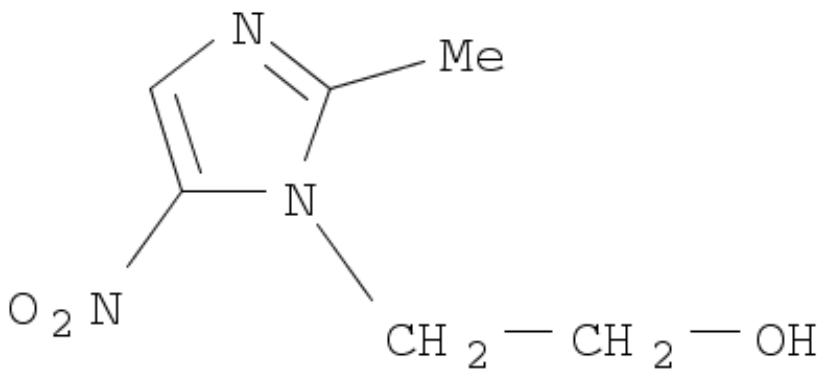
Rapport d'Analyse Structurale par Spectrométrie

Di Pascoli Thomas – M1 VRV
2010-2011

Principe actif n° 51 : « métronidazole »



2-(2-methyl-5-nitro-1imidazolyl)éthanol

I. Introduction :

Durant ces TP nous avons été amené à déterminer la structure d'une molécule pharmaceutique inconnue sous forme de poudre, pour se faire nous avons eu recours à plusieurs types d'analyses :

- Des analyses de **spectrométrie de masse** :
  - **ESI** (ElectroSpray Ionization), c'est un système d'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) couplé à un spectromètre de masse qui ionise la molécule par un champ électrique intense.
    Solution (S1) de la molécule 51 à 1mg/mL dans de l'acétonitrile.
  - **EI** (Electron Ionization) qui est couplé à une GC (Gaz Chromatography) qui ionise la molécule par impact électronique et génère des fragments.
    Dilution de S1 au 20ième (50µL/mL) dans de l'acétate d'éthyle.
  - **MALDI-TOF** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) qui est une méthode d'ionisation beaucoup plus douce et va donc générer peu de fragments.
    Solution (S2) à 5mg/200µL (100µL acétonitrile + 100µL DMSO) sur une matrice HCCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique).
- Des analyses de **résonance magnétique nucléaire (RMN)** :
  - **RMN 1D ^{1}H** ; **RMN 2D ^{1}H** ; **RMN 1D ^{13}C** ; **RMN 1D ^{13}C (DEPT 135°)** ; **RMN 1D ^{13}C (DEPT 90°)**. Les spectres RMN ^{1}H permettent de savoir combien de molécules d'hydrogènes sont présentes dans notre molécule. La RMN 2D permet de mettre en évidence les couplages scalaires entre les protons. La RMN ^{13}C permet de déterminer le nombre de carbones, puis par Dept 135° d'en déduire les CH2 (négatifs) et C quaternaires (non présents sur le spectre mais présents sur le spectre 1D ^{13}C). Enfin le Dept 90° nous permet de distinguer les CH et par conséquent les CH3 (présents en Dept135° mais pas en Dept90°).
    Pour se faire nous avons préparé une solution à 20mg de molécule 51 dans 0,5mL de DMSO $^{2}D_6$.

- Une analyse par spectrométrie **UV-visible** :
  - Une solution de la molécule 51 à 1mg/mL dans de l'eau (soluble également dans l'éthanol mais eau a été choisie).
- Une analyse par spectrométrie **infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)** sur pastille de KBr :
  - 3mg de poudre de la molécule 51 mélangé avec 200mg de KBr qui est comprimé en pastille et analysé.

Les études des analyses présentées dans la suite ont permis de trouver la structure du composé 51 qui est le métronidazole.

II. Résultats :

1. Spectrométries de masse :

a) Détermination du pic moléculaire :

Grâce aux différentes spectrométries de masses nous avons dans un premier temps pu déterminer le pic moléculaire de notre composé, en effet en **ESI** on voit un très fort pic à **172,0** pour m/z, en **EI** on observe un pic à **172,3** et à **172,06** en **MALDI-TOF** en mode ($M+H^+$). On peut donc déduire que la masse molaire du composé 51 est :

$$\mathbf{171{,}0 < PM_{51} < 171{,}3\ g/mol}$$

De cette masse impaire on peut en déduire que nous avons un nombre impair d'azote (1 ou 3 au vu de la faible masse totale du composé).

b) Détermination des fragments majoritaires :

On peut grâce à l'**EI** déterminer les fragments principaux : **172,3** ; **124,3** ; **80,3** ; **54,2** ; **42,3**. Cette information permettra de confirmer notre molécule dans les bases de données car les fragments majoritaires sont spécifiques d'une molécule donnée.

On peut également observer un fragment de **128,0** en **ESI**.

c) Autres informations :

Sur le spectre MALDI-TOF on voit des pics à 174 et 175, notamment le pic à 174 qui est en M+2 pourrait faire penser à la présence d'un chlore dans la molécule mais en fait ces pics sont issus de la matrice, cela est bien visible lorsque qu'on observe le spectre de la matrice.

2. Spectrométrie RMN :

a) RMN 1D et 2D ^{1}H :

On peut constater qu'il y a **9 hydrogènes** dans notre molécule, exprimés sous la formes de 5 pics (plus les pics du solvant DMSO), nous avons donc des équivalences. On observe en COSY que H2 couple avec H3 et H4, mais que H3 ne couple qu'avec H2 et H4 ne couple qu'avec H2, on peut en déduire que H2 doit être placé entre H3 et H4.

b) RMN 1D ^{13}C ; ^{13}C(DEPT 135°) ; ^{13}C(DEPT90°) :

On peut constater qu'on à 6 pics (plus ceux du DMSO) donc **6 carbones** au minimum, en superposant le Dept135° deux carbones ne sont pas présents et sont donc des carbones quaternaires (C5 et C6), on a aussi 2 pics négatifs → 2 CH2 (C2 et C3), puis avec Dept90° on voit qu'on a un CH (C4) et un CH3 (C1) (présent sur dept135° en positif et absent en Dept90°).

c) Récapitulatif :

Nom	Déplacement chimique δ (ppm)	Intégrale	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Conclusions
H1	2,46	3	s	/	3H équivalents sans voisinage de protons, surement CH3
DMSO	2,50	1,2	qt	/	Solvant
H2	3,68	2	dd	10,7 – 5,6	2H au voisinage de 3H non 2quivalents que sont H3 et H4 qui sont surement un CH2 et OH
H3	4,35	2	t	5,5	2H déblindés avec 2H équivalents en voisinage → CH2-CH2
H4	5,01	1	t	5,3	H très déblindé au voisinage de 2H équivalents → CH2- OH très certainement
H5	8,02	0,8	s	/	H sans voisinage de protons et très déblindé (encore plus que H4)
C1	14,22	/	s	/	**CH3** dont H = **H1**
DMSO	39,50	/	m	/	Solvant
C2	48,24	/	s	/	**CH2** dont H = **H3** puisque H2 avec C3
C3	59,73	/	s	/	**CH2** très déblindé donc les H = **H2**
C4	132,93	/	s	/	**CH** dont H = **H5** ou H4 mais H4 surement OH
C5	138,37	/	s	/	**C quaternaire**
C6	151,91	/	s	/	**C quaternaire**

s : singulet ; t : triplet ; dd : doublet dédoublé ; qt : quintuplet ; m :multiplet

3. Spectrométrie UV-visible :

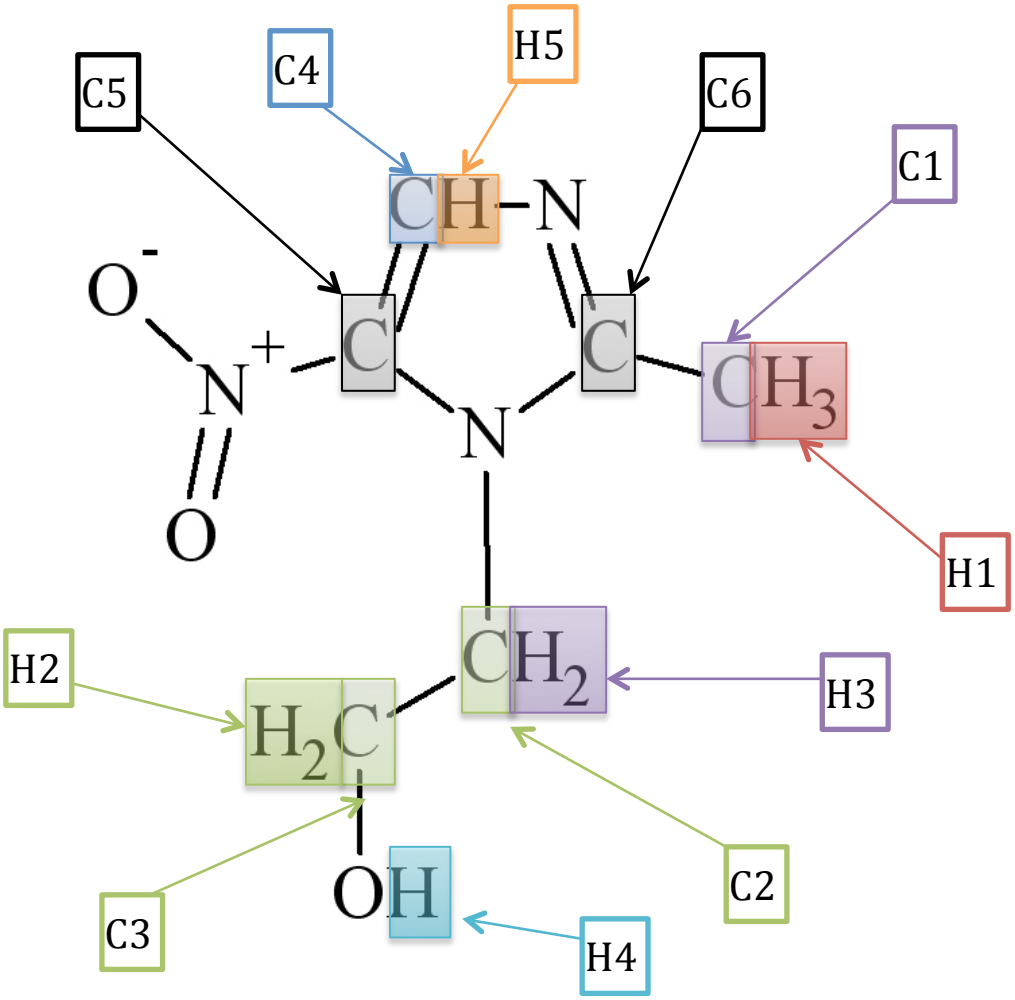
On observe un pic faible à environ **319nm**, cela peut indiquer que la molécule absorbe faiblement dans les UV ce qui indique que la molécule possède au moins 1 **chromophore**.

4. Spectrométrie IRTF sur KBr:

Nombre d'onde (cm^{-1})	Intensité	Remarque	Conclusion
3400-3200	F	Très large, élongation	Alcool primaire
3100-3000	m	élongation	C-H aromatique
2900-2800	m	élongation	CH2
1600-1500	v	élongation	C=C
1570-1550 1370-1300	F	2 bandes, élongation	NO2
1410-1330	m	déformation	OH
1250-1100	F/m	élongation	C-N aromatique
900-700	v	déformation	C-H aromatique

F : fort ; m : moyen ; v : variable

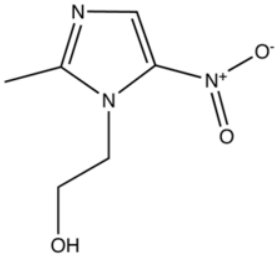
Grâce au spectre IRTF on peut confirmer la présence d'un OH, comme suspecté précédemment, mais également de liaison C-N et C=C. On peut notamment noter la présence d'un groupement **nitro NO_2**. Or on sais qu'on ne peut pas avoir de nombre pair d'azote puisque masse molaire de 171, donc il doit y avoir un 3ième Azote. On peut aussi noter le fait qu'on a surement un cycle très certainement multi-substitué.



III. Conclusion :

A la vue des résultats précédents nous arrivons à 6 carbones, 9 hydrogènes 3 oxygènes et 3 azotes, cela correspond parfaitement puisque : (6 x 12 + 9 x 1 + 16 x 3 + 14 x 3) = 171g/mol.
On arrive donc à une formule brut de **C6 H9 O3 N3**.
En croisant les informations déjà obtenues et des recherches sur la base de donnée « Spectral database for organic compounds SDBS » et sur la base de donnée du « NIST webbook », ainsi que dans l'ouvrage « Clark's analysis of drugs and poisons » nous arrivons à retrouver la molécule qu'est le **métronidazole**.

1. Dénomination :



La **molécule 51** est donc le **métronidazole** (DCI) ou:
- 2-Méthyl-5-nitroimidazole-1-éthanol
- 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)éthanol

Son numéro CAS est le : CAS-443-48-1
Masse exacte est : **171.064392 g/mol**
Elle existe dans plusieurs préparations pharmaceutiques :

Anabact®	Metro®	Metrotop®	Noritate®	Rozagel®	Zidoval®
Elyzol®	Metrocream®	Metrolyl®	Norzol®	Trichozole®	Zyomet®
Flagyl®	Metrogel®	Metrozole®	Protostat®	Vaginyl®	…
Metizol®	Metrogyl®	Metryl®	Rozex®	Zadstat®	

2. Prescription et effet pharmacologique:

Par voie orale, le métronidazole (Flagyl®) est utilisé comme **antiparasitaire** pour traiter les amibiases et les vaginites à *Trichomonas*. Il est également utilisé pour traiter les infections dues aux anaérobies (*Clostridium* et *Bacteroides*) et dans le traitement des artérites infectées et des gangrènes à l'hôpital :
- Flagyl® (métronidazole) 250, 500mg et solution Buvable :
  - trichomonas euro-génitale : adulte, 500mg/j en 2 prises pendant 10 jours ;
  - amibiase : adulte, 1,5g/j ; enfant 30 à 40mg/kg/j en 3 prises pendant 7 jours ;
  - lambliase : adulte, 750mg à 1g pendant 5 jours ; enfant de moins de 5ans, 250mg/j pendant 5 jours ;
  - infections à germes anaérobies : adulte, 1 à 1,5g/j ; enfant, 20 à 30mg/kg/j en 3 prises.
- Birodogyl® (spiramycine, métronidazole).

En usage externe, le métronidazole (Rozex®, Rozagel®) crème ou gel est utilisé contre la rosacée, la couperose, les éruptions cutanées sur le visage.

Le métronidazole est absorbée sélectivement par des bactéries anaérobies et les protozoaires sensibles, il réagit avec la ferrédoxine réduite, qui est générée par la pyruvate oxydo-réductase. Cette réduction entraîne la production de produits toxiques pour les cellules. Ces métabolites attaque l'ADN bactérien, et forme des molécules instables. Cette fonction se produit uniquement lorsque le métronidazole est partiellement réduit, et parce que cette réduction se produit généralement que dans les cellules anaérobies, il a relativement peu d'effet sur les cellules humaines ou des bactéries aérobies.

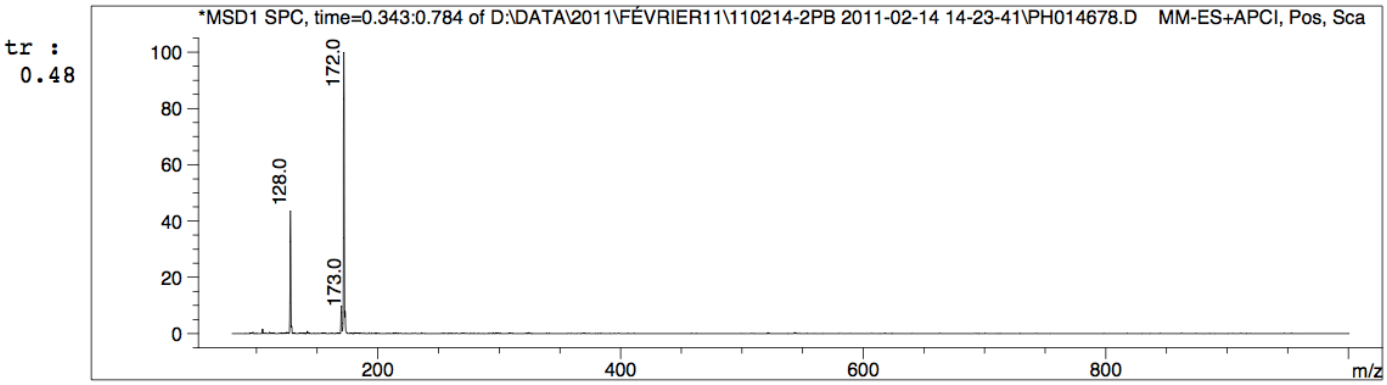
IV. Bibliographie :

- *The Aldrich library of FT-IR spectra :Vol.1.* ; 1985 par Charles J. Pouchert (Aldrich ChemicalCo).
- *Clarke's analysis of drugs and poisons* : In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. par A.C. Moffat, M.D. Osselton, E.G.C. Clarke, B. Widdop, L.Y. Galichet.
- *Structure determination of organic compounds: tables of spectral data ; 4th revised and enlarged edition.* ; 2009 par E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter (Springer , cop. 2009).
- http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng
- http://webbook.nist.gov/chemistry/
- http://www.chemexper.com/
- https://scifinder.cas.org/
- http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm

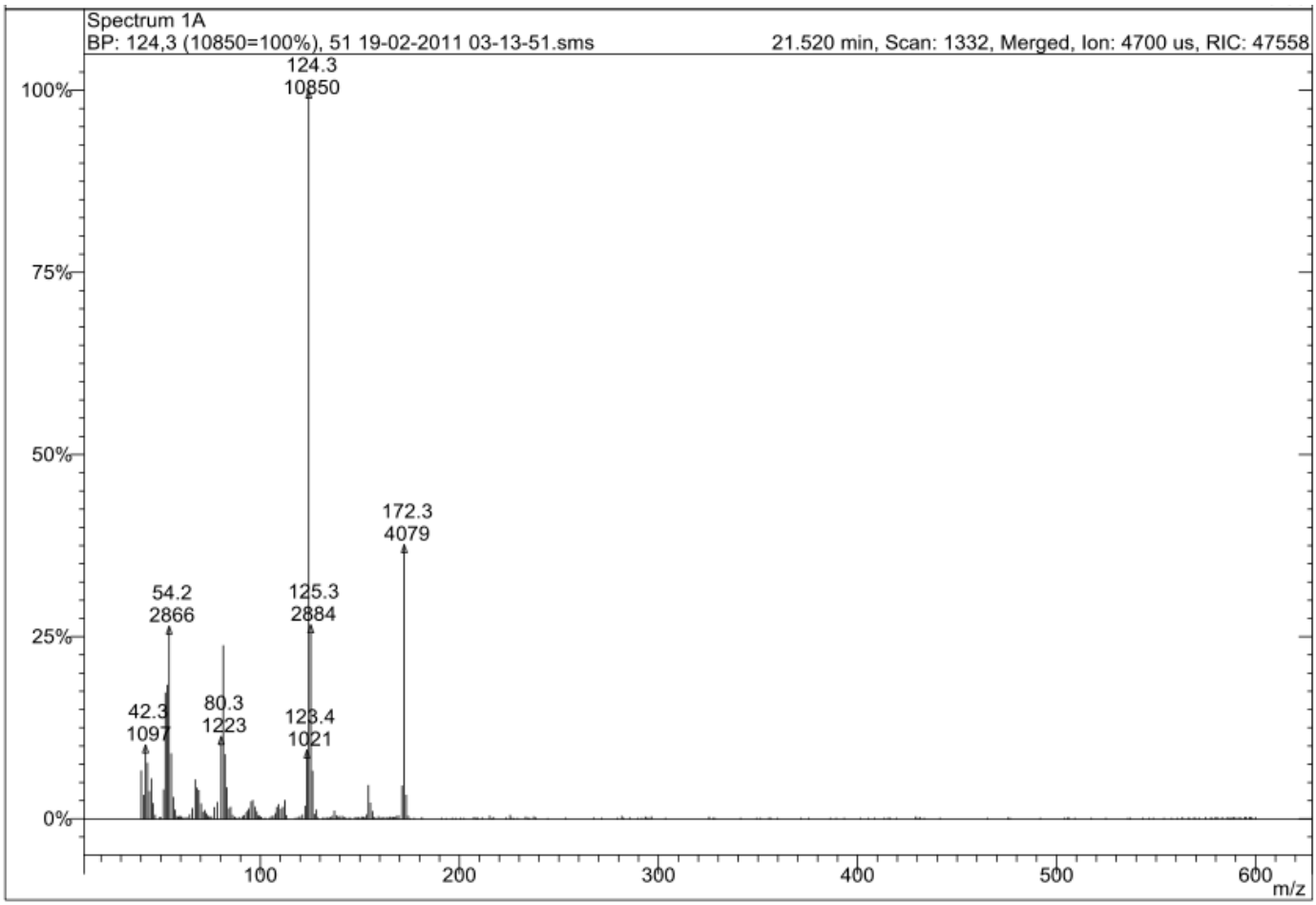
V. Annexes :

1. Spectres de masses :

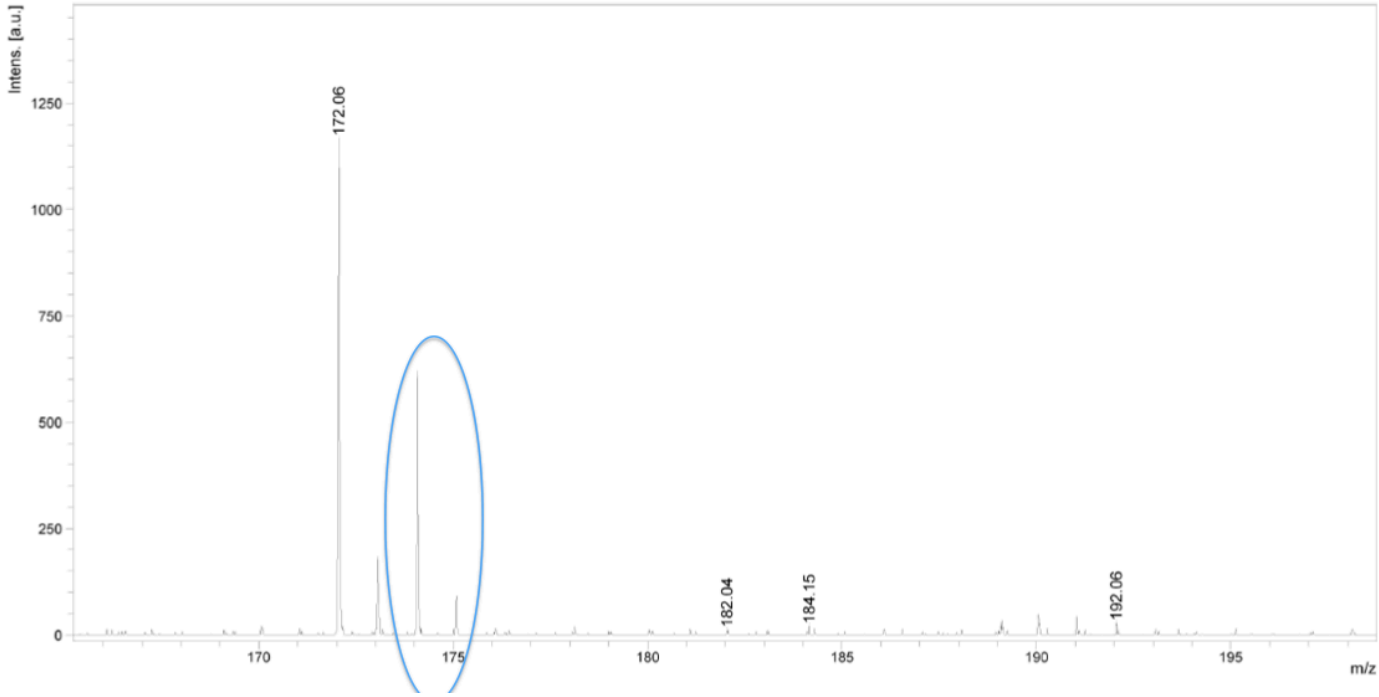
a) LC-MS-ESI (Positive):



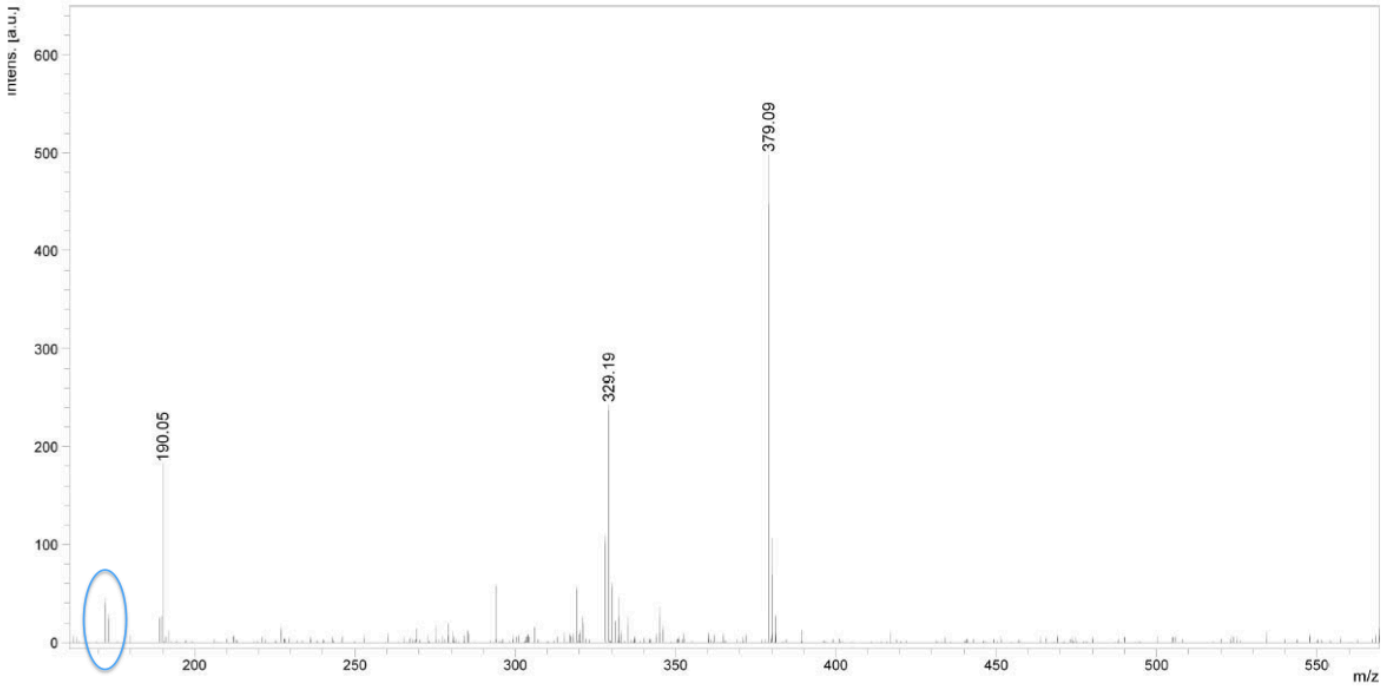
b) GC-MS-EI :



c) MS-MALDI-TOF :

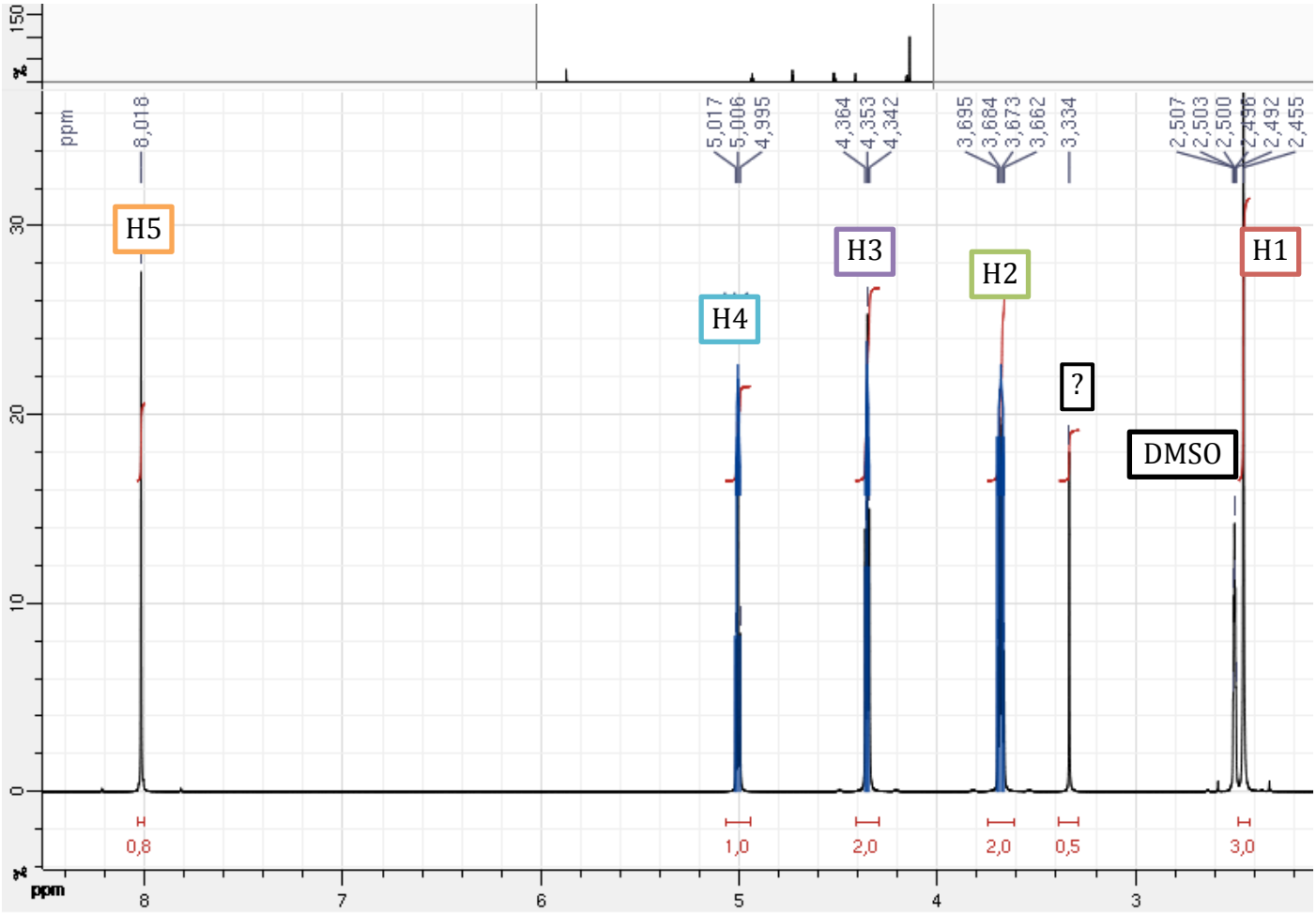


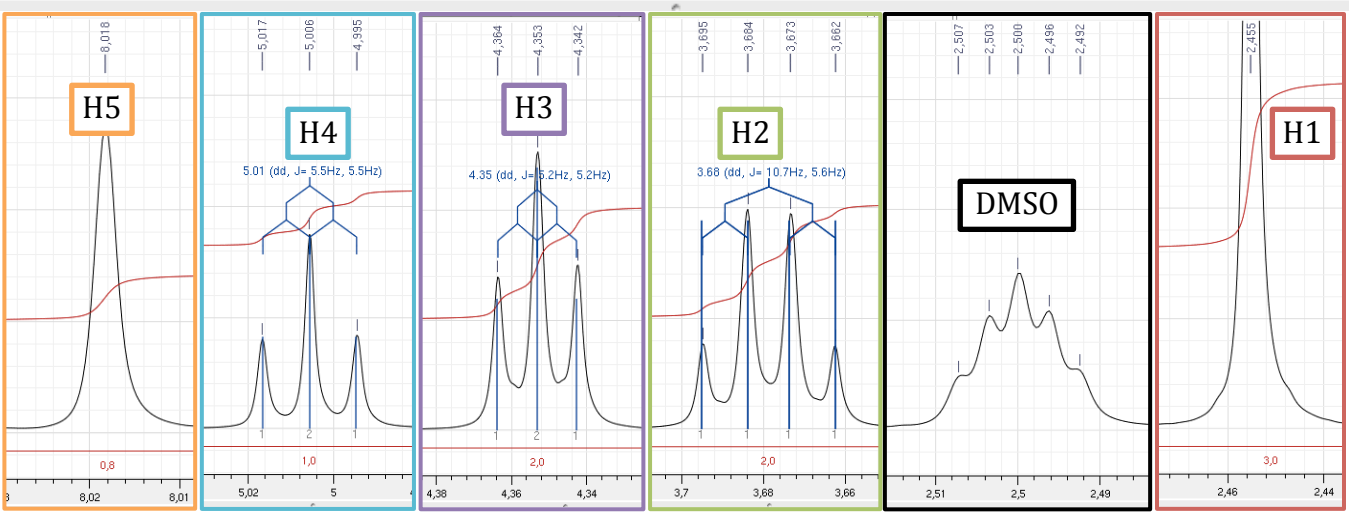
d) Matrice HCCA MALDI-TOF :



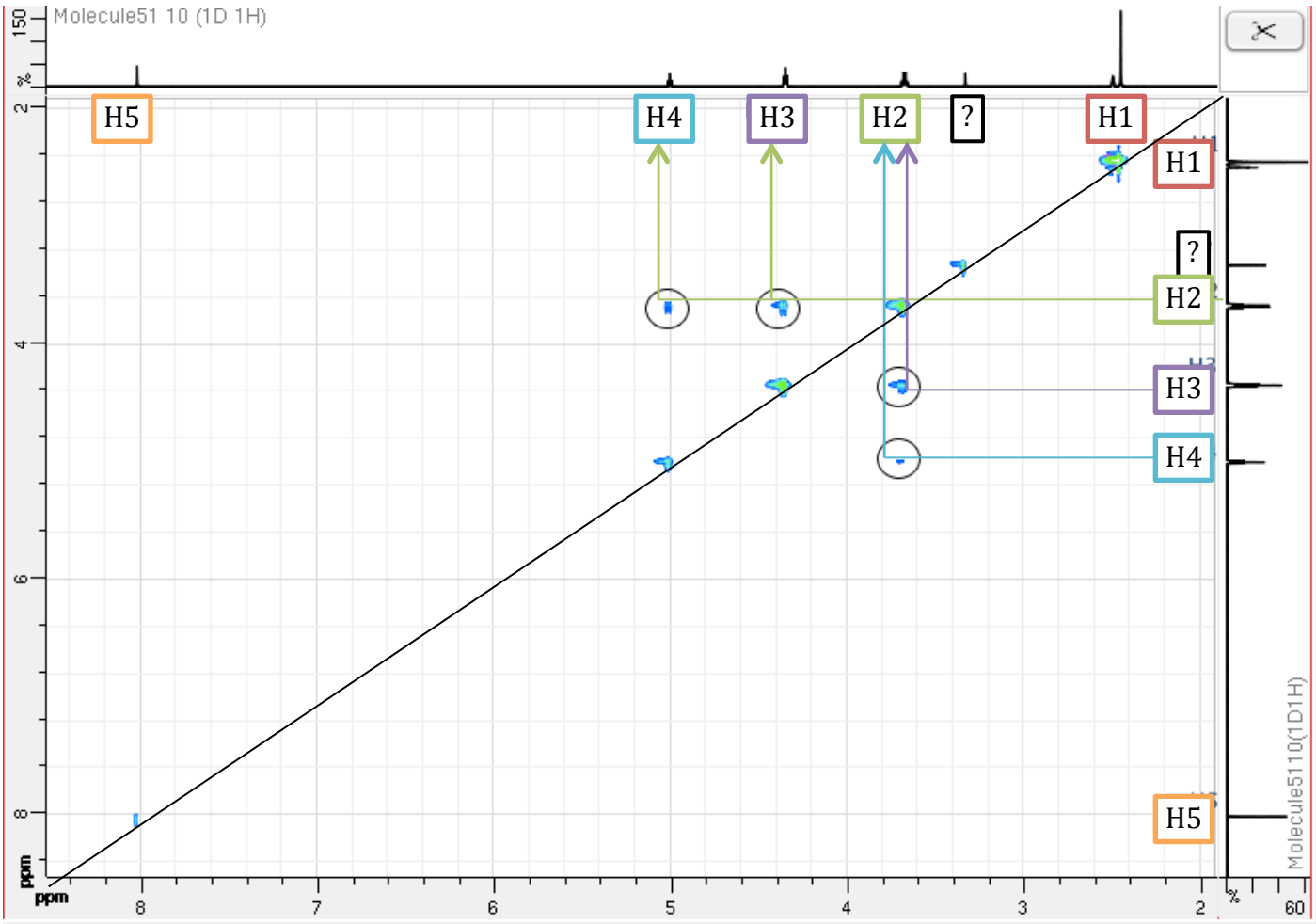
2. Spectres RMN :

a) 1D ^{1}H :

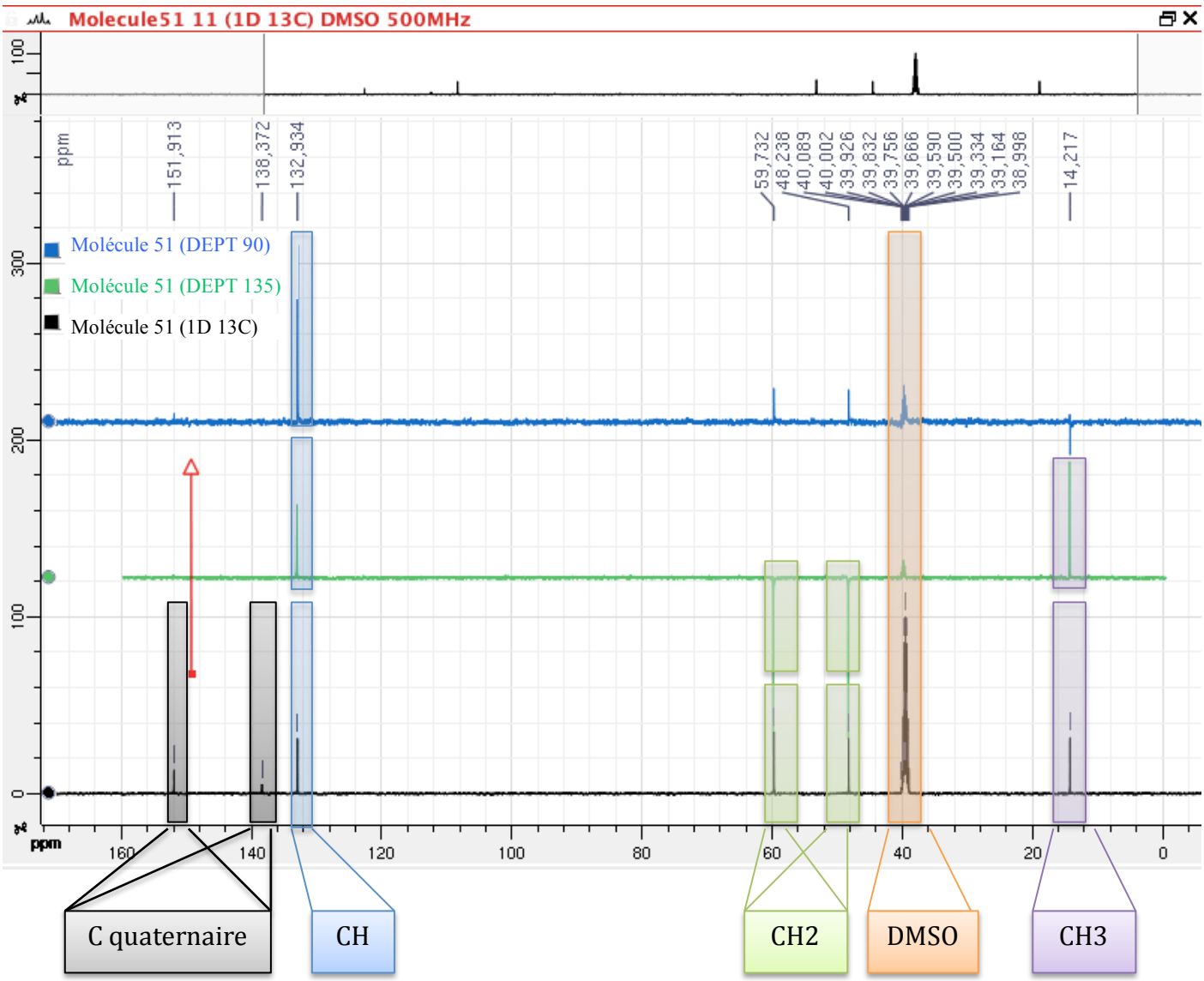




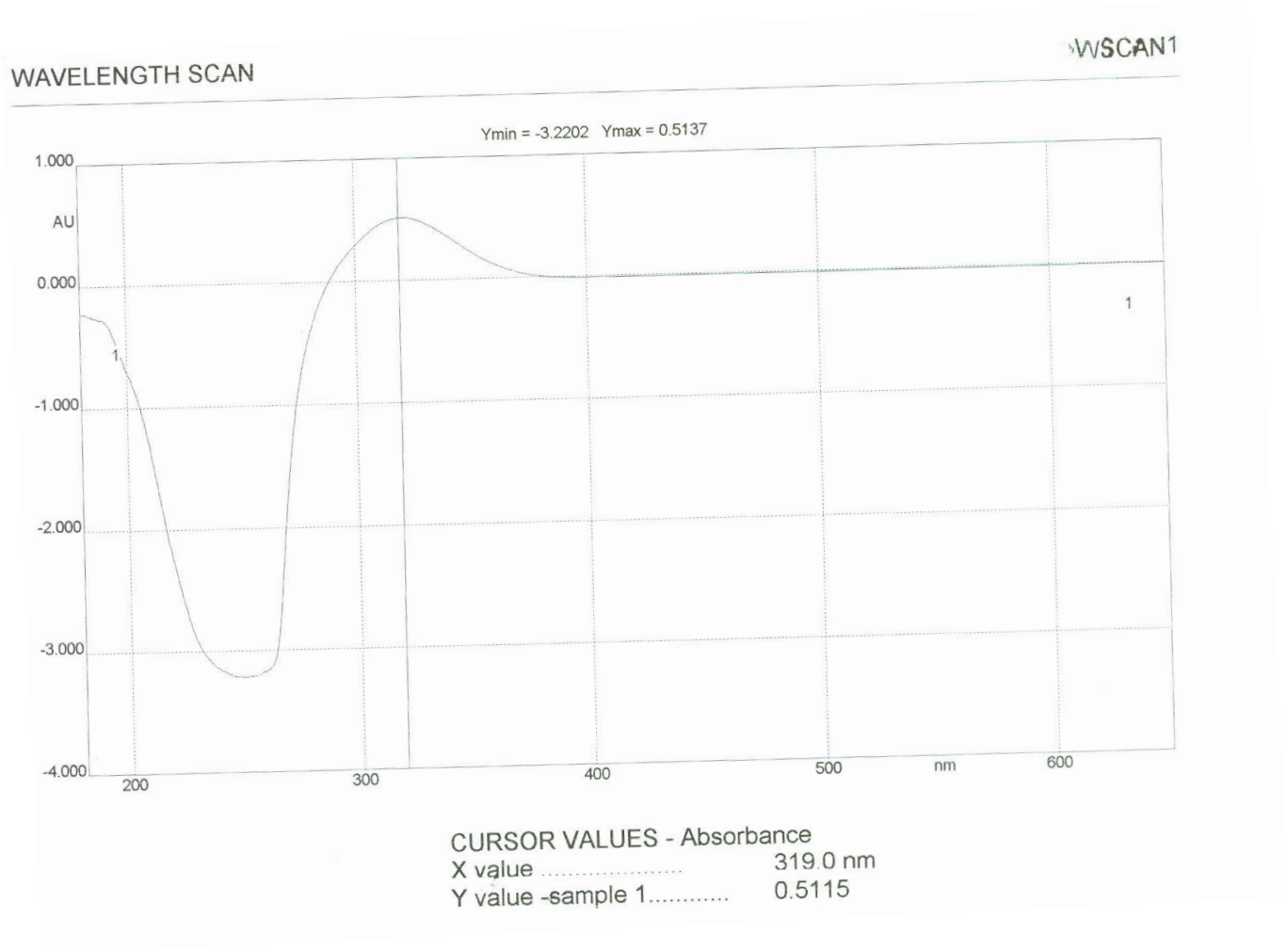
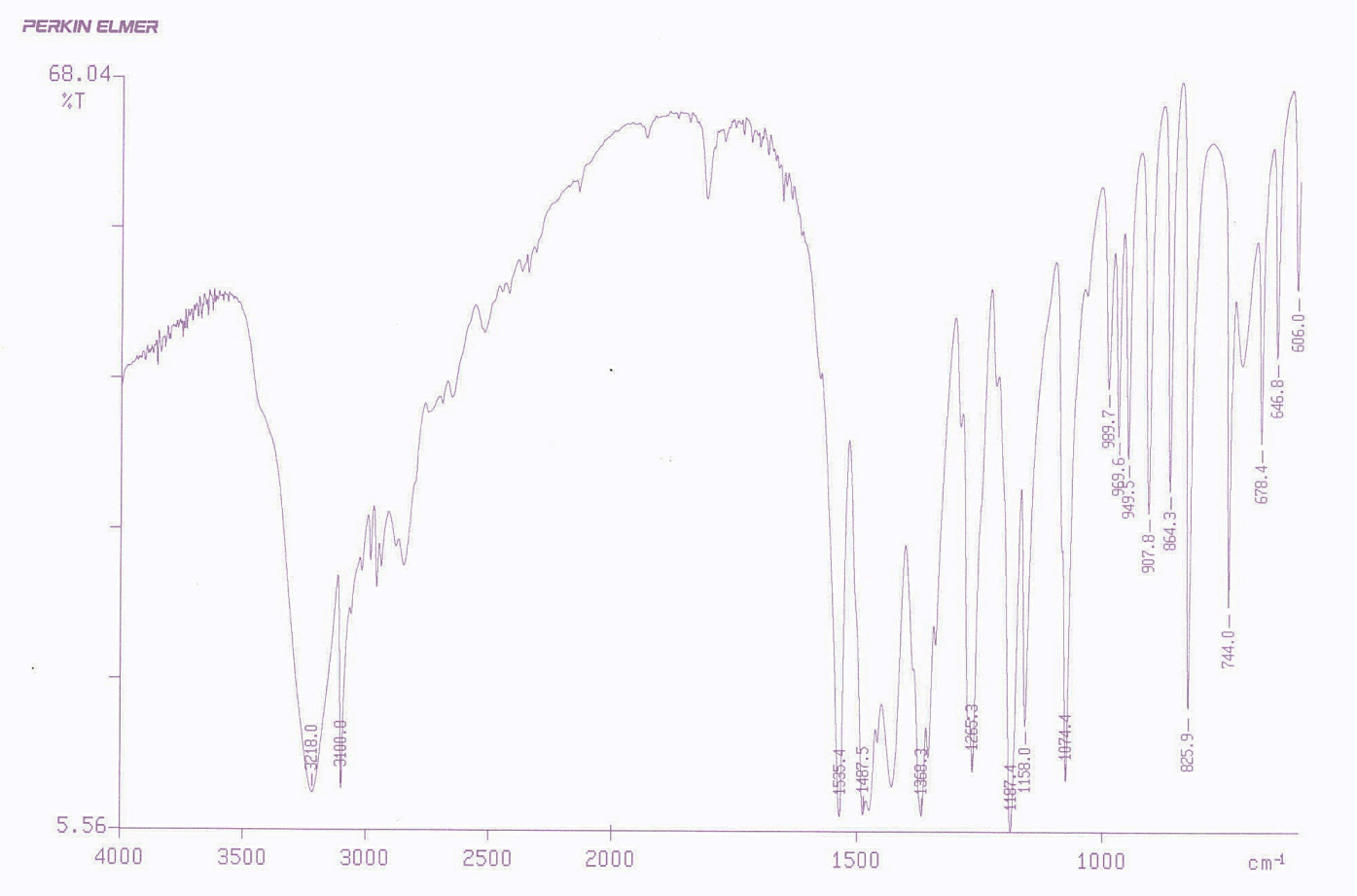
b) 2D ^{1}H :


Molecule51 10 (1D 1H)
H5
H4
H3
H2
?
H1
H1
?
H2
H3
H4
H5
ppm
8
7
6
5
4
3
2
60
Molecule5110(1D1H)

c) 1D ^{13}C + ^{13}C(DEPT 135°) + ^{13}C(DEPT 90°)



3. Spectre UV-visible :



4. Spectre IRTF :