

DETERMINATION SIMULTANEE DE L'ENTHALPIE, DE L'ENTHALPIE LIBRE VIA LE COEFFICIENT DE PARTAGE ET DE L'ENTROPIE DE TRANSFERT EAU/*n*-OCTANOL DE L'EPHEDRINE PAR TITRIMETRIE THERMOMETRIQUE

GWENOLA BURGOT

Laboratoire de Chimie Analytique, U.E.R. du Médicament, Université de Rennes I, Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex (France)

JEAN-LOUIS BURGOT

Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Université de Lille II, Rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille Cedex (France)

(Reçu le 7 juin 1984)

ABSTRACT

Thermometric titrimetry allows the simultaneous determination of the three thermodynamic parameters of transfer (ΔG_T^0 , ΔH_T^0 and ΔS_T^0) of ephedrine from water to *n*-octanol. Principle, methods, results and discussion are given.

RESUME

Un titrage thermométrique du soluté en présence de deux solvants non miscibles permet, dans certaines conditions expérimentales, d'accéder simultanément à son enthalpie, à son enthalpie libre (via le coefficient de partage) et donc à son entropie de transfert d'un solvant à l'autre. Le principe de ces déterminations appliqué au système éphédrine/eau/*n*-octanol conduit à des résultats en plein accord avec ceux de la littérature.

INTRODUCTION

La connaissance des composantes enthalpique et entropique de la variation d'énergie libre accompagnant le transfert de solutés apolaires ou peu polaires d'une phase aqueuse à une phase organique non miscible est d'un grand intérêt. Pour rester dans le seul domaine de la pharmacochimie, il suffit de songer aux multiples corrélations coefficients de partage-propriétés pharmacologiques qui ont déjà été effectuées pour se rendre compte que l'obtention de ces paramètres thermodynamiques de transfert va ouvrir le champ à de nombreuses recherches [1]. Car c'est un fait que la variation

d'énergie libre de transfert a fait l'objet de très nombreuses déterminations via l'obtention du coefficient de partage qui en est finalement une autre expression (voir, par exemple, réf. 2).

Par contre, beaucoup moins de valeurs d'enthalpies de transfert sont mentionnées dans la littérature. Elles sont obtenues (liste non exhaustive):

(1) soit par mesure des chaleurs de solution du soluté dans les deux solvants [3-7];

(2) soit par application de l'équation de Van't Hoff après détermination du coefficient de partage à différentes températures [8-17];

(3) soit après des mesures cinétiques de transfert [10,11,18-26];

(4) soit par mesure calorimétrique indirecte permettant d'obtenir globalement la somme de la chaleur de transfert et de la chaleur d'ionisation ou de neutralisation connue par ailleurs [27-29];

(5) soit par détermination des chaleurs de mélange des deux phases contenant des concentrations différentes en soluté [30-34].

Quant aux entropies de transfert, elles sont obtenues par différence.

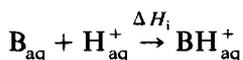
Nous montrons dans cette note qu'un titrage thermométrique du soluté en présence des deux solvants non miscibles permet, dans certaines conditions expérimentales, d'accéder simultanément à son enthalpie et à son enthalpie libre de transfert (via le coefficient de partage). Nous prenons l'exemple du titrage de l'éphédrine-base par une solution d'acide chlorhydrique en présence d'eau et d'octanol-1. En effet des valeurs des paramètres de transfert eau/octanol-1, de cette molécule ont été déterminées récemment par une méthode cinétique [24,25]. D'autre part, l'éphédrine présente l'avantage d'être bien soluble en phase aqueuse et l'ion éphédrinium celui de ne pas donner dans l'octanol-1 des réactions d'association et des paires d'ions [24].

PARTIE THEORIQUE

Symbolisme

B et BH^+	éphédrine et ion éphédrinium
$P = \frac{ B _{org}}{ B _{aq}}$	coefficient de partage
V_{aq}	volume de la phase aqueuse avant toute addition (l)
v	volume de solution titrante ajouté (l)
V_{org}	volume d'octanol-1 (l)
C_t	concentration de la solution titrante (mol l^{-1})
N_0	nombre total de moles d'éphédrine sous toutes ses formes
ΔH_T	enthalpie de transfert (J mol^{-1})
	$B_{org} \xrightarrow{\Delta H_T} B_{aq}$

ΔH_i enthalpie de protonation (J mol^{-1})



r $V_{\text{aq}}/V_{\text{org}}$ rapport des volumes de phases aqueuse et organique

$$A \quad C_t \Delta H_i + \frac{C_t \Delta H_T}{1 + \frac{r}{P}}$$

Principe

Avant toute addition de la solution titrante, les N_0 moles sont partagées entre les deux phases. Soient $|\text{B}^0|_{\text{org}}$, $|\text{BH}^{+0}|_{\text{aq}}$ et $|\text{B}^0|_{\text{aq}}$ les concentrations initiales. En tout point du titrage, l'équation d'électroneutralité donne

$$|\text{BH}^+|_{\text{aq}} + |\text{H}^+|_{\text{aq}} = |\text{Cl}^-|_{\text{aq}} + |\text{OH}^-|_{\text{aq}} \quad (1)$$

avec $|\text{Cl}^-|_{\text{aq}} = C_t v / (V_{\text{aq}} + v)$.

Si on ne retient que les effets thermiques qui correspondent aux points du titrage tels que dans (1) $|\text{H}^+|_{\text{aq}}$ et $|\text{OH}^-|_{\text{aq}}$ soient négligeables respectivement devant $|\text{BH}^+|_{\text{aq}}$ et $|\text{Cl}^-|_{\text{aq}}$, on a

$$|\text{BH}^+|_{\text{aq}} = \frac{C_t v}{V_{\text{aq}} + v}$$

d'où

$$|\text{B}|_{\text{aq}}(V_{\text{aq}} + v) + |\text{B}|_{\text{org}} V_{\text{org}} = N_0 - C_t v$$

Lorsque les conditions sont telles que l'équilibre entre les deux phases est atteint

$$\frac{|\text{B}|_{\text{org}}}{|\text{B}|_{\text{aq}}} = P \text{ d'où } |\text{B}|_{\text{org}} = \frac{N_0 - C_t v}{(V_{\text{aq}} + v)/P + V_{\text{org}}}$$

Les nombres de moles d'éphédrine transférée et protonée sont respectivement

$$(|\text{B}^0|_{\text{org}} - |\text{B}|_{\text{org}}) V_{\text{org}} = \left[|\text{B}^0|_{\text{org}} - \frac{N_0 - C_t v}{(V_{\text{aq}} + v)/P + V_{\text{org}}} \right] V_{\text{org}}$$

$$|\text{BH}^+|_{\text{aq}}(V_{\text{aq}} + v) - |\text{BH}^{+0}|_{\text{aq}} V_{\text{aq}} = C_t v - |\text{BH}^{+0}|_{\text{aq}} V_{\text{aq}}$$

L'effet thermique expérimentalement mesuré est donné par la relation

$$q = (C_t v - |\text{BH}^{+0}|_{\text{aq}} V_{\text{aq}}) \Delta H_i + \left[|\text{B}^0|_{\text{org}} - \frac{N_0 - C_t v}{(V_{\text{aq}} + v)/P + V_{\text{org}}} \right] V_{\text{org}} \Delta H_T$$

En regroupant tous les termes constants et en s'arrangeant pour que, en tout point du titrage, $v \ll V_{\text{aq}} + P V_{\text{org}}$ (la condition $v \ll$ volume de solution à titrer, est systématiquement recherchée en titrimétrie thermométrique pour

s'affranchir des écarts à la linéarité liés à la variation de la capacité calorifique) on aboutit à la relation (2)

$$q = \text{constante} + \left(C_t \Delta H_i + \frac{C_t \Delta H_T}{1 + r/P} \right) v \quad (2)$$

La pente A de la droite des effets thermiques/volume de solution titrante ajouté est fonction des deux paramètres ΔH_T et P cherchés et aussi du rapport des volumes r ajustable expérimentalement. La détermination des pentes par regression linéaires q/v pour deux et mieux pour plusieurs valeurs de r différentes donne P et ΔH_T .

En considérant que les solutions sont assez diluées pour que P ainsi déterminé soit le coefficient de partage thermodynamique, la variation d'énergie libre standard accompagnant le transfert $\text{aq} \rightarrow \text{org}$ est donnée par [2]

$$\Delta G_T^0 = -RT \ln P$$

Pour le calcul de cette dernière, nous laissons P rapporté à l'échelle des concentrations molaires, car selon Ben-Naim [35]), seule l'enthalpie libre de transfert rapportée à cette échelle correspond exactement à la différence de solvation du soluté dans les deux solvants. D'autre part, nous considérons également que les solutions sont suffisamment diluées pour pouvoir assimiler variation d'enthalpie et variation d'enthalpie standard [36]. En conséquence la variation d'entropie ΔS_T^0 calculée par l'expression

$$\Delta H_T^0 = \Delta G_T^0 + T \Delta S_T^0 \quad (3)$$

sera la variation d'entropie standard.

La légitimité de la relation (2) implique que:

(1) P ne varie pas d'un volume de solution titrante ajouté à un autre et d'un rapport r à l'autre;

(2) le relargage de l'octanol par l'éphédrine transférée soit négligeable.

Il est bien connu que pour les solutés non ioniques, ces conditions s'appliquent lorsque les solutions sont suffisamment diluées [28].

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareillage

C'est notre ensemble de titrage thermométrique adiabatique décrit par ailleurs [37]. Le déséquilibre du pont de Wheatstone dû aux variations de température est traité immédiatement par un micro-ordinateur H.P.85 qui est interfacé. De très nombreuses mesures répétitives permettent d'estimer un écart-type de l'ordre de 0,08 J pour un effet thermique moyen de 4,50 J.

Solutions

L'octanol est l'octanol-1 Merck qualité très pure. Avant utilisation il est distillé sous vide partiel en coupant systématiquement les tête et queue de distillation.

Les solvants eau et octanol sont préalablement saturés mutuellement eu égard à leur miscibilité qui n'est pas nulle [9,38] et qui entraînerait, si les solutions pures étaient employées, un changement de titre et un effet thermique [25] non négligeable.

Les solutions d'éphédrine sont préparées par pesée de (-) ephedrine anhydrous "Sigma" anhydre et dissolution le plus souvent dans la phase aqueuse. La dissolution initiale du même nombre de moles dans l'octanol ne modifie pas les résultats obtenus. La qualité anhydre est vérifiée au cours du titrage thermométrique lui-même puisque le volume de solution d'acide chlorhydrique versé au point équivalent permet d'apprécier le nombre de moles réellement pesées. Aucun résultat contradictoire n'a été constaté. De toute façon, l'utilisation des pentes pour obtenir les paramètres recherchés élimine un tel problème.

Conditions opératoires

Le volume total des deux phases dans le calorimètre est de $92 \cdot 10^{-3}$ l. Les volumes d'octanol retenus sont: 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 et $42 \cdot 10^{-3}$ l conférant à r les valeurs: ∞ ; 91, 45 17, 40 8,20 5,13 3,60 2,07 1,19.

$N_0 = 10^{-3}$ mol. Les concentrations dans les deux phases sont donc faibles spécialement pour la phase aqueuse, ce qui permet l'assimilation des activités aux concentrations.

$$C_i = 1 \text{ mol l}^{-1}$$

Le débit de la burette est de $8,658 \times 10^{-6}$ l s⁻¹. C'est le meilleur compromis entre la précision de la burette, le temps d'équilibrage du calorimètre, les pertes avec l'extérieur et les effets cinétiques découlant du transfert d'une phase à l'autre (voir discussion).

Les regressions linéaires sont effectuées sur les 19 premiers points qui se succèdent toutes les 4 s.

Obtention des paramètres ΔH_i , ΔH_T^0 et ΔG_T^0 (ou P)

Dans un premier temps, pour chaque valeur de r choisie, la regression linéaire q/v conduit à la pente A de la relation affine (2). Dans un deuxième temps, une regression non linéaire A/r permet d'accéder aux trois paramètres. Ce procédé permet d'exploiter simultanément l'ensemble des données expérimentales ce que ne permettrait pas le calcul effectué à partir de trois pentes A choisies arbitrairement afin de résoudre le système à trois

inconnues. De plus, le théorème de la propagation des erreurs permet de prévoir que, lors de l'application de ce dernier procédé, des faibles erreurs sur les pentes utilisées entraînent une grande incertitude sur les résultats obtenus.

Ce sont les pentes moyennes établies à partir le plus souvent de sept manipulations indépendantes, pour une même valeur de r , ainsi que les variances des populations correspondantes (pour la pondération) qui sont utilisées dans la regression non linéaire. Celle-ci est effectuée selon l'algorithme de Newton–Gauss, adapté par Deming, tel qu'il est présenté par Wentworth [39]. Le programme est assez simple pour être traité par une calculatrice de poche (H.P. 41 CV) *.

Bien que l'enthalpie ΔH_i soit déterminée indépendamment ($r = \infty$), elle est considérée commé troisième inconnue dans la regression non linéaire. Ceci permet de prendre en compte, très simplement, les erreurs l'entâchant pour l'estimation, via la matrice des covariances, de celles régnant sur les valeurs déterminées de ΔH_T^0 et P . De même pour calculer l'écart-type sur la variation d'entropie standard ΔS_T^0 , il faut appliquer le théorème de la propagation des erreurs à la relation (3), ce qui implique de connaître la covariance $\sigma_{\Delta H_T^0 \Delta G_T^0}$. Celle-ci est donnée immédiatement par la matrice des covariances si dans l'expression de A , P est remplacé par son expression en ΔG_T^0 , c'est-à-dire si, lors de la regression non linéaire, les paramètres à ajuster sont ΔH_T^0 , ΔG_T^0 et ΔH_i .

En ce qui concerne les regressions q/v , une seule regression linéaire tenant compte de tous les effets thermiques pour un rapport r donné n'est pas satisfaisante car les tests statistiques montrent que, si les pentes proviennent de la même population, les ordonnées à l'origine, dont les valeurs très faibles sont dans les limites de l'imprécision conférées par notre appareillage (et qui d'ailleurs nous importent peu) diffèrent suffisamment pour justifier le traitement séparé que nous retenons.

RESULTATS

Nous mentionnons dans le Tableau 1 les pentes A obtenues pour les différents rapports r , les pentes moyennes \bar{A} , les variances sur les populations et celles sur les moyennes correspondantes.

Dans le Tableau 2, nous notons les estimations obtenues pour les paramètres cherchés et leurs variances, ainsi que les valeurs de la littérature.

* Les auteurs tiennent à la disposition du lecteur l'algorithme et le programme.

TABLEAU I

Pentes A pour différents r après regressions linéaires q/v

$A(JI^{-1})$	$r = \infty$	$r = 91$	$r = 45$	$r = 17,50$	$r = 8,20$	$r = 5,13$	$r = 3,60$	$r = 2,07$	$r = 1,19$
1	-45030	-47080	-47520	-50880	-52790	-53690	-55130	-56260	-57450
2	-45140	-46680	-48440	-50640	-53680	-53540	-56200	-55770	-56590
3	-45150	-46750	-47490	-50710	-53100	-54816	-54390	-56100	-57090
4	-44660	-46500	-47830	-50330	-53520	-54530	-55410	-55690	-56360
5	-45340	-47540	-48240	-50470	-52320	-54630	-55380	-56420	-56640
6	-45350	-46390	-48220	-50430	-52630	-54650	-55030	-56640	-57140
7	-45360	-46350	-47910	-49910	-52590	-54520	-54620	-55750	-57250
8	-45600	-47040							
9	-44970								
10	-44930								
11	-45010								
\bar{A}	-45140	-46792	-47951	-50483	-52947	-54340	-55167	-56091	-56931
σ^2	$6,81 \times 10^4$	$1,67 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$	$9,86 \times 10^4$	$2,58 \times 10^5$	$2,56 \times 10^5$	$3,48 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$
σ_m^2	$6,19 \times 10^3$	$2,08 \times 10^4$	$1,93 \times 10^4$	$1,41 \times 10^4$	$3,68 \times 10^4$	$3,65 \times 10^4$	$4,98 \times 10^4$	$1,94 \times 10^4$	$2,28 \times 10^4$

TABLEAU 2

Valeurs obtenues après régression non linéaire

	Estimations	σ^2	Litt. [25]
ΔG_T^0	-6270 J mol^{-1}	2501	-6200 J mol^{-1}
P	12,54	$6,41 \times 10^{-2}$	12,20
ΔH_T^0	$-12837 \text{ J mol}^{-1}$	4770	$-13900 \text{ J mol}^{-1}$
ΔS_T^0 ^a	$64,09 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	10^{-1} ^b	$67 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

^a Après application de la relation (3).^b Après application du théorème de la propagation des erreurs $\sigma_{\Delta H_T^0 \Delta G_T^0} = -1825$ (voir partie expérimentale).

DISCUSSION

(1) Tous les résultats obtenus sont en plein accord avec ceux de Brodin et al. [25]. En ce qui concerne la valeur de P notre estimation (ainsi que celle de Brodin et al.) est très nettement différente de celle de réf. 40 ($P = 36,50$). Par contre, elle est proche d'une autre donnée dans la littérature [41] ($P = 8,51$).

(2) Le "fit" de l'hyperbole A/r est excellent:

(a) d'une part l'alternance des résidus est nette;

(b) d'autre part, les valeurs des pentes A calculées à partir de celles obtenues pour les paramètres ΔH_i , ΔH_T^0 et P , ne s'écartent même pas d'un écart type relatif aux moyennes de la moyenne des valeurs expérimentales (Tableau 3).

(3) La cohérence de ces résultats expérimentaux quelle que soit la valeur de r choisie plaide, en soi, en faveur d'une non interférence des cinétiques de transfert d'un compartiment à l'autre. Les cassures nettes des thermogrammes aux points équivalents attendus en sont une preuve supplémentaire. Il est en effet intuitif, et dans certains cas démontré [42-44] qu'un effet cinétique retarde, quelquefois considérablement, l'apparition du point équivalent (lorsqu'il reste même discernable!). De plus, les "fits" des régressions linéaires q/v sont très bons (coefficients de corrélations dans tous les cas supérieurs à 0,9995) et excluent des courbures d'origine cinétique. Enfin, des mesures effectuées avec un débit beaucoup plus important ($7,177 \cdot 10^{-5} \text{ l}$

TABLEAU 3

Comparaison des résultats expérimentaux et calculés

r	∞	91	45	17,40	8,20	5,13	3,60	2,07	1,19
\bar{A}	-45140	-46792	-47951	-50483	-52947	-54340	-55167	-56091	-56931
A_{calc}	-45153	-46709	-47952	-50531	-52917	-54263	-55128	-56175	-56878
Résidu	-13	+83	-1	-48	+30	+77	+39	-84	+53
σ_m		79	144	139	119	192	191	223	139

s^{-1}) nous ont permis d'avoir une estimation des constantes de vitesse qui commandent les transferts. Leurs valeurs corroborent bien le fait que, dans les conditions expérimentales retenues dans ce travail, les transferts doivent être considérés comme immédiats. Ces considérations feront l'objet d'une publication ultérieure.

(4) Un calcul à "l'envers" effectué avec la valeur de P obtenue, permet de constater que pour les volumes de solution titrante retenus pour calculer les pentes $A|H^+|_{aq}$ et $|OH^-|_{aq}$ sont bien négligeables (voir partie théorique).

CONCLUSION

Ces résultats montrent que la titrimétrie thermométrique est une technique commode et rapide pour obtenir les trois paramètres thermodynamiques de transfert de l'éphédrine. Elle présente l'avantage évident de conduire à une estimation des trois fonctions thermodynamique établie dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous travaillons, à l'heure actuelle, à l'application du procédé à d'autres composés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Leo, C. Hansch et D. Elkins, *Chem. Rev.*, 71 (1971) 525.
- 2 B. Tremillon, dans *La Chimie en Solvants Non-Aqueux*, Presses Universitaires de France, Paris, 1971.
- 3 R. Aveyard et R.W. Mitchell, *Trans. Faraday Soc.*, 65 (1969) 2645.
- 4 R. Aveyard et R.W. Mitchell, *Trans. Faraday Soc.*, 66 (1970) 37.
- 5 C.V. Krisham et H. Friedman, *J. Phys. Chem.*, 73 (1969) 1572.
- 6 Y. Marcus, *J. Chem. Eng. Data*, 20 (1975) 141.
- 7 A.E. Beezer, W.H. Hunter et D.E. Storey, *J. Pharm. Pharmacol.*, 35 (1983) 350.
- 8 M.J. James, S.S. Davis et N. Anderson, *J. Pharm. Pharmacol.*, (1981) 108P.
- 9 A.E. Beezer, W.H. Hunter et D.E. Storey, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32 (1980) 815.
- 10 R. Fleming, R.H. Guy et J. Hadgraft, *J. Pharm. Sci.*, 72 (1983) 142.
- 11 N.H. Anderson, S.S. Davis, M. James et I. Kojima, *J. Pharm. Sci.*, 72 (1983) 443.
- 12 A. Gomez, J. Mullens et P. Huyskens, *J. Phys. Chem.*, 76 (1972) 4011.
- 13 E.M. Wooley, J.G. Travers, B.P. Erno et L. Hepler, *J. Phys. Chem.*, 75 (1971) 3591.
- 14 N.H. Sagert et W. Lee, *Can. J. Chem.*, 58 (1980) 1463.
- 15 P.K. Nandi, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 8 (1976) 253.
- 16 I. Ueda, K. Oguchi et K. Arakawa, *Anesth. Analg. (Paris)*, 61 (1982) 56.
- 17 H.J. Wynne, K.H. van Buuren et W. Walkelkamp, *Experientia*, 38 (1982) 655.
- 18 R.H. Guy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1983) 404.
- 19 R.H. Guy, T.R. Aquino et D.H. Honda, *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 2861.
- 20 G.E. Schumacker et J.B. Nagwekar, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 240.
- 21 G.E. Schumacker et J.B. Nagwekar, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 245.
- 22 A. Brodin et A. Ågren, *Acta Pharm. Suec.*, 8 (1971) 609.
- 23 A. Brodin et M.I. Nilsson, *Acta Pharm. Suec.*, 10 (1973) 187.

- 24 A. Brodin, *Acta Pharm. Suec.*, 11 (1974) 141.
- 25 A. Brodin, B. Sandin et B. Fojjerson, *Acta Pharm. Suec.*, 13 (1976) 331.
- 26 L. Koprivc, E. Polla et J. Hranilovic, *Acta Pharm. Jugosl.*, 26 (1976) 29.
- 27 K.J. Breslauer, B. Terrin et J.M. Sturtevant, *J. Phys. Chem.*, 78 (1974) 2363.
- 28 K.J. Breslauer, L. Witkowski et K. Bulas, *J. Phys. Chem.*, 82 (1978) 675.
- 29 W. Riebesehl et E. Tomlinson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 79 (1983) 1311.
- 30 R. De Lisi, M. Goffredi et V.T. Liveri, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1980) 380.
- 31 M. Goffredi et V.T. Liveri, *J. Solution Chem.*, 10 (1981) 693.
- 32 M. Goffredi et V.T. Liveri, *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 2455.
- 33 R. De Lisi, C. Genova et V. Turco Liveri, *J. Colloid Interface Sci.*, 95 (1983) 428.
- 34 M. Goffredi, J. Liszi, B. Nemeth et V. Turco Liveri, *J. Solution Chem.*, 12 (1983) 221.
- 35 A. Ben-Naim, *J. Phys. Chem.*, 82 (1978) 792.
- 36 I.M. Klotz, dans *Chemical Thermodynamics*, Benjamin, New York, 1964.
- 37 M. Bernard et J.L. Burgot, *Talanta*, 28 (1981) 939.
- 38 R.N. Smith, C. Hansch et M.M. Ames, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 599.
- 39 W.E. Wentworth, *J. Chem. Educ.*, 42 (1965) 96.
- 40 E.J. Lien, dans E.J. Ariens (Ed.), *Drug Design*, Vol. V, Academic Press, New York, 1975.
- 41 S. Anderson, unpublished analysis (voir réf. 1).
- 42 R.E. Cover et L. Meites, *J. Phys. Chem.*, 67 (1963) 1528.
- 43 R.E. Cover et L. Meites, *J. Phys. Chem.*, 67 (1963) 2311.
- 44 P.W. Carr et J. Jordan, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 634.