

ETUDE POLAROGRAPHIQUE DE LA REDUCTION DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE PAR LES THIOLS

C. REGNAULT ROGER

Faculté de Pharmacie - 5019 MONASTIR , TUNISIE

RESUME

L'étude de la réduction de l'acide déhydroascorbique par les thiols est menée par polarographie classique et différentielle. Le comportement électrochimique des différents réactifs : acide ascorbique et acide déhydroascorbique, glutathion, cystéine et dimercapto-2,3 propanol -1, est examiné ainsi que les avantages que présente l'utilisation de la polarographie dans l'étude de cette réaction.

* * * * *

Les méthodes électrochimiques apparaissent bien adaptées à la détection et au dosage de nombreux composés organiques, vitaminiques ou hormonaux dans des substances complexes, et à l'analyse des réactions d'oxydo-réduction à caractère biologique dans lesquelles ils interviennent.

Les propriétés oxydo-réductrices de l'acide ascorbique (AA), notamment, indiquent qu'il devrait être possible d'étudier par polarographie les réactions dans lesquelles ce composé est impliqué.

Nous nous proposons d'étudier la réduction de l'acide déhydroascorbique (ADA) par les thiols.

Si "in vitro", de nombreux thiols, en particulier la glutathion (GSH), la cystéine (CSH) et le dimercapto-2,3 propanol -1 (ou BAL : British Anti Lewisite), peuvent réduire l'ADA, seul "in vivo" le glutathion tissulaire manifeste de façon significative cette propriété (1,2).

Nous nous sommes donc attaché à suivre plus particulièrement cette dernière réaction tout en recourant à l'utilisation d'autres thiols (CSH, BAL) lorsque l'analogie et la comparaison de leurs réactivités permettaient de préciser les comportements particuliers des réactifs en présence.

La stœchiométrie de cette réaction diffère selon la nature du thiol. Elle est de deux molécules GSH ou de CSH pour une molécule d'ADA et une molécule de BAL pour une molécule d'ADA (fig. 1).

Le présent travail se propose de détailler le comportement polarographique des différents composés mis en œuvre au cours de la réaction étudiée et de dégager l'intérêt que présente l'utilisation de la polarographie pour ce type de réaction.

MATERIEL ET METHODES

Appareillage :

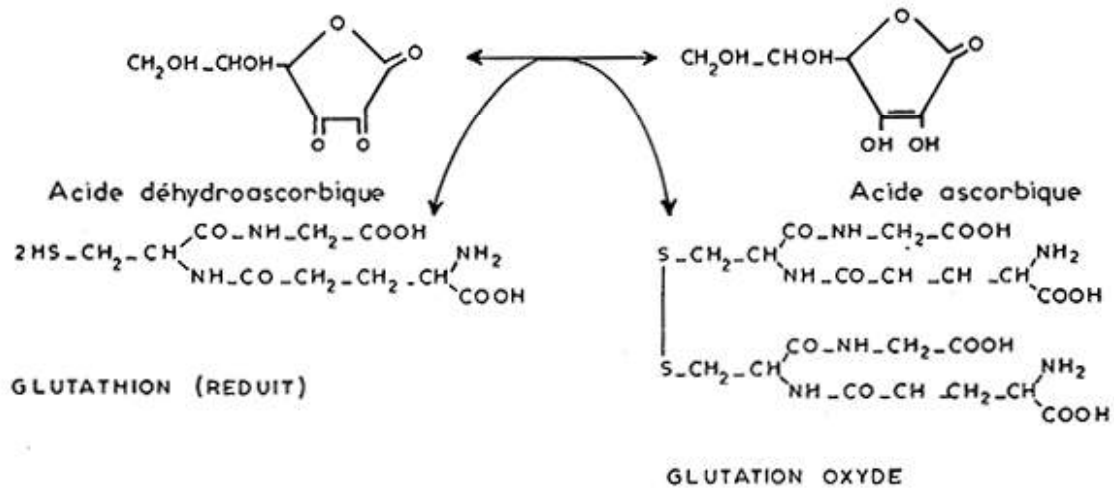
Les courbes voltampérométriques sont obtenues avec un polarographe TACUSSEL PRG5 couplé à un enregistreur SEFRAM X - Y de type TRP.

Réactifs :

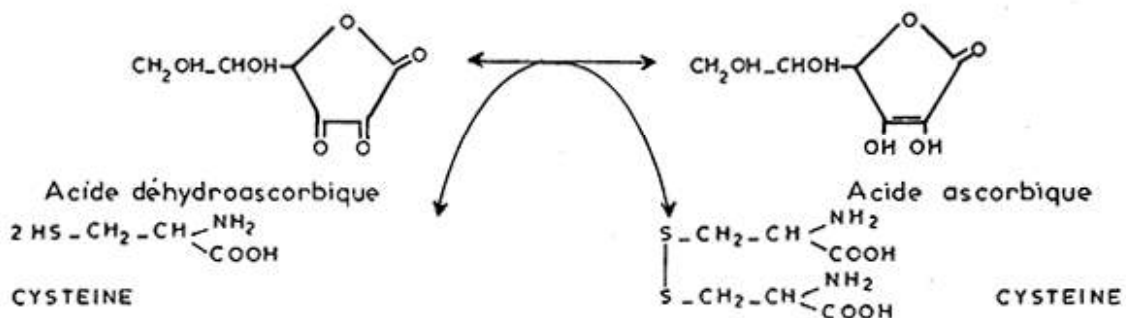
Les produits chimiques sont utilisés sans purification préalable (ppa) : acide ascorbique, glutathion, cystéine, dimercapto-2,3 propanol -1 (Prolabo, France), acide déhydroascorbique (FluKa, Suisse).

DIFFERENTES REDUCTIONS DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE
PAR LES THIOLS

1. Réduction par le glutathion



2. Réduction par la L cystéine



3. Réduction par le dimercapto_2,3 propanol (B.A.L)

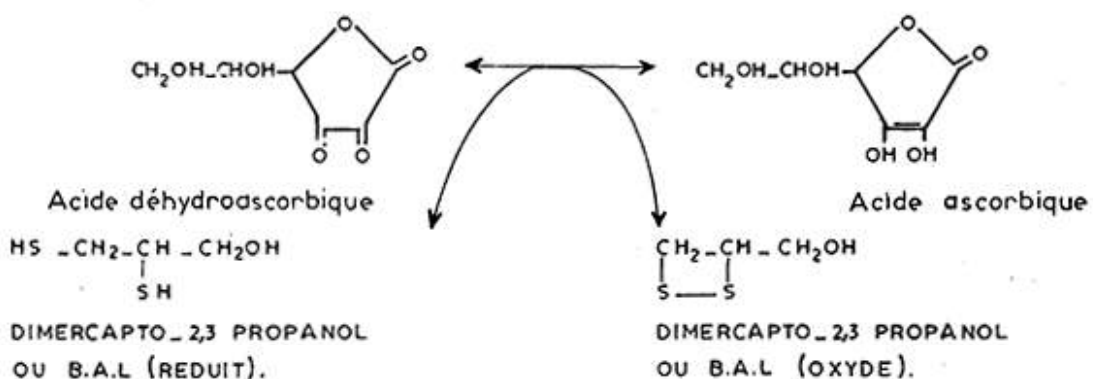


FIGURE 1 : REDUCTION DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE PAR LES THIOLS

Protocole opératoire :

Les réactifs sont dissous dans un tampon phosphate de SØRENSEN (concentration M/15) de pH 6,8 préalablement privé d'oxygène et conservé sous gaz inerte. Le tampon sert d'électro-support et les réactions sont réalisées dans une cellule thermostatée contenant 25 ml d'électrolyte support.

Les courbes polarographiques sont obtenues avec une électrode à goutte de mercure dont le temps de goutte (1 s) est fixé par stillation forcée. La référence est l'électrode au calomel saturé (ECS). Les polarogrammes par impulsions sont obtenus avec des impulsions surimposées de 10 mV.

RESULTATS

1. Comportement électrochimique des réactifs

Le comportement polarographique des différents composés impliqués dans la réaction est examinée dans les conditions opératoires mises en œuvre.

acides dehydroascorbique et ascorbique :

Dans les tampons de Mac Ilvaine et à des pH acides compris entre 2,2 et 5,04, l'ADA présente une vague de réduction de nature cinétique dont le potentiel de demi-vague varie de -0,35V à -0,48V, et dont le courant limite serait contrôlé par la vitesse de déshydratation de l'ADA (3). Cette vague n'atteint que le millième de la hauteur d'une vague de diffusion normale et ne se manifeste que pour des concentrations supérieures à 10^{-2} M. Dans le milieu expérimental utilisé et aux concentrations mises en œuvre, l'ADA ne présente donc aucune vague polarographique.

L'AA présente une ou deux vagues polarographiques, la deuxième n'apparaissant qu'à des pH supérieurs à 8 (4). A pH 6,8, dans le tampon de SØRENSEN, l'AA présente une vague anodique de diffusion de potentiel de demi-vague de -0,04V. Cette vague est accompagnée d'un maximum qui disparaît sous l'influence de tensio-actifs (notamment les thiols à faible concentration).

Les thiols :

Le comportement électrochimique des thiols dépend fortement de la concentration et du pH (5). **Cystéine et cystine** : le polarogramme de la cystéine est comparable à celui obtenu dans le tampon Clark et Lubs ; aux concentrations de l'ordre de 10^{-4} M, la cystéine ne présente qu'une seule vague de diffusion ($E_{1/2} = -0,47V$) tandis qu'à des concentrations plus élevées (de l'ordre de $1,5 \cdot 10^{-3}$ M) deux vagues bien définies apparaissent : une pré vague d'adsorption due à la formation d'un composé disulfure accompagne la vague de diffusion. La polarographie différentielle confirme ces résultats et le phénomène d'adsorption mentionné donne un pic caractéristique.

L'allure des courbes intensités-potentiels de la cystine varie de manière significative avec le temps. Fraîchement dissoute, la cystine présente deux vagues de réduction : une pré vague d'adsorption ($E_{1/2} = -0,48V$) qui ne se manifeste qu'à des pH compris entre 6,8 et 9,5 et une vague de diffusion ($E_{1/2} = -0,85V$). Selon certains auteurs (5), cette pré vague résulterait d'un phénomène d'adsorption et la 2^{ème} vague serait caractéristique d'une réduction irréversible du groupe disulfure.

Glutathion : Les polarogrammes expérimentaux du GSH sont en accord avec la littérature (5). Pour des concentrations supérieures à $8 \cdot 10^{-4}$ M, le GSH présente 3 vagues polarographiques : une vague cathodique ($E_{1/2} = -0,49V$) indépendante de la concentration pour des valeurs supérieures à 10^{-3} M, une vague anodique ($E_{1/2} = -0,35V$) qui présente un maximum important aux hautes concentrations, et une troisième ($E_{1/2} = +0,13V$) qui serait un maximum de second ordre. Aux plus faibles concentra-

tions (10^{-4} M) une seule vague de diffusion apparaît. La polarographie impulsionnelle confirme ces résultats : un seul pic existe à des concentrations égales ou inférieures à 10^{-4} M tandis qu'un pic de potentiel $E_p = -0,36V$ est observé à de plus fortes concentrations, accompagné d'un épaulement insensible à l'augmentation de la concentration. Le glutathion oxydé (GSSG), formé durant la réduction de l'ADA, présente une vague (ou un pic) de diffusion située à un potentiel très négatif. Le système GSH/GSSG est lent.

Dimercapto-2,3 propanol -1 : à une concentration de $8 \cdot 10^{-4}$ M, le BAL présente une double vague d'oxydation semblable à celle du GSH : une pré vague d'adsorption ($E_{1/2} = -0,60V$) et une vague de diffusion ($E_{1/2} = -0,50V$). Aux concentrations supérieures, les phénomènes d'adsorption deviennent plus importants et provoquent des déformations des vagues. Les valeurs de potentiels en tampon phosphate de pH 6,8 ne présentent pas de différence notable avec celles obtenues dans d'autres tampons (6) (respectivement $-0,46V$ et $-0,64V$). Après oxydation, le BAL présente deux vagues polarographiques de réduction une pré vague ($E_{1/2} = -0,62V$) et une vague de diffusion ($E_{1/2} = -0,80V$). Le couple BAL réduit / oxydé se présente comme un système rapide.

2. Etude polarographique de la réaction :

Les différentes réactions sont réalisées en proportions stœchiométriques ou avec un excès d'ADA à des concentrations comprises entre 10^{-4} M et 10^{-2} M : à de trop fortes concentrations de thiols d'importants phénomènes d'adsorption sont constatés. A ces concentrations, il est possible de suivre l'évolution de la réduction de l'ADA par mesure de l'intensité limite de diffusion de la vague ou du pic du thiol réduit, du thiol oxydé ou de l'AA.

Les mesures analytiques ont été réalisées à un potentiel constant de $-0,20V$ (glutathion) et de $-0,35V$ (cystéine).

Plusieurs arguments ont motivé ce choix :

- La vague de diffusion du thiol oxydé est située à des valeurs de potentiels très négatifs et quelques composés très électro-négatifs (notamment des vitamines ou des flavonoides) peuvent interférer avec elle tandis qu'il existe peu d'interférence avec la formule réduite. Un étalonnage interne peut être réalisé.
- bien que la plupart des composés vitaminiques soient déterminés simultanément dans des substances complexes (7,8), il a toutefois été noté des interférences entre l'AA et la thiamine (9,10).
- La vague d'oxydation de l'AA est influencée par la concentration en GSH : une déformation du polarogramme apparaît et le courant limite diminue tandis que la concentration du GSH augmente. Cette diminution résulterait de l'adsorption du GSH à la surface de la goutte de mercure (11). De surcroît, la 3^{ème} vague anodique du GSH interfère avec la vague d'oxydation de l'AA et ne permet pas de déterminer avec précision les intensités limites des courants de diffusion. Le même phénomène est observé avec la cystéine (figure 2 et 3).

En revanche, l'AA atténue les maximums d'adsorption de la vague de diffusion du GSH mais n'en modifie pas la hauteur quelle que soit la quantité d'AA ajoutée.

Dans ces conditions, il est possible d'étalonner cette vague de diffusion en régime pseudo-stationnaire ou le pic correspondant en polarographie impulsionnelle (tableau 1).

Les courbes d'étalonnage, réalisées pour des concentrations de GSH comprises entre $4 \cdot 10^{-5}$ M et $4 \cdot 10^{-3}$ M, ont les équations suivantes :

polarographie classique :
$$I_D = -0,1 (\pm 0,109) + 0,9 (\pm 0,037) 10^3 C$$

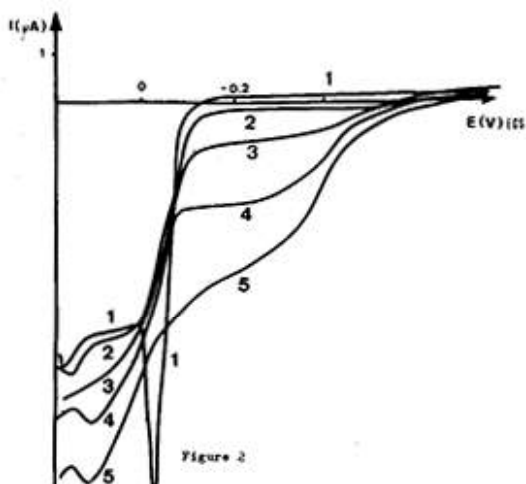
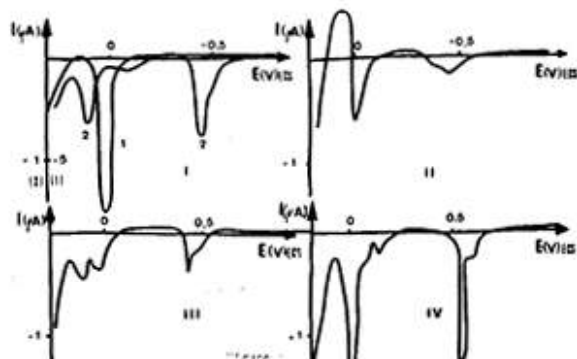


Figure 2
 POLAROGRAMME DE 10⁻³ mol l⁻¹ ASCORBIQUE (10⁻³ mol l⁻¹) DANS LE TAMPON PHOSPHATE DE PH 6,8 : INFLUENCE DU GLUTATHION
 (1) sans glutathion; (2) GSH = 10⁻⁴ mol l⁻¹; (3) GSH = 8 · 10⁻⁴ mol l⁻¹; (4) GSH = 10⁻³ mol l⁻¹; (5) GSH = 2 · 10⁻³ mol l⁻¹
 conditions expérimentales: 0,5 µA cm⁻²; 100 mV s⁻¹; temps de dépôt: 10 s



POLAROGRAMME IMPULSIONNEL DE 10⁻³ mol l⁻¹ ASCORBIQUE (10⁻³ mol l⁻¹) DANS LE TAMPON PHOSPHATE DE PH 6,8 : INFLUENCE DE LA GLUTATHION
 (I) sans GSH; (2) GSH seule = 6 · 10⁻⁴ mol l⁻¹; (III) AA = 10⁻³ mol l⁻¹, GSH = 2 · 10⁻⁴ mol l⁻¹; (II) AA = 10⁻³ mol l⁻¹, GSH = 4 · 10⁻⁴ mol l⁻¹; (IV) AA = 10⁻³ mol l⁻¹, GSH = 10⁻³ mol l⁻¹;
 conditions expérimentales: 0,2 µA cm⁻²; 100 mV s⁻¹; temps de dépôt: 10 s

Polarographie classique (vague E 1/2 = - 0,364 V)		Polarographie impulsionnelle (pic E = - 0,36 V)	
Concentration (10 ⁻³ mol l ⁻¹)	I _D (µA)	concentration (10 ⁻⁴ mol l ⁻¹)	I _p (µA)
1	0,8	0,4	1,36
2	1,7	0,6	2,64
2,5	2,1	0,8	3,6
3	2,65	1	4,32
		2	8
3,25	2,85	3	14,2
3,5	3	4	18,8
		5	22,4
4	3,5	6	26,1

TABLEAU : 1 : ETALONNAGE DU GLUTATHION REDUIT PAR POLAROGRAPHIE HYDRODYNAMIQUE ET DIFFERENTIELLE

- polarographie impulsionnelle : $I_D = -0,13 (\pm 0,84) + 4,49 (\pm 0,26) 10^4 \cdot C$
 (les limites de confiance sont calculées pour une probabilité de 95%).

Par conséquent, les polarogrammes de la réduction de l'ADA par le GSH ou la CHS, qui sont des réactions lentes, présentent simultanément les trois vagues polarographiques des réactifs en présence. L'évolution de ces réactions peut être suivie par la mesure de l'intensité de la vague de diffusion ou de pic du thiol réduit (figure 4a et b).

Les perturbations de polarogrammes de l'AA par le GSH (ou CSH) n'apparaissent cependant pas au cours de la réduction de l'ADA par le BAL. Cette réaction, en effet, est rapide et totale. Aussi, à la fin de la réaction, seuls apparaissent les vagues polarographiques de réduction du BAL oxydé et d'oxydation de l'AA : les groupements SH sont transformés en disulfures et ne perturbent plus la vague

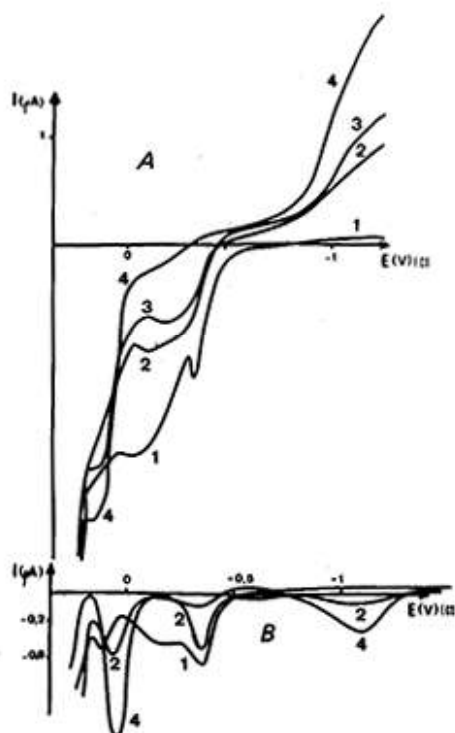


Figure 4
EVOLUTION DES POLAROGRAMMES DU GLUTATHION ($4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) DANS LE TAMPON PHOSPHATE (pH 6,5) PENDANT LA REDUCTION DE L'ACIDE DITHYDROSCORBIQUE ($10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$)
(A) Polarographie classique: $v = 0,5 \text{ μA cm}^{-2}$; $v_{\text{balay}} = 1 \text{ mV s}^{-1}$; temps goutte: 1s
(B) Polarographie impulsionnelle: $v = 0,2 \text{ μA cm}^{-2}$; $v_{\text{balay}} = 1 \text{ mV s}^{-1}$; temps goutte: 10ms; Impulsions: 10ms
(1) $T = 0\text{ms}$; (2) $T = 20\text{ms}$; (3) $T = 45\text{ms}$; (4) $T = 210\text{ms}$

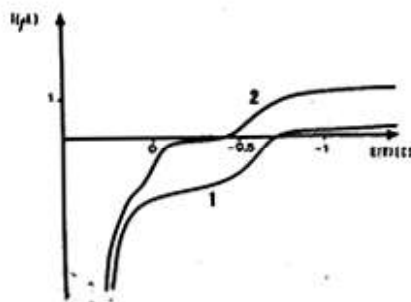


Figure 5
EVOLUTION DES POLAROGRAMMES DU B.A.L. ($6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) DANS LE TAMPON PHOSPHATE DE PH 6,5 PENDANT LA REDUCTION DE L'ACIDE DITHYDROSCORBIQUE ($6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$)
(1) $T = 0\text{ms}$ (2) $T = 7\text{ms}$.
 $v = 0,4 \text{ μA cm}^{-2}$ $v_{\text{balay}} = 0,5 \text{ V s}^{-1}$ temps goutte: 1s

d'oxydation de l'AA. Aussi est-il possible de suivre l'évolution de cette réaction par la mesure de la diminution de la vague de diffusion du thiol mais aussi par l'apparition de la vague d'oxydation de l'AA (figure 5).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les potentiels d'oxydoréduction des systèmes en présence et les constantes d'équilibre correspondantes (respectivement $10^{9,6}$ pour le GSH et $10^{13,6}$ pour le CSH) impliquent une complète réduction de l'ADA par les thiols. Mais la quantité de l'AA formé est différente de celle qu'on pouvait initialement prévoir : dans nos conditions expérimentales les pourcentages de l'AA formé n'ont pas excédé 57% pour le GSH et 35% pour le CSH.

Plusieurs phénomènes peuvent être considérés :

- La complexité des systèmes ADA/AA et surtout RSH/RSSR, soulignée par les difficultés rencontrées pour établir la valeur de leurs potentiels d'oxydo-réduction (12).
- L'instabilité des réactifs : importante pour les thiols en milieu alcalin et pour l'AA en présence d'oxygène (13,14), l'oxydation de ces composés est négligeable dans nos conditions expérimentales. Elle reste cependant importante pour l'ADA, comme ce fut souligné (14,15) dans la littérature. Cette instabilité peut être également observée par voltampérométrie : l'ADA, en solution vieillissante, est réduit en proportions stœchiométriques par le BAL. Une partie de l'ADA est oxydée de façon irréversible en acide dicétogulonique. Les paramètres cinétiques de la réaction ont été établis (16).

Aussi, la seule réaction parmi celles qui ont été étudiées dont les données cinétiques et thermodynamiques coïncident, est la réduction de l'ADA par le BAL qui est une réaction rapide. En moins de 7 mn, 98% de l'ADA est réduit en AA. Ce résultat justifie l'utilisation du dimercapto-2,3 propanol-1 comme stabilisateur de la vitamine C dans les aliments (17).

Sur le plan analytique, la détermination des thiols et de la vitamine C dans des milieux variés (chimiques, biologiques, alimentaires) est maintenant réalisée par des méthodes chromatographiques ou électrochimiques très performantes.

La polarographie se révèle également une méthode de choix pour suivre des réactions d'oxydo-réduction à caractère biologique comme la réduction de l'acide déhydroascorbique par les thiols. Sa mise en œuvre présente plusieurs avantages sur les méthodes d'absorptiométrie classiques (notamment la méthode de TILLMANS (18) longtemps employée) : un large domaine de concentration (avec une limite expérimentale d'environ 10^{-5} M), un dispositif expérimental qui diminue les risques de dégradation des réactifs instables, pas d'interférence colorimétrique et la possibilité de suivre simultanément tous les constituants de la réaction.

REMERCIEMENTS

Une partie de ce travail a été réalisée au laboratoire d'Electrochimie Analytique et Appliquée, associé au CNRS n° 216, de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP). Nous remercions vivement le Professeur B. TREMILLON de nous avoir accueillie dans son laboratoire et nous exprimons notre profonde gratitude au D^r J. DEVYNK, directeur de Recherche au CNRS, sans lequel ce travail n'aurait pu être réalisé, de sa disponibilité et des conseils qu'il nous a prodigués au cours de cette recherche.

*Soumis en Novembre 84
accepté en Mars 85*

BIBLIOGRAPHIE

- 1) E. GERO, A. CANDIDO, Int. J. Vit. Nut. Res., 1969, 39, 152
- 2) E. M. CROOK, F. G. HOPKINS, Biochem. J., 1938, 30, 1356.
- 3) S. ONO, M. TAKAGI, T. WASA, Bull. Chem. Soc. Japon, 1958, 31 (3), 356
- 4) J. J. RUIZ, A. ALOAZ, M. DOMINGUEZ, Can. J. Chem. 1977, 55(15), 2799
- 5) C. A. MAIRESSE - DUCARMOIS, PATRIARCHE, G. J, J. L. VANDELBALK : Anal Chim. Acta, 1974, 71, 165 ; 1975, 76, 299 ; 1976, 84, 347 ; 1977, 88, 47 ; 1977, 90, 103.
- 6) J. HEYROVSKI, J. KUTA, Principles of polarography, Academic Press, London, New-York, 1966 549 pp.
- 7) E. JACOBSEN, M. WIESE BOORSEN, Anal. Chim. Acta, 1978, 96, 345.
- 8) M. JOZAN, G. SZASZ, K. SZEMEREDY, Acta. Pharm Hung, 1980, 50(4), 153
- 9) P. SODERJHERM, J. LINQUIST, Acta. Pharm. Suec, 1976, 13, 201.

- 10) L. I. RAPAPORT, E.L. IVCHENKO, Farmatsiya (Moscou), 1971, 20 (3), 41
- 11) M. TOMANA, Collec. Czech. Chem. Comm, 1966, 31, 4728
- 12) W. A. CLARK, Oxidation Reduction Potentials of organic systems, William. and Wilkins, Baltimore, 1960.
- 13) P. MADER, J. VOLKE, J. KUTA, Collec. Czech. Chem. Comm, 1970, 35, 552
- 14) C. NOFFRE, A. CIER, D. REVON, Bull. Soc. Chim. Paris, 1960, 5, 245
- 15) H. BORSOOK, H. W. DAVENPORT, C. E. P. JEFFREYS, R. C. WARNER, J. Biol. Chem, 1937, 117, 237.
- 16) C. REGNAULT ROGER, GAZAVE J. M., J. DEVYNK, Int, J. Vit. Nut. Res, 1982, 52, 159.
- 17) C. F. BOURGEOIS, P. MANGUY, Analisis, 1973, 2, 556.
- 18) TILLMANS J., P. HIRSCH, J. JAKISH, Z. Untersuch. Lebenn, 1932, 63, 241.