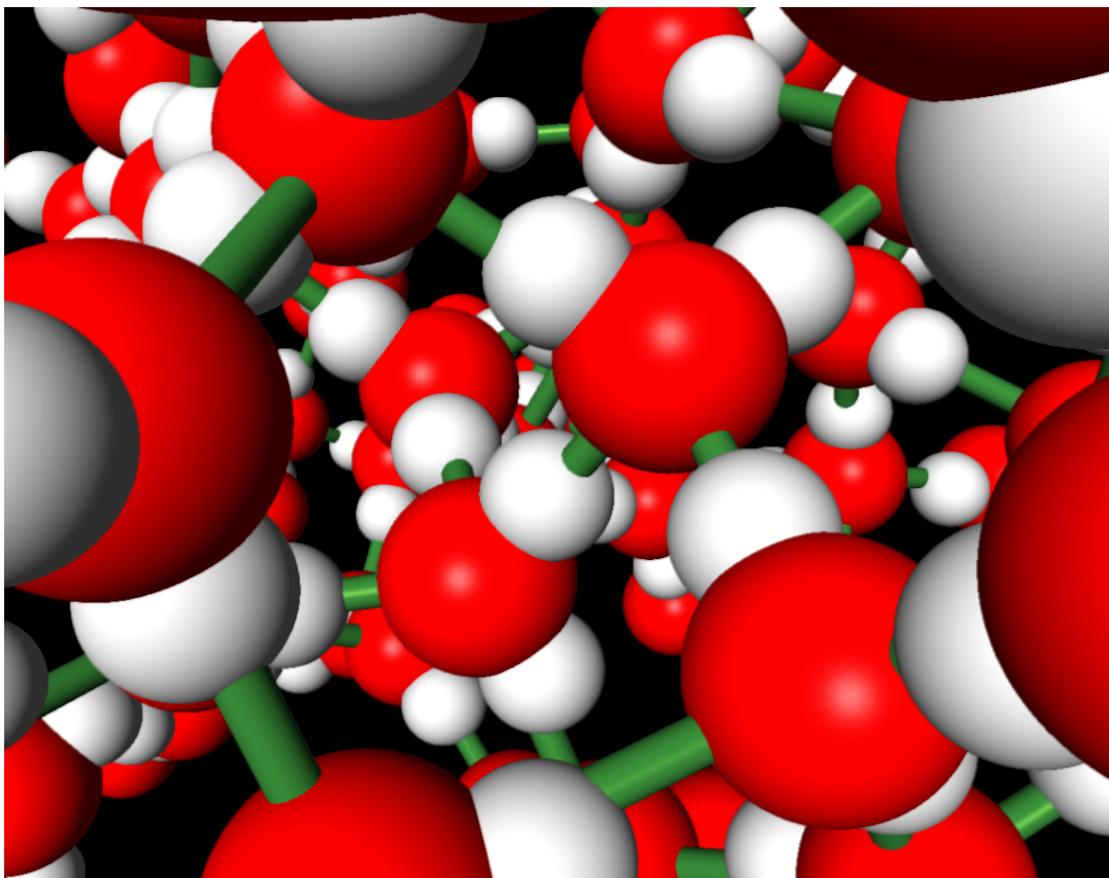


Travaux Pratiques

Analyse Structurale Spectrométrie



Ces TP ont été réalisés le 14 février 2011 au sein de la Faculté de Pharmacie d'Illkirch.

Ils consistaient en l'élucidation d'une substance thérapeutique inconnue à l'aide de plusieurs techniques de spectrométrie. En l'occurrence, j'ai soumis mon échantillon à une spectrométrie infrarouge (*IRFT*), une spectrométrie *UV-visible*, plusieurs spectrométries par Résonance Magnétique Nucléaire (*RMN du proton, du Carbone 13, DEPT et RMN bidimensionnelle COSY*) puis enfin à plusieurs spectrométries de masse (*GC-MS {Impact électronique}, HPLC-ESI, MALDI-TOF*).

J'ai pour ma part étudié la Molécule inconnue numéro 4.

Spectrométrie IRFT

On prépare une pastille de KBr dans laquelle on inclut notre produit :

On pèse pour se faire 199mg de KBr que l'on mélange à 3,1mg de notre substance inconnue.

On passe ensuite notre poudre sous presse pour constituer la pastille de KBr.

Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Intensité	Signification
3225,7 & 3086 (pic bifide)	Forte	NH ₂ ou 2 N-H
2959,3 à 2850 (plusieurs pics)	Moyenne	C-H aliphatiques
1694,2 (bande large)	Forte	Plusieurs C=O mal séparés
1433,8 à 1317,6	Forte	C-H aliphatiques (déformation)
853,7 à 800 (pic bifide)	Moyenne	NH ₂ ou N-H (déformation)

Spectrométrie UV-visible

On prépare en dissolvant une prise d'essai de notre substance inconnue dans l'éthanol une solution à 1mg/mL. On observe alors un signal, que l'on va corroborer en repassant un échantillon à 0,1 mg/mL.

Longueur d'onde (nm)	intensité	Signification
280	Faible	Cycle aromatique (faible signal cependant)

Résonance Magnétique Nucléaire

On prépare une solution de concentration 60,4 mg/mL en dissolvant 30,2mg de notre substance inconnue dans 0,5 mL de CDCL₃.

Le spectromètre fonctionne à une fréquence de 500 MHz.

- 1D1H :

Déplacement chimique (en ppm)	Multiplicité	Intégration	Signification
0,88	Doublet	6H	Groupement isopropyle
0,92	Triplet	3H	- CH ₃
1,1	Multiplet irrégulier	2H	- CH ₂ -
1,5	Multiplet régulier	1H	CH (C tertiaire)
2	Multiplet irrégulier	2H	- CH ₂ -
2,07	Quadruplet	2H	- CH ₂ -
7,286	Singulet	1H	Pic du solvant (CHCL ₃ résiduel)
8,79	Singulet	2H	NH (x2)

- 1D 13C

Déplacement chimique (en ppm)	Multiplicité	Intégration	Signification
9,474	Singulet	1C	1 carbone primaire
22,213	Singulet	2C	2 carbones primaires
28,073	Singulet	1C	1 carbone tertiaire (corroboré par DEPT-90)
32,558	Singulet	1C	1 carbone secondaire
33,887	Singulet	1C	1 carbone secondaire
36,887	Singulet	1C	1 carbone secondaire
57,422	Singulet	1C	1 carbone quaternaire (corroboré par DEPT-45)
77	Triplet	1C	Pic du Solvant CDCL ₃
148,997	Singulet	1C	1Groupement C=O
172,702	Singulet	2C	2 groupements C=O

- **DEPT-45**

On observe que les pics 172 / 149 et 57,4 disparaissent. Ces carbones ne sont donc reliés à aucun proton. Les groupement carbonyles sont donc intégrés dans une chaîne ou un cycle et le carbone à 57,4 ppm est donc quaternaire.

- **DEPT-90**

On observe que seul le pic à 28 ppm ainsi que le pic du solvant CDCl_3 subsistent. Le carbone persistant est donc, à l'image de celui de CDCl_3 , tertiaire.

- **COSY**

Je ne parviens pas à analyser mon spectre de RMN 2D. La corrélation entre les 2 spectres n'est pas évidente.

Spectrométrie de Masse

• GC-MS

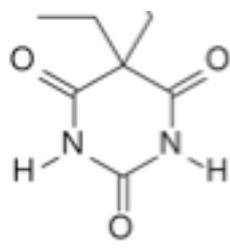
La prise d'essai de notre substance est diluée dans l'acétate d'éthyle. On obtient une solution à 50 microlitres/mL.

On obtient un temps de rétention de 22,074 min.

m/z	Intensité	Nature	Différence par rapport au précédent	Groupement perdu par rapport au précédent
227,5	4071	Ion moléculaire Donc Masse Molaire = $227,5 - 1$ = environ 226 g/mol^{-1}		
197,6	1895	Ion	30	2x « - CH ₃ »
183,5	725	Ion	14	1x « - CH ₂ »
156,6	7727	Ion Majoritaire	27	1x « CH ₂ - CH »
141,3	5279	Ion	15	1x « - CH ₃ »

D'autre part, on peut noter que ;

- le fragment 43 correspond à un radical CH₃ - CH₂ - CH₂ ·
- Le fragment 156 semble correspondre au fragment ci-dessous:



- La différence entre 227 et 156 (71 soit C₅H₁₁) peut correspondre à la chaîne latérale suivante :



- La différence entre 156 et 141 peut correspondre à la perte du CH₃ de la seconde petite chaîne greffée sur le cycle.

Enfin, Les pics en M+1 des ions majoritaires et moléculaires n'apportent pas d'informations décisives, mais excluent la présence de Brome ou de Chlore.

Il est à noter que ces analyses ne sont que conjectures, quand bien même elles correspondent à la formule développée de la molécule inconnue supputée.

- **HPLC-ESI**

Le temps de rétention de notre composé est d'environ 3,1 minutes.

On obtient un pic moléculaire de rapport $m/z = 225,2$, soit dans le cas présent une Masse Molaire de $225,2 + 1 =$ environ $226 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

On confirme donc la Masse molaire

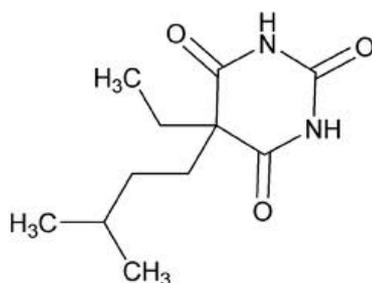
- **MALDI-TOF**

Le spectre MALDI n'est pas exploitable, il y a trop d'interférences et d'ionisations secondaires pour pouvoir en tirer des données exploitables. D'autre part, nous n'observons pas le pic moléculaire préalablement mis en évidence, mais des signaux de rapport m/z bien supérieurs et non multiples de 226.

Conclusion

Deux Composés semblent pouvoir remplir les critères retenus, à savoir une masse molaire de 226 g/mol^{-1} et une adéquation aux différents spectres. Il s'agit de l'amobarbital et du pentobarbital, 2 barbituriques qui ne diffèrent que par la géométrie de leur chaîne latérale.

Cependant, au vu de la multiplicité observé en RMN du proton et des fragments identifiés en CG-MS, la molécule 4 se révèle être l'**amobarbital**.



Ce médicament a été retiré du marché en France, où il était à l'époque commercialisé sous le nom d'Eunoctal®. Cette molécule est cependant toujours sur le marché, notamment aux Etats-Unis (Amytal®) et dans de nombreux pays européens (Suède : Isomyl® ; Allemagne : Stadadorm®...etc)

L'amobarbital est un barbiturique. A ce titre, il agit en potentialisant l'action du GABA (le principal neurotransmetteur inhibiteur du Système Nerveux Central). Il prolonge en effet l'ouverture du canal chlorure des récepteurs Gaba_A, et ce faisant renforce l'action du GABA. Il bloque aussi les récepteurs AMPA du Glutamate (Principal Neurotransmetteur excitateur du SNC) et donc diminue l'excitation des neurones.

Ces deux actions, l'une potentialisatrice et l'autre inhibitrice, sont ainsi complémentaires et expliquent l'activité de dépresseur du SNC de l'amobarbital.

Cette substance psycholeptique et hypnotique, est prescrite en vue de :

- Prévention des crises convulsives (anti-épileptique)
- Troubles sévères du sommeil (hypnotique)

Il est à noter que ce médicament peut être détourné par les toxicomanes. Il est également fréquemment impliqué dans les tentatives de suicide. Enfin, pour historique, il était à l'instar de son petit camarade le thiopental (Pentothal®) utilisé comme sérum de vérité.

Sources :

- *Clarke's analysis of drugs and poisons* : In Pharmaceuticals Body Fluids and Postmortem materials par A.C Moffat, M.D. Osselton, E.G.C Clarke, B. Widdop, L.Y Galichet.
- <http://www.chemexper.com/>
- <http://www.nmrdb.org/> (prévision spectre RMN de l'amobarbital)
- http://www.atomer.fr/1/1c_table_absorptions_infrarouge.html
- <http://www.biam2.org/www/Sub2356.html#SubPharma>

