\text{HA}] + [\text{A}^-] = C_{\text{HA}} + C_{\text{A}} \quad \text{Bilan matière}$$

$$[\text{Na}^+] = C_{\text{A}} \quad \text{Bilan matière}$$

La combinaison des trois dernières équations donne :

$$[\text{H}^+] + [\text{HA}] = C_{\text{HA}} + [\text{OH}^-] \quad (\text{II.51})$$

En faisant l'approximation que  $[\text{H}^+]$  et  $[\text{OH}^-]$  sont négligeables dans (II.51), il vient :

$$[\text{HA}] = C_{\text{HA}}$$

$$[\text{A}^-] = C_{\text{A}}$$

$$[\text{H}^+] = K_{\text{a}_c} \frac{C_{\text{HA}}}{C_{\text{A}}} \quad (\text{II.52})$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}_c} + \log \frac{C_{\text{A}}}{C_{\text{HA}}}$$

Ces deux dernières équations portent le nom d'équations d'Henderson.

Que devient le pH de la solution précédente lorsqu'on lui rajoute une solution d'acide chlorhydrique ? Si  $C$  est la concentration analytique d'acide chlorhydrique et  $C_{\text{HA}}$  et  $C_{\text{A}}$  les concentrations des espèces  $\text{HA}$  et  $\text{A}^-$  après l'addition, les équations suivantes sont vérifiées :

$$[\text{H}^+] [\text{A}^-] = K_{\text{a}} [\text{HA}]$$

$$[\text{H}^+] [\text{OH}^-] = K_{\text{e}}$$

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{A}^-] + [\text{Cl}^-]$$

$$[\text{HA}] + [\text{A}^-] = C_{\text{HA}} + C_{\text{A}}$$

$$[\text{Na}^+] = C_{\text{A}}$$

$$[\text{Cl}^-] = C$$

La combinaison des quatre dernières équations donne :

$$[\text{H}^+] + [\text{HA}] = C_{\text{HA}} + C + [\text{H}^+] \quad (\text{II.53})$$

En négligeant  $[\text{H}^+]$  et  $[\text{OH}^-]$ , il vient après addition d'acide :

$$[\text{H}^+] = K_{\text{a}_c} \frac{C_{\text{HA}} + C}{C_{\text{A}} - C}$$

(II.54)

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{C_A - C}{C_{\text{HA}} + C} \quad (\text{II.55})$$

Après addition d'une base, nous aurions trouvé :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{C_A + C}{C_{\text{HA}} - C} \quad (\text{II.56})$$

Rappelons que les équations (II.53) (II.55) (II.56) ne sont légitimes seulement si  $[\text{H}^+]$  et  $[\text{OH}^-]$  sont négligeables dans les équations (II.52) et (II.54), c'est-à-dire lorsque :

$$[\text{Na}^+] \gg [\text{H}^+] \quad \text{et} \quad [\text{A}^-] \gg [\text{OH}^-]$$

Autrement dit, il faut que les deux formes du tampon soient en concentration suffisamment élevée. Le domaine de concentration pour que l'approximation soit valable dépend de l'acidité du milieu. Les expressions (II.55) et (II.56) peuvent encore se simplifier lorsque la concentration de l'acide et de la base ajoutée à la solution tampon est très faible c'est-à-dire si :  $c \ll C_A$  et  $c \ll C_{\text{HA}}$ . Dans ces conditions, le pH ne varie pas.

## 4.6. Coefficient de Schawrzenbach ( $\alpha_H$ )

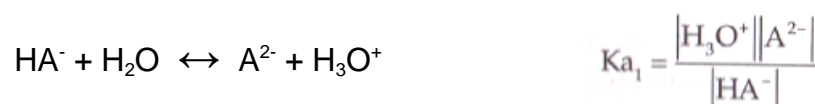
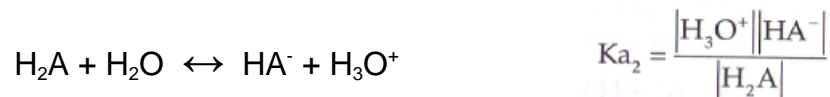
### 4.6.1. Définition

Le coefficient de Schawrzenbach ( $\alpha_H$ ) permet, dans le cas d'un polyacide d'apprécier le rapport de la concentration ( $C_t$ ) en acide sous toutes ses formes à la concentration de la base conjuguée la plus chargée. Par exemple l'acide  $\text{H}_n\text{A}$  :

$$\alpha_H = \frac{C_t}{[\text{A}^{n-}]} = \frac{[\text{H}_n\text{A}] + [\text{H}_{n-1}\text{A}^-] + [\text{H}_{n-2}\text{A}^{2-}] + \dots + [\text{A}^{n-}]}{[\text{A}^{n-}]} \quad (\text{II.61})$$

### 4.6.2. Calcul de $\alpha_H$ pour un diacide $\text{H}_2\text{A}$

Les équilibres de dissociation d'un diacide sont les suivants :



Les concentrations totales  $C_t$  en acide sous toutes ses formes seront alors :



$$C_t = |A^{2-}| + |HA^-| + |H_2A| = |A^{2-}| \left[ 1 + \frac{|H_3O^+|}{K_{a1}} + \frac{|H_3O^+|^2}{K_{a1}K_{a2}} \right]$$

D'après (II.61) :

$$\alpha_H = 1 + \frac{|H_3O^+|}{K_{a1}} + \frac{|H_3O^+|^2}{K_{a1}K_{a2}}$$

#### 4.6.3. Calcul de $\alpha_H$ pour un polyacide quelconque $H_nA$

$$\alpha_H = 1 + \frac{|H_3O^+|}{K_{a1}} + \frac{|H_3O^+|^2}{K_{a1}K_{a2}} + \dots + \frac{|H_3O^+|^n}{K_{a1}K_{a2}\dots K_{an}} \quad (II.62)$$

ou

$$\alpha_H = 1 + 10^{(pK_{a1} - pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} - 2pH)} + \dots + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} + \dots + pK_{an} - npH)}$$

#### 4.6.4. Calcul des pourcentages de forme ionisée et de forme moléculaire

Dans le cas d'un monoacide (HA) la formule (II.62) se simplifie :

$$\alpha_H = 1 + \frac{|H_3O^+|}{K_{a1}}$$

La concentration totale en acide sous toutes ses formes est  $C_t$  :

$$C_t = |HA| + |A^-|$$

Les pourcentages de HA et de  $A^-$  sont définis par les équations suivantes :

$$\% A^- = \frac{|A^-|}{C_t} \times 100 \quad \text{et} \quad \% HA = \frac{C_t - |A^-|}{C_t} \times 100 = \left( 1 - \frac{|A^-|}{C_t} \right) \times 100$$

Sachant que  $\alpha_H = C_t / |A^-|$  (II.61), les pourcentages de  $A^-$  et de  $HA^-$  peuvent donc s'exprimer en fonction de  $\alpha_H$  selon :

$$\% A^- = \frac{100}{\alpha_H}$$

et

$$\% HA = 100 \left( 1 - \frac{1}{\alpha_H} \right)$$

Le calcul de ces pourcentages pourra donc être effectué, après calcul de  $\alpha_H$  (en appliquant l'équation II.62).

### Remarque :

Ces calculs, valables pour tous les ampholytes, sont fondamentaux dans l'étude du métabolisme des médicaments. De très nombreux médicaments peuvent être considérés comme des couples acide faible – base faible : une des forme est ionisée et l'autre à l'état moléculaire est soluble dans les graisses.

## 4.7. Titrages acide-base

### 4.7.1. Définition

#### 4.7.1.1. Titration acide-base

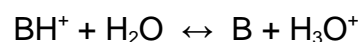
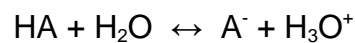
Le titrage acide base correspond à la mise en présence d'un acide (HA) et d'une base (B) afin de déterminer la concentration de l'un des deux antagonistes. Au cours du titrage, on ajoute une base dans une solution d'acide (ou inversement) et on génère le sel correspondant BHA (lequel est ionisé en  $BH^+$  et  $A^-$ ). L'équation du dosage est la suivante :



La constante K de la réaction est :

$$K = \frac{|A^-||BH^+|}{|HA||B|}$$

L'équation (II.71) peut se décomposer en deux équilibres de solvolysse correspondant aux deux couples acide-base mis en jeu :



auxquels sont associées les constantes d'acidité correspondantes :

$$K_{a_{HA}} = \frac{|A^-||H_3O^+|}{|HA|} \quad \text{et} \quad K_{a_B} = \frac{|B||H_3O^+|}{|BH^+|}$$

La constante K de l'équilibre acide-base peut donc être exprimée en fonction de  $K_{a(HA)}$  et  $K_{a(B)}$  selon :

$$K = \frac{K_{a_{HA}}}{K_{a_B}}$$

ou

$$pK = pK_{a(HA)} - pK_{a(B)}$$

#### 4.7.1.2. Point d'équivalence

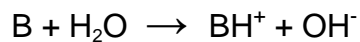
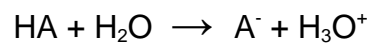
Le point d'équivalence correspond à la neutralisation de l'acide par la base (ou inversement) c'est-à-dire la mise en présence de quantités équivalentes d'acide et de base (stœchiométrie).

### 4.7.2. Variation du pH au cours de la neutralisation

On distingue trois types de dosages de A par B, selon les forces respectives de l'acide et de la base.

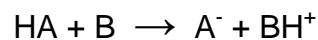
#### 4.7.2.1. Les deux antagonistes (acide et base) sont forts

Ils sont totalement dissociés dans l'eau selon :



Dans ce cas, le titrage peut être considéré comme la neutralisation de  $H_3O^+$  par  $OH^-$  (ou inversement), avec formation d'eau et du sel neutre BAH.

K est très grand et l'équilibre (II.71) est totalement déplacé vers la droite :



Les figures suivantes (figure I-19) représentent deux exemples d'un acide fort ( $HNO_3$ ) par une base forte (KOH) ou d'une base forte (NaOH) par un acide fort (HCl).

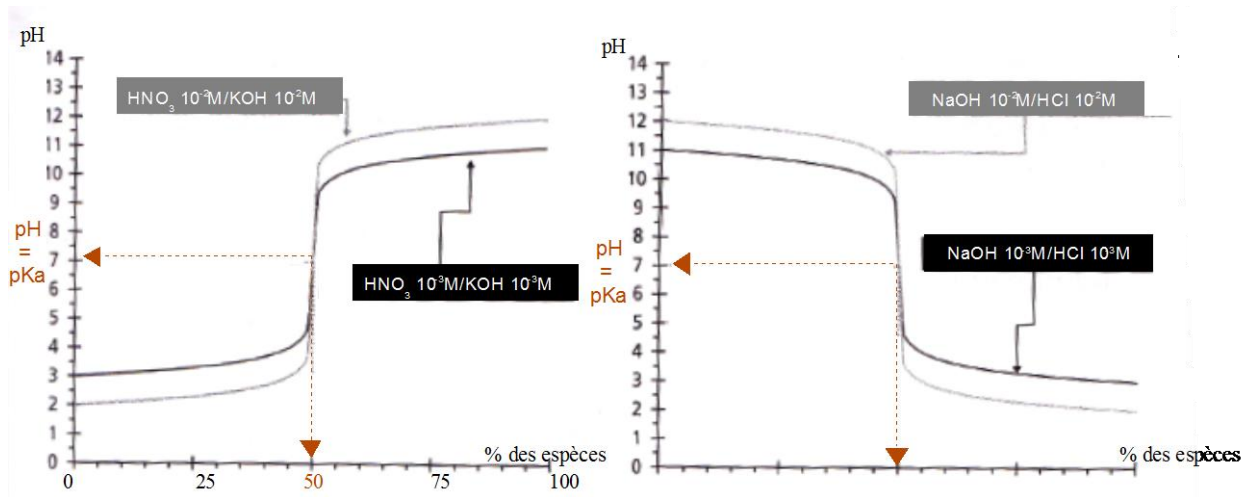


Figure I-19 : Courbes de neutralisation de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) par KOH ou de NaOH par HCl  
(les pH sont calculés sans tenir compte des variations de volumes)

Remarque :

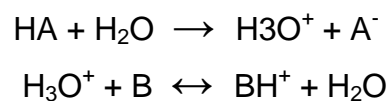
Pour les pH extrêmes (inférieurs à 2 ou supérieurs à 12), on s'aperçoit que celui-ci varie peu pour un ajout de réactif important : cette zone est souvent considérée comme zone tampon.

4.7.2.2. Un des deux antagonistes est faible et l'autre est fort

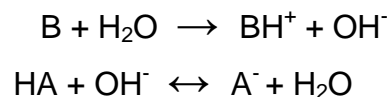
Dans cette hypothèse K, bien que plus petit, est encore suffisamment grand pour qu'on puisse considérer que l'équilibre (II.71) est totalement déplacé vers la droite.

L'équilibre mis en jeu dépend de la nature de l'antagoniste faible et peut s'exprimer par :

- Si la base B est faible (et l'acide HA fort)



- Si l'acide HA est faible (et la base B forte)



Les figures I-20 suivantes représentent deux exemples de titrages d'un acide faible ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) par une base forte (NaOH) ou d'une base faible ( $\text{NH}_3$ ) par un acide fort (HCl).

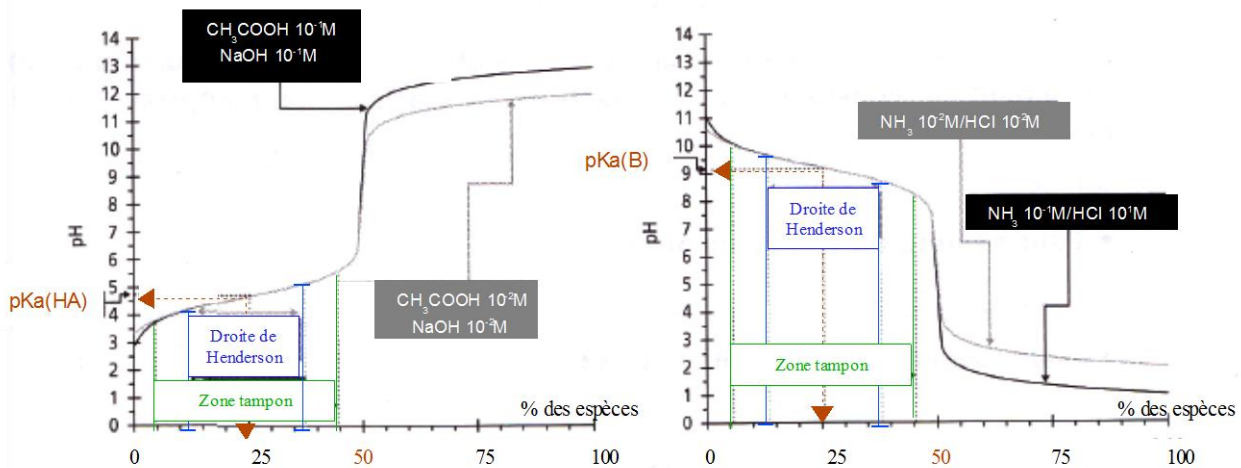


Figure I-20 : Courbes de neutralisation de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  par  $\text{NaOH}$  ou de  $\text{NH}_3^+$  par  $\text{HCl}$   
 (Les pH sont calculés sans tenir compte des variations de volume)

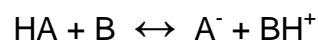
Remarque :

Dans les exemples ci-dessus, on distingue une zone tampon pour des pH voisins de  $\text{pH} = \text{pK}_a$  (correspondant à  $\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$ ) dans laquelle les variations de pH sont relativement faibles lors de l'addition du réactif titrant ( $0.1 < X < 0.9$ ). La variation de pH est d'autant plus faible que le pH se rapproche de  $\text{pH} = \text{pK}_a$  ( $X$  se rapprochant de 0.5). Dans les zones  $0.1 < X < 0.25$  et  $0.75 < X < 0.9$ , le pouvoir tampon est d'autant moins bon que la valeur de  $X$  s'écarte des valeurs limites 0.25 et 0.75.

On voit que si  $0.25 < X < 0.75$  la courbe peut être assimilée à une droite (droite d'Henderson) dont la pente est minimale c'est-à-dire que le pouvoir tampon est maximum. La pente des tangentes à la courbe est d'autant plus faible que la concentration  $C_t$  du tampon est grande, entraînant une augmentation du pouvoir tampon.

4.7.2.3. L'acide et la base sont faibles

Dans ce cas, la constante  $K$  est bien plus petite et la réaction (III.71) est équilibrée.



On utilise très rarement une base faible pour neutraliser un acide faible (ou vice-versa) en raison des faibles variations de pH observées et du manque de quantitativité de la réaction. Cependant on considérera ici uniquement le cas où la réaction est pratiquement totalement déplacée vers la droite ( $\Delta\text{pK}_a \geq 4.6$ ).

La figure I-21 suivante représente le titrage de deux acides faibles ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$  ou  $\text{HF}$ ) par une base faible ( $\text{NH}_3$ ). Dans les deux cas  $\text{pK}_{a(B)} - \text{pK}_{a(\text{HA})} > 4.6$ . La réaction est donc quantitative.

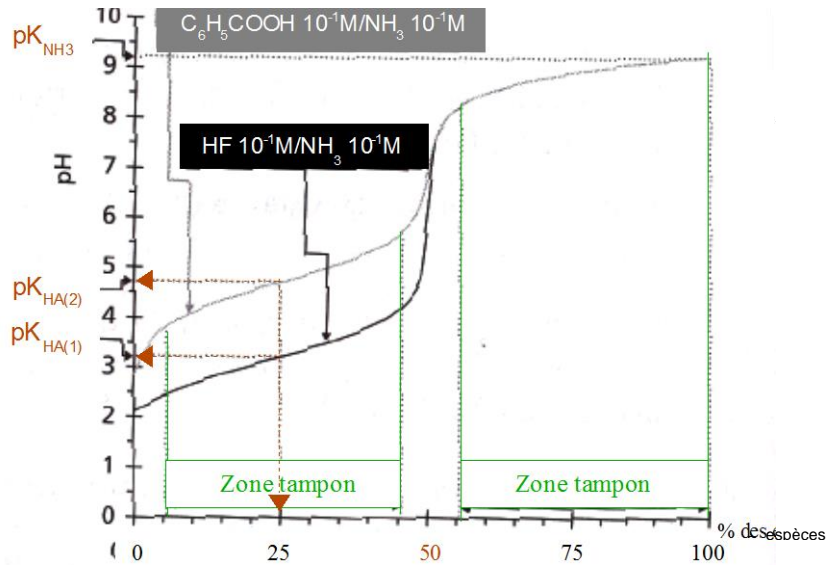


Figure I-21 : Neutralisation de l'acide fluorhydrique (HF) ou de l'acide benzoïque ( $C_6H_5COOH$ ) par  $NH_3$   
 (Les pH sont calculés sans tenir compte des variations de volume)

#### 4.7.2.4. Mélange d'acides, polyacides

- Mélange d'acides forts

Ceux-ci étant totalement solvolysés, il est impossible de les doser séparément : la courbe obtenue est identique à celle d'un acide fort dont la concentration serait égale à la somme des concentrations de chacun de ceux-ci.

- Mélange d'acides faibles

Si la différence des  $pK_a$  est suffisamment importante, chaque acide peut être dosé séparément avec une bonne précision. Les courbes de neutralisation n'interférant pratiquement pas, la neutralisation a lieu en commençant par l'acide le plus fort (dont le  $pK_a$  est le plus petit).

- Mélange d'acide fort et d'acide faible

L'acide fort est dosé en premier, l'acide faible en second : les deux courbes de neutralisation se développent l'une après l'autre.

- Polyacides

Le cas des polyacides reprend les raisonnements précédents, sachant qu'on peut considérer qu'un polyacide est un mélange d'acides en concentration équimoléculaire.

L'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) en est un excellent exemple. Ce triacide possède trois  $\text{pK}_a$  qui correspondent respectivement à un acide de force moyenne ( $\text{pK}_{a3} = 2.1$ ), à un acide faible ( $\text{pK}_{a2} = 7.2$ ) et à un acide très faible ( $\text{pK}_{a1} = 12.4$ ). Sur la courbe de neutralisation de ce triacide par la soude (représentée dans la figure I-22) on ne retrouve que deux points d'équivalence. En effet la troisième acidité est trop faible ( $\text{pK}_{a1} = 12.4$ ) pour que l'on puisse la doser dans l'eau, même par une base forte par les techniques habituellement employées.

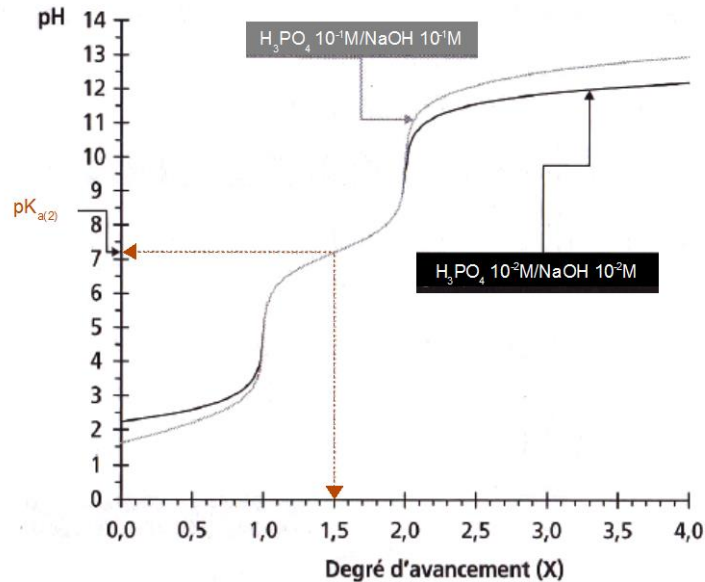


Figure I-22 : Courbes de neutralisation de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  par  $\text{NaOH}$   
 (Les  $\text{pH}$  sont calculés sans tenir compte des variations de volume.)

#### 4.7.2.5. Mélange de bases

Ce cas est comparable à celui des acides, mais la neutralisation commence par la base la plus forte, c'est-à-dire celle dont le  $\text{pK}_a$  est le plus élevé.

## 5. BILAN

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible est un outil précieux au chimiste analyste pour les deux domaines complémentaires de toute analyse : l'identification puis le dosage.

L'utilisation de détecteurs UV-visible à barrette de diodes présente de nombreux avantages en autorisant l'enregistrement des spectres sur le domaine entier, prédéterminé, de longueurs d'onde et pendant la totalité de l'analyse du surcroît. Les progrès de la micro-informatique permettent le stockage des spectres d'absorption UV-visible puis le retraitement *a posteriori* des informations.

Cette approche de la détection associée à des traitements statistiques et chimiométriques permet obtenir des informations là où les conditions retenues pour l'analyse ne se révèlent pas totalement satisfaisantes.

Dans ce chapitre, l'outil mathématique utilisé pour extraire l'information spectrale a été décrits. Grâce à la méthode de l'ACP, la(les) constante(s) d'acidité d'une molécule pourra être déterminée(s).

Enfin, un aspect de la chimie en solution aqueuse a été abordé. Il s'agit de l'équilibre chimique des acides et des bases et des calculs fondamentaux basés sur la constante d'acidité.



# CHAPITRE II

**Développement de méthodes d'analyses permettant de déterminer des constantes d'acidité de molécules pharmaceutiques ionisables en développement à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup>**

# 1. INTRODUCTION

Le groupe Servier a été fondé en 1954 à Orléans par le docteur Jacques Servier. Aujourd'hui, il est présent sur les 5 continents et il ne cesse d'étendre ses activités. Il s'agit du premier groupe pharmaceutique français indépendant. Le centre situé à Orléans travaille principalement sur deux axes. Le premier vise à évaluer de façon précoce les nouvelles molécules issues des centres de recherche. Le deuxième concerne la prise en charge du développement des nouvelles entités chimiques découvertes pour les mener progressivement au stage de médicaments commercialisables. Pour accomplir ces missions, les équipes de travail basées à Orléans se répartissent sur deux grands pôles de développement :

- La pharmacocinétique qui étudie le devenir du médicament une fois dans l'organisme.
- Le pôle pharmaceutique qui se divise en une entité Physico-Chimie Analytique et une entité Galénique. L'entité Physico-Chimie Analytique regroupe 8 services dont le département de Développement Analytique. Ce département développe des méthodes analytiques pour contrôler un médicament à différents stades de son développement.

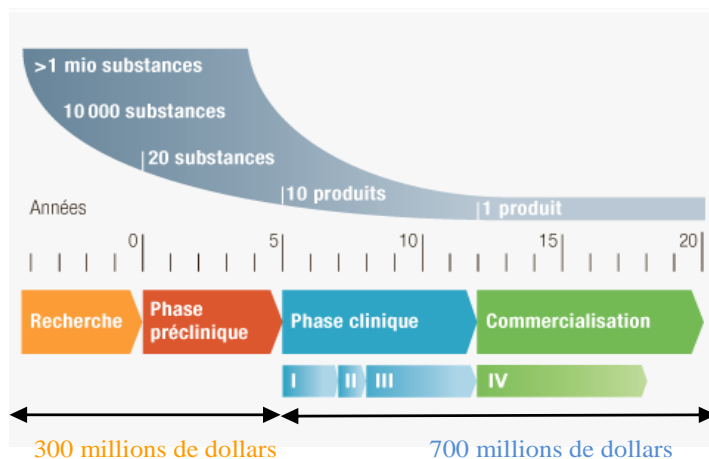


Figure II-1: La genèse d'un médicament

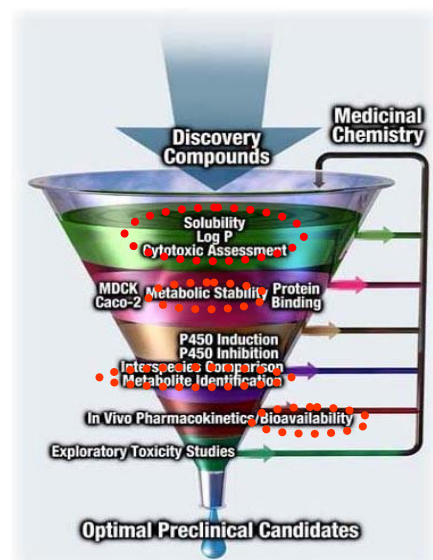


Figure II-2: La phase d'optimisation

Les deux axes principaux sur lesquels travaillent le centre situé à Orléans correspondent à deux étapes différentes dans la vie d'un médicament. Le premier axe correspond à la phase de recherche et le deuxième à la phase préclinique et clinique (figure II-1). La phase de recherche se déroule en deux étapes :

## -L'étape de découverte

Cette phase a subi un changement radical au début des années 90 avec l'apparition de nouvelles technologies qui ont entraîné une explosion du taux de découverte des molécules biologiquement actives.

### -L'étape d'optimisation (figure II-2)

L'étape d'optimisation joue un rôle crucial au niveau économique en sélectionnant les molécules qui passeront en phase de développement<sup>16</sup>. Cette étape a pour but de sélectionner une vingtaine de molécules pouvant potentiellement devenir un futur médicament parmi le million issu de l'étape de découverte. Elle consiste à effectuer en parallèle sur des molécules des études de pharmacodynamies, de pharmacocinétiques, de toxicologie et de chimie analytique. Le développement analytique comprend l'étude des différents paramètres physico-chimiques (ionisation, lipophilie, solubilité), de la stabilité, de la cytotoxicité, de la biodisponibilité du principe actif (PA) et de l'identification de ces métabolites<sup>17</sup>.... (figure II-2). Ces différentes études fournissent des informations utiles pour les prévisions des paramètres pharmacocinétiques et des effets biologiques.

Le département de Développement Analytique étudie certains des paramètres physico-chimiques (ionisation, lipophilie, solubilité) d'une molécule lors de la phase d'optimisation. Ces paramètres physico-chimiques sont :

### -Les $pK_a$ (figure II-3)

La majorité des molécules pharmaceutiques sont des composés ionisables et particulièrement des bases. La valeur du  $pK_a$  varie en fonction de la température. C'est pourquoi, il est intéressant de la mesurer à la température du corps humain ( $T=37^\circ\text{C}$ ). Elle est particulièrement importante car elle affecte la lipophilie et la solubilité.

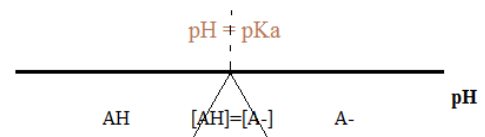


Figure II-3:

Diagramme de prédominance des espèces

### -Les coefficients de partage (Log P) et de distribution (Log D)

Le coefficient de partage mime les différentes barrières physiologiques des organismes vivants. Il donne une indication de la lipophilie d'un PA. Le log P optimal pour la diffusion passive d'un PA à travers la barrière intestinale se situe entre 1 et 3. C'est une constante indépendante du pH contrairement au coefficient de distribution. Le pH sanguin étant à 7.4, le coefficient de distribution est souvent exprimé à ce pH. Il donne une indication de la lipophilie d'un PA.

### -La solubilité en fonction du pH

Les PA doivent être en solution pour traverser les barrières de l'organisme [3]. La solubilité intrinsèque ( $S_0$ ) d'un composé ionisable correspond à la solubilité d'une molécule sous sa forme neutre.

Les trois paramètres physico-chimiques décrits ci-dessus entrent en compte lors de la prédiction de la biodisponibilité [3]. Une molécule candidate pour la diffusion passive par voie orale doit être suffisamment soluble et lipophile aux pH intestinaux pour entrer et traverser les membranes intestinales<sup>18</sup>. Un système de classification biopharmaceutique (BCS) regroupe les PA en quatre classes distinctes selon leurs lipophilies et de leurs solubilités. La plupart des molécules sur le marché appartiennent à la classe 1, c'est-à-dire qu'elles sont solubles ( $\log S_0$  sup. à 0) et lipophiles ( $\log P$  sup à 1). Cependant, les molécules actuellement découvertes appartiennent majoritairement aux classes 3 ou 2. Elles sont respectivement soit peu lipophiles, soit peu solubles (figure II-4).

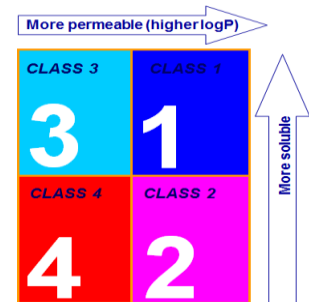


Figure II-4:  
Classification BCS

## 2. DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ACIDITE A L'AIDE DU SIRIUS T3<sup>®</sup>

Le Sirius T3<sup>®</sup> est l'appareil qui a été utilisé pour mesurer les paramètres physico-chimiques (ionisation et lipophilie) des diverses PA décrits dans ce rapport. Contrairement aux méthodes décrites ci-dessus, le Sirius T3<sup>®</sup> permet de mesurer les  $pK_a$ ,  $\log P$  et solubilités de PA étant solubles comme insolubles. Il est robotisé, rapide et consomme une faible quantité de PA. Il possède une justesse et une précision importante. Son véritable atout est de se rapprocher au plus près des conditions *in vivo*. Il maintient aux cours des expériences les solutions à une température de 37°C et à une force ionique constante grâce à un tampon de KCl 0.15M (soit NaCl à 0.9M) correspond à la pression osmotique. Cependant, le Sirius T3<sup>®</sup> ne convient pas aux composés non ionisables et représente un coût certain à l'achat et à l'usage pour le laboratoire. C'est un appareil récent qui dont les méthodes de mesure ont besoin d'être développées contrairement aux techniques précédemment décrites qui ont été maintes fois éprouvées<sup>19</sup>.

Le Sirius T3<sup>®</sup> comprend 3 modules (figure II-5) :

- Un module de distribution

Il gère le système de micro-titrage qui additionne de l'eau tamponnée, des solvants et des réactifs de titrage (solutions acides et basiques) à partir de bouteilles situées dans la partie basse **5**. Il comporte également un spectrophotomètre UV/visible **1**.

- Un passeur automatique

Il s'agit d'une table robotisée comportant 4 portoirs de 48 positions **9**. Ce passeur est équipé d'un bras robotisé **4** qui transporte les vials situés sur les portoirs vers leurs positions de titrage **6**. Il peut en amont les amener vers un bain à ultra-sons **8**.

-Un module de titrage

Il se compose d'un bras mobile automatisé **2** qui déplace une cellule de mesure miniaturisée **3** (figure II-6) sur les différentes positions nécessaires aux actions effectuées.

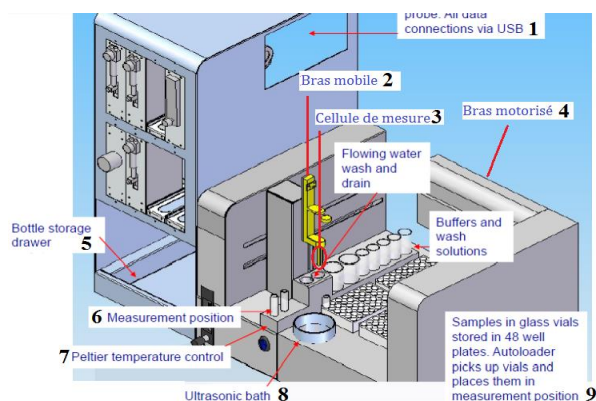


Figure II-5: Composition du Sirius T3®

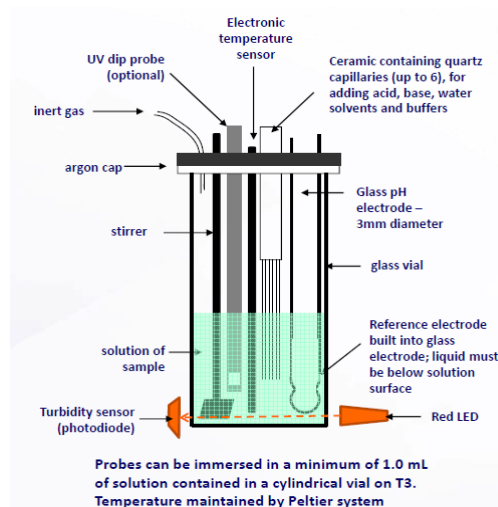


Figure II-6: Cellule de mesure

Cette cellule possède une électrode de verre, une sonde UV immergée, six capillaires pour additionner les réactifs, un thermomètre électronique, un agitateur et un flux d'azote (figure II-6). Toutes les expériences sont effectuées dans une solution aqueuse de KCl 0.15M sous une atmosphère d'azote à  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  ou à  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . La solution de KCl 0.15M maintient la force ionique constante durant les expériences. Les solutions sont constituées d'eau milli-Q ayant une résistivité supérieure à  $10^{18} \Omega\text{-cm}$ .

Le Sirius T3® utilise conjointement un spectrophotomètre UV/visible et un titrage potentiométrique afin de capturer automatiquement les changements de spectre<sup>20</sup> :

-Le spectrophotomètre capture les modifications mises en jeu dans le domaine UV/visible correspondant à des transitions électroniques des électrons de liaisons, permettant ainsi la caractérisation de la molécule elle-même et non des atomes constitutifs de cette molécule. Il s'agit de transition d'électrons entre orbitales moléculaires. Les groupements responsables de l'absorption UV/visible sont des groupements fonctionnels dans lesquels les électrons sont délocalisés. Ce sont des groupements dits chromophores<sup>9</sup>. Le spectrophotomètre se compose d'une lampe deutérium et d'une barrette de diodes constituée de 256 éléments. Une sonde immergée est reliée à la lampe et au détecteur par deux fibres optiques ayant un trajet optique de 1cm de longueur d'onde (figure II-7).

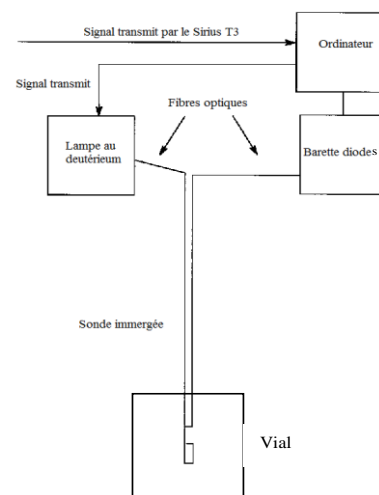


Figure II-7: Composition du spectrophotomètre UV/visible

-Le potentiomètre indique le pH grâce à une électrode qui mesure l'activité des protons. Le titrage s'effectue automatiquement à l'aide d'une électrode en verre calibrée dans une gamme de pH allant de 1.8 à 12.2. Cette électrode est étalonnée avec un tampon à pH = 7 avant chaque essai. Elle est ensuite standardisée quotidiennement par un titrage à blanc de l'acide avec la base à une température donnée sous azote. Ces différentes étapes permettent de connaître la concentration en protons<sup>20</sup>.

### POTENTIEL de l'ELECTRODE

E (mV)



### ETALONNAGE

Tampon à pH 7



### CALIBRAGE

Titration à blanc de l'acide avec la base à une température donnée sous azote.

Le calibrage est basé sur l'équation suivante :

$$\text{pH} = \alpha + S \cdot \text{p}[\text{H}] + j_{\text{H}}[\text{H}] + j_{\text{OH}} \text{Ke} / [\text{H}]$$

Chaque paramètre ci-dessous doit être compris dans un certain intervalle

$\alpha$  : coefficient d'activité des protons [0.07-0.21]

$S$  : pente de l'électrode comparée à l'équation de Nernst [0.9860-1.0060]

$j_{\text{H}}$  : potentiel acide de jonction [-0.9-2.0]

$j_{\text{OH}}$  : potentiel basique de jonction [-1.5-0.4]

$\text{Ke}$  : produit ionique de l'eau

### 3. STRATEGIE

Le stage débutera par la prise en main de l'appareil, le Sirius T3<sup>®</sup> en reproduisant des méthodes déjà expérimentées par le service de Développement Analytique. C'est-à-dire, la détermination de  $pK_a$  dans la gamme de pH de 3 à 11.

Le retraitement des données spectrales devra être maîtrisé afin de valider le protocole existant.

De nouvelles approches seront mises en œuvre. Elles portent sur l'extension de la gamme de pH pour la recherche du  $pK_a$ .

Ces nouvelles approches seront d'abord testées sur des molécules connues et décrites dans la littérature afin de développer des méthodes robustes. Puis, des molécules Servier seront analysées.

Ces molécules Servier sont des molécules inconnues sur le plan physico-chimique. Le logiciel « Prédiction Advanced Chemistry » (ACD<sup>®</sup>) apporte une aide en prédisant les  $pK_a$  des PA.

Le développement d'une méthode analytique, comporte 3 aspects différents qui entraînent des choix impactant sur l'exactitude totale des résultats (figure II-8).

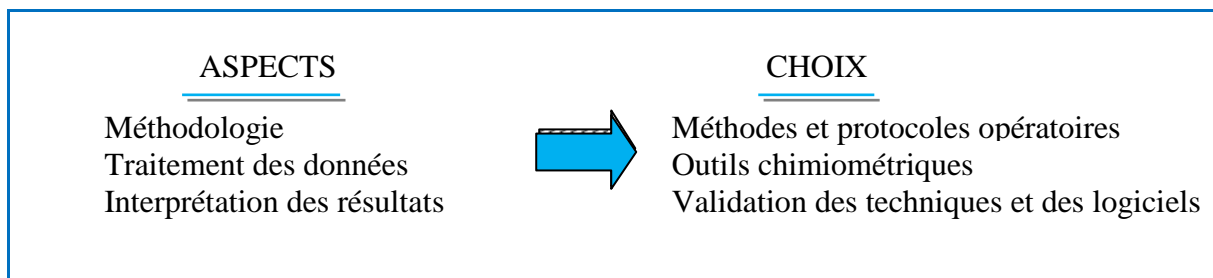


Figure II-8 : Assurance qualité au niveau du développement analytique

## 4. PROTOCOLES OPERATOIRES DU PKa

Pour déterminer la valeur d'un pK<sub>a</sub> d'une molécule, un titrage potentiométrique est effectué afin de capturer les changements de spectre à l'aide du spectrophotomètre UV/visible. Une solution mère doit préalablement être effectuée. L'étape critique du protocole opératoire correspond au transfert de 10 à 20µL de ces solutions mères dans un vial où s'effectuera le titrage. Ce transfert est actuellement fait manuellement avec une micropipette (proline 5–100µL, Biohit France) calibrée pour des solutions aqueuses, quelque soit le solvant de la solution mère.

L'expérience a pour but de comparer l'exactitude et la précision des volumes transférés avec une micropipette proline et avec une micropipette Evol (seringue de 50µL).

Le volume testé est de 25µL d'eau pour chromatographie et de méthanol (annexe 4-1). Afin de s'affranchir au maximum de l'évaporation, les introductions du solvant sont effectuées dans un erlen de 25mL contenant 15mL d'eau pour chromatographie. La pesée est relevée avec l'erlen fermé par un bouchon sur la balance AX205 (Mettler Toledo, Suisse). Une détermination de masse volumique est effectuée au préalable sur une fiole de 20mL contenant le réactif. Les solvants, la fiole et les erlens ont été stockés à la température de travail 1 heure auparavant pour minimiser l'effet de la variation de température.

La micropipette Evol possède une justesse et une précision supérieures à la norme NF EN ISO 8655-2 pour les deux réactifs utilisés alors que la micropipette proline possède une justesse et une précision inférieurs à la norme NF EN ISO 8655-2 pour les deux solvants utilisés (tableau II-1). Cette différence provient du fait que la micropipette Evol est une pipette par déplacement positif.

Tableau II-1 : Justesse et précision de la micropipette proline et de la micropipette Evol (annexe 4-1)

Solvants	Pipette	Justesse		Précision	
		µL	%	µL	%
Eau pour chromatographie	Proline	-0.64	-2.60	0.39	1.60
	Evol	-0.02	-0.10	0.03	0.10
Méthanol	Proline	-0.94	-3.80	0.64	2.70
	Evol	-0.09	-0.30	0.18	0.70
NF EN ISO 8655-2 : avril 2003		±0.50	±2.50	±0.20	±1.00

La micropipette proline ne peut donc pas être utilisée pour le transfert de 10 à 20µL des solutions mères dans le vial où se déroulera l'essai. Ce transfert doit être uniquement effectué à l'aide d'une micropipette Evol pour pouvoir être sûr du volume transféré.



## 5. LE pK<sub>a</sub>

### 5-1- Méthodologie

#### 5.1.1. Les pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 2 à 12

Les valeurs de pK<sub>a</sub> sont déterminées à partir d'une solution mère de PA en solution dans de l'eau milli-Q ou un co-solvant à une concentration allant de 10 à 31mM. 10 à 17µL de cette solution sont ensuite introduits dans un vial. Le SiriusT3<sup>®</sup> ajoute ensuite automatiquement un volume de 1.5mL de KCl 0.15M à une température de 25 ou 37±0.5°C (annexe 5-1-1). La concentration de l'échantillon est alors de l'ordre 10<sup>-7</sup>M. Si le pK<sub>a</sub> correspond à une base, l'échantillon en solution est pré-acidifié à une valeur de pH 2 avec de HCl 0.5M puis titré par addition de KOH 0.5M jusqu'à une valeur de pH 12. Si le pK<sub>a</sub> correspond à un acide, l'échantillon est pré-alcalinisé à une valeur de pH 12 avec du KOH 0.5M puis il est titré par addition de HCl 0.5M jusqu'à une valeur de pH 2. Le titrage est effectué 3 fois dans un même vial.

#### 5.1.2. Les pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 1 à 3 ou de 11 à 13 (annexe 5-1-2)

##### 5.1.2.1. Les pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 1 à 3

La méthode permettant de déterminer des pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 1 à 3 est appelée méthode des pK<sub>a</sub> extrêmes acides. Le titrage débute dans un volume de 1.2 mL de KCl 0.15M et de 0.3mL de HCl 0.5M sans ajustement du pH. Le titrage avec du KOH 0.5M se déroule d'une valeur de pH acide vers une valeur de pH basique.

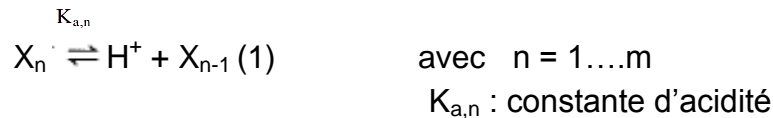
##### 5.1.2.2. Les pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 11 à 13

La méthode permettant de déterminer des pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 11 à 13 est appelée méthode des pK<sub>a</sub> extrêmes basiques. Le titrage débute dans un volume de 1.2mL de KCl 0.15M et de 0.3mL de KOH 0.5M sans ajustement du pH. Le titrage avec HCl 0.5M se déroule d'une valeur de pH basique vers une valeur de pH acide.

## 5.2. Retraitement

### 5.2.1. Systèmes en équilibres

Considérons un processus de  $n$  étapes d'ionisation dans lequel  $X_i$  ( $i=1,2,\dots,n+1$ ) représente les différentes espèces. Les réactions peuvent ainsi s'écrire :



A partir de la loi d'action de masse, on obtient :

$$Y = \sum_{n=1}^{m+1} C(n) \quad (2) \quad \text{avec } Y : \text{concentration initiale}$$

$C(n)$  : concentration de  $X_n$

Les équations (1) et (2) donne lieu à une matrice permettant de déterminer les constantes d'ionisation ( $K_a$ ) :

	y	1	1	...	...	...	1	1			C(1)
	0	$K_{a,1}$	-H	0	...	...	...	0			C(2)
	0	0	$K_{a,2}$	-H	0	...	...	0			
	0	=									
	0	0	0	0	$K_{a,n}$	-H	0	0			C(n)
	0	0	0	0	0	$K_{a,m-1}$	-H	0			C(m)
	0	0	0	0	0	0	$K_{a,m}$	-H			C(m+1)

avec  $H$  : concentration en proton

### 5.2.2. L'analyse des composantes principales (PCA)

Lors d'un titrage spectrophotométrique d'un PA, les données spectrales recueillies sont une série de spectres d'absorption mesurée à différentes valeurs de pH. Cette approche permet de connaître la valeur du ou des  $pK_a$  et le nombre d'espèces indépendantes absorbant la lumière présente dans le milieu. Les spectres d'absorption du composé peuvent ainsi être déterminés en une seule titration sans connaître au préalable ses propriétés optiques<sup>21</sup>.

Les données spectrales recueillies sont exprimées sous la forme d'une matrice d'absorbance  $A$ . En accord avec la loi de Beer, cette matrice peut s'écrire :

$$A = CE \quad \text{avec}$$

$C$  : Matrice correspondant aux concentrations des différentes espèces en fonction du pH (annexe 5-2-2 ; A)  
 $E$  : Matrice représentant les coefficients d'extinction des différentes espèces en fonction des longueurs d'onde (annexe 5-2-2 ; B)

La procédure de l'analyse des principales composantes, permet de déterminer le nombre de caractéristiques spectroscopiques distinctes présentes dans l'ensemble du spectre. Leurs capacités de prédiction du modèle est supérieur à 0.8 (annexe 5-2-2 ; C).

La matrice A est ensuite reconstituée, à partir des vecteurs propres et des valeurs propres, et donne la matrice A'. Le test du Chi-squared ( $X^2$ ) est utilisé pour comparer ces deux matrices. Il estime la perte de données spectrales c'est-à-dire l'absorbance résiduelle de la matrice reconstituée A' par rapport à la matrice initiale A (annexes 5-2-2 ; D). La valeur du test du  $X^2$  se détermine à l'aide de l'équation suivante :

$$X^2 = \frac{(A-A')^2}{A'}$$

L'inverse du  $X^2$  ( $1/X^2$ ) exprime une densité de probabilité de présence d'un  $pK_a$  (annexe 5-2-2 ; E).

### 5.3. Résultats et discussion

#### 5.3.1. Validation du protocole de détermination des $pK_a$ dans la gamme de pH allant de 2 à 12 à 25°C à l'aide de molécules décrites dans la littérature

##### 5.3.1.1. Un acide faible : L'acide salicylique

Validation du protocole de détermination des  $pK_a$  dans la gamme de pH de 2 et 12 à 25°C pour un acide faible, l'acide salicylique (figure II-9). Cet acide faible a été précédemment décrit dans la littérature<sup>22</sup>.

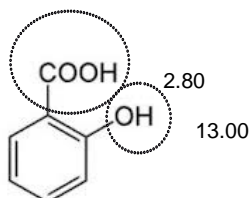


Figure II-9 : Structure chimique de l'acide salicylique

L'acide salicylique possède deux fonctions ionisable au niveau du groupement acide et au niveau du groupement alcool. Le  $pK_a$  du groupement acide est un  $pK_a$  acide ayant une valeur de pH de 2.80. Le  $pK_a$  du groupement alcool est un  $pK_a$  basique ayant une valeur de pH de 13.0. Le groupement alcool L'une acide au niveau de la fonction «-acide » et l'autre basique au niveau de la fonction « -alcool »<sup>22</sup>.

- Informations préalables au début de l'essai

Le logiciel de retraitement mathématique du Sirius T3<sup>®</sup> a besoin de connaître le nombre, la nature et la valeur du ou des  $pK_a$  présents dans la gamme de pH de 2 à

12. On indique donc au logiciel du Sirius T3<sup>®</sup> que l'acide salicylique a un pK<sub>a</sub> acide possédant une valeur de 2.8 dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-10).

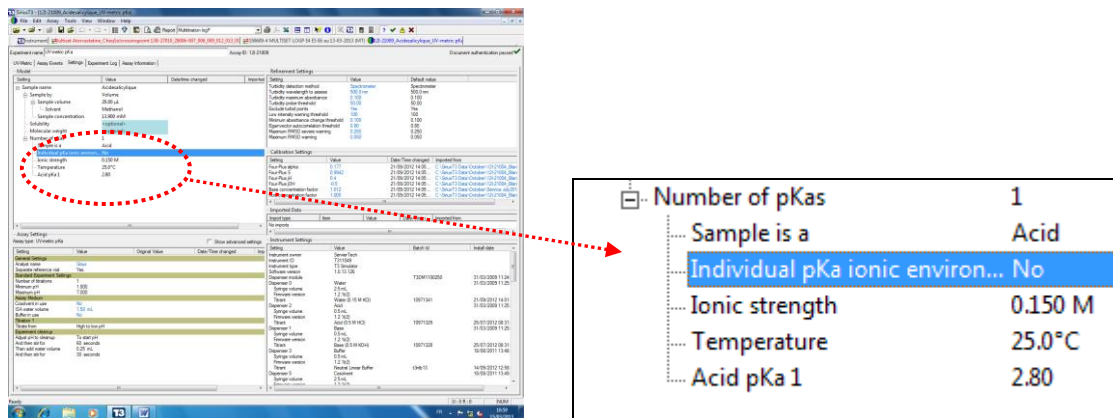


Figure II-10 : Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> avant le début de l'essai de détermination la valeur du pK<sub>a</sub> acide de l'acide salicylique

- Mis en œuvre de l'essai

Selon la méthodologie décrite précédemment, dans le paragraphe 4-1-1, l'essai est mis en œuvre pour l'acide salicylique dans une gamme de pH allant de 2 à 12.

- Retraitement manuel à l'aide du logiciel mathématique de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup>

- Le retraitement manuel

Le retraitement manuel consiste à centrer les données spectrales en diminuant le nombre de longueurs d'onde et la gamme de pH pris en compte.

-Les longueurs d'onde

Sans retraitement, l'ACP prend en compte les données spectrales de toutes les longueurs d'onde entre 235 et 600nm. Or, l'absorbance résiduelle est quasiment nulle après la longueur d'onde à 380nm. Lors du retraitement manuel, les données spectrales conservées sont comprises entre les longueurs d'onde à 235 et à 380nm.

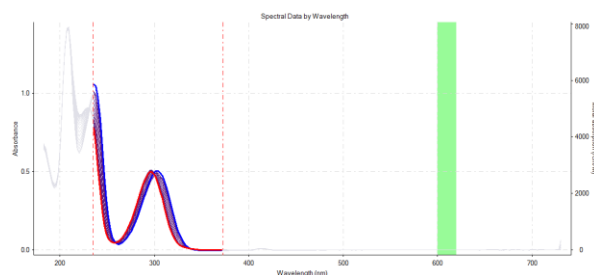


Figure II-11 : Absorbance en fonction des longueurs d'onde de l'acide salicylique

## -La gamme de pH

Sans retraitement, l'ACP prend en compte les données spectrales de toutes les valeurs de pH entre 1.8 et 12.2. Or, l'absorbance résiduelle est quasiment nulle après la valeur de pH 5.5. Lors du retraitement manuel, les données spectrales conservées sont comprises entre les valeurs de pH 1.8 et 5.5.

### ○ Le test du $X^2$

Le test du  $X^2$  compare la matrice initiale et la matrice reconstituée à partir des vecteurs propres et des valeurs propres déterminés par l'ACP. La valeur du test du  $X^2$  représente la justesse de l'essai (figure II-12).

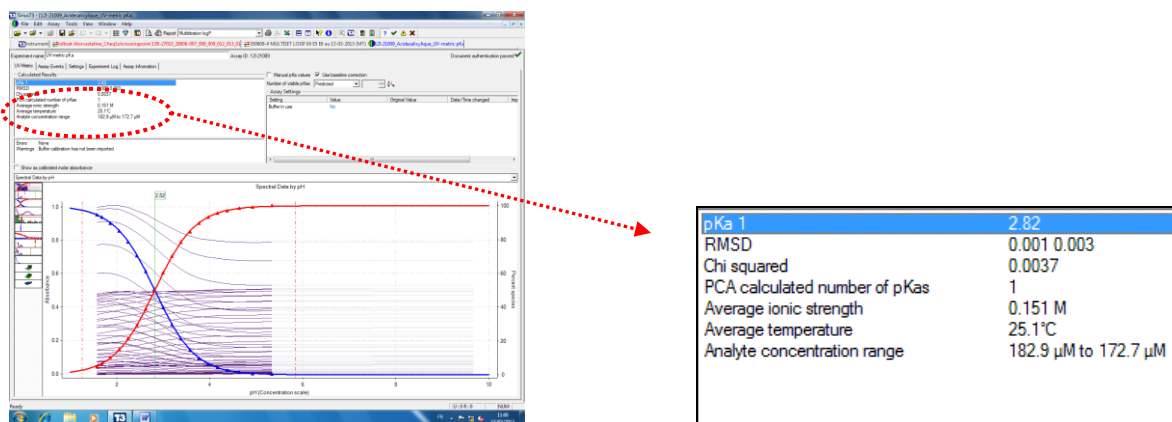


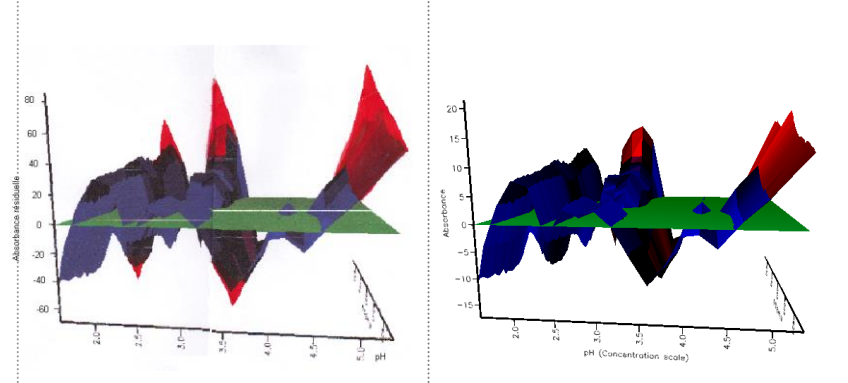
Figure II-12 : Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> à la fin de l'essai de détermination de la valeur du pK<sub>a</sub> acide de l'acide salicylique

L'absorbance résiduelle et la valeur du test du  $X^2$  sont plus élevées avant qu'après le retraitement. Le retraitement manuel permet donc une meilleure justesse de l'essai (tableau II-2).

Tableau II.2 : Valeur du test du  $X^2$  et de l'absorbance résiduelle lors de l'essai de détermination du  $pK_a$  de l'acide salicylique avant et après retraitement

	Avant retraitement manuel	Après retraitement manuel
$X^2$ moyen	0.0113	0.0037
Absorbance résiduelle	[-60 – 80]	[-10 – 15]

Absorbance résiduelle de l'acide salicylique



○ La densité de probabilité

L'inverse de la valeur du test du  $X^2$  exprime une densité de probabilité de présence du  $pK_a$ . La densité de probabilité est de 250 avant retraitement et de 280 après retraitement. Par ailleurs, l'aire sous la courbe est plus importante avant qu'après le retraitement (figure II-13). Par conséquent, le retraitement manuel permet également une meilleure justesse du  $pK_a$ .

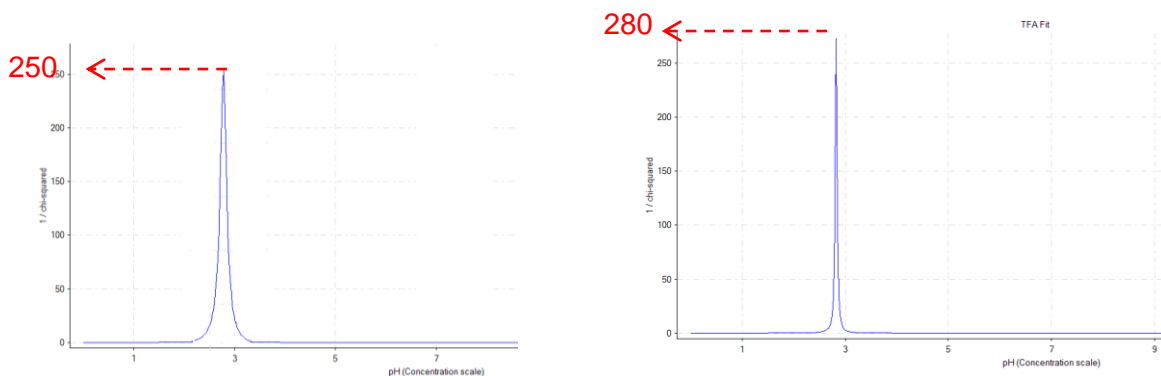


Figure II-13 : Densité de probabilité du  $pK_a$  du propranolol

• Interprétation

Le logiciel de retraitement de Sirius T3<sup>®</sup> utilise l'ACP pour déterminer le nombre de caractéristiques spectroscopiques distinctes présentes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. C'est-à-dire le nombre d'espèces indépendantes absorbant la lumière présente dans le milieu.

L'acide salicylique présente deux caractéristiques spectroscopiques distinctes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. Par conséquent, on peut affirmer que l'acide salicylique possède deux espèces indépendantes absorbantes la lumière dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-14).

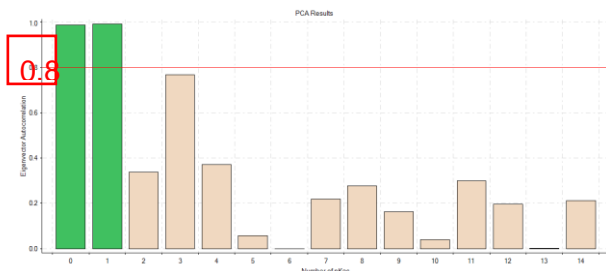


Figure II-14 : Nombre de composantes principales pour l'acide salicylique

Pour conclure, l'acide salicylique a un  $pK_a$  acide a  $2.82 \pm 0.01$  dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-15).

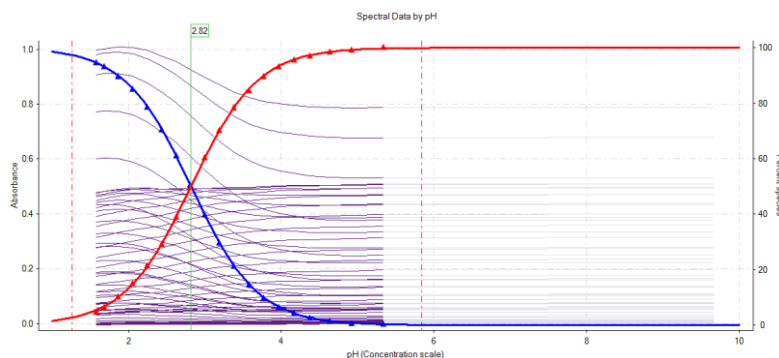


Figure II-15 : Spectre d'absorbance des espèces de l'acide salicylique en fonction du pH

### 5.3.1.2. Une base faible : Le propranolol

Validation du protocole de détermination des  $pK_a$  ayant une valeur de pH comprise entre 2 et 12 à 25°C pour une base faible, le propranolol (figure II-16) qui a été décrit dans la littérature<sup>23</sup>.

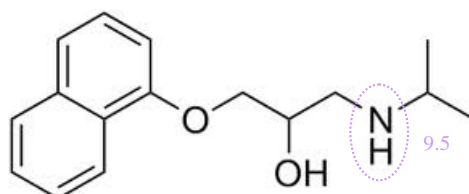


Figure II-16 : Structure chimique du propranolol

Le propranolol possède une fonction ionisable au niveau du groupement amine (figure II-16). Le  $pK_a$  de ce groupement est un  $pK_a$  basique ayant une valeur de pH de 9.50<sup>23</sup>.

- Informations préalables au début de l'essai

Le logiciel de retraitement mathématique du Sirius T3<sup>®</sup> a besoin de connaître le nombre, la nature et la valeur du ou des  $pK_a$  présents dans la gamme de pH de 2 à 12. On indique donc au logiciel du Sirius T3<sup>®</sup> que le propranolol a un  $pK_a$  basique possédant une valeur de 9.5 dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-17).

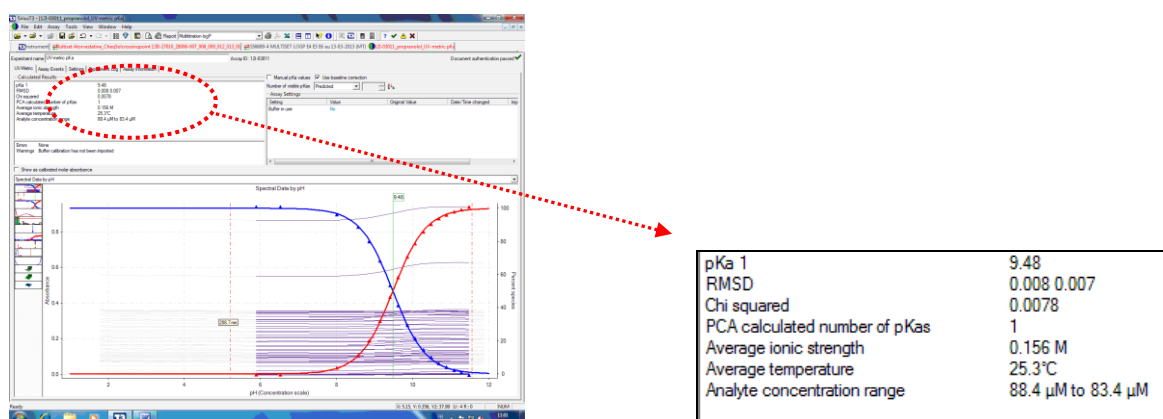


Figure II-17 : Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> avant le début de l'essai de détermination la valeur du  $pK_a$  basique du propranolol

- Mis en œuvre de l'essai

Selon la méthodologie décrite précédemment, dans le paragraphe 4-1-1, l'essai est mis en œuvre pour le propranolol dans une gamme de pH allant de 2 à 12.

- Retraitement manuel à l'aide du logiciel mathématique de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup>

- Le retraitement manuel

Le retraitement manuel consiste à centrer les données spectrales en diminuant le nombre de longueurs d'onde et la gamme de pH pris en compte.

-Les longueurs d'onde

Sans retraitement, l'ACP prend en compte les données spectrales de toutes les longueurs d'onde entre 235 et 600nm. Or, l'absorbance résiduelle est quasiment nulle après la longueur d'onde à 380nm. Lors du retraitement manuel, les données spectrales conservées sont comprises entre les longueurs d'onde à 235 et à 380nm.

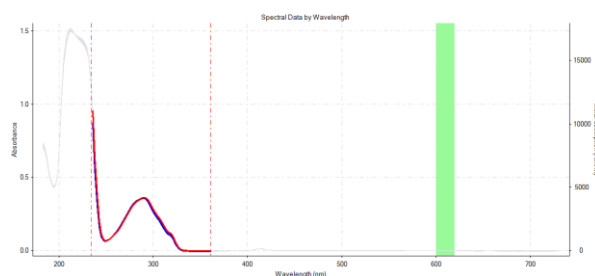


Figure II-18 :

Absorbance en fonction des longueurs



## -La gamme de pH

Sans retraitement, l'ACP prend en compte les données spectrales de toutes les valeurs de pH entre 1.8 et 12.2. Or, l'absorbance résiduelle est quasiment nulle avant la valeur de pH 6 et après 11.5. Lors du retraitement manuel, les données spectrales conservées sont comprises entre les valeurs de pH 6 et 11.5.

### ○ Le test du $X^2$

Le test du  $X^2$  compare la matrice initiale et la matrice reconstituée à partir des vecteurs propres et des valeurs propres déterminés par l'ACP. La valeur du test du  $X^2$  représente la justesse de l'essai (figure II-19).

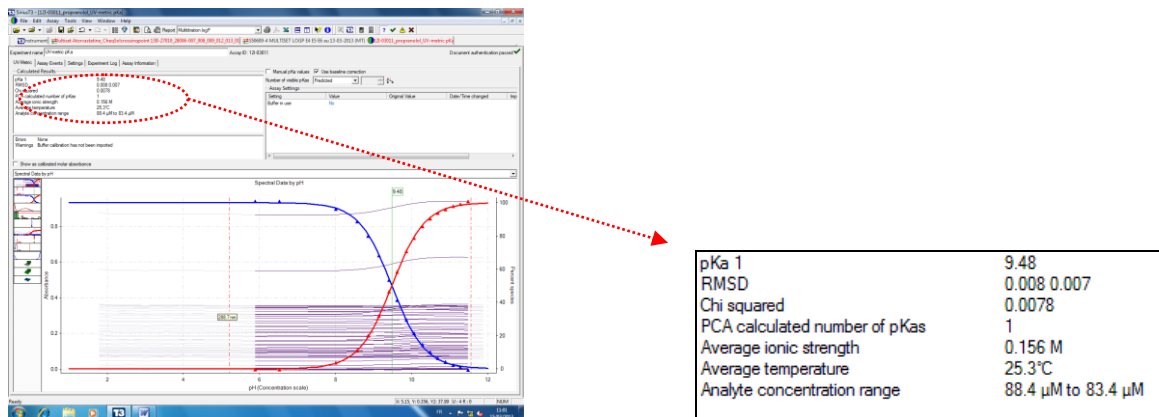


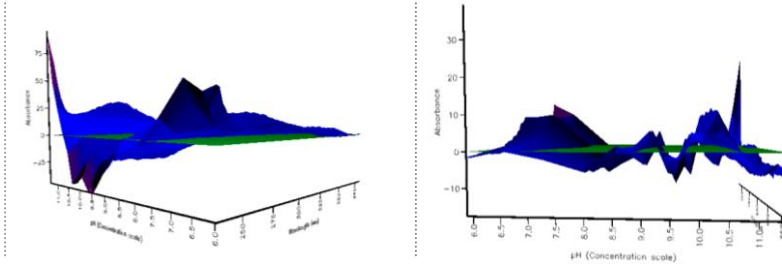
Figure II-19 : Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> à la fin de l'essai de détermination de la valeur du pK<sub>a</sub> du propranolol

L'absorbance résiduelle et la valeur du test du  $X^2$  sont plus élevées avant qu'après le retraitement. Le retraitement manuel permet donc une meilleure justesse de l'essai (tableau II-3).

Tableau II-3: Valeur du test du  $\chi^2$  et de l'absorbance résiduelle lors de l'essai de détermination du  $pK_a$  du propranolol avant et après retraitement

	Avant retraitement manuel	Après retraitement manuel
$\chi^2$ moyen	0.0203	0.0078
Absorbance résiduelle	[-30 – 85]	[-10 – 30]

Absorbance résiduelle du propranolol



- La densité de probabilité

L'inverse de la valeur du test du  $\chi^2$  exprime une densité de probabilité de présence du  $pK_a$ . La densité de probabilité est de 100 avant retraitement et de 125 après retraitement. Par ailleurs, l'aire sous la courbe est plus importante avant qu'après le retraitement (figure II-20). Par conséquent, le retraitement manuel permet également une meilleure justesse du  $pK_a$ .

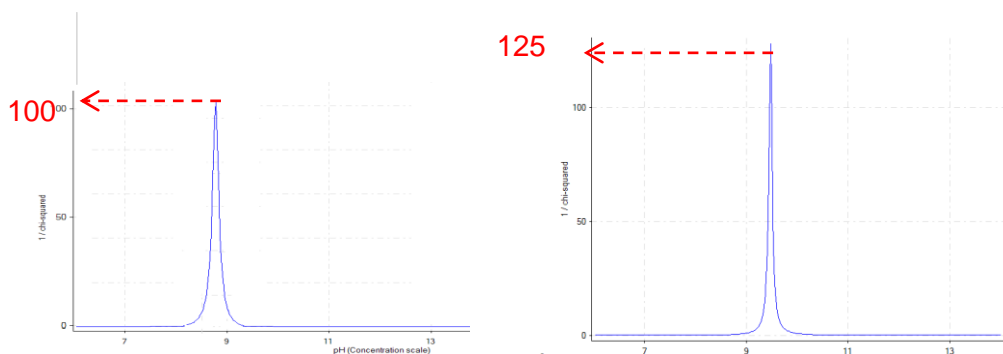


Figure II-20 : Densité de probabilité du  $pK_a$  du propranolol

- Interprétation

Le logiciel de retraitement de Sirius T3<sup>®</sup> utilise l'ACP pour déterminer le nombre de caractéristiques spectroscopiques distinctes présentes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. C'est-à-dire le nombre d'espèces indépendantes absorbant la lumière présente dans le milieu.

L'acide salicylique présente deux caractéristiques spectroscopiques distinctes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. Par conséquent, on peut affirmer que le propranolol possède deux espèces indépendantes absorbant la lumière dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-21).

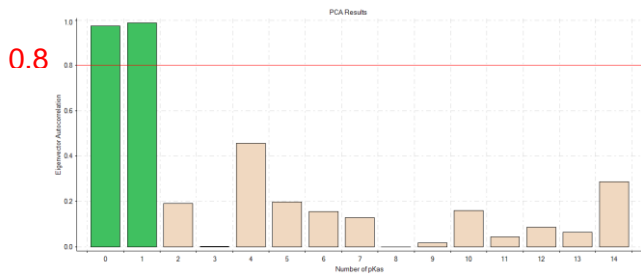


Figure II-21 : Nombre de composantes principales pour le propranolol

Pour conclure, le propranolol a un  $pK_a$  basique acide a  $9.48 \pm 0.01$  dans la gamme de pH de 2 à 12 (figure II-22).

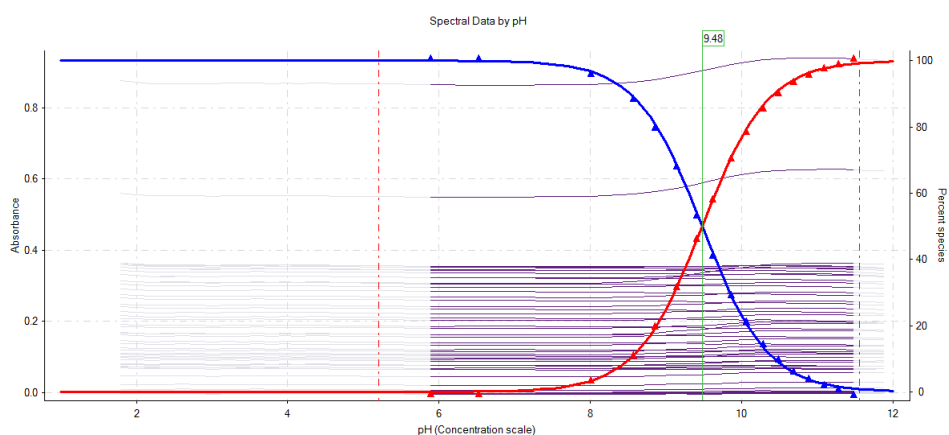


Figure II-22 : Spectre d'absorbance des espèces du propranolol en fonction du pH

### 5.3.2. Extension de la gamme de pH de 2 à 1 et de 12 à 13 pour le protocole de détermination des $pK_a$ à 25°C à l'aide d'une molécule Servier : S47693

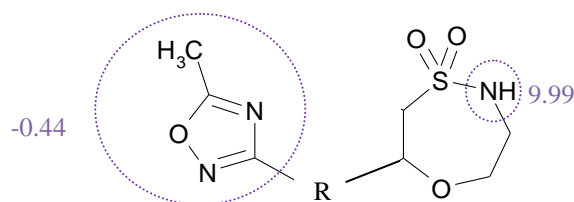


Figure II-23: Structure chimique du PA S 47693

Le PA S47693 possède trois fonctions ionisables. L'une au niveau de l'azote de la fonction « sulfonamide » et les deux autres sur les deux azotes de la fonction « -oxadiazol » (figure II-23). Le logiciel ACD® prédit 2  $pK_a$ , l'un acide à 9.99 sur l'azote de la fonction « sulfonamide » et l'autre basique à -0.44 pour l'ensemble de la fonction « -oxadiazole ».

- Information préalables au début de l'essai

On indique au logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> que le PA S47693 a un pK<sub>a</sub> acide possédant une valeur de 9.99 dans la gamme de pH de 2 à 12.

- Mis en œuvre de l'essai

Selon la méthodologie décrite précédemment dans le paragraphe 4-1-1, l'essai est mis en œuvre pour le PA S47693 dans une gamme de pH allant de 2 à 12.

- Retraitement manuel à l'aide du logiciel mathématique de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup>

- Le retraitement manuel

-Les longueurs d'onde

L'absorbance résiduelle augmente significativement avant 240nm. Afin de perdre le moins de données spectrales possibles, la région de longueurs d'onde prise en compte est étendue de 235 à 230nm (figure II-24).

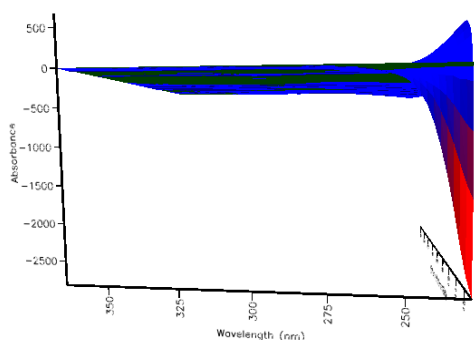


Figure II-24 : Absorbance résiduelle du PA S47693

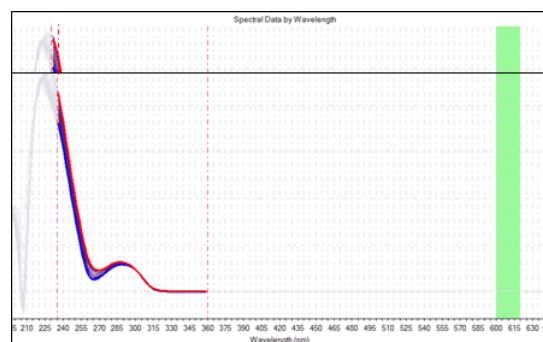


Figure II-25 : Absorbance en fonction des longueurs d'onde du PA S47693

Sans retraitement, l'ACP prend en compte les données spectrales de toutes les longueurs d'onde entre 235 et 600nm. Or, l'absorbance résiduelle est quasiment nulle après la longueur d'onde à 360nm. Lors du retraitement manuel, les données spectrales conservées sont comprises entre les longueurs d'onde à 230 et à 360nm (figure II-25).

- Le test du  $X^2$

Le test du  $X^2$  compare la matrice initiale et la matrice reconstituée à partir des vecteurs propres et des valeurs propres déterminés par l'ACP. La valeur du test du  $X^2$  est de 0.25 soit un coefficient de variation de 56.2%. Cet essai n'est donc pas acceptable.

- La densité de probabilité

L'inverse de la valeur du test du  $X^2$  exprime une densité de probabilité de présence du  $pK_a$ . La densité de probabilité est de 4 (figure II-26).

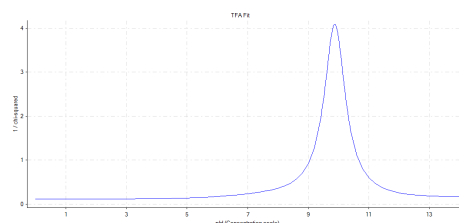


Figure II-26 : Densité de probabilité du  $pK_a$  du PA S47693

- Interprétation

Le logiciel de retraitement de Sirius T3<sup>®</sup> utilise l'ACP pour déterminer le nombre de caractéristiques spectroscopiques distinctes présentes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. C'est-à-dire le nombre d'espèces indépendantes absorbant la lumière présente dans le milieu.

Le PA S47693 présente trois caractéristiques spectroscopiques distinctes dans l'ensemble du spectre ayant une capacité de prédiction du modèle supérieure à 0.8. Le PA S47693 semble posséder trois espèces indépendantes absorbant la lumière. Il aurait donc deux  $pK_a$ .



Figure II-27: Nombre de composantes principales pour le PA S47693

- Nouvelle modélisation

On indique au logiciel de retraitement du Sirius T3<sup>®</sup> que le PA S47693 possède non pas un mais deux  $pK_a$ , contrairement à la prédiction faite par le logiciel ACD<sup>®</sup>.

- Le test du  $X^2$

La valeur du test du  $X^2$  de l'essai passe alors de 0.25 à 0.07.

- Interprétation

Le PA S47693 possède donc deux  $pK_a$ .

Ce deuxième pKa,  $pK_{a2}$ , a une valeur supérieure à 12 car sa densité de probabilité se situe à des valeurs de pH supérieur à 12 (figure II-28). La méthode utilisée ne permet d'étudier les  $pK_a$  supérieurs à 12.

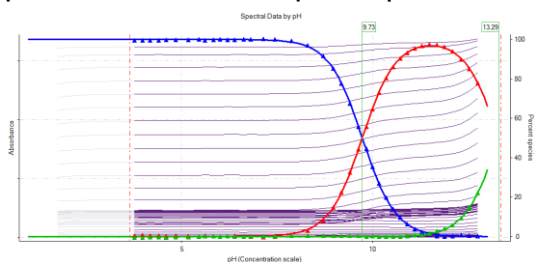


Figure II-28 : Absorbance en fonction des  $pK_a$

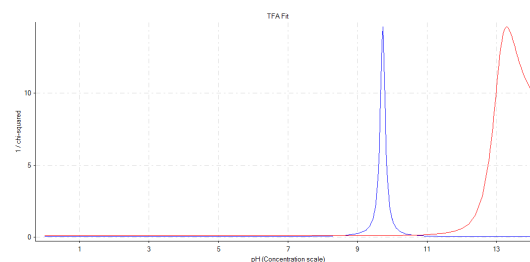


Figure II-29 : Densité de probabilité du pH du PA S47693

Le premier pKa,  $pK_{a1}$  prédit à 9.99 par le logiciel ACD<sup>®</sup>, possède une valeur de  $9.81 \pm 0.03$  (figure II-28). Un autre protocole permettant d'étudier les  $pK_a$  ayant une valeur supérieure à 12 doit être mis en place.

#### 5.3.1.1.

Mis en œuvre du protocole de détermination des  $pK_a$  ayant une valeur de pH de 1 à 2 ou de 12 à 13 à 25°C à l'aide de PA connus au sein du laboratoire Servier

Afin de confirmer et de mieux étudier le deuxième  $pK_a$  ( $pK_{a2}$ ) du PA S47693, la méthode des  $pK_a$  extrêmes est mise en place selon la méthodologie décrite dans le paragraphe 4-1-2 sur le PA S47693 et sur d'autres PA connus au sein du laboratoire Servier.

- Le PA S48168

Le S48168 possède deux fonctions ionisables se situant dans la gamme de pH de 3 à 11 (annexe 5-3-2-1 ; A).

Les expériences effectuées avec une pré-dose d'acide et celles avec une pré-dose de base indiquent chacune la présence de trois composantes principales, c'est-à-dire deux  $pK_a$ . Les valeurs de ces deux  $pK_a$  sont identiques quelque soit la méthode utilisée (tableau II-4).

Tableau II-4 : Valeurs du  $pK_{a1}$  et du  $pK_{a2}$  du PA S48168 lors des essais effectués avec une pré-dose d'acide et de base (annexe 5-3-2-1 ; B)

	X <sup>2</sup> moyen	CV moyen	$pK_{a1} \pm S.D$	$pK_{a2} \pm S.D$
Pré-dose d'acide	0.046	$\pm 9.4\%$	$3.56 \pm 0.00$	$6.65 \pm 0.00$
Pré-dose de base	0.013	$\pm 2.7\%$	$3.58 \pm 0.01$	$6.65 \pm 0.00$

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

La valeur du test du  $X^2$  donne un CV plus important pour les expériences accomplies avec une pré-dose d'acide que celle avec une pré-dose de base (tableau II-4).

Le  $pK_{a1}$  a une valeur de 3.6, il se situe donc à une distance du pH de 1.8 de la limite inférieure de pH de qualification de l'électrode (pH = 1.8). Le  $pK_{a2}$  possède un écart de pH de 6.6 avec la limite supérieure de qualification de l'électrode (pH = 12.2). Cette différence d'éloignement avec les limites de pH de qualification de l'électrode pourrait expliquer la différence entre les deux valeurs de  $X^2$ . Il se pourrait que l'injection de 0.3mL d'acide en une seule fois introduise une perturbation dans la solution analysée et donc du  $pK_{a1}$ .

Les deux valeurs du test du  $X^2$  restent satisfaisantes malgré leurs différences. Par conséquent, les essais sont acceptés.

- L'hydrochlorothiazide

L'hydrochlorothiazide est également testé. Le logiciel ACD<sup>®</sup> indique la présence de 3  $pK_a$  : -4, 7.80 et 9.20. L'intérêt de l'hydrochlorothiazide réside dans l'existence d'un  $pK_a$  situé vers -4 (annexe 5-3-2-1 ; C).

Les expériences effectués avec une pré-dose d'acide et celles avec une pré-dose de base indiquent chacune la présence de trois composantes principales, c'est-à-dire deux  $pK_a$ . La valeur du  $pK_{a2}$  est identique quelque soit la méthode utilisée contrairement à la valeur du  $pK_{a1}$  qui varie d'une valeur de pH de 0.18. Par ailleurs, lors des expériences avec une pré-dose d'acide, la valeur du test du  $X^2$  est de 1.04 pendant que celle des expériences avec une pré-dose de base est de 0.05 (tableau II-5).

Tableau II-5 : Valeurs du  $pK_{a1}$  et du  $pK_{a2}$  de l'hydrochlorothiazide lors des essais effectués avec une pré-dose d'acide et de base (annexe 5-3-2-1 ; D)

	$X^2$ moyen	CV moyen	$pK_{a1}$ ±S.D	$pK_{a2}$ ±S.D
Pré-dose d'acide	1.04	NR*	8.75 ±0.00	9.94 ±0.00
Pré-dose de base	0.05	±10.5%	8.69 ±0.03	9.76 ±0.03

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

\*NR : Essai non recevable

Les expériences accomplies avec la méthode des  $pK_a$  extrêmes acides ne sont pas acceptables. La valeur du test du  $X^2$  est trop élevée (tableau II-4). Ces expériences pourraient être perturbées par l'existence d'un  $pK_a$  à -4.

Les expériences accomplies avec la méthode des  $pK_a$  extrêmes basiques sont acceptables. La valeur du test du  $X^2$  est de 0.05 (tableau II-5). Elle est identique à celle du  $X^2$  lors des essais de  $pK_a$  extrêmes acides du PA S48168 (tableau II-4). Le  $pK_{a2}$  se situe à une distance du pH de 2.4. Il serait trop proche de la limite supérieure

de pH de qualification de l'électrode (pH = 12.2) comme le pK<sub>a</sub> du PA S48168 serait trop proche la limite inférieure de qualification de pH.

Par conséquent, afin d'obtenir des essais les plus exactes possibles, les pK<sub>a</sub> compris entre 3 et 11 doivent être effectués avec la méthode des pK<sub>a</sub> ayant une valeur dans la gamme de pH de 3 à 11 décrites dans le paragraphe 5-1-1. Ils doivent donc être déterminés sans pré-dose de titrant.

Le PCA ne calcule pas de pK<sub>a</sub> extrême pour les PA molécules ne contenant pas de pK<sub>a</sub> à l'extérieur de la gamme de pH de 3 à 11. Quand le PCA calcule un pK<sub>a</sub> extrême acide ou basique, il existe réellement.

5.3.2.2. Mis en œuvre du protocole de détermination des pK<sub>a</sub> ayant une valeur de pH de 1 à 2 et de 12 à 13 à 25°C sur la molécule Servier : S47693

- Le PA S47693

La méthode des pK<sub>a</sub> extrêmes acides est également effectuée sur le PA S47693. Un pK<sub>a</sub> extrême acide est observé, le pK<sub>a0</sub>. La valeur du test du X<sup>2</sup> est très élevée, elle est de 0.7. Par conséquent, on ne peut pas donner de valeur du pK<sub>a0</sub>, on peut seulement affirmer qu'il existe un pK<sub>a</sub> inférieur à 2 (annexe et figure 30).

La méthode des pK<sub>a</sub> extrêmes basiques est mise en œuvre sur le PA S47693. Un pK<sub>a</sub> est alors trouvé, le pK<sub>a2</sub>, il a pour valeur 13.11 ± 0.17 (annexe et figure II-30).

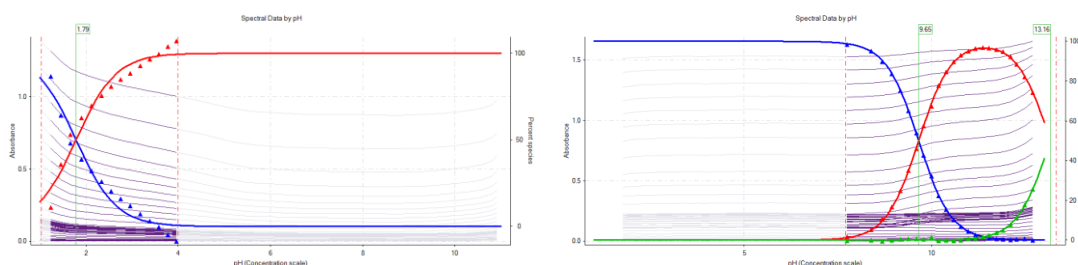


Figure II-30 : Absorbance en fonction du pH du PA S47693 avec la méthode des pK<sub>a</sub> extrêmes acides et des pK<sub>a</sub> extrêmes basiques

- L'impureté Y2169

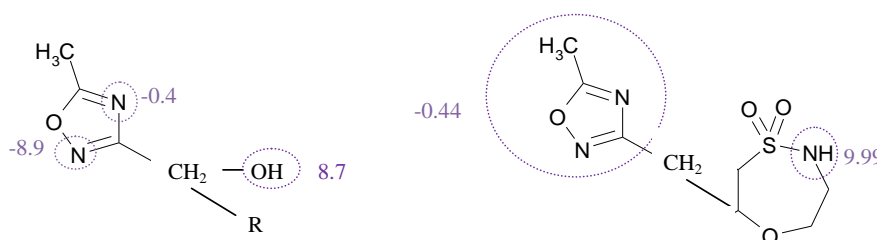


Figure II-31 : Structure chimique de l'impureté Y2163 et du PA S7693



L'impureté nommée Y2169 est un dérivé du S47693 qui correspond à la partie « -oxadiazole » (figure II-31). Le logiciel ACD<sup>®</sup> prédit 3 pK<sub>a</sub> dont les valeurs sont indiquées dans la figure II-31.

Lors des essais de pK<sub>a</sub> extrêmes acide, un pK<sub>a</sub> acide est observé, pK<sub>a0</sub>. Lors des essais de pK<sub>a</sub> extrêmes basiques, deux pK<sub>a</sub> sont constatés. Le premier, pK<sub>a1</sub>, a une valeur approximative de 9 correspond à la fonction « -hydroxy » de l'impureté. Le deuxième, pK<sub>a2</sub>, est un pK<sub>a</sub> extrême basique.

Etant donnée que le pK<sub>a1</sub> à 9 correspond à la fonction « -phénol », le pK<sub>a</sub> extrême acide et le pK<sub>a</sub> extrême basique appartiennent à la fonction « -oxadiazole ». On retrouve le même scénario que pour le PA S47693. L'impureté Y2163 correspondant à la partie « -hydroxy » du PA S47693 et contenant par conséquent la fonction « -oxadiazole », on peut tirer comme conclusion que la fonction « -oxadiazole » du PA S47693 possède également un pK<sub>a</sub> extrême acide et un pK<sub>a</sub> extrême basique.

- Hypothèse de la présence du pK<sub>a2</sub>

Le pK<sub>a2</sub> a une valeur de pH supérieur à 12. Dans ces conditions la fonction « -oxadiazole » se trouve dans un milieu très basique et le cycle pourrait s'ouvrir. L'ouverture du cycle pourrait s'effectuer selon deux possibilités que l'on peut visualiser dans la figure II-32 par des flèches rouges.

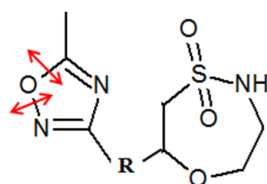
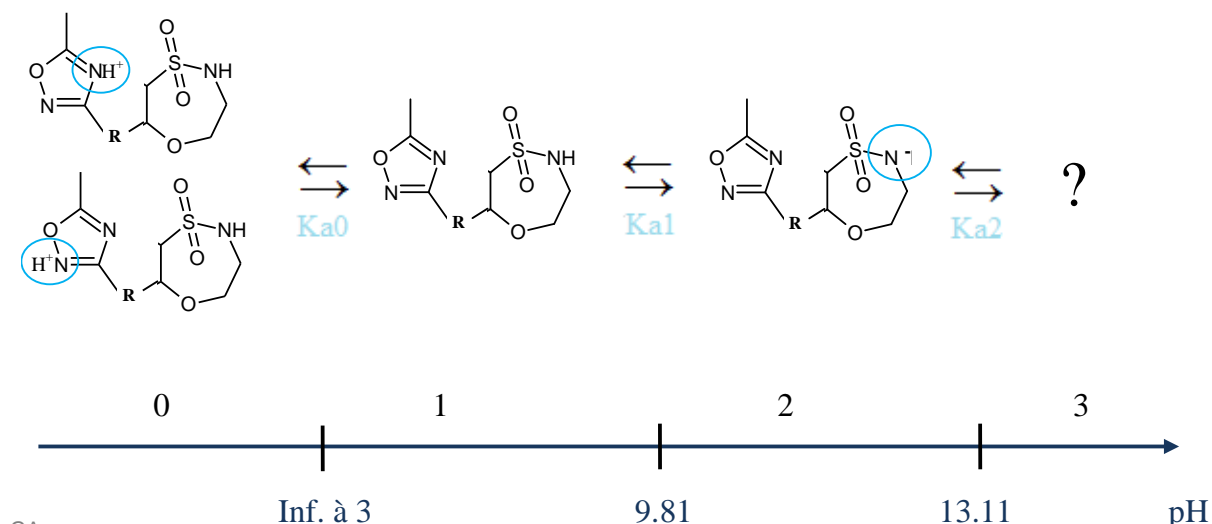


Figure II-32 : Structure chimique du PA S47693

### 5.3.2.3. Les différentes espèces à 25°C de la molécule Servier : S47693

Le PA S47693 possède trois étapes d'ionisation avec quatre espèces différentes.



Les valeurs des différentes constantes d'ionisation sont déterminées à partir de la matrice suivante :

$y$	=	1	1	1	1	1	$C(0)$
0		$K_{a0}$	$-H$	0	0	0	$C(1)$
0		0	$K_{a1}$	$-H$	0	0	$C(2)$
0		0	0	$K_{a2}$	$-H$	0	$C(3)$

### 5.3.3. Mis en œuvre du protocole de détermination des $pK_a$ ayant une valeur de pH de 1 à 13 à 37°C sur la molécule Servier : S47693

Les mêmes essais sont mis en œuvre sur le PA S47693 à une température de 37°C afin de simuler la température corporelle humaine.

Une recherche de  $pK_a$  dans la gamme de pH allant de 2 à 12 à 37°C est effectuée selon la méthodologie 4-1-1. Un  $pK_a$ ,  $pK_{a1}$ , est trouvé. La justesse des essais est de  $\pm 0.0\%$ . Le  $pK_{a1}$  possède une valeur de 9.55 avec une précision de  $\pm 0.13$  (tableau II-6).

Des essais de  $pK_a$  extrêmes acides et basiques sont mis en œuvre à 37°C selon la méthodologie 4-1-2. Un  $pK_a$  extrême acide,  $pK_{a0}$ , est observé. La justesse des essais est de  $\pm 5.6\%$ . Le  $pK_{a0}$  possède une valeur de 1.11 avec une précision de  $\pm 0.02$ . Par ailleurs, aucun  $pK_a$  extrême basique n'est détecté.

Tableau II-6 : Justesse et précision des essais de détermination du  $pK_{a0}$  et du  $pK_{a1}$  du PA S47693

	Justesse		Précision
	$X^2$ moyen	CV moyen	S.D des $pK_a$ extrêmes
Pré dose d'acide ( $pK_{a0}$ )	0.188	$\pm 5.6\%$	1.11 $\pm 0.13$
Sans pré-dose ( $pK_{a1}$ )	0.012	$\pm 0.0\%$	9.55 $\pm 0.02$

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

### 5.3.4. Comparaison des valeurs de $pK_a$ à 25 et 37°C pour la molécule Servier : S47693

Le  $pK_{a0}$  prend une valeur de pH plus basique à 37 qu'à 25°C. Le  $pK_{a1}$ , contrairement au  $pK_{a0}$ , possède une valeur plus acide à 37°C (tableau II-7).

Tableau II-7 : Valeurs des  $pK_a$  du PA S47693 à 25 et 37°C

	$pK_a \pm SD$ à 25°C	$pK_a \pm S.D$ à 37°C	$\Delta pK_a = pK_{a(25^\circ C)} - pK_{a(37^\circ C)}$
$pK_{a0}$	Non quantifiable	1.11 $\pm 0.13$	+
$pK_{a1}$	9.81 $\pm 0.03$	9.55 $\pm 0.02$	-0.26
$pK_{a2}$	13.11 $\pm 0.17$	Non détecté	?

La figure II-33 ci-dessous montre la différence de distribution des espèces en fonction de la gamme de pH de 6 à 12 par rapport au  $pK_{a1}$  à 25 et à 37°C.

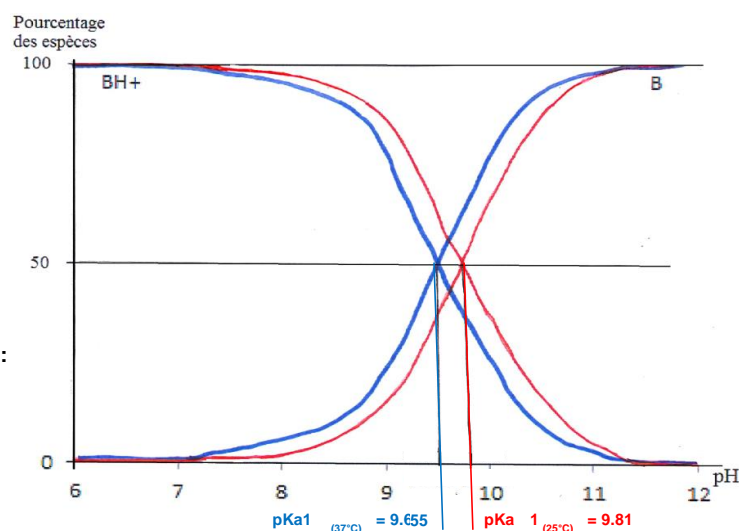


Figure II-33 :  
Distribution des espèces du PA S47693 en fonction du pH à 25 et 37°C

## 6. BILAN

La compréhension du retraitement des données spectrales des  $pK_a$  a permis de valider le protocole déjà expérimenté dans le service de Développement Analytique permettant la détermination de  $pK_a$  dans la gamme de pH allant de 2 à 12.

Lorsque cette étape fut terminée, de nouvelles possibilités ont pu être envisagées. L'extension de la gamme de pH de 1 à 3 et de 11 à 13 a pu être développée. Des molécules connues ont dans un premier temps été utilisées afin de valider ces nouveaux protocoles à 25 et à 37°C. Des molécules Servier en développement ont été ensuite testées à 25 et à 37°C, le PA S47693 et le PA S55370.

## Conclusion

L'objectif de cette thèse a été de valider le protocole de détermination de  $pK_a$  dans la gamme de pH allant de 2 à 12 puis d'étendre la gamme de pH de 1 à 3 et de 11 à 13 à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup>.

L'originalité de l'étude se situe à deux niveaux. Il existe très peu de laboratoire équipé du Sirius T3<sup>®</sup>. A ma connaissance, il y en aurait seulement quatre en France. Le caractère pluridisciplinaire de la thèse est également important. Les thématiques abordées sont variées : chimie analytique, spectrophotométrie, chimiométrie et statistiques.

Dans le premier chapitre, les principes fondamentaux de la spectroscopie UV-visible, les différents spectrophotomètres sont abordés. L'analyse des composantes principales et les équilibres acido-basiques sont expliqués.

Le deuxième chapitre des travaux de recherche. Un acide faible, l'acide salicylique, et une base faible, le propranolol, qui sont les molécules utilisées valident le protocole de détermination des  $pK_a$  dans la gamme de pH allant de 2 à 12. Les protocoles permettant l'extension de la gamme de pH de 1 à 3 et de 11 à 13 pour la détermination des  $pK_a$  ont également été validés par des molécules déjà publiées.

La molécule S47693 a ensuite été testée à 25 et à 37°C. C'est un PA Servier en phase de développement. Un  $pK_a$  est observé lors des trois protocoles différents (dans la gamme de pH allant de 1 à 3, dans la gamme de pH allant de 3 à 11 et dans la gamme de pH allant de 11 à 13). La forme neutre du PA est majoritaire dans la gamme de pH de 2 à 9 à 25 et 37°C. Le pH intestinal varie entre 5 et 9. Le PA S47693 est donc sous forme neutre dans l'intestin et pourra potentiellement traverser la barrière intestinale.

## Références bibliographiques

- <sup>1</sup>P. Jurs, B. Kowalski, T. Isenhour et C. Reilly. Computerized learning machines applied to chemical problems: Investigation of convergence rate and predictive ability of adaptive binary pat-tern classifiers. *Anal. Chem.*, 1969, 41 (6), p.690–695.
- <sup>2</sup>B.R. Kowalski. *Chemometrics. Chem. Ind.*, 1978, 22, p.882
- <sup>3</sup>G. Vandeginste et al. *Handbook of chemometrics and qualimetrics part A*, Elsevier, New York, 1988, 207p.
- <sup>4</sup>S. Wold and M. Sjöström. *Chemometrics, present and future success. Chemometr. Int. Lab. Syst.*, 1998, 44 (3), p.3-14
- <sup>5</sup>L. Bokobza. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 1998, 6 (3)
- <sup>6</sup>Y. Landry et J-P. Gies. *Pharmacologie : Des cibles vers l'indication thérapeutique*. 2<sup>ème</sup> éd. Dunod, 2009, 544p.
- <sup>7</sup>D. Skoog, D. West, F. Holler. « Introduction aux méthodes spectrochimiques », dans *Chimie analytique*. Traduit par C. Buess-Herman, J. Dauchot, F. Dumont. 1<sup>ère</sup> éd. De Boeck Supérieur, 1997, p.497-526
- <sup>8</sup>D. Skoog, D. West, F. Holler. « Spectroscopie d'absorption moléculaire », dans *Chimie analytique*. Traduit par C. Buess-Herman, J. Dauchot, F. Dumont. 1<sup>ère</sup> éd. De Boeck Supérieur, 1997, p.557-600
- <sup>9</sup>Vaubourdolle, M et al. « Spectroscopie d'absorption moléculaire UV-visible », dans *Le moniteur internat*, tome 1. Rueil-Malmaison : Wolters Kluwer France, 3<sup>ème</sup> édition, 2007, p.675-716
- <sup>10</sup>D. Skoog, D. West, F. Holler. « Les appareils de spectrométrie optiques », dans *Chimie analytique*. Traduit par C. Buess-Herman, J. Dauchot, F. Dumont. 1<sup>ère</sup> éd. De Boeck Supérieur, 1997, p.527-556
- <sup>11</sup>W.W. Cooley et P.R. Lohnes. *Multivariate data analysis*. Wiley, 1971, 364p.
- <sup>12</sup>L. Lebart, A. Morineau et K.M. Warwick. *Multivariate descriptive statistical analysis, Multivariate descriptive statistical analysis correspondence analysis and related techniques for large matrices*. Wiley, 1984, 231p.
- <sup>13</sup>M.G. Greenacre. *Theory and applications of correspondence analysis*. Academic Press, 1984, 364p.
- <sup>14</sup>Vaubourdolle, M et al. « Les ions en solutions », dans *Le moniteur internat*, tome 1. Rueil-Malmaison : Wolters Kluwer France, 3<sup>ème</sup> édition, 2007, p.513-570
- <sup>15</sup>M. Guernet, E. Guernet et C. Herrenknecht. *Chimie analytique : équilibre en solution*. Dunod, 2004, 211p.

- <sup>16</sup>M.H. Abraham et al. Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. *Drug Discov. Today* 7, 2002, p.1056-1063
- <sup>17</sup>A.D. Baxter and P.M. Lockey. 'Hit' to 'lead' and 'lead' to 'candidate' optimisation using multi-parametric principles. *Drug Discov. World* 3, 2001, p.9-15
- <sup>18</sup>K.J. Box and J.E.A. Comer. Using measured pKa, log P and solubility to investigate supersaturation and predict BCS Class. *Current Drug Metabolism* 9, 2008, p.869-878
- <sup>19</sup>E. Mark, E « A guide to Log P and pKa measurements and their use » dans pKa and Log P measurements. 2006. <http://www.raell.demon.co.uk/chem/logp/logppka.htm>
- <sup>20</sup>J. Comer and K. Box. Introduction to pH measurement. Sirius Analytical Instruments Ltd, 30p.
- <sup>21</sup>R.I. Allen et al. Multiwavelength spectrometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, p.699-712
- <sup>22</sup>L. Geiser et al. Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. *J Sep Sci.* 2005, 28(17), p.2374-2380.
- <sup>23</sup>E. Fuguet. A fast method for pKa determination by capillary electrophoresis. *Chem Biodivers.* 2009, 6(11) p.1822-1827

## Table des illustrations

Figure I-1	Domaine spectraux du rayonnement électromagnétique .....	18
Figure I-2	Schéma d'une transition électronique .....	18
Figure I-3	Faisceau incident $I_0$ et faisceau transmis $I$ .....	19
Figure I-4	Spectre UV-visible d'une molécule .....	20
Figure I-5	Principales transitions électroniques .....	20
Figure I-6	Principe d'un spectromètre d'absorption .....	21
Figure I-7	Modèle de spectrophotomètres .....	24
Figure I-8	Représentation d'un nuage de points de $n$ individus à $p$ dimensions ..	25
Figure I-9	Reconstruction des données .....	26
Figure I-10	Illustration de l'accumulation de variance « scree test » de Cattell .....	32
Figure I-11	Cercle de corrélation .....	33
Figure I-12	Cercle de corrélation .....	34
Figure I-13	Plan factoriel représentant des individus .....	34
Figure I-14	Plan factoriel ( $c^1, c^2$ ) représentant un individu $i$ .....	35
Figure I-15	Structure du cation oxonium dans l'eau .....	41
Figure I-16	Forces des acides et des bases .....	45
Figure I-17	Diagramme de prédominance des espèces d'un couple $HA/A^-$ .....	45
Figure I-18	Diagramme de prédominance des espèces de la glycérine .....	46
Figure I-19	Courbes de neutralisation de l'acide nitrique ( $HNO_3$ ) par KOH ou de NaOH par HCl .....	52
Figure I-20	Courbes de neutralisation de $CH_3COOH$ par NaOH ou de $NH_3^+$ par HCl .....	53
Figure I-21	Courbe de neutralisation de l'acide fluorhydrique (HF) ou de l'acide benzoïque ( $C_6H_5COOH$ ) par $NH_3$ .....	54
Figure I-22	Courbes de neutralisation de $H_3PO_4$ par NaOH .....	55
Figure II-1	La genèse d'un médicament .....	58
Figure II-2	La phase d'optimisation .....	58
Figure II-3	Diagramme de prédominance des espèces .....	59
Figure II-4	Classification BCS .....	60
Figure II-5	Composition du Sirius T3® .....	61
Figure II-6	Cellule de mesure .....	61
Figure II-7	Composition du spectrophotomètre UV/visible .....	61
Figure II-8	Assurance qualité au niveau du développement analytique .....	63
Figure II-9	Structure chimique de l'acide salicylique .....	67
Figure II-10	Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3® avant le début de l'essai de détermination la valeur du $pK_a$ acide de l'acide salicylique .....	68
Figure II-11	Absorbance en fonction des longueurs d'onde de l'acide salicylique ..	68
Figure II-12	Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3® à la fin de l'essai de détermination de la valeur du $pK_a$ acide de l'acide salicylique .....	69
Figure II-13	Densité de probabilité du $pK_a$ du propranolol .....	70
Figure II-14	Nombre de composantes principales pour l'acide salicylique .....	71
Figure II-15	Spectre d'absorbance des espèces de l'acide salicylique en fonction du pH .....	71
Figure II-16	Structure chimique du propranolol .....	71
Figure II-17	Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3® avant le début de l'essai de détermination la valeur du $pK_a$ basique du	

	propranolol .....	72
Figure II-18	Absorbance en fonction des longueurs .....	72
Figure II-19	Impression écran du logiciel de retraitement du Sirius T3 <sup>®</sup> à la fin de l'essai de détermination de la valeur du pK <sub>a</sub> du propranolol .....	73
Figure II-20	Densité de probabilité du pK <sub>a</sub> du propranolol .....	74
Figure II-21	Nombre de composantes principales pour le propranolol .....	75
Figure II-22	Spectre d'absorbance des espèces du propranolol en fonction du pH .....	75
Figure II-23	Structure chimique du PA S47693 .....	75
Figure II-24	Absorbance résiduelle du PA S47693 .....	76
Figure II-25	Absorbance en fonction des longueurs d'onde du PA S47693 .....	76
Figure II-26	Densité de probabilité du pK <sub>a</sub> du PA .....	77
Figure II-27	Nombre de composantes principales pour le PA S47693 .....	77
Figure II-28	Absorbance en fonction des pK <sub>a</sub> .....	78
Figure II-29	Densité de probabilité du pH du PA S47693 .....	78
Figure II-30	Absorbance en fonction du pH du PA S47693 avec la méthode des pK <sub>a</sub> extrêmes acides et des pK <sub>a</sub> extrêmes basiques .....	80
Figure II-31	Structure chimique de l'impureté Y2163 et du PA S7693 .....	80
Figure II-32	Structure chimique du PA .....	81
Figure II-33	Distribution des espèces du PA S47693 en fonction du pH à 25 et 37°C .....	81



## Table des tableaux

Tableau I-1	Répartition des valeurs propres et des pourcentages de variance associées à chacune des composants principales .....	31
Tableau I-2	Récapitulatif des abréviations et des formules des items utilisés dans la partie 3 du premier chapitre .....	37
Tableau II-1	Justesse et précision de la micropipette proline et de la micropipette Evol	64
Tableau II-2	Valeur du test du $X^2$ et de l'absorbance résiduelle lors de l'essai de détermination du $pK_a$ de l'acide salicylique avant et après retraitement ...	70
Tableau II-3	Valeur du test du $X^2$ et de l'absorbance résiduelle lors de l'essai de détermination du $pK_a$ du propranolol avant et après retraitement .....	74
Tableau II-4	Valeurs du $pK_{a1}$ et du $pK_{a2}$ du PA S48168 lors des essais effectués avec une pré-dose d'acide et de base .....	78
Tableau II-5	Valeurs du $pK_{a1}$ et du $pK_{a2}$ de l'hydrochlorothiazide lors des essais effectués avec une pré-dose d'acide et de base .....	79
Tableau II-6	Justesse et précision des essais de détermination du $pK_{a0}$ et du $pK_{a1}$ du PA S47693 .....	82
Tableau II-7	Valeurs des $pK_a$ du PA S47693 à 25 et 37°C .....	82

## Table des annexes

Annexe 4.1. ....	91
Annexe 4.2.1. ....	92
Annexe 4.2.2. ....	92
Annexe 4.2.2. ....	92
Annexe 5.1.1. ....	93
Annexe 5.1.2. ....	93
Annexe 5.2.2. ; A ....	94
Annexe 5.2.2. ; B ....	94
Annexe 5.2.2. ; C ....	94
Annexe 5.2.2 ; D ....	95
Annexe 5.2.2. ; E ....	96
Annexe 5.3.1. ....	97
Annexe 5.3.2.1. ; A ....	98
Annexe 5.3.2.1. ; B ....	98
Annexe 5.3.2.1. ; A ....	98
Annexe 5.3.2.1. ; B ....	99
Annexe 5.3.2.1. ; C ....	100
Annexe 5.3.1. ; D ....	100
Annexe 5.3.2.2. ; A ....	100
Annexe 5.3.2.2. ; B ....	103
Annexe 5.4.1. ....	104

# Annexes

## Annexe 4.1.: Eau pour chromatographie

volume prélevé : 25 µl eau purifiée

$\rho = 1.000 \text{ mg}/\mu\text{l}$  à 25°C

**Biohitt 5-100µl PM10893**

m (mg)	v (µl)
23.54	23.54
23.51	23.51
23.64	23.64
23.83	23.83
24.49	24.49
24.47	24.47
24.67	24.67
24.64	24.64
24.54	24.54
24.7	24.70
24.59	24.59
24.55	24.55
24.47	24.47
24.26	24.26
24.56	24.56
24.66	24.66
24.36	24.36
24.64	24.64
24.48	24.48
24.55	24.55

Ev (µl) = **-0.64**  
 E% = **-2.6**  
 Sv (µl) = **0.39**  
 cv% = **1.6**

erreur systématique

erreur aléatoire

**Evol : seringue 50µl vitesse = 5**

m (mg)	v (µl)
24.91	24.91
24.94	24.94
24.98	24.98
24.99	24.99
24.95	24.95
24.97	24.97
24.96	24.96
24.95	24.95
24.96	24.96
24.99	24.99
25.00	25.00
24.98	24.98
24.98	24.98
25.00	25.00
24.98	24.98
25.01	25.01
24.97	24.97
24.97	24.97
25.06	25.06
25.00	25.00

Ev (µl) = **-0.02**  
 E% = **-0.1**  
 Sv (µl) = **0.03**  
 cv% = **0.1**

## Méthanol

volume prélevé : 25 µl méthanol

$\rho = 0.785 \text{ mg}/\mu\text{l}$  à 25°C

**Biohitt 5-100µl PM10893**

m (mg)	v (µl)
14.47	18.43
17.77	22.64
18.17	23.15
18.71	23.83
19.45	24.78
19.45	24.78
19.48	24.82
18.96	24.15
17.93	22.84
19.04	24.25
19.42	24.74
19.01	24.22
19.16	24.41
19.10	24.33
18.39	23.43
19.18	24.43
19.13	24.37
18.67	23.78
18.91	24.09
18.96	24.15

Ev (µl) = **-0.94**  
 E% = **-3.8**  
 Sv (µl) = **0.64**  
 cv% = **2.7**

valeur non retenue: perte de méthanol au moment du transfert

erreur systématique

erreur aléatoire

**Evol : seringue 50µl vitesse = 5**

m (mg)	v (µl)
19.67	25.06
19.70	25.10
19.69	25.08
19.73	25.13
19.71	25.11
19.52	24.87
19.59	24.96
19.57	24.93
19.55	24.90
19.60	24.97
19.62	24.99
19.52	24.87
19.62	24.99
19.67	25.06
19.36	24.66
19.40	24.71
19.57	24.93
19.52	24.87
19.23	24.50
19.31	24.60

Ev (µl) = **-0.09**  
 E% = **-0.3**  
 Sv (µl) = **0.18**  
 cv% = **0.7**

Annexe 4.2.1. : Précision de la balance XP 26 (Mettler Toledo, Suisse)

	Masse mesurée	Moyenne	Précision	
Masse 1	0.52	0.50	0.012mg	2.45%
	0.49			
	0.49			
Masse 2	0.72	0.77	0.040mg	5.24%
	0.83			
	0.75			
Masse 3	0.77	0.78	0.022mg	2.87%
	0.80			
	0.78			

Annexe 4.2.2.: Aténolol (low log P)

Masse (mg)	Log P <sup>0</sup> ±S.D	Log P <sup>1</sup> ±S.D
0.59	0.42 ±0.02	-0.46 ±0.05
0.61	0.36 ±0.02	-0.68 ±0.09
<b>0.64</b>	<b>0.31 ±0.03</b>	<b>-0.90 ±0.2</b>
0.67	0.42 ±0.02	-0.46 ±0.05
0.69	0.42 ±0.03	-0.46 ±0.07
0.76	0.32 ±0.03	-0.86 ±0.22

Moyenne	0.66mg	0.38	-0.64
Précision	±0.034mg	±0.03	±0.12
	±5.19%	±7.76%	±18.20%

Annexe 4.2.2.: Pindolol (medium log P)

Masse (mg)	Log P <sup>0</sup> ±S.D	Log P <sup>1</sup> ±S.D
0.65	1.91 ±0.00	-0.51 ±0.02
0.77	1.92 ±0.00	-0.55 ±0.03
0.80	1.92 ±0.00	-0.53 ±0.02
<b>0.83</b>	<b>1.92 ±0.00</b>	<b>-0.53 ±0.02</b>
0.87	1.92 ±0.00	-0.53 ±0.01
0.90	1.96 ±0.01	-0.50 ±0.06

Moyenne	0.80mg	1.93	-0.53
Precision	±0.049mg	±0.01	±0.01
	±6.16%	±0.51%	±1.87%

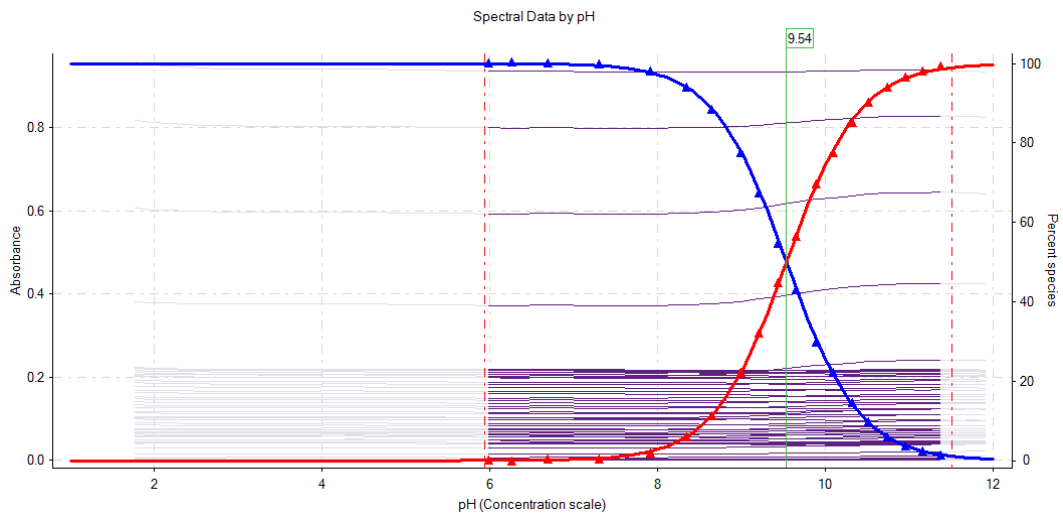
Annexe 5.1.1. :

PA	Température	Solution mère			Volume de départ
		Solvant	Concentration	Volume injecté	KCL, 0.15M
S47693	25°C	Acétonitrile	10mM	10µL	1.5mL
	37°C	Acétonitrile	10mM	10µL	1.5mL

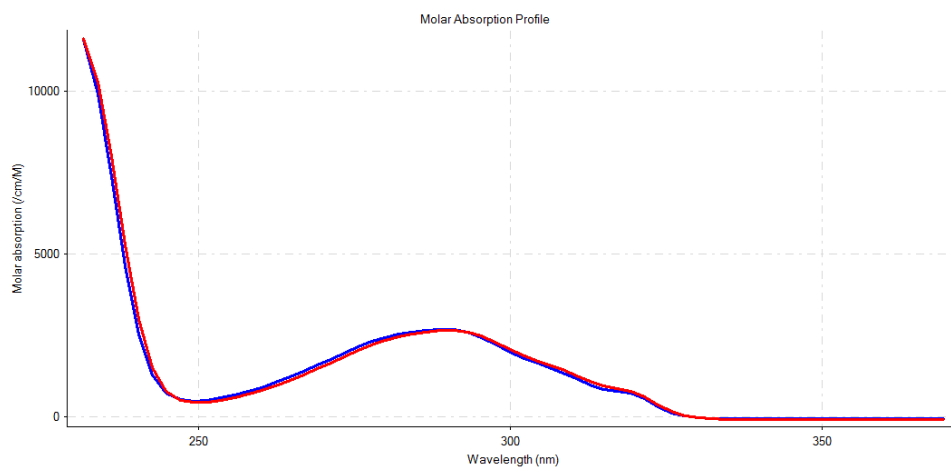
Annexe 5.1.2. :

PA	Température	Solution mère			Volume de départ	
		Solvant	Concentration	Volume injecté	KCl 0.15M	Titants
S47693	25°C	Dioxane	12.4mM	10µL	1.2mL	0.3mL HCl
		Dioxane	12.4mM	10µL	1.2mL	0.3mL KOH
	37°C	Dioxane	12.4mM	10µL	1.2mL	0.3mL HCl
		Dioxane	12.4mM	10µL	1.2mL	0.3mL KOH
S48168	25°C	Eau	23.7mM	10µL	1.2mL	0.3mL HCl
		Eau	23.7mM	10µL	1.2mL	0.3mL KOH
HCZ	25°C	Méthanol	10.6mM	17µL	1.2mL	0.3mL HCl
		Méthanol	10.6mM	17µL	1.2mL	0.3mL KOH
Y2169	25°C	DMSO	30.6mM	17µL	1.2mL	0.3mL HCl
		DMSO	30.6mM	17µL	1.2mL	0.3mL KOH

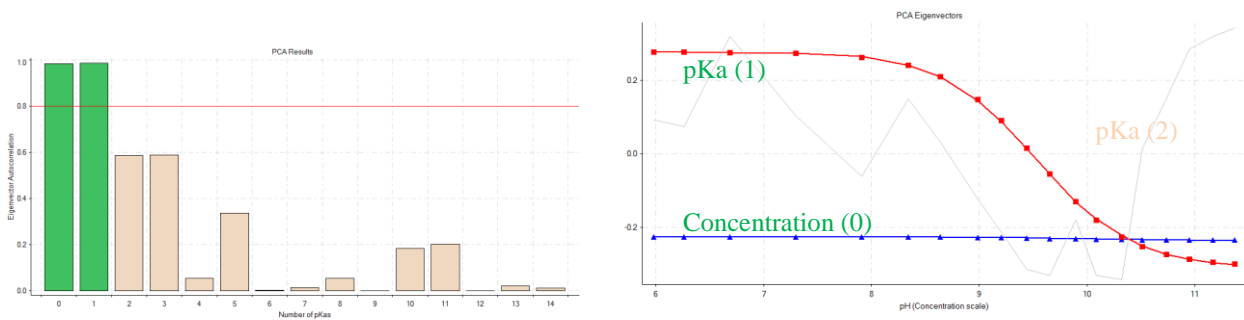
**Annexe 5.2.2. ; A : Matrice C, Spectre des concentrations des différentes espèces du propranolol en fonction du pH**



**Annexe 5.2.2. ; B : Matrice E, Spectre des coefficients d'extinction des différentes Espèces du propranolol en fonction des longueurs d'onde**

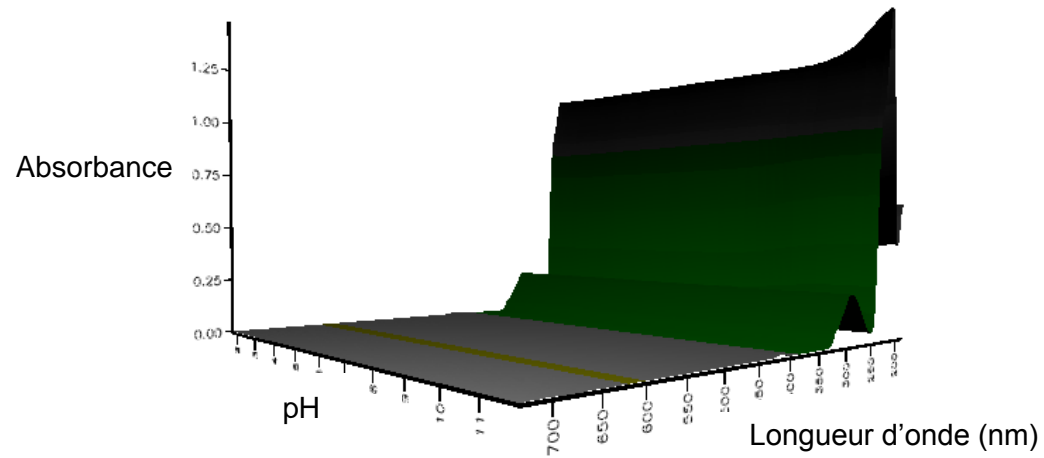


**Annexe 5.2.2. ; C : Nombre de composantes principales pour le propranolol**



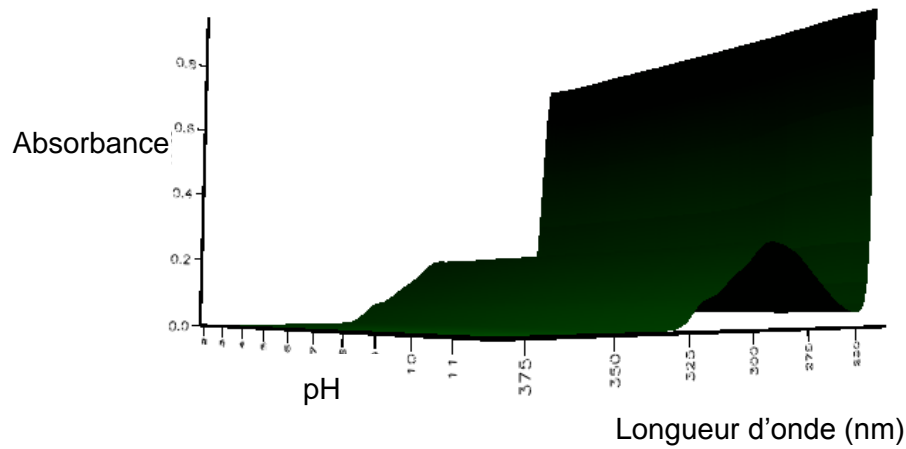
Annexe 5.2.2 ; D :

Matrice initiale = Matrice reconstituée + résidu matriciel

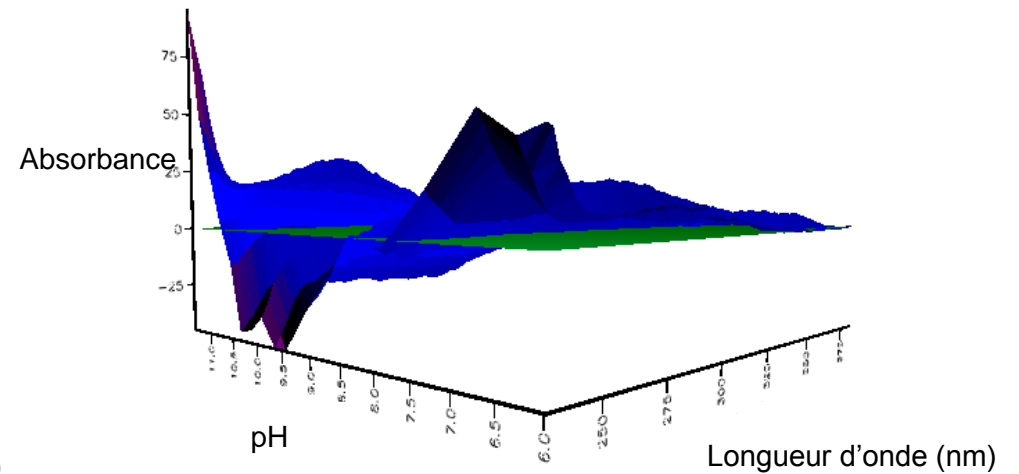


Matrice d'absorbance A

=



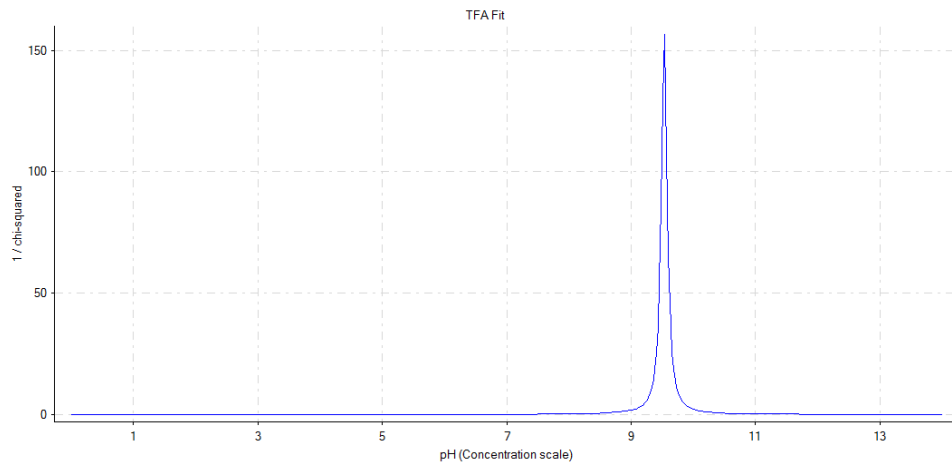
Matrice d'absorbance reconstituée (A')



+

Résidu matriciel

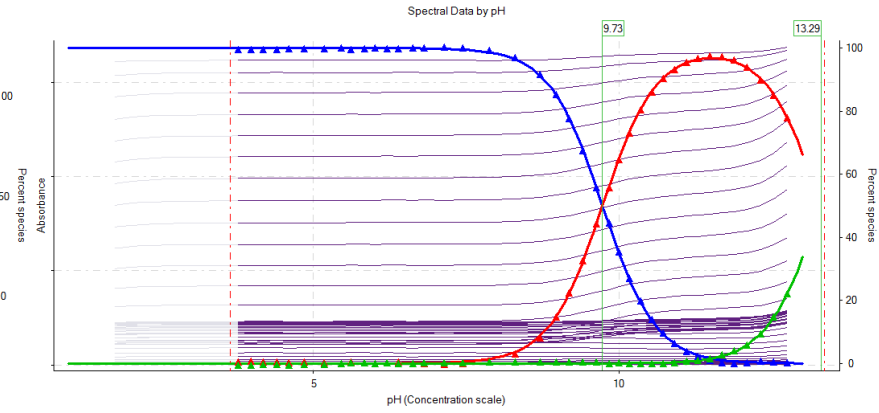
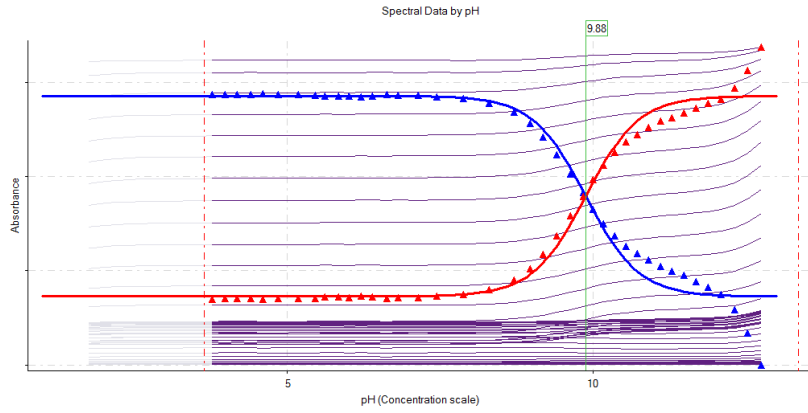
## Annexe 5.2.2. ; E : Densité de probabilité du $pK_a$ en fonction du pH



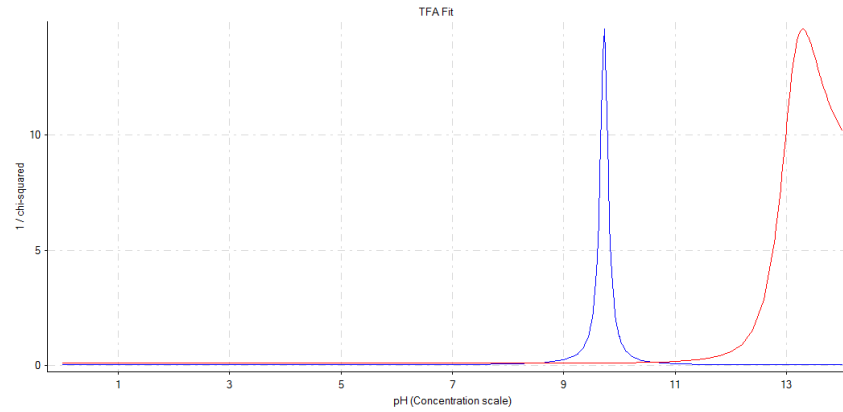
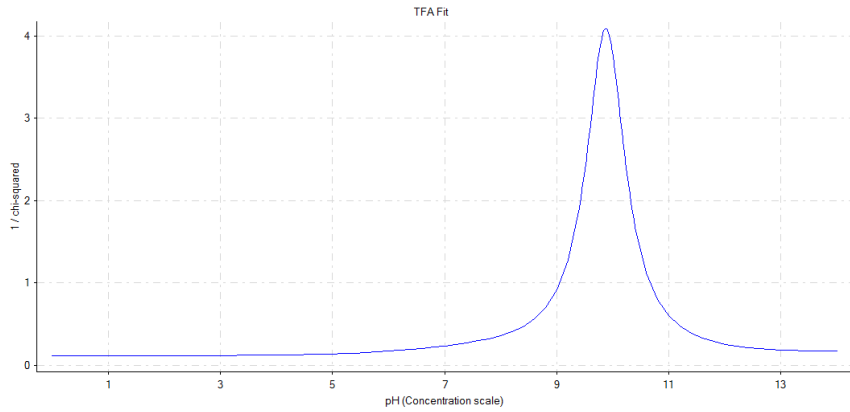


## Annexe 5.3.1., B : Le PA S47693

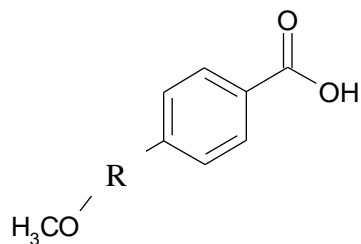
### Absorbance en fonction du pH du PA S47693



### Densité de probabilité du PA S47693



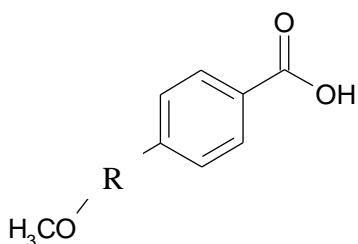
Annexe 5.3.2.1., A : Structure chimique du S48168



Annexe 5.3.2.1., B : Essais sur le PA S48168

		$\chi^2$	CV	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a1</sub> ±S.D	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a2</sub> ±S.D
Pré-dose d'acide	Essai 1	0.05	11%	3.59	3.58 ±0.01	6.65	6.65 ±0.00
	Essai 2	0.03	6%	3.57		6.65	
	Essai 3	0.06	11%	3.57		6.65	
Pré-dose de base	Essai 1	0.02	3%	3.56	3.56 ±0.00	6.65	6.65 ±0.00
	Essai 2	0.01	2%	3.56		6.65	

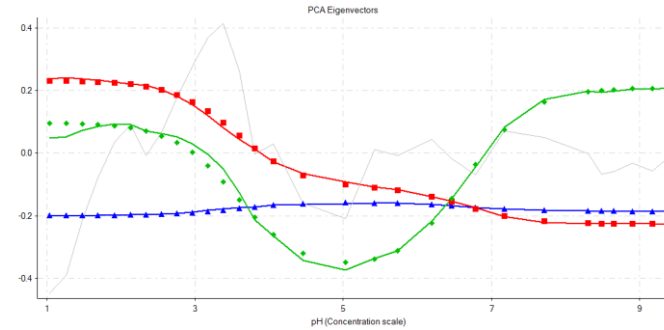
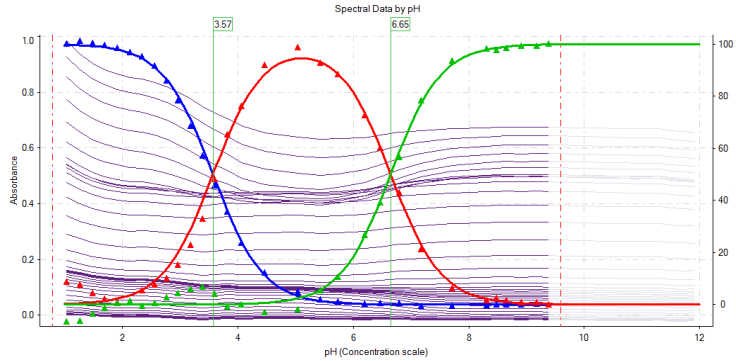
Annexe 5.3.2.1., A : Structure chimique du S48168



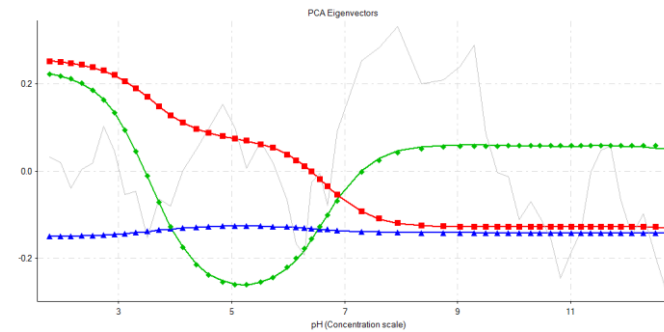
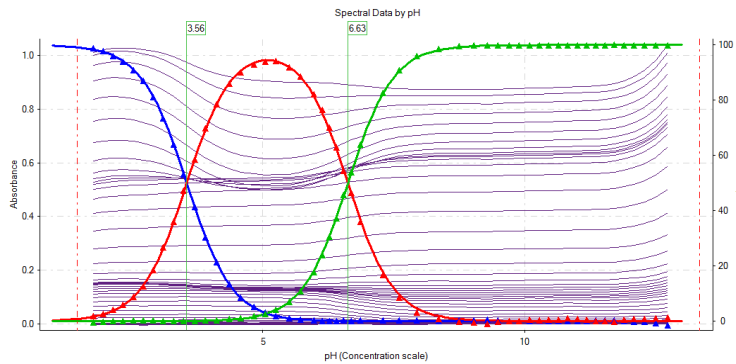
### Annexe 5.3.2.1., B : Essais sur le PA S48168

		$\chi^2$	CV	$pK_{a1}$	$pK_{a1} \pm S.D$	$pK_{a2}$	$pK_{a2} \pm S.D$
Pré-dose d'acide	Essai 1	0.05	11%	3.59	$3.58 \pm 0.01$	6.65	$6.65 \pm 0.00$
	Essai 2	0.03	6%	3.57			
	Essai 3	0.06	11%	3.57			
Pré-dose de base	Essai 1	0.02	3%	3.56	$3.56 \pm 0.00$	6.65	$6.65 \pm 0.00$
	Essai 2	0.01	2%	3.56			

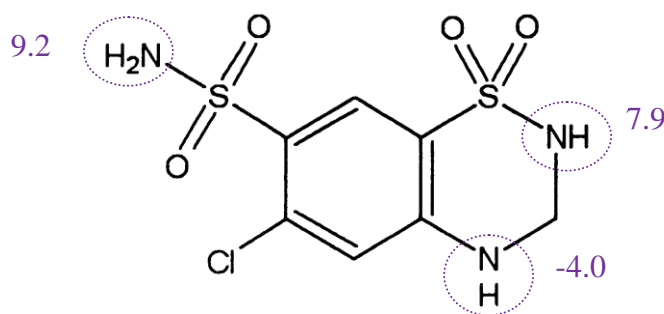
#### Pré-dose d'acide du PA S48163



#### Pré-dose de base du PA S48163



### Annexe 5.3.2.1.,C : Structure chimique de l'hydrochlorothiazide



### Annexe 5.3.1., D : Essais sur l'hydrochlorothiazide

		X <sup>2</sup>	C.V	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a1</sub> ±S.D	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a2</sub> ±S.D
Pré-dose d'acide	Essai 1	0.73	260%	8.75	8.75 ±0.00	9.95	9.94 ±0.00
	Essai 2	1.61	NR*	-		-	
	Essai 3	0.79	310%	8.75		9.94	
Pré-dose de base	Essai 1	0.09	19%	8.67	8.69 ±0.03	9.80	9.76 ±0.03
	Essai 2	0.03	7%	8.72		9.74	
	Essai 3	0.03	6%	8.68		9.76	

\*NR : essai non recevable

### Annexe 5.3.2.2., A : Retraitement

- L'impureté Y2163

Le premier essai de retraitement des expériences de pK<sub>a</sub> extrême acide de l'impureté Y2163 garde les données spectrales situées entre les valeurs de pH 1 et 2.8. La valeur de pH de 2.8 correspond à une unité de pH au-dessus de la limite inférieure de calibration de l'électrode, ΔpH = 1. Les essais de retraitement suivants conservent les données spectrales à deux unités de pH au-dessus de la limite inférieure de calibration puis à trois et quatre unités de pH, soient ΔpH = 2, 3 et 4.

Suite à ces différents retraitements, des valeurs du test X<sup>2</sup> et de pK<sub>a</sub> sont ainsi trouvées (tableau A). La valeur du test du X<sup>2</sup> est la plus faible à ΔpH = 1, soit pH = 2.8. Cependant, cette valeur se stabilise à partir de ΔpH = 2, soit pH = 3.8. Par ailleurs, la valeur du pK<sub>a0</sub> et de son S.D reste identique également à partir de ΔpH = 2.

Tableau A

pH	ΔpH= pH – 1.8	X <sup>2</sup> moyen	pK <sub>a0</sub> ±S.D
2.8	1	0.015	0.31 ±0.11
3.8	2	0.024	0.38 ±0.22
4.8	3	0.026	0.38 ±0.24
5.8	4	0.026	0.38 ±0.24

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

Pour les essais de retraitement des expériences de  $pK_a$  extrêmes basiques de l'impureté Y2163, les données spectrales gardées se situent entre les valeurs de pH de 8 à 14. La valeur de pH de 8 correspond une unité de pH au-dessous de la valeur du  $pK_{a1}$ ,  $\Delta pH = -1$ . Les essais de retraitement suivants conservent les données spectrales à deux unités de pH au-dessous de la valeur de  $pK_{a1}$  puis à trois et quatre unités de pH, soient  $\Delta pH = -2, -3$  et  $-4$ .

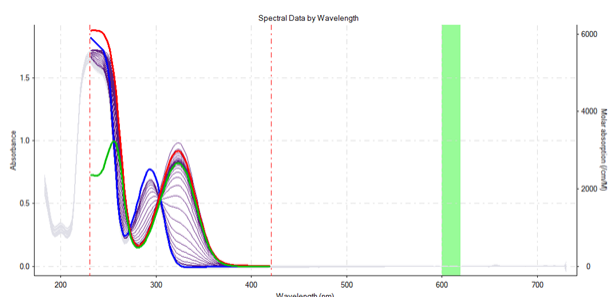
Suite à ces différents retraitements, des valeurs du test  $X^2$ , de  $pK_{a1}$  et de  $pK_{a2}$  sont ainsi trouvées (tableau A). Les valeurs du test du  $X^2$ , du  $pK_{a2}$  et de son S.D restent relativement constante entre  $\Delta pH = -1$  et  $\Delta pH = -3$ . A  $\Delta pH = -4$ , la valeur du test du  $X^2$  double et le S.D du  $pK_{a2}$  passe de 0.03 à 0.30. La valeur du  $pK_{a1}$  et son S.D restent identique quelque soit le type de retraitement effectué (tableau B).

Les valeurs du test du  $X^2$  sont beaucoup plus élevées que pour les  $pK_a$  extrêmes acides. Ce phénomène pourrait s'expliquer en partie par l'absorbance plus faible de 30% de la forme la plus basique (courbe verte, figure A) par rapport aux deux autres espèces.

Tableau B

pH	$\Delta pH = pH - pK_{a1}$	$X^2$ moyen	$pK_{a1} \pm S.D$	$pK_{a2} \pm S.D$
8	-1	0.101	8.97 $\pm 0.01$	12.86 $\pm 0.03$
7	-2	0.104	8.97 $\pm 0.01$	12.82 $\pm 0.03$
6	-3	0.104	8.97 $\pm 0.01$	12.80 $\pm 0.03$
5	-4	0.226	8.97 $\pm 0.01$	12.61 $\pm 0.30$

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial



**Figure A** : Absorbance en fonction du pH de l'impureté Y2163

- Le PA S47693

Les différents retraitements sont également effectués sur les essais de  $pK_a$  extrêmes acides et basiques du PA S47693.

Les essais de retraitement des expériences de  $pK_a$  extrême acide du PA S47693 gardent les données spectrales situées entre les valeurs de pH 1 et 2.8, 3.8, 4.8, 5.8. Les valeurs de pH de 2.8, 3.8, 4.8 et 5.8 correspondent respectivement à une, deux, trois et quatre unités de pH au-dessus de la limite inférieure de calibration de l'électrode,  $\Delta pH = 1, 2, 3$  et  $4$ .

La valeur du test du  $X^2$  augmente très rapidement avec l'agrandissement de la gamme de pH donc le nombre de données spectrales pris en compte lors du retraitement. A  $\Delta pH = 2$ , la

valeur du test du  $X^2$  est très élevée. La valeur du  $pK_{a0}$  est donc inexacte. A  $\Delta pH = 3$ , la valeur du test du  $X^2$  est supérieure à 1. Or une valeur de probabilité ne peut être supérieure à 1. Par conséquent, l'essai est non recevable et ne peut pas donner de valeur du  $pK_{a0}$  (tableau C). La seule conclusion possible des expériences de  $pK_a$  extrêmes acides menées sur le PA S47693 est qu'il existe un  $pK_a$  inférieur à une valeur de pH 2.

Tableau C

pH	$\Delta pH = pH - 1.8$	$X^2$ moyen	$pK_{a0} \pm S.D$
3.8	1	0.200	0.95 $\pm 0.21$
4.8	2	0.716	1.27 $\pm 0.01$
5.8	3	Sup à 1	NR*

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

\*NR : Essai non recevable

Les essais de retraitement des expériences de  $pK_a$  extrêmes basiques du PA S47693 conservent les données spectrales situées entre les valeurs de pH 8.7, 7.7, 6.7, 5.7 et 14. Les valeurs de pH de 8.7, 7.7, 6.7 et 5.7 correspondent respectivement à une, deux, trois et quatre unités de pH au-dessous de la valeur du  $pK_{a1}$ ,  $\Delta pH = -1, -2, -3$  et  $-4$ .

La valeur du test du  $X^2$  augmente lentement avec l'agrandissement de la gamme de pH donc le nombre de données spectrales pris en compte lors du retraitement. A  $\Delta pH = -4$ , la valeur du test du  $X^2$  est pratiquement multipliée par 2 mais reste encore acceptable. La valeur du  $pK_{a2}$  varie de 0.05 entre les différents retraitements. Sa valeur de S.D varie entre  $\pm 0.13$  et  $\pm 0.20$ . Ce sont des valeurs relativement élevées. La valeur du  $pK_{a1}$  et son S.D restent identiques quelque soit le type de retraitement effectué (tableau D).

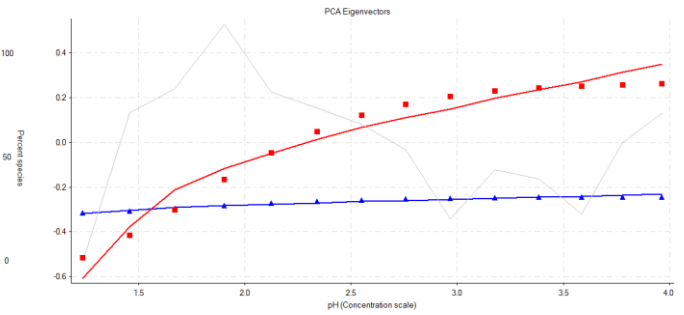
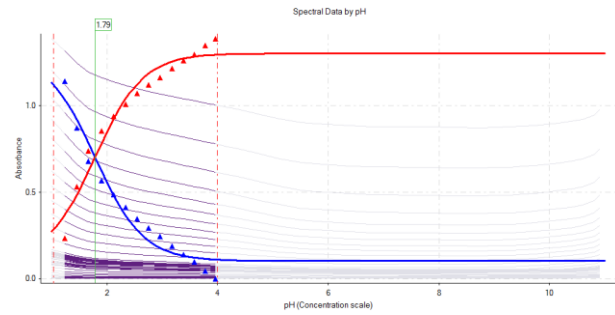
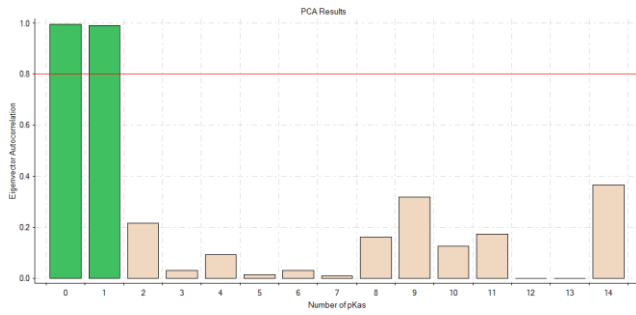
Tableau D

pH	$\Delta pH = pH - pK_{a1}$	$X^2$ moyen	$pK_{a1} \pm S.D$	$pK_{a2} \pm S.D$
8.7	-1	0.037	9.70 $\pm 0.04$	13.12 $\pm 0.13$
7.7	-2	0.039	9.68 $\pm 0.04$	13.11 $\pm 0.17$
6.7	-3	0.046	9.68 $\pm 0.04$	13.10 $\pm 0.18$
5.7	-4	0.074	9.68 $\pm 0.04$	13.07 $\pm 0.20$

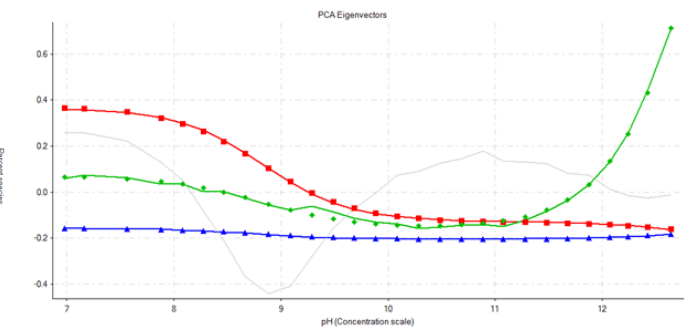
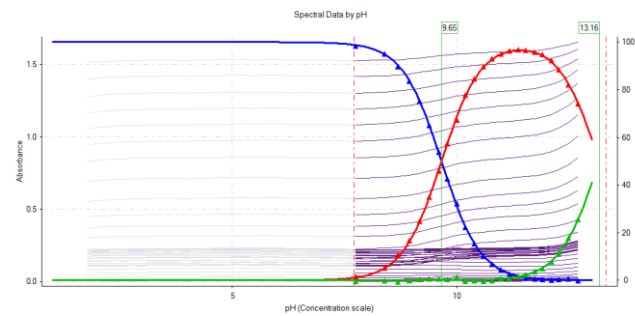
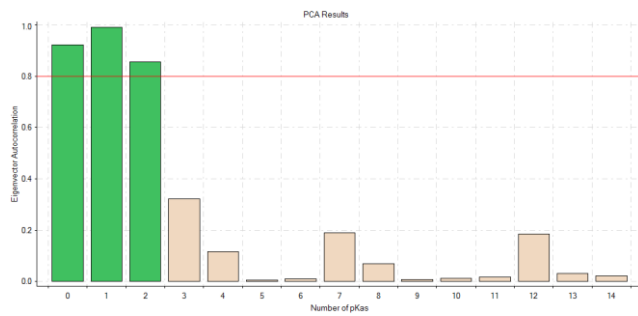
Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

## Annexe 5.3.2.2., B : Retraitement des essais du PA S47693

### Pré-dose d'acide du PA S47693



### Pré-dose de base du PA S47693



### Annexe 5.4.1. : S47693 à 37°C

#### Sans pré-dose de titrant du PA S47693 à 37°C

	$X^2$	$X^2$ moyen	$pK_{a1}$	$pK_{a1} \pm S.D$
Essai 1	0.015	0.188	9.54	9.55 $\pm$ 0.02
Essai 2	0.012		9.55	
Essai 3	0.010		9.57	

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

#### Pré-dose d'acide du PA S47693 à 37°C

	$X^2$	$X^2$ moyen	$pK_{a0}$	$pK_{a0} \pm S.D$
Essai 1	0.187	0.012	1.12	1.11 $\pm$ 0.13
Essai 2	0.289		1.23	
Essai 3	0.088		0.97	

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial

#### Pré-dose de base du PA S47693 à 37°C

	$X^2$	$X^2$ moyen	$pK_{a1}$	$pK_{a1} \pm S.D$
Essai 1	0.251	0.328	9.55	9.57 $\pm$ 0.02
Essai 2	0.214		9.57	
Essai 3	0.520		9.58	

Moyen : Moyenne sur les 3 titrations effectuées dans le même vial



## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



## **Développement de méthodes d'analyses permettant le screening de molécules pharmaceutiques à l'aide du Sirius T3<sup>®</sup>**

### **Détermination de constante d'acidité de molécules ionisables par spectrophotométrie UV-visible et par l'analyse des composantes principales**

Dans le domaine de la recherche pharmaceutique, la connaissance de l'état d'ionisation d'un groupement fonctionnel particulier est essentielle pour comprendre les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des principes actifs en développement. La constante d'acidité ( $pK_a$ ) est un paramètre physicochimique indispensable permettant de définir la gamme de pH où les groupements fonctionnels sont sous leurs formes neutres.

Une approche spectrophotométrique à longueurs d'onde multiples a été mise en place pour déterminer les valeurs de  $pK_a$  comprises entre 2 et 12, pour des molécules solubles. L'analyse des composantes principales a été utilisée pour déduire les valeurs de  $pK_a$  à partir des données enregistrées à différentes valeurs de pH lors de l'absorption UV-visible à des longueurs d'onde multiples. La gamme de pH a été étendue entre 1 et 13 et nous avons démontré que les valeurs de  $pK_a$ , comprises entre 1 et 13, sont cohérentes avec des mesures effectuées antérieurement. Les valeurs de  $pK_a$  d'une molécule pharmaceutique en cours de développement ont été déterminées à partir de cette méthode.

Mots clés: Constante d'acidité; Spectrophotométrie; Analyse des composantes principales; développement d'un médicament

## **Development of screening methods for drug candidates using Sirius T3<sup>®</sup>**

### **Determination of acid dissociation constant for ionized drug compounds using spectrophotometric analysis and principal component analysis**

In research pharmaceutical areas, knowledge of the ionization state of a particular functional group is often vital in order to understand the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of new drug substances. Acid dissociation constants ( $pK_a$  values) are useful physico-chemical measurements describing the extent of ionization of functional groups, with respect to pH.

A multiwavelength spectrophotometric approach has been developed to determine  $pK_a$  values between 2 and 12 of soluble drug compounds. Principal component analysis has been applied to deduce the  $pK_a$  values from the multiwavelength UV absorption data recorded at different pH values. This method was extended to 1 and 13  $pK_a$  values. We demonstrated that the  $pK_a$  values, between 1 and 13, are consistent with each other and with previously reported measurements. The method has also been applied to determine the  $pK_a$  values of one pharmaceutical molecule which was in the process of drug development.

Keywords: Acid dissociation constants; Spectrophotometry; Principal analysis component; Drug development