Extrait du *Journal de Chimie Physique*, 1969, **66**, n° 11-12, p. 1903

N° 260. — PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES DES DÉRIVÉS POLYCONJUGUÉS HÉTÉROCYCLIQUES D'INTÉRÊT BIOLOGIQUE.

I. — Effets de concentration sur la réduction électrochimique de la pyrimidine en solution aqueuse à pH contrôlé,

par Daniel THEVENOT, Gilbert HAMMOUYA et René BUVET.

(Faculté des Sciences de Paris, Laboratoire d'Énergétique Électrochimique associé au CNRS, 10, rue Vauquelin, Paris, V^e.)

(Manuscrit reçu le 16.6.69.)

SOMMAIRE

L'utilisation de la polarographie à stillation commandée a permis de montrer que les propriétés électrochimiques de la pyrimidine en solution aqueuse dépendent à la fois du pH de la solution et de la concentration du réactif. A des pH compris entre 3,0 et 5,0 on observe, en solution aqueuse très diluée, deux vagues de réduction; lorsque la concentration est supérieure à environ 10^{-3} mole.l^{-1} la deuxième vague est remplacée par deux vagues, la première ayant un courant de diffusion indépendant de la concentration du réactif.

SUMMARY

The electrochemical reduction of pyrimidine is investigated in aqueous buffered solutions by drop-time-controlled polarography. The different waves observed are strongly dependent on pH and pyrimidine concentration. For instance, in very dilute solutions two reduction waves are evidenced between pH 3.0 and 5.0; at pyrimidine concentration higher than ca. one millimole per litre, the second wave splits into two waves, the diffusion current of the first one being concentration-independant.

1. — Introduction.

A l'occasion de travaux récents concernant l'étude thermodynamique et cinétique des réactions prébiologiques, quelques auteurs ont réalisé des synthèses par voie abiotique de purines et de pyrimidines à partir de précurseurs simples ([1, 2]) ainsi que des synthèses de nucléosides et nucléotides à partir de purines et de pyrimidines libres en solution aqueuse ([3–9]). On connaît par ailleurs le rôle fondamental tant en biochimie qu'en biophysique ([10, 11]) des hétérocycles polyconjugués dérivés de la pyridine, de la pyrimidine et de la purine. La connaissance des propriétés d'échange électronique ([12–14]) de ces matériaux, mises en jeu dans les processus évoqués, revêt donc un intérêt primordial. Il en est de même des propriétés d'échange protonique des mêmes matériaux, en particulier dans la mesure où celles-ci se répercutent sur les propriétés d'oxydo-réduction. Nous avons donc entrepris l'étude de ces propriétés élémentaires en solution aqueuse à l'aide de méthodes électrochimiques.

Plusieurs groupes ([16–29]) ont déjà abordé l'étude de ces propriétés électrochimiques d'abord par polarographie classique, puis, plus récemment, par oscillopolarographie et voltampérométrie sur électrode de graphite stationnaire. Toutefois, le fait que ces composés soient en général difficiles à réduire et à oxyder dans l'eau, a limité considérablement le nombre de ceux pour lesquels nous possédons des données quantitatives, ainsi que le domaine de pH des solutions dans lesquelles de telles études ont été conduites (tableau I).

Les milieux faiblement acides étant ceux pour lesquels nous avons le plus de données, nous avons comparé à pH 5 les potentiels de demi-vague correspondant aux processus de réduction ou d'oxydation des dérivés hétérocycliques en question. Sur le tableau II, qui permet de telles comparaisons, nous avons fait figurer quelques dérivés possédant en plus des substituants les plus simples tels que $-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$, $-CO_2H$ et $-CONH_2$, un groupement ribose ou désoxyribose (nucléosides) et un ou plusieurs groupements phosphate (nucléotides). La présence d'une chaîne latérale de ce type ne modifie apparemment que peu les propriétés oxydo-réductrices de l'hétérocycle bien que l'on ait envisagé dans ce cas la formation d'associations complexes intramoléculaires.

Les substituants, liés aux carbones, tels que $-CH_3$ ou $-OH$ et $-NH_2$ abaissent en général très notablement le potentiel de réduction de l'hétérocycle sur lequel ils se trouvent fixés. Une exception apparaît pour les substituants $-NH_2$ et $-OH$ en position 2 de la pyrimidine. Par contre, les substituants tels que $-Cl$, ou $-CO_2H$, $-CONH_2$, $-CHO$ et $-NO_2$ ont pour effet d'accroître plus ou moins selon leur position le potentiel de réduction des hétérocycles auxquels ils se trouvent fixés. Les pH correspondant aux transitions acide-base de tous ces produits ont été répertoriés; ces échanges protoniques étant susceptibles de se répercuter sur les propriétés oxydo-réductrices, nous avons fait également figurer dans le tableau I les pK_a qui définissent ces propriétés acide-base.

TABLEAU I

Propriétés oxydo-réductrices et acide-base des composés hétérocycliques d'intérêt biologique dérivés de la pyridine, de la pyrimidine et de la purine.

Domaine de pH pour lequel des résultats quantitatifs ont été publiés tant en réduction (——) qu'en oxydation (- - -). pK_a de ces produits d'après A. ALBERT [3] (◊).

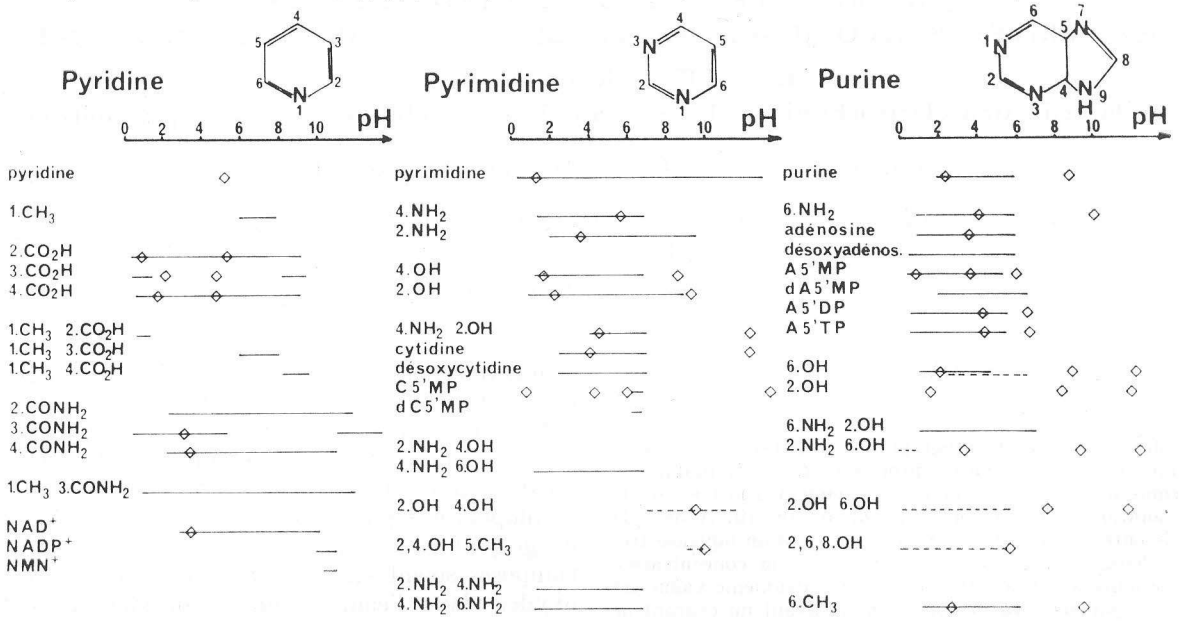
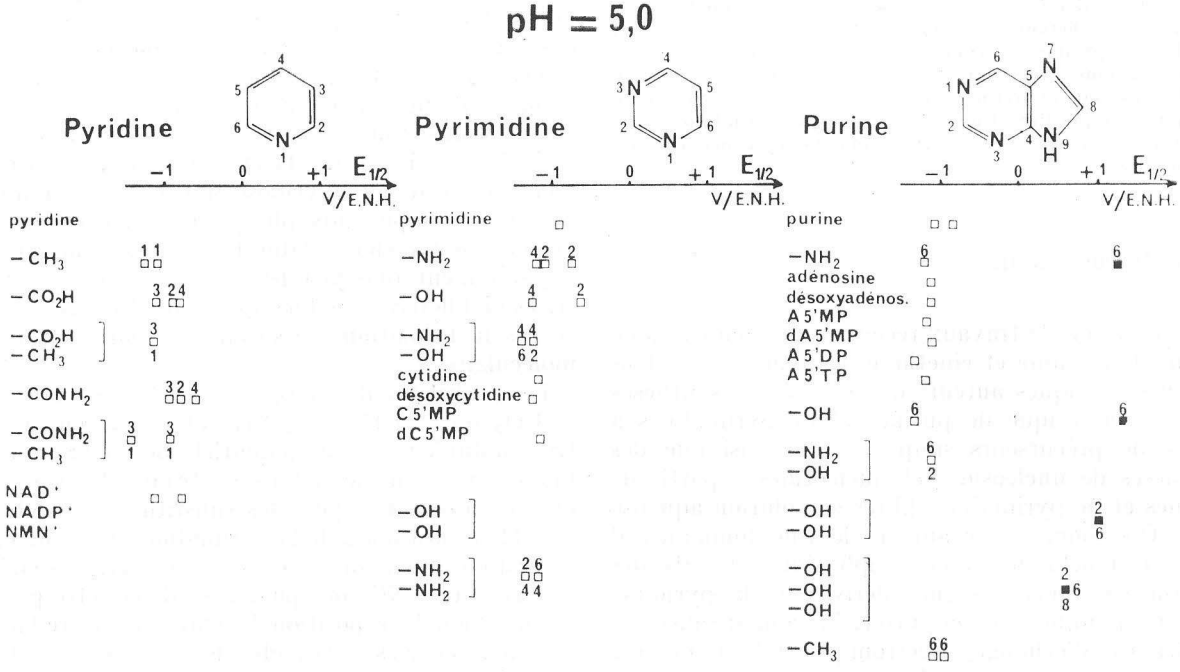


TABLEAU II

Propriétés oxydo-réductrices des composés hétérocycliques d'intérêt biologique dérivés de la pyridine, de la pyrimidine et de la purine.

Valeur des potentiels de demi-vague à pH 5 en fonction de la nature et de la position des substituants : (□) réduction polarographique, (■) oxydation sur graphite stationnaire [3–17].

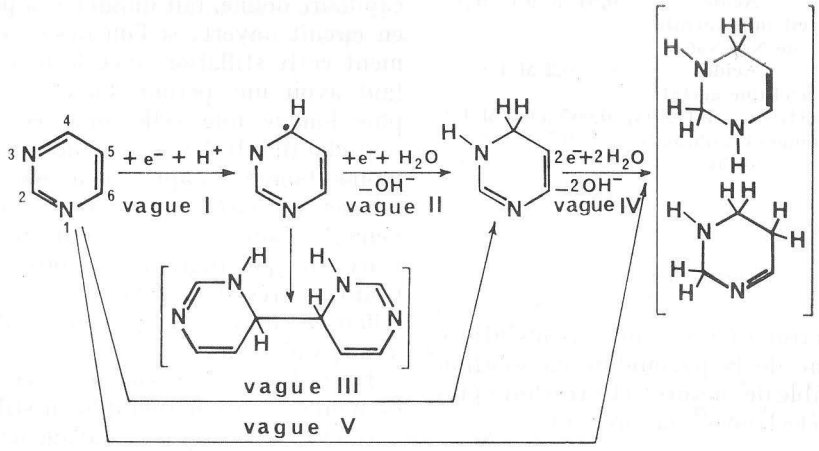


En fonction de ces faits, parmi les dérivés de la pyrimidine nous avons retenu pour cette étude, afin de ne pas accroître les difficultés d'ordre électrochimique, la pyrimidine elle-même. Les propriétés électrochimiques de ce composé en solution aqueuse ont été étudiés par L. F. CAVALIERI et coll. [16] puis par P. J. ELVING et coll. [17–20]. Ces auteurs ont relevé les courbes intensité-potentiel à des électrodes à goutte de mercure plongées dans des solutions aqueuses, tamponnées en pH, de pyrimidine.

Le temps de chute des gouttes n'était pas maintenu constant, ainsi qu'il est couramment procédé en polarographie classique dite à stillation libre. Ces mesures ont par ailleurs été effectuées dans une gamme assez étroite de concentrations. ELVING a représenté les résultats obtenus sous forme de diagramme faisant apparaître les variations du potentiel de demi-vague avec le pH : les points obtenus sont répartis suivant quatre segments de droite. D'autre part, des relevés par spectrophotométrie ultraviolette des modifications des solutions obtenues par électrolyse à potentiel contrôlé, tant pour la pyrimidine que pour ses dérivés les plus simples, ont permis à ELVING de proposer des mécanismes de réactions pour chacune des étapes relevées par polarographie classique (fig. 1).

Nous avons repris l'étude électrochimique de la pyrimidine en solution aqueuse en tenant compte systématiquement des critères qui permettent d'attribuer aux potentiels relevés une signification thermodynamique ou au contraire mettent en évidence l'intervention de phénomènes cinétiques. Parmi les méthodes en régime stationnaire la voltampérométrie sur électrode solide tournante apparaît particulièrement bien adaptée à une telle fin, surtout en relation avec l'utilisation de géométries disque-anneau. A ce propos nous avons effectué quelques essais sur électrode tournante de Cd et de Pb qui, en milieu acide, possèdent des surtensions élevées de réduction des protons. A ces électrodes la pyrimidine est effectivement réductible mais il n'est possible d'observer qu'une seule étape de réduction et ceci dans une gamme étroite de pH. A notre connaissance le mercure est le métal d'électrode qui, permettant d'obtenir en réduction le domaine d'électroactivité le plus étendu, conduit à l'observation la plus complète des propriétés oxydantes de la pyrimidine en solution aqueuse. Cependant on sait que la polarographie à stillation libre fournit des polarogrammes dont la forme est en partie liée à l'intervention de phénomènes physiques tels que l'électrocapillarité, plus complexes que la simple diffusion, et qui de ce fait sont difficilement interprétables sur le plan thermodynamique. Parmi les techniques permettant d'obtenir des résultats sensiblement améliorés grâce à un meilleur contrôle des conditions d'apport de réactifs à des électrodes indicatrices de mercure (voltampérométrie sur nappe de mercure à convection contrôlée, ...), nous avons utilisé une des techniques les plus simples et dont il est connu qu'elle donne des résultats plus fiables, la polarographie à stillation commandée.

D'autre part, nous avons noté que les propriétés électrochimiques de la pyrimidine n'ont été jusqu'à présent, étudiées que dans un domaine relativement étroit de concentration du réactif, alors que l'étude de produits semblables, comme l'adénine et ses dérivés, montre qu'il existe une dépendance notable du potentiel de demi-vague avec la concentration ([8]). L'étude thermodynamique et cinétique des conditions de réduction électrochimique de la pyrimidine doit donc être effectuée en tenant compte systématiquement du paramètre important que constitue la concentration de ce réactif.



	pH	Concentration (mole.l^{-1})	$E_{1/2}$ (mV/ E.N.H.)	$I = \frac{-i_d}{C.m^{2/3}.t^{1/6}}$	$\lvert E_{3/4} - E_{1/4} \rvert$ (mV)	Nombre e⁻ (coulométrie)
vague I	0,5 à 5	0,3 à 4.10^{-3}	− 334 − 105 pH	2,0 à 2,5	44 ± 7	0,94 ± 0,01
vague II	3 à 5	0,3 à 0,4 . 10^{-3}	− 900 − 11 pH	2,2 à 2,7	95	1,08 ± 0,06
vague III	5 à 8	0,3 à 5.10^{-3}	− 438 − 89 pH	4,3 à 4,7	41 à 95	2,00 ± 0,3
vague IV	7 à 8	0,3 . 10^{-3}	−1358 − 5 pH	4,8		
vague V	9 à 13	0,4 à 1,5 . 10^{-3}	− 563 − 79 pH	8 à 9 (6 à pH 13)		3,93 ± 0,06

Fig. 1. — Interprétation par P. J. ELVING et coll. ([5-8]) des comportements électrochimiques de la pyrimidine en solution aqueuse lors de sa réduction polarographique et données numériques correspondant aux différentes étapes de cette réduction.

2. — Méthode expérimentale.

Afin de fournir les éléments qui permettent d'apprécier la fiabilité des résultats dont nous serons amenés à faire état, nous préciserons brièvement les conditions expérimentales utilisées.

2.1. — *Produits.*

Nous avons utilisé la pyrimidine « purum » de provenance FLUKA AG, et fixé le pH des solutions à l'aide de solutions tampons préparées à partir de produits MERCK de pureté analytique (tableau III). La continuité des caractéristiques des polarogrammes d'un pH à l'autre pour différents systèmes tampons et différentes concentrations de ceux-ci, nous a servi de critère pour éliminer l'éventualité d'une modification des processus de réduction de la pyrimidine par formation de complexe avec les réactifs utilisés. Le mercure polarographique est lavé à HNO_3 à 10 %, à l'eau, à l'alcool et à l'éther de pétrole puis bidistillé et enfin conservé dans l'appareillage sous azote.

TABLEAU III

Solutions utilisées pour assurer le transport et pour fixer le pH.

Tampon n°	Domaine de pH	Composition	Concentration de la substance tampon
1	3 à 6	Acide citrique-Citrate de Na, NaCl	0,04 à 0,1 $M.l^{-1}$
2	4,6	Acide acétique-acétate	0,2 $M.l^{-1}$
3	6 à 7	K_2HPO_4 — KH_2PO_4	0,065 à 0,5 $M.l^{-1}$
4	5	mono et diphtalate de K	0,5 $M.l^{-1}$

2.2. — *Appareillage.*

L'appareillage électronique que nous avons utilisé pour la polarographie de la pyrimidine en solution aqueuse est un ensemble de mesures électrochimiques TACUSSEL, à trois électrodes comprenant :

— un potentiostat PRT 500 LC imposant un potentiel défini entre une électrode de référence et une électrode indicatrice à gouttes de mercure;

— un millivoltmètre électronique S6RZ à grande impédance d'entrée dont le signal de sortie est envoyé à la partie tension (X) d'un enregistreur X — Y;

— un enregistreur bigalvanométrique SEFRAM LUXYTRACE TR VAC branché pour sa partie courant (Y) sur le circuit de l'électrode auxiliaire qui est constituée d'un fil de platine séparé de la solution par un compartiment fritté,

— un appareil SERVOVIT 9B, permettant le balayage linéaire en fonction du temps à vitesse réglable du potentiel imposé par le potentiostat.

Cet ensemble expérimental permet le relevé direct de courbes intensité-potentiel pour lesquelles le courant est défini à 1 % près et le potentiel à 5 mV près.

Dans notre appareillage la stillation du mercure est commandée par un marteau frappant latéralement le capillaire avec une fréquence égale à celle de la rotation d'une came. Ce capillaire, de longueur 200 mm, a un temps de goutte en circuit ouvert sous une hauteur de mercure de 30 cm de $t_0 = 4{,}3_4$ s (soit $m_0 = 2{,}1_6$ mg de Hg/s) et a toujours été utilisé avec un temps de goutte imposé de $0{,}5_2$ s (soit $m = 2{,}0_3$ mg de Hg/s). La température de la solution contenue dans la cellule thermostatée est fixée à 25,0 ± 0,2 °C. Lorsque cela représente une correction notable, c'est-à-dire pour les concentrations de pyrimidine les plus faibles, le courant de fond obtenu en présence de solution tampon seule est soustrait du courant obtenu en présence de réactif. Le potentiel fourni par les électrodes de référence (Ag/AgCl, KCl saturé ou calomel, KCl saturé) est périodiquement contrôlé avec des électrodes de référence « témoin », ce potentiel est donc connu à mieux que 1 mV.

2.3. — *Ajustement des paramètres expérimentaux.*

Une étude préliminaire a été entreprise pour déterminer l'influence de quelques paramètres secondaires intervenant dans la méthode et pour les fixer aux valeurs les plus favorables.

L'augmentation de la hauteur de mercure, pour un capillaire donné, fait diminuer la période de stillation en circuit ouvert; si l'on désire contrôler effectivement cette stillation avec le marteau mécanique, il faut avoir une période en circuit ouvert beaucoup plus longue que celle imposée. D'autre part, la reproductibilité des courbes intensité-potentiel semble moins bonne lorsque la période imposée devient inférieure à environ 0,05 s. Ces deux facteurs intervenant simultanément pour fixer la qualité de tracé du polarogramme, nous avons obtenu des résultats très satisfaisants en fixant les périodes de stillation libre et de commande respectivement à $4{,}3_4$ s et à 0,52 s.

Du fait de la très courte durée de vie des gouttes de mercure, la polarographie à stillation commandée permet des vitesses de balayage de potentiel relativement importantes sans altération de la forme, ni de la hauteur des vagues de réduction. Avec l'enregistreur galvanométrique utilisé nous avons observé des tracés superposables à 1 mV près avec des vitesses de balayage comprises entre 5 et 500 $mV.mn^{-1}$. Par suite tous nos tracés ont été effectués à 250 $mV.mn^{-1}$.

Les courants ont été mesurés juste après la chute de la goutte de mercure, donc pour les minima de la valeur absolue de l'intensité du courant. Dans les conditions du tracé de nos polarogrammes, l'écart entre courant maximum et minimum, à un potentiel donné, reste inférieur à environ 5 %.

Ces paramètres opératoires étant définis nous

avons entrepris l'étude systématique de l'influence, sur les propriétés électrochimiques de la pyrimidine des paramètres suivants : pH de la solution, nature et concentration de la substance tampon, concentration du réactif, température et conditions d'apport du réactif à l'électrode indicatrice, c'est-à-dire fréquence de la stillation commandée.

3. — Résultats.

3.1. — *Pyrimidine en solution aqueuse très diluée.*

Nous décrirons tout d'abord les résultats obtenus en solution très diluée de pyrimidine à des pH compris entre 3,0 et 6,6. En effet, pour des concentrations variant au voisinage de 10^{-4} mole.l^{-1} la forme des courbes $\frac{i}{C} = f(E)$ ne change pratiquement pas.

La comparaison des courbes intensité-potentiel tracées avec une même concentration de pyrimidine égale à 10^{-4} mole.l^{-1} conduit à distinguer selon le pH deux types de courbes (fig. 2). Pour les pH compris entre 3 et 5 on note deux vagues de réduction de hauteurs voisines; le potentiel de la première vague (vague I) varie avec le pH alors que la deuxième (vague II) reste, à tout pH, située au même potentiel. Aux pH 6,0 et 6,6 ces deux vagues sont remplacées par une seule vague (vague III) dont la hauteur est égale à la somme des hauteurs des vagues précédentes. Il faut également noter qu'à pH 6,6 apparaît une vague IV située à un potentiel beaucoup plus négatif que la vague III, dont la hauteur est par ailleurs voisine de celle de cette vague.

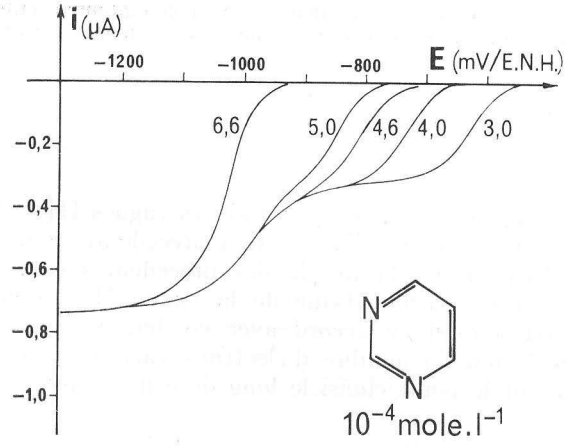


Fig. 2. — Polarogrammes à pH 3,0 et 4,0 (tampon 1), 4, 6 (tampon 2), 5, 0 (tampons 1 et 4) et 6,6 (tampon 3).

Pour chacune de ces étapes de réduction de la pyrimidine, des renseignements importants peuvent être déduits de l'observation de l'évolution de la position, de la hauteur et de la forme des vagues avec le pH (fig. 3 à 5).

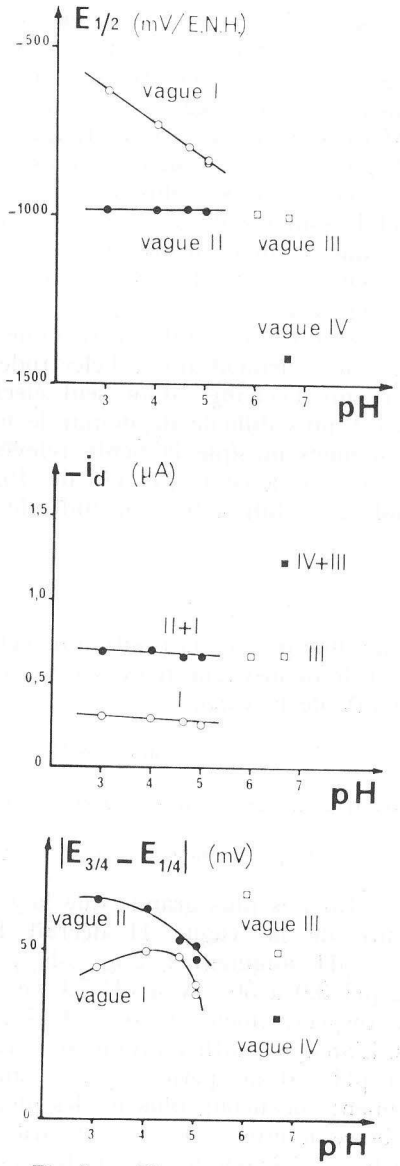


Fig. 3. — Diagramme potentiel de demi-vague — pH : ○ vague I, ● vague II, □ vague III et ■ vague IV.

Fig. 4. — Courant de diffusion correspondant à : ○ la vague I seule, ● la somme des vagues I et II, □ la vague III seule et ■ la somme des vagues III et IV.

Fig. 5. — Pente en fonction du pH de : ○ la vague I, ● la vague II, □ la vague III et ■ la vague IV.

Fig. 2. 3, 4 et 5.
Réduction électrochimique de la pyrimidine en solution aqueuse très diluée (10^{-4} mole.l^{-1}) par polarographie à stillation commandée.

Vague I.

Les potentiels de demi-vague se distribuent en fonction du pH suivant un segment de droite correspondant à mieux que ± 10 mV près à la relation :

$$(E_{1/2})_I = (-321 - 102\ pH)\ mV/E.N.H.$$

Le courant de diffusion ne varie que très peu lorsque le pH augmente, il passe de — 0,29 μA à pH 3,0 à

— 0,27 μA à pH 5. La pente de cette vague I ne varie pas notablement avec le pH puisque $E_{3/4} - E_{1/4}$ reste voisin de 45 ± 5 mV, ce qui correspondrait à un échange de 1,3 ± 0,2 électron si le processus correspondant à cette vague était rapide. L'analyse mathématique de la courbe intensité-potentiel obtenue à pH 3,0, c'est-à-dire dans le cas où les vagues I et II sont les plus éloignées l'une de l'autre, conduit à une évaluation du nombre d'électrons échangés compris entre 1,1 et 1,3 selon le point choisi le long de la vague I.

L'ensemble de ces résultats laisse donc supposer que la réaction élémentaire à l'électrode pourrait faire intervenir l'échange d'un seul électron. Par contre, il est plus difficile de définir le nombre de protons échangés puisque la pente relevée pour la variation de $E_{1/2}$ avec le pH est de 102 mV/pH soit sensiblement différente d'un multiple simple de 59 mV/pH.

Vague II.

Le pH n'influe pas sur la position de cette vague : le potentiel de demi-vague relevé ne s'écarte pas de plus de 4 mV de la valeur

$$(E_{1/2})_{II} = -986 \text{ mV/E.N.H.}$$

Sa hauteur reste également constante et égale à :

$$(i_d)_{II} = -0,39 \pm 0,04 \ \mu A$$

c'est-à-dire 1,3 fois plus grande que la vague I.

La pente de la vague II décroît légèrement lorsque le pH augmente : $E_{3/4} - E_{1/4}$ passe de 65 mV à pH 3,0 à 50 mV à pH 5,0 ce qui correspondrait respectivement à 0,9 et 1,2 électrons échangés. L'analyse mathématique du polarogramme obtenu à pH 3,0 ne permet pas d'apporter des renseignements beaucoup plus fiables puisque l'évaluation de ce nombre d'électrons varie de 0,75 à 1,2 selon le point choisi le long de la vague (fig. 6).

Il est important de noter la continuité de la variation des caractéristiques des différents polarogrammes lorsque le pH varie, malgré le changement de nature et de concentration de la solution tampon utilisée (tampons 1, 2 et 4). Cette observation nous permet d'écarter toutes hypothèses correspondant à une intervention spécifique du réactif tamponnant le milieu dans les propriétés électrochimiques de la pyrimidine, la valeur de pH obtenue suffisant seule à définir ces propriétés.

Lorsque le pH est supérieur à 5, en particulier aux pH 6,0 et 6,6, les vagues I et II fusionnent pour former la vague III. Si l'on considère le diagramme $E_{1/2}$/pH relatif aux vagues I et II (fig. 3), le pH de fusion peut être prévu par extrapolation vers 6,3. A pH 6,6 apparaît en outre une seconde vague de réduction, la vague IV. Les courants de diffusion des vagues III et IV sont respectivement à pH 6,6 :

$$(i_d)_{III} = -0,67 \pm 0,02 \ \mu A$$

et

$$(i_d)_{IV} = -0,55 \pm 0,04 \ \mu A,$$

c'est-à-dire voisins du double du courant de diffusion des vagues I et II. La pente de ces vagues III et IV n'est pas, comme l'observation précédente pourrait le faire croire, la moitié des précédentes (fig. 5). L'analyse mathématique de la vague III obtenue à pH 6,6 est en accord avec ce dernier résultat; l'évolution du nombre d'électrons varie de 1 à 1,5 suivant le point choisi le long de celle-ci (fig. 7).

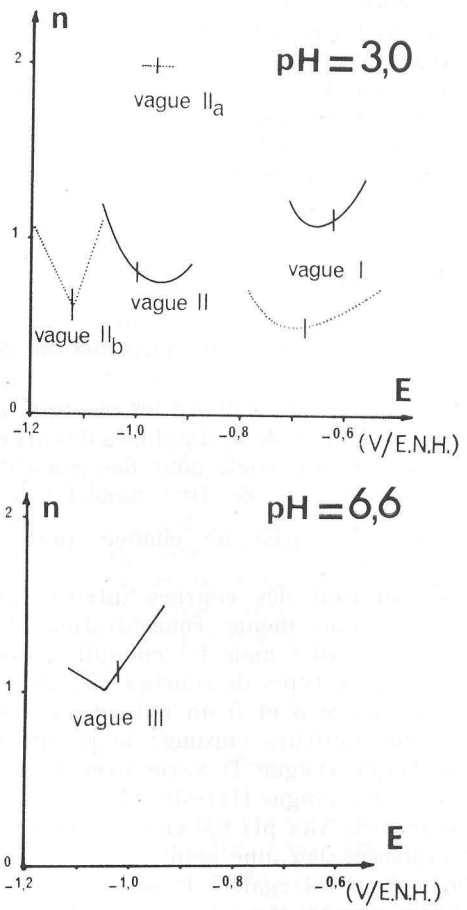


Fig. 6. — Analyse mathématique des polarogrammes obtenus à pH 3,0 avec une concentration de 10^{-4} mole.l^{-1} (———) et 10^{-2} mole.l^{-1} (.....) en pyrimidine.

$$n = 0,059 \frac{\log_{10} \frac{i_d - i}{i}}{E - E_{1/2}}.$$

Fig. 7. — Analyse mathématique du polarogramme obtenu à pH 6,6 pour une concentration de 10^{-4} mole.l^{-1} en pyrimidine.

$$n = 0,059 \frac{\log_{10} \frac{i_d - i}{i}}{E - E_{1/2}}.$$

3.2. — *Influence de la concentration de pyrimidine sur ces propriétés électrochimiques.*

Lorsque la solution de pyrimidine n'est plus très diluée, sa concentration constitue un facteur déterminant dans la définition des propriétés électrochimiques de ce composé. L'exploitation des polarogrammes obtenus par exemple à pH 4,6 montre que la valeur de la concentration de pyrimidine dans une solution de pH donné conditionne non

seulement la position et la hauteur des vagues de réduction mais aussi leur nombre (fig. 8 à 10).

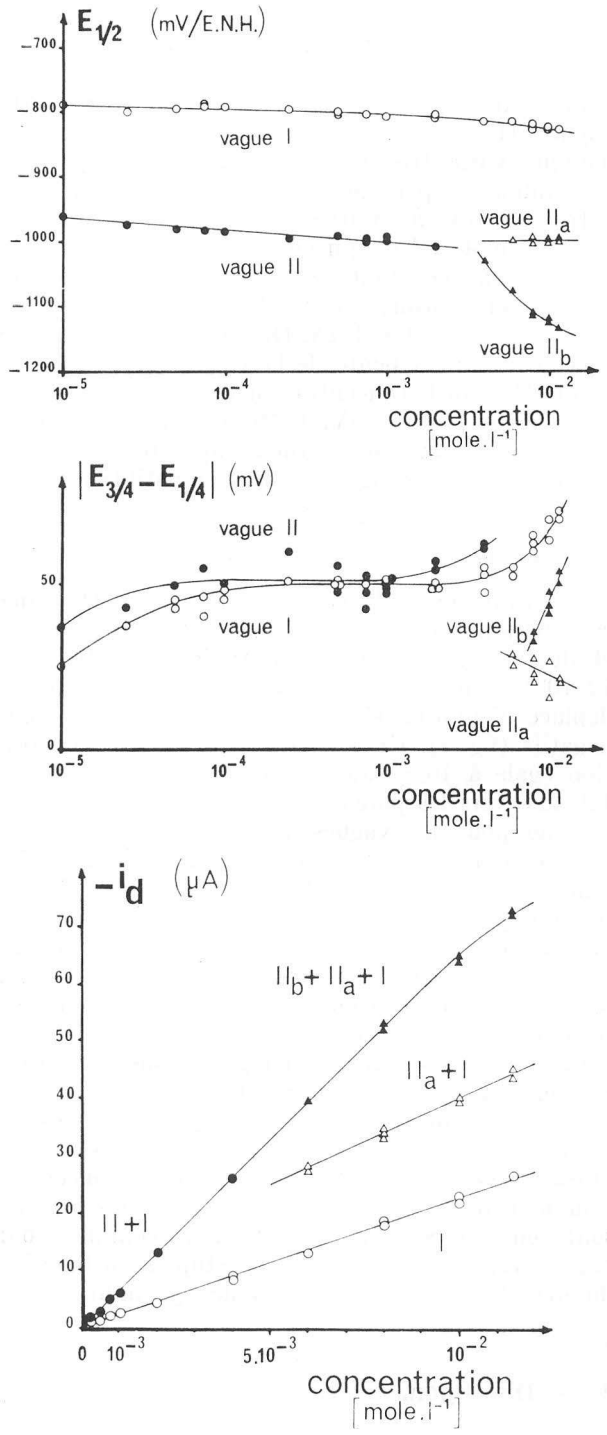


Fig. 8. — Potentiel de demi-vague : ○ vague I, ● vague II, △ vague II_a et ▲ vague II_b.

Fig. 9. — Pente des vagues I(○), II(●), II_a (△) et II_b (▲).

Fig. 10. — Courant de diffusion correspondant à : ○ la vague I seule, ● la somme des vagues II et I, △ la somme de vagues II_a et I et ▲ la somme des vagues II_b, II_a et I.

Fig. 8, 9 et 10.

Influence de la concentration de pyrimidine en solution aqueuse sur sa réduction électrochimique à pH 4,6 (tampon 2) en polarographie à stillation commandée.

Lorsque cette concentration devient supérieure à environ 3.10^{-3} mole.l^{-1} la vague II se dédouble en donnant deux vagues de caractéristiques tout à fait différentes que nous noterons II_a et II_b. Celles-ci sont observables dans toute la gamme de pH où la vague II existe; cependant lorsque les vagues I et II sont voisines comme c'est le cas à pH 5,0, les vagues I et II_a se confondent et l'étude des phénomènes s'en trouve rendue plus complexe. Nous décrirons ci-après les transformations relevées par effet de concentration pour les différentes vagues.

Vague I.

Bien que le dédoublement décrit ne concerne pas la vague I, celle-ci est modifiée de façon non négligeable lorsque la concentration de pyrimidine passe de 10^{-5} à 10^{-2} mole.l^{-1}. Cette modification concerne essentiellement la valeur des potentiels de demi-vague relevés. Dans le diagramme potentiel de demi-vague-pH (fig. 11) les points correspondant à cette vague restent, malgré leur déplacement, disposés sur des segments de droite. A ± 10 mV près on a pour une concentration de

10^{-4} mole.l^{-1} $(E_{1/2})_I = (-321 - 102.pH)$ mV/E.N.H.
10^{-3} mole.l^{-1} $(E_{1/2})_I = (-315 - 106.pH)$ mV/E.N.H.
10^{-2} mole.l^{-1} $(E_{1/2})_I = (-422 - 88.pH)$ mV/E.N.H.

La pente de la relation $E_{1/2}$/pH est donc très nettement fonction de la concentration.

Si la concentration de pyrimidine est supérieure à 10^{-3} mole.l^{-1}, le courant de diffusion relatif décroît légèrement lorsque le pH augmente : cette décroissance de l'ordre de 10 % par unité de pH autour de 2,9 µA/millimole.l^{-1} reste toutefois difficilement décelable compte tenu des imprécisions sur le relevé de $-\frac{i_d}{C}$. Il en est de même des variations, à un pH fixé, de $-\frac{i_d}{C}$ en fonction de la concentration. Par contre, la forme de cette vague I évolue beaucoup à la fois avec le pH et avec la concentration de pyrimidine : il est par suite difficile de déduire de l'évolution de $E_{3/4} - E_{1/4}$ en fonction du pH des hypothèses sur le nombre d'électrons échangés et sur la rapidité de cet échange. Plus précisément, l'analyse mathématique de cette vague, tracée à pH 3,0 et avec une concentration de 10^{-2} mole.l^{-1} (fig. 6) donne des résultats d'interprétation difficile puisque n varie de 0,5 à 0,8 selon le point de la vague utilisé pour l'évaluation.

Vague II.

La vague II peut être observée sans dédoublement entre pH 3 et 5 lorsque la concentration de pyrimidine est inférieure à environ 3.10^{-3} mole.l^{-1}. Lorsque la concentration passe de 10^{-5} à 3.10^{-3} mole.l^{-1} le potentiel de demi-vague décroît d'environ 15 mV par décade de concentration mais ne dépend pas du pH. Sa hauteur relative reste, quelles que soient les conditions de pH et de concentration égale à

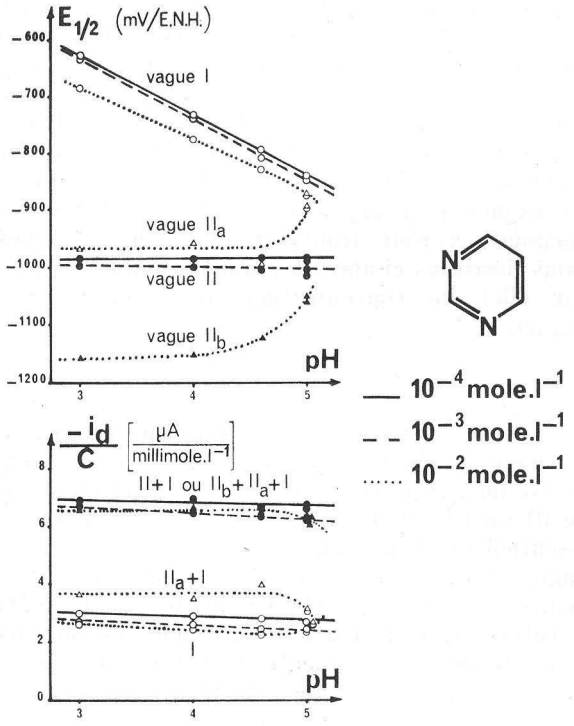


Fig. 11. — Potentiel de demi-vague : ○ vague I, ● vague II, △ vague II_a, et ▲ vague II_b. Le signe ⊖ correspond à la fusion des vagues I et II_a à pH 5,0.

Fig. 12. — Courant de diffusion correspondant à ○ la vague I, ● la somme des vagues II_a et I, △ la somme des vagues II et I et ▲ la somme des vagues II_b, II_a et I. La signe ⊖ correspond à la fusion des vagues I et II_a à pH 5,0.

Fig. 11 et 12.

Influence de la concentration de pyrimidine en solution aqueuse sur sa réduction électrochimique en polagrographie à stillation commandée : concentration égale à 10^{-4} mole.l^{-1} (———), 10^{-3} mole.l^{-1} (— —) et 10^{-2} mole.l^{-1} (.....)

3,8 ± 2 µA/millimole.l^{-1} c'est-à-dire comparable mais non identique à celle de la vague I (1,3 fois plus grande). De même que pour celle-ci, ni la mesure de la pente de la vague II, ni son analyse mathématique ne conduisent à des informations facilement exploitables. On constate en effet que pour un pH donné (fig. 9), la pente de cette vague, mesurée par $E_{3/4} - E_{1/4}$, varie de 25 à 75 mV quand la concentration passe de 10^{-5} à 3.10^{-3} mole.l^{-1}. Des variations d'aussi grande amplitude sont observées, pour une même concentration, entre pH 3 et 5.

Le dédoublement de la vague II est complet pour des pH compris entre 3 et 5, quelles que soient la nature et la concentration du mélange tampon, lorsque la concentration de pyrimidine devient supérieure à 3.10^{-3} mole.l^{-1}. Nous avons donc analysé les caractéristiques des vagues II_a et II_b dans la zone de pH allant de 3 à 5 et pour des concentrations comprises entre 5.10^{-3} et 12.10^{-3} mole.l^{-1}.

Vague II_a.

Ainsi que l'indique la figure 8, à pH 4,6 cette vague est située sensiblement au même potentiel que la vague II. Son potentiel de demi-vague ne varie pratiquement pas avec la concentration de réactif Dans la totalité du domaine de pH et de concentration que nous avons exploré, les variations de ce potentiel de demi-vague restent faibles :

$$(E_{1/2})_{II_a} = [-980 \pm 20] \text{ mV/E.N.H.}$$

Le caractère le plus marquant de cette vague II_a est constitué par le fait que sa hauteur varie très peu avec la concentration de pyrimidine. A pH 4,6 (fig. 10) cette hauteur varie entre 13 µA à 5.10^{-3} mole.l^{-1} et 17 µA à $1{,}2.10^{-2}$ mole.l^{-1} ce qui peut être considéré comme sensiblement constant dans ce cas où les vagues I et II_a sont voisines. Aux autres pH sa hauteur est toujours égale à 9 ± 1 µA. De même que sa position et sa hauteur, la pente de la vague II_a ne dépend ni du pH, ni de la concentration de réactif; $E_{3/4}$—$E_{1/4}$ reste voisine de 25 mV. Cette valeur ainsi que le résultat de l'analyse mathématique de la courbe obtenue à pH 3,0 (fig. 6) serait compatible avec un échange de deux électrons.

Vague II_b.

Contrairement à la vague II_a, la vague II_b a des caractéristiques qui dépendent fortement du pH et de la concentration de pyrimidine. Entre 5 et 12.10^{-3} mole.l^{-1} son potentiel de demi-vague se déplace d'environ 50 mV vers les potentiels plus négatifs (fig. 8). Entre pH 3 et 5 et à concentration égale à 10^{-2} mole.l^{-1} il se déplace d'environ 110 mV vers les potentiels moins négatifs (fig. 11). Comme pour les vagues I et II, sa hauteur est proportionnelle à la concentration. La somme des hauteurs des vagues II_a et II_b est égale à la hauteur de la vague II. $E_{3/4} - E_{1/4}$ se situe suivant le pH et la concentration entre 35 et 75 mV; de même, l'analyse mathématique de la courbe obtenue à pH 3,0 et avec une concentration de 10^{-2} mole.l^{-1} de pyrimidine ne permet pas d'avancer une hypothèse sur le nombre d'électrons échangés : celui-ci varierait, le long de la vague, entre 0,6 et 1,1.

Dans les milieux peu acides, lorsque les vagues III et IV sont observables en solution très diluée, plusieurs vagues apparaissent lorsque la concentration devient de l'ordre de 10^{-2} mole.l^{-1}. Des travaux sont en cours pour déterminer, comme pour vagues II_a et II_b, leurs caractéristiques en fonction du pH et de la concentration de pyrimidine.

4. — Discussion.

Dans l'ensemble des résultats que nous venons de décrire il faut distinguer d'une part les propriétés électrochimiques de la pyrimidine en solution aqueuse très diluée, et d'autre part l'influence de la concentration de ce réactif sur ses propriétés de réduction à l'électrode à goutte de mercure.

Lorsque la concentration de pyrimidine est très faible, c'est-à-dire voisine de 10^{-4} mole.l^{-1}, les vagues de réduction polarographique que nous avons observées entre pH 3,0 et 6,6 ont une position, une

forme et une hauteur tout à fait comparables à celles observées par ELVING et dont nous avons rappelé les caractéristiques dans la figure 1. Les relations potentiel de demi-vague/pH sont identiques à celles relevées par ELVING pour la vague I (écarts inférieurs à 15 mV pour $E_{1/2}$ à un pH donné) et comparables pour la vague II (écarts compris entre 35 et 50 mV). Il est important de noter cette similitude des résultats bien que les méthodes expérimentales soient sensiblement différentes puisque nous avons utilisé la polarographie à stillation commandée au lieu de la polarographie à stillation libre, et surtout des mélanges tampons de nature et de concentration différentes.

Par contre, lorsque la pyrimidine n'est plus en solution très diluée et que sa concentration devient supérieure à quelques 10^{-3} mole.l^{-1}, nous pouvons affirmer que sa réduction polarographique est radicalement modifiée. Lorsque le pH est compris entre 3 et 5, c'est-à-dire lorsque les vagues I et II, que l'on pourrait observer en solution très diluée, sont suffisamment distinctes, la réduction qui se faisait en deux étapes en milieu dilué, se décompose en trois étapes. La vague II est alors remplacée par deux vagues de caractéristiques tout à fait différentes. La vague II_a a une position indépendante à la fois du pH et de la concentration de réactif, une pente qui semble compatible avec un échange de 2 électrons et surtout une hauteur indépendante du pH et de la concentration de réactif. La vague II_b, située à un potentiel plus négatif a des caractéristiques qui dépendent toutes fortement de la concentration de pyrimidine. Sa position varie de 100 mV environ lorsque cette concentration passe de 4 à 12.10^{-3} mole.l^{-1}. Dans ce même domaine de concentration sa pente varie continûment du simple au double. La somme des hauteurs des vagues II_a et II_b est égale à celle qu'aurait la vague II dans les mêmes conditions.

Entre pH 3 et 6,6 il faut noter que le courant relatif de diffusion correspondant soit à la somme des vagues I et II, soit à la somme des vagues $I + II_a + II_b$ a une amplitude qui se maintient sensiblement constante alors que des mécanismes qualitativement différents sont mis en place. Le fait que ce courant relatif de diffusion ne dépende ni du pH, ni de la concentration de réactif permet de supposer qu'il correspond à une valeur entière du nombre d'électrons échangés par mole de pyrimidine. Plus précisément nous pouvons admettre que dans nos conditions expérimentales $-\frac{i_d}{C}$ total de 4,8 μA/millimole.l^{-1} correspond à l'extraction d'un nombre entier d'électrons par un flux de molécules de pyrimidine limité par la diffusion de celle-ci vers l'électrode. Pour préciser ce nombre d'électrons nous devons en outre considérer le fait qu'une possibilité supplémentaire de réduction faisant intervenir un courant voisin, donc un même nombre d'électrons (vague IV), a été mise en évidence dans les mêmes conditions. Si nous excluons l'idée que, la molécule de pyrimidine puisse fixer plus de six électrons en tout (avant la rupture du cycle) un courant relatif de 4,8 μA/millimole.l^{-1} ne peut correspondre qu'à 1, 2 ou 3 électrons. La valeur 1 semble pouvoir être raisonnablement exclue étant donné le nombre de mécanismes observé à pH inférieur à 5.

En deuxième lieu nous pouvons admettre que l'analyse de la pente de vague ne peut donner qu'une estimation du nombre d'électrons échangés égale ou inférieure au nombre réel échangé. Si nous appliquons ce raisonnement à la vague I qui se retrouve à travers deux mécanismes qualitativement différents suivant la concentration de pyrimidine, nous pouvons dire que celle-ci correspond au moins à un électron.

Il ressort nettement de cet ensemble de données expérimentales qu'aucune méthode classique n'aboutit, lors de l'interprétation des résultats, à des conclusions qui puissent être considérées comme valables en toutes circonstances. Ceci concerne en particulier les nombres d'électrons mis en jeu dans la réduction de la molécule de la pyrimidine, les échanges de protons couplés à cette réduction et l'intervention éventuelle de réactions secondaires avec le solvant ou entre molécules de pyrimidine. Par exemple l'analyse de la forme des vagues fait apparaître comme valeur possible du nombre d'électrons échangés pour la vague II la valeur unité alors que pour les vagues II_a et II_b, donnant un même courant de diffusion total que la vague II, ces nombres seraient respectivement 2 et 1 soit au total 3 électrons. De même, on note dans les relevés potentiel de demi-vague/pH correspondant à une concentration de 10^{-2} mole.l^{-1} de pyrimidine et à un pH compris entre 3 et 5 que $E_{1/2}$ augmente si le pH augmente alors qu'on ne connaît actuellement aucun cas semblable.

En conséquence, il ne nous semble pas possible de retenir les éléments d'interprétation antérieurement proposés en ce qui concerne la réduction électrochimique de la pyrimidine en solution aqueuse. Avant de pouvoir proposer des mécanismes de réactions à l'électrode tant pour les vagues I et II connues depuis longtemps, que pour les vagues II_a et II_b que nous avons mis en évidence à concentration élevée de pyrimidine, il nous semble nécessaire de déterminer en outre l'influence de la température, des conditions d'apport de réactif à l'électrode et de la nature de celle-ci sur les propriétés électrochimiques de la pyrimidine.

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. de ROSNAY. — *Ann. Chim.*, 1967, 14e série, **2**, 57-79 et 133-148.

(2) J. A. THOMAS. — *Biogenèse*, Coll. Systèmes biologiques élémentaires et la biogenèse, Masson, 1968.

(3) C. PONNAMPERUMA, R. MARINER et C. SAGAN. — *Nature*, 1963, **198**, 1199.

(4) C. PONNAMPERUMA, R. MARINER et C. SAGAN. — *Nature*, 1963, **199**, 222.

(5) C. PONNAMPERUMA. — *O.P.S.*, 1965, p. 221.

(6) G. SCHRAMM, H. GROTSH et W. POLLMANN. — *Angew. Chem.*, 1961, **73**, 619.

(7) G. SCHRAMM, H. GROTSH et W. POLLMANN. — *Angew. Chem.*, (Inter. Ed.) 1962, **1**, 1.

(8) G. Schramm. — *O.P.S.*, 1965, p. 299.
(9) C. Ponnamparuma et R. Mack. — *Sci.*, 1965, **148**, 1221.
(10) B. Pullman et A. Pullman. — *Quantum Biochemistry* (Interscience), 1963.
(11) M. Florkin et E. Schoffeniels. — *Biochimie et Biologie moléculaire*, Desoer, 1967.
(12) A. Szent-Gyorgyi. — *Nature*, 1941, **148**, 157.
(13) A. Szent-Gyorgyi. — *Sci.*, 1941, **93**, 609.
(14) A. Szent-Gyorgi. — *Nature*, 1946, **157**, 875.
(15) A. Katritzky. — *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, A. P. New York, 1963.
A. Albert. — *Propriétés acide-base.*
J. Volke. — *Propriétés oxydo-réductrices.*
(16) L. F. Cavalieri et B. A. Lowy, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **35**, 83-92, 1952.
(17) D. L. Smith et P. J. Elving. — *J. amer. chem. Soc.*, 1962, **84**, 2741-2747.
(18) D. L. Smith et P. J. Elving. — *Anal. Chem.*, 1962, **34**, 930-936.
(19) P. J. Elving, W. A. Struck et D. L. Smith. — *Mises au point de chimie analytique orhanique*, pharmaceutique et bromatologique, 1965, **14**, 141-149.
(20) B. Janik et P. J. Elving. — *Chem. Reviews*, 1968, **68** (3), 295-319.
(21) V. P. Skulachev et L. I. Denisovitch. — *Biokhimiya*, 1966, **31** (1), 132-136.
(22) K. Sugino, K. Shirai, T. Sekine et K. Odo. — *J. Electrochem. Soc.*, 1957, pp. 667-672.
(23) D. Hamer, D. M. Waldron et D. L. Woodhouse. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, **47**, 272-281.
(24) B. Janik et E. Palacek. — *Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med.*, 1966, pp. 513-518.
(25) B. Janik et E. Palacek. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **105**, 225-236.
(26) D. L. Smith et P. J. Elving. — *J. amer. chem. Soc.*, 1962, **84**, 1412-1420.
(27) P. J. Elving. — *Comm. privée*, 1968.
(28) J. C. Cheath. — *Nature*, 1946, **158**, 23.
(29) F. A. McGinn et G. B. Brown. — *J. amer. chem. Soc.*, 1960, **82**, 3193-3195.