



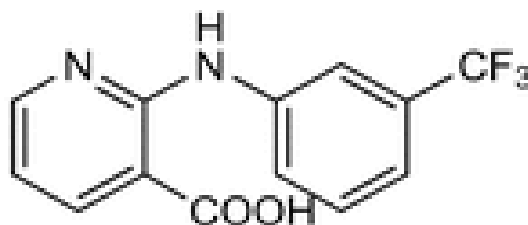
Travaux pratiques APC1

Analyse du principe actif inconnu n°4

Mélanie – 1ère année de master SNVIE

Année 2008/2009

Principe actif n°4 : « Acide niflumique »



2-(alpha, alpha, alpha-trifluoro-m-toluidino)nicotinic acid *

(* Source SDBS)

Sommaire

Introduction.....	3
Spectrométrie de masse.....	4
Spectrométrie RMN 1D ^1H	5
Spectrométrie RMN 2D ^1H	5
Spectrométrie RMN 1D ^{19}F	6
Spectrométrie RMN 1D ^{13}C	6
Spectrométrie UV-visible.....	7
Spectrométrie IR sur pastille KBr.....	7
Conclusion.....	8
Bibliographie.....	8

Introduction

Le but de ces TP a tout d'abord été d'identifier un produit inconnu à partir de plusieurs méthodes d'analyses couramment utilisées en laboratoires d'analyses tels que :

- la **spectrométrie UV-visible**,
- la **spectrométrie infra-rouge** à partir d'un spectromètre IR à transformée de Fourier (IRFT),

toutes les deux réalisées en salle de TP ;

- la **spectrométrie RMN** (1H, 13C et 2D)
- ainsi que plusieurs **spectrométries de masse** :
 - o par ESI qui est une spectrométrie de masse couplée à une HPLC (High Performance Liquid Chromatography) par un système d'électrospray comme système d'ionisation (ionisation par un champ électrique intense),
 - o par EI qui est une spectrométrie de masse couplée à une GC (Gas Chromatography) par un système d'impact électronique comme système d'ionisation (ionisation par un faisceau d'électrons qui génère des fragments),
 - o MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ») couplée à une méthode d'analyse « Time Of Flight »),

réalisées plus tard au laboratoire.

Pour réaliser les différents spectres, il a fallu préparer les échantillons pour l'analyse. Un test de dissolution nous a permis de déterminer que notre composé est le plus soluble dans **l'éthanol**. Ensuite nous avons préparé les solutions suivantes :

- UV-visible : 5 mg du composé n°4 dans 20 mL d'éthanol diluée ensuite au 1/20 ;
- IRFT : 3 mg du composé n°4 avec 200 mg de KBr pour la réalisation d'une pastille ;
- RMN : 20 mg du composé n°4 dans 0,5 mL de **DMSO** ;
- MS-ESI : 10 mg du composé n°4 dans 10 mL de **méthanol** (obtention de la solution mère S1) ;
- MS-GC-EI : 50 µL de la solution mère S1 dans 1mL d'acétate d'éthyle ;
- MS-MALDI-TOF : 5 mg du composé n°4 dans 200 µL de **méthanol/eau (50/50)**, avec utilisation d'une **matrice HCCA** (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique).

L'analyse des spectres obtenus va nous permettre de déterminer le nom du principe actif n°4.

Spectrométrie de masse

1) Identification du pic moléculaire

Les spectromètres de masse par ESI (LC-MS) nous permettent d'obtenir des spectres avec des pics moléculaires correspondant à $m/z = 281$ dans le cas du $(M-H^+)$ et à $m/z = 283,1$ dans le cas du $(M+H^+)$. Nous pouvons donc en déduire que la masse molaire du composé n°4 est :

$$\text{PM} \approx 282 \text{ g/mol}$$

2) Analyse du spectre GC-MS

La molécule inconnue n°4 n'a pas pu être analysée en spectrométrie de masse couplée à une GC, cela montre que la molécule n'est pas volatile.

3) Analyse du spectre Maldi-TOF

Le spectre nous confirme la masse molaire du composé inconnu n°4 puisqu'il y a également un pic à $m/z = 283,074$. Les pics situés à des m/z supérieurs à 283,074 peuvent correspondre à des impuretés.

Spectrométrie RMN 1D ^1H

La spectrométrie RMN ^1H permet de déterminer le nombre d'hydrogènes qui constituent la molécule analysée. La constante de couplage J , calculable lorsqu'il y a des multiplets, nous permet aussi de supposer l'arrangement de ces hydrogènes au sein de la molécule.

	δ (ppm)	Multiplicité*	Intégrale	J (constante de couplage)	Signification
H1	13,68	s	1		signal très large, H très labile lié à un hétéroatome
H2	10,65	s	1		signal très fin, H peu labile
H3	8,44	dd	1	4,8 – 2,0	H aromatique, 1 voisin en ortho ($^1J=4,8$) et 1 voisin en méta ($^4J=2,0$)
H4	8,3	t	2	1,5	H aromatique qui possède 2 voisins en méta
H5	8,29	dd		7,8 – 2,0	H aromatique, 1 voisin en ortho ($^1J=7,8$) et 1 voisin en méta ($^4J=2,0$)
H6	7,86	dd	1	8,0 – 1,5	H aromatique, 1 voisin en ortho ($^1J=8,0$) et 1 voisin en méta ($^4J=1,5$)
H7	7,53	t	1	8,0	H aromatique qui possède 2 voisins en ortho
H8	7,33	d	1	8,0 – 1,5	H aromatique, 1 voisin en ortho ($^1J=8,0$) et 1 voisin en méta ($^4J=1,5$)
H9	6,94	dd	1	7,8 – 4,8	H aromatique, 2 voisins en ortho ayant un J différent
	2,50	qt	2		DMSO (solvant)

* s : singulet ; d : doublet ; dd : doublet de doublet ; t : triplet ; qt : quintuplet

D'après l'analyse de ce spectre, nous avons donc un total de 9 hydrogènes dans la molécule inconnue n°4, dont 7 H qui sont compris dans des cycles aromatiques. On constate également que H1 n'est pas aisément identifiable puisque sa liaison à l'oxygène le rend très labile, on peut donc uniquement observer une moyenne de positions (un pic très étalé).

Spectrométrie RMN 2D ^1H

La spectrométrie bidimensionnelle nous donne de nouvelles informations sur les couplages entre les hydrogènes, leur(s) liaison(s) et leur proximité. Le système COSY nous a permis de mettre en évidence les couplages scalaires entre les protons.

Nous pouvons voir que les protons H6-H7-H8 se suivent, mais que les protons H6 et H8 couplent également, mais plus faiblement, avec H4 ce qui laisse penser à un cycle aromatique comme celui de la figure 1 ci-dessous. Nous pouvons aussi constater qu'il y a un enchaînement avec les protons H3-H9-H5 qui pourraient se situer sur un deuxième cycle comme celui de la figure 2.

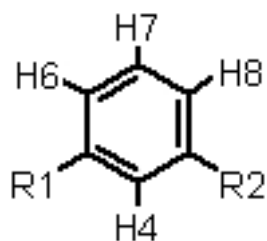


Figure 1 :

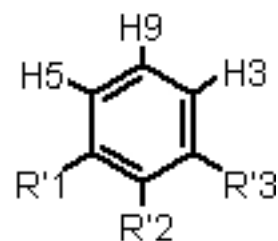


Figure 2 :

Spectrométrie RMN 1D ^{19}F

Le spectre obtenu nous permet d'observer la présence d'atomes de fluor dans la molécule n°4.

Spectrométrie RMN 1D ^{13}C

Spectre RMN 1D ^{13}C

Le spectre ^{13}C nous permet de connaître le nombre de carbones présents dans la molécule inconnue.

Spectre RMN ^{13}C DEPT90

Ce spectre nous permet de trouver le nombre de CH uniquement.

Spectre RMN ^{13}C DEPT135

En comparant ce spectre au DEPT90, on peut déterminer le nombre de CH_2 et CH_3 de la molécule. En effet, les pics positifs non présents sur le DEPT90 correspondent aux CH_3 alors que les pics négatifs correspondent aux CH_2 .

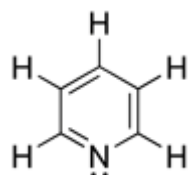
Après avoir comparé ces trois spectres, nous pouvons en déduire qu'il n'y a aucun CH_2 ou CH_3 , mais qu'il y a 7 CH uniquement. Les 6 pics sur le spectre ^{13}C , non identifiés précédemment, correspondent aux carbones quaternaires. Le septuplet situé aux environs de 39,5 ppm détermine le solvant DMSO.

δ (ppm)	Multiplicité	Signification
168,894	singulet	C quaternaire
155,170	singulet	C quaternaire
152,479	singulet	CH
140,639	} doublet de doublet	CH
140,555		C quaternaire
129,739	singulet	CH
129,5	quadruplet	C qui couple avec autre chose que H
124,2	quadruplet	C qui couple avec autre chose que H
123,436	singulet	CH
118,18	quadruplet	CH qui couple avec autre chose que H
115,62	quadruplet	CH qui couple avec autre chose que H
114,757	singulet	CH
108,393	singulet	C quaternaire
39,5	septuplet	DMSO (solvant)

On peut voir qu'il y a 2 carbones quaternaires et 2 CH qui couplent encore avec autre chose que de l'hydrogène. Vu qu'ils sortent en quadruplet, on peut supposer qu'ils sont couplés à 3 atomes de fluor. Cela est dû au fait que lors du découplage des protons, le fluor n'est pas découplé.

Spectrométrie UV-visible

Le spectre UV-visible présente 1 pic plutôt bien résolu à 288 nm, ainsi qu'un pic mal résolu à 341 nm. Cela confirme le fait que la molécule possède des noyaux aromatiques dont un pourrait être une pyridine d'où le pic vers les 340 nm.



Spectrométrie IR sur pastille KBr

Vibration (cm ⁻¹)	Intensité	Signification
3500 – 2500	m, l	Ac. carboxylique : liaison de valence OH
3500 – 3000	m	Chromophore amine : N-H (vibration de valence)
1670 – 1570	f, m	Amines : N-H primaire Amines : N-H secondaire
1670 – 1570	m	C=C aromatique C=O
1530 – 1470	m	Liaison multiple C-C aromatique (vibration de valence)
1400 – 1000	f	C-F
< 900	v f	C-H : aromatiques 1 à 5H adjacents C-Cl ?

Au vu des résultats obtenus avec les spectres précédents, on peut confirmer la présence de liaisons C-F, on sait également qu'il y a bien une liaison OH comme on a pu le voir grâce à la RMN ¹H et que le ou les cycles aromatiques peuvent contenir entre 1 et 5 hydrogènes adjacents.

On peut également supposer que les liaisons C=C et C-C sont présentes au sein du ou des cycles aromatiques

Conclusion

Nous avons donc pu voir que :

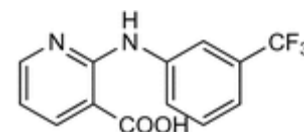
- la molécule possède une masse molaire de 282 g/mol donc soit il y a un nombre pair d'atomes d'azote, soit il n'y en a pas du tout ;
- la RMN 1H nous montre la présence de 9 atomes d'hydrogène dont 1 fortement labile lié à un hétéroatome ;
- la RMN 13C met en évidence la présence de 7 atomes de carbone liés à des hydrogènes, 6 carbones quaternaires donc il y a 13 atomes de carbones dont 1 qui est lié avec 3 atomes de fluor ;
- $MM (C_{13}H_9F_3) = (13 \times 12) + (9 \times 1) + (3 \times 19) = 222 \text{ g/mol}$, donc il manque : 60 um.

↩ Si on ajoute 2 azotes, il reste : $60 - (2 \times 14) = 32 \text{ g/mol}$

↩ On peut donc ajouter 2 oxygènes (hétéroatomes) et on obtient la formule :



Il semblerait donc que le principe actif n°4 soit l'**acide niflumique** ou 2-(alpha,alpha,alpha-trifluoro-m-toluidino)nicotinic acid ou 2-[[3-(Trifluoromethyl)phenyl]amino]-3-pyridinecarboxylic acid.



C'est un anti-inflammatoire non stéroïdien que l'on peut retrouver dans les médicaments suivants :

- **NIFLUGEL 2,5 %** : gel percutané, tube de 60 g,
Utilisation, prescription : Il lutte localement contre l'inflammation et la douleur. Il est utilisé dans le traitement local des tendinites, des entorses et des contusions.
Posologie : Appliquer le gel par massage doux et prolongé. Adulte : 3 applications par jour.
- **NUFLURIL** : gélule (rouge et blanc), boîte de 30 – **NIFLURIL 700 mg** : suppositoire, boîte de 8 – **NIFLURIL 400 mg** : suppositoire, boîte de 8 ; en association avec du morniflumate.
Utilisation, prescription : Ce médicament lutte contre l'inflammation et la douleur, fait baisser la fièvre et fluidifie le sang. Il est utilisé dans le traitement symptomatique des rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) et des crises d'arthrose. Il est également utilisé dans le traitement d'appoint des inflammations douloureuses de l'oreille, du nez et de la gorge, des affections buccales et dentaires.
Posologie : *Adulte* : 1 gélule, 3 ou 4 fois par jour ou 1 suppositoire à 700 mg, matin et soir / *Enfant de plus de 12 ans* : 1 gélule, 2 ou 3 fois par jour ou 1 suppositoire à 700 mg, matin et soir / *Enfant de 30 mois à 12 ans* : 1 suppositoire à 400 mg par 10 kg et par jour, sans dépasser 3 suppositoires par jour. Soit, pour un enfant de 20 kg, 1 suppositoire matin et soir / *Nourrisson de 6 à 30 mois* : 1/2 suppositoire à 400 mg, 2 fois par jour.

Effets pharmacologiques :

Action **anti-inflammatoire** au stade aiguë de l'inflammation, agit sur les phénomènes précoces de l'inflammation: inhibe l'augmentation de la perméabilité capillaire, diminue la migration des polynucléaires et des monohistiomacrophages, inhibe la sortie des enzymes lysosomiaux, s'oppose à l'action des médiateurs chimiques. Au stade du granulome, inhibe la prolifération des fibroblastes, la biosynthèse des mucopolysaccharides, et la formation du collagène.

Action **analgésique périphérique** de type aspirine par action antibradykinine et par action analgésique propre.

Action **antipyrétique** de type aspirine.

Ces différentes actions sont probablement liées à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines au niveau de la cyclo-oxygénase.

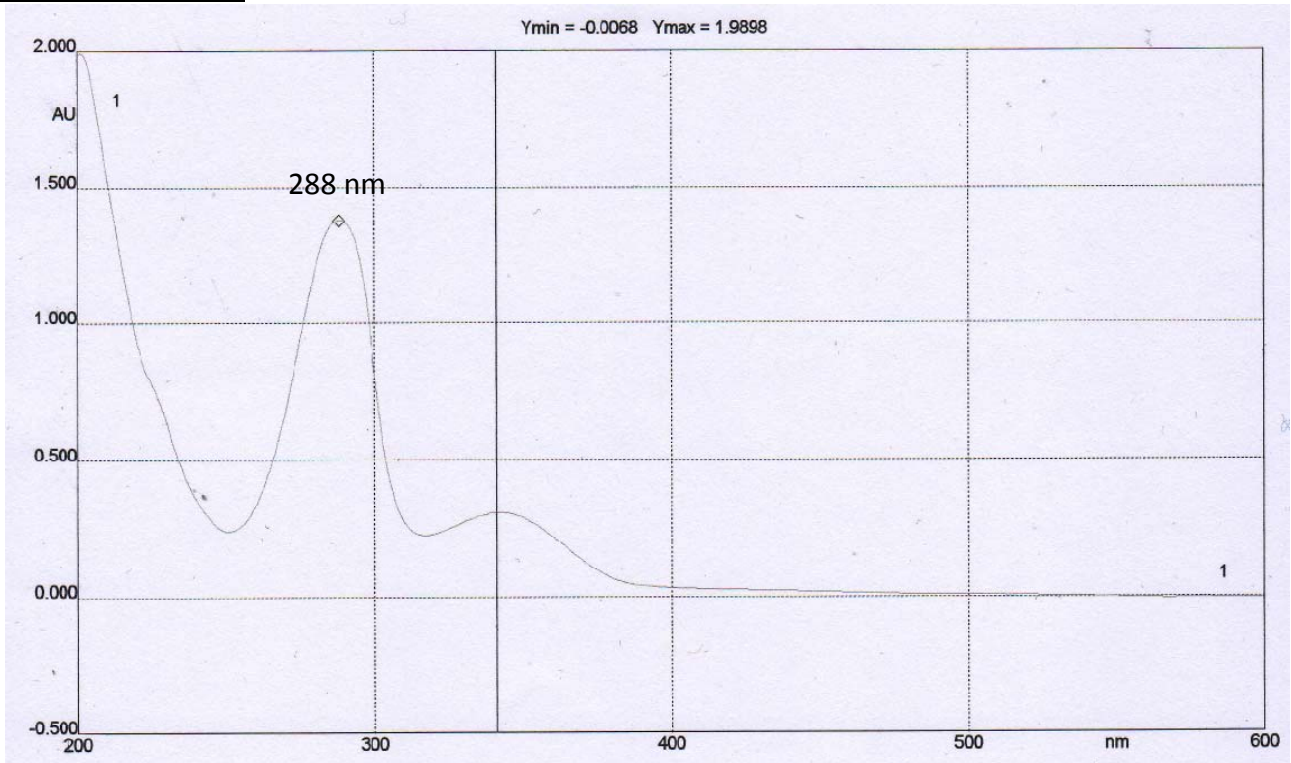
Autres dénominations : Actol, Flaminon, Flunir, Niflactol, Niflam

Bibliographie

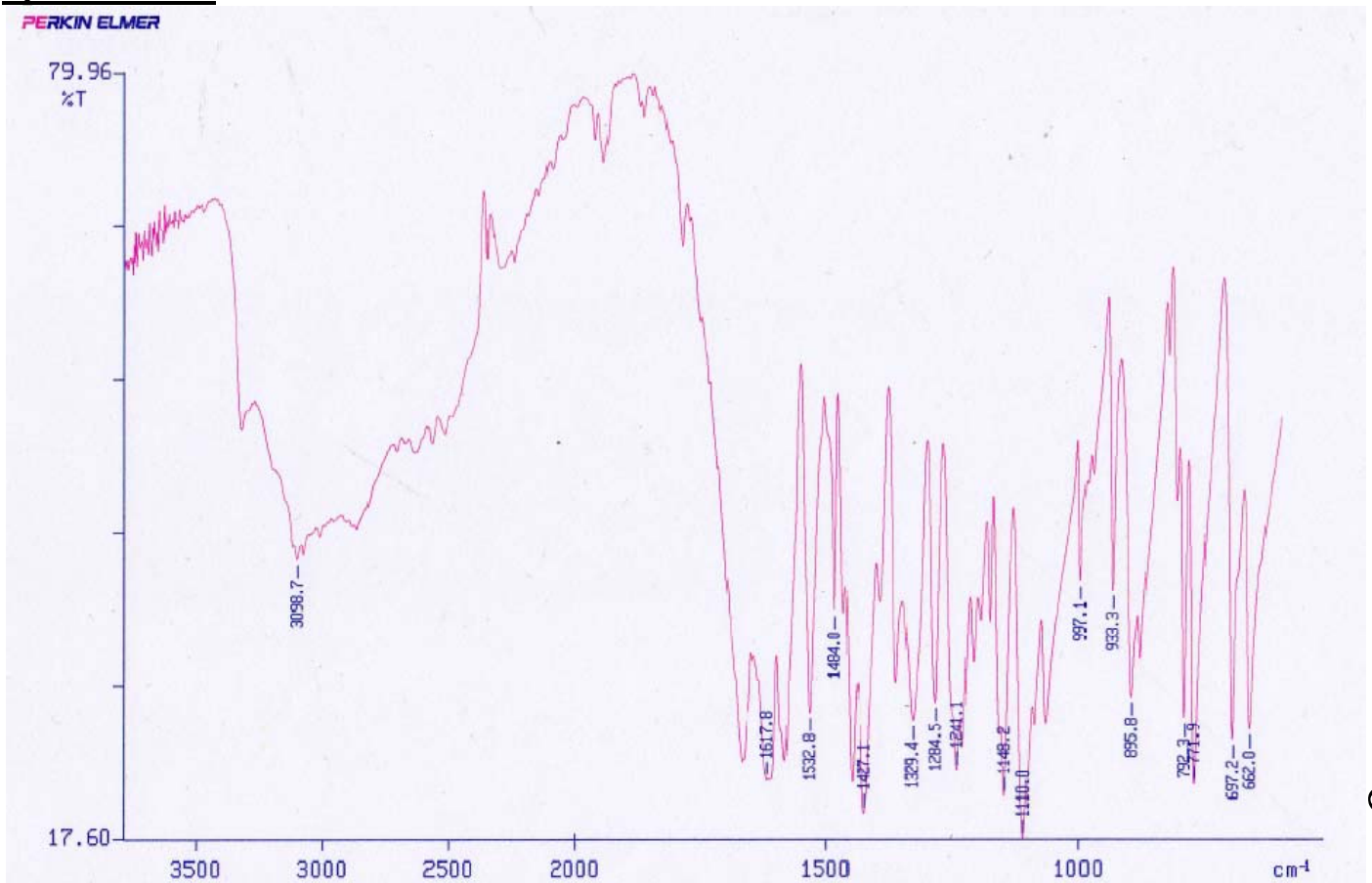
- *Clarke's analysis of drugs and poisons* : In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, par Anthony C. Moffat, M. David Osselton, Eustace George Coverley Clarke, Brian Widdop, Laurent Y. Galichet.
- *Spectral Database for Organic Compounds*, SDBS. URL : http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

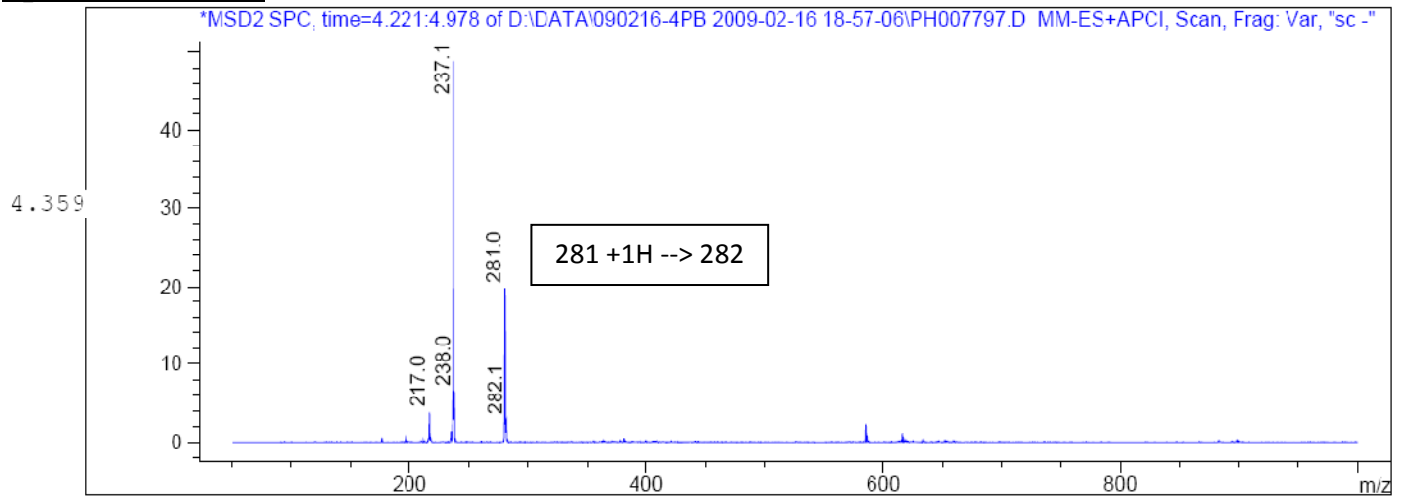
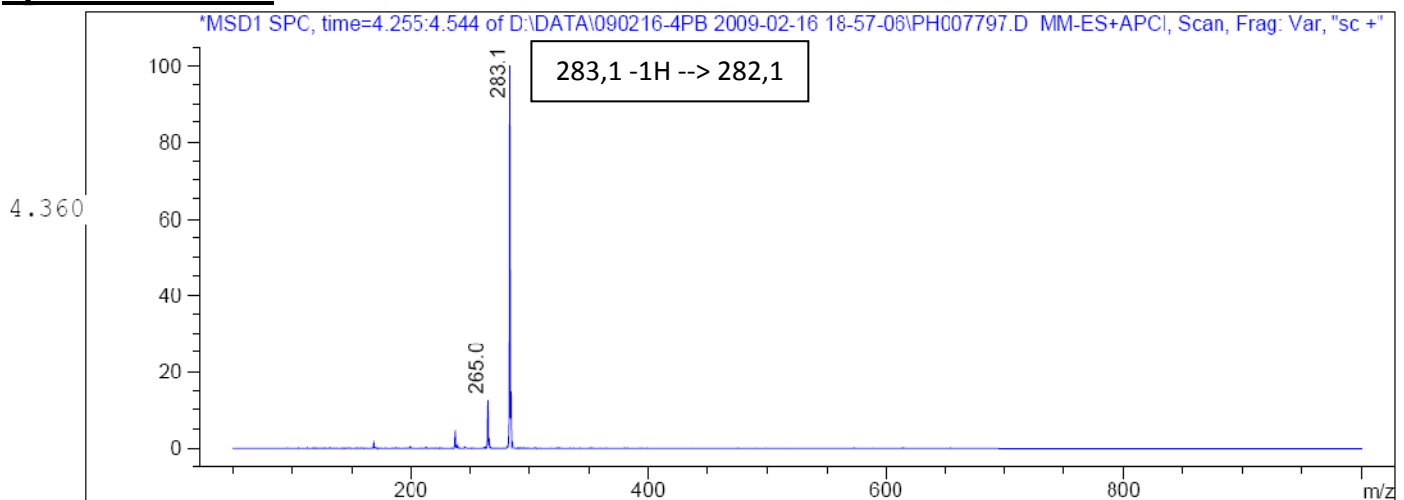
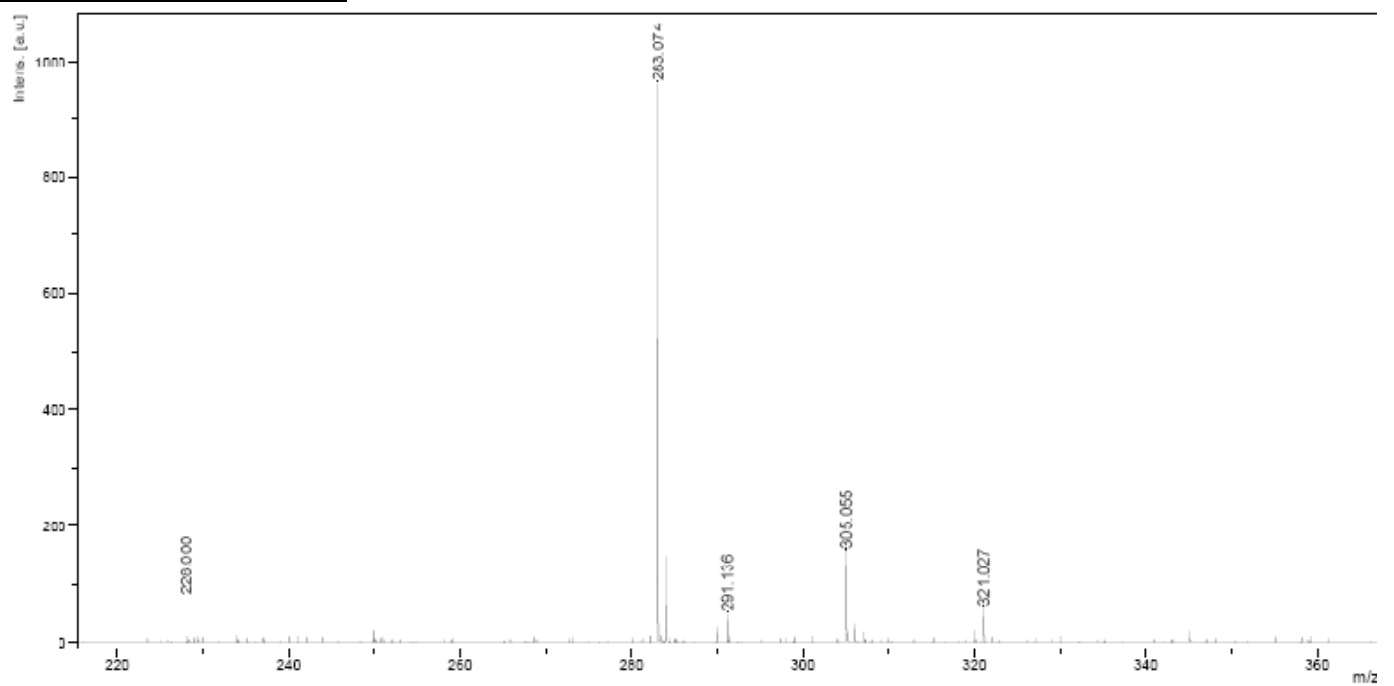
Annexes

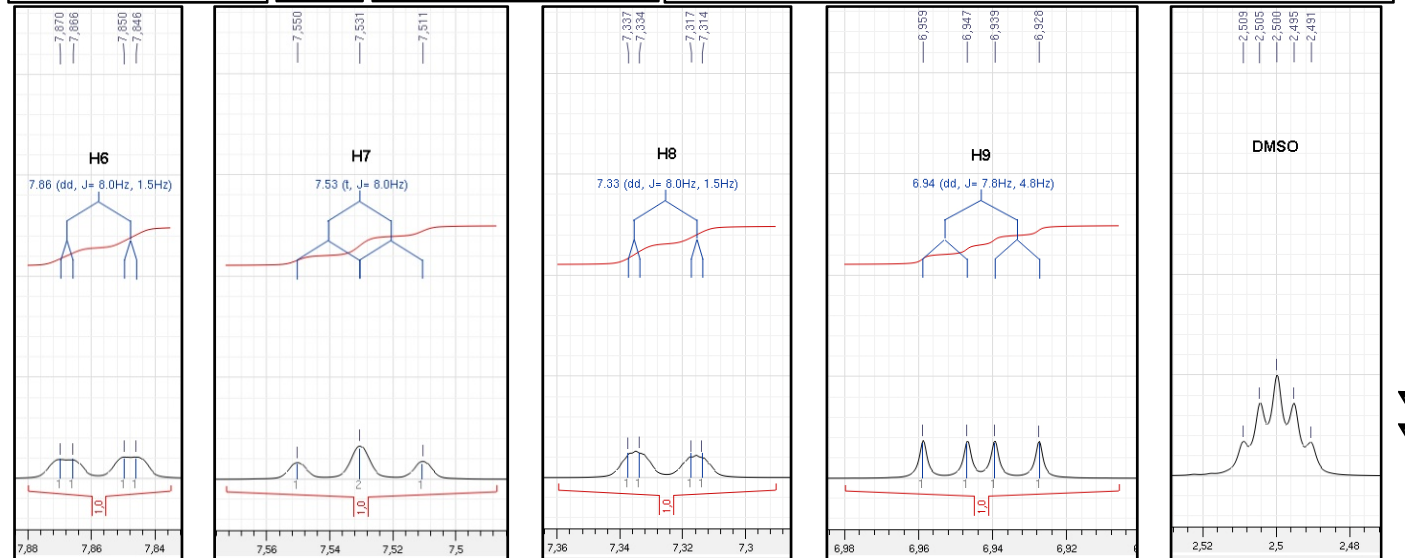
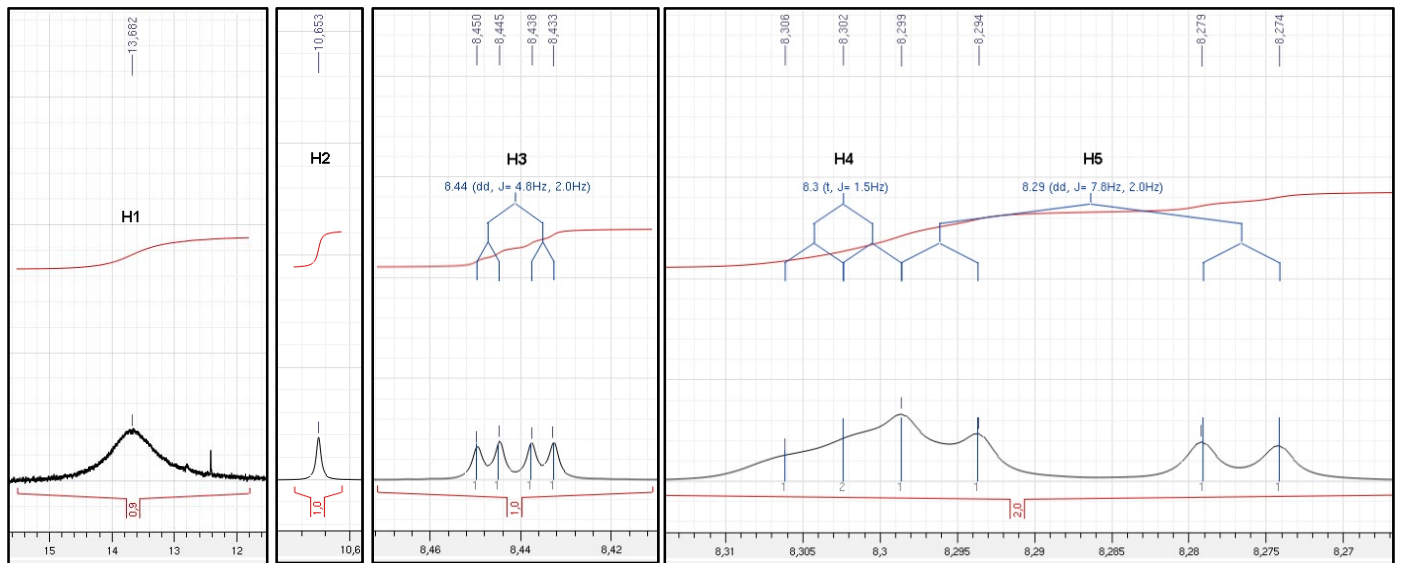
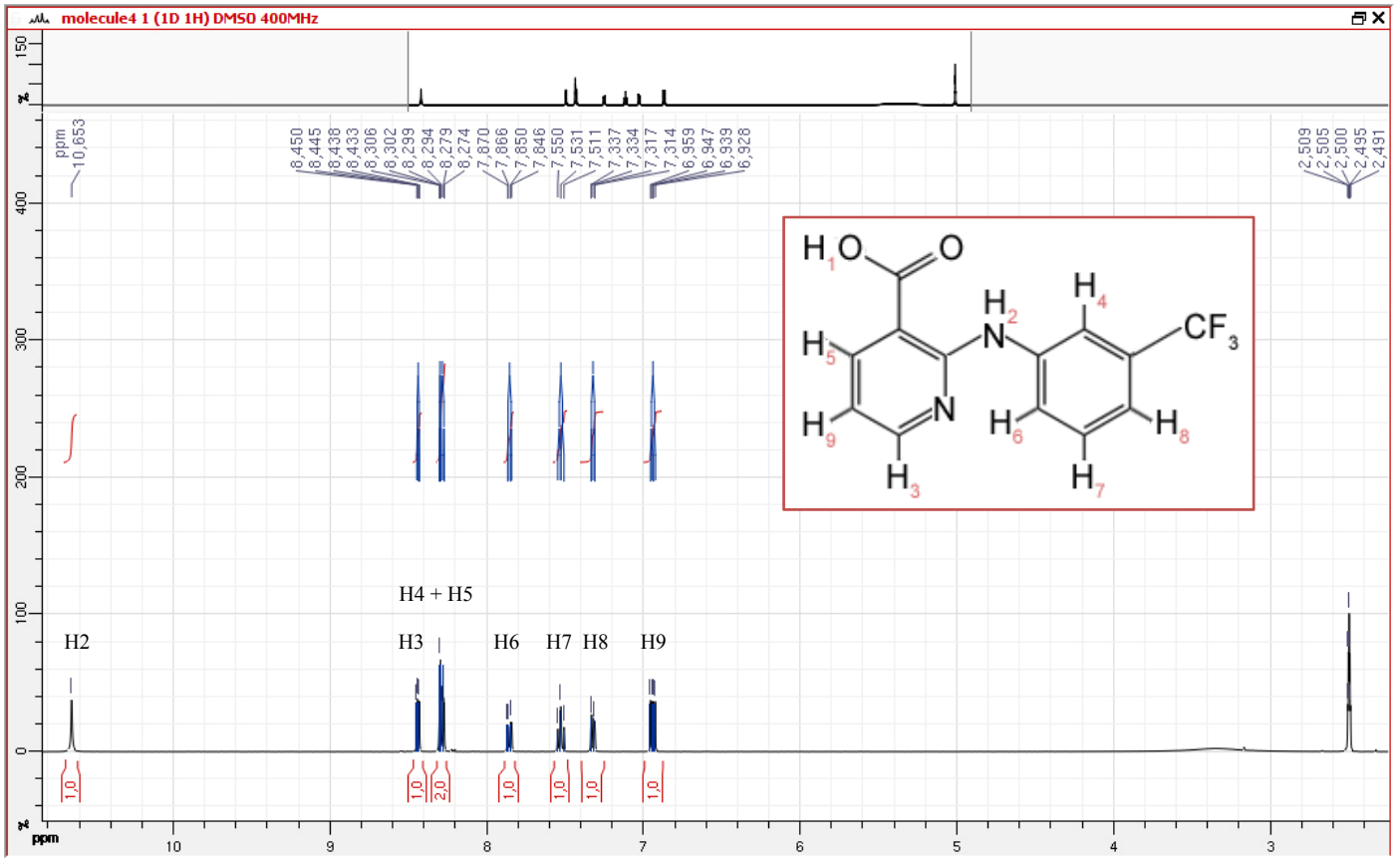
Spectre UV-visible :



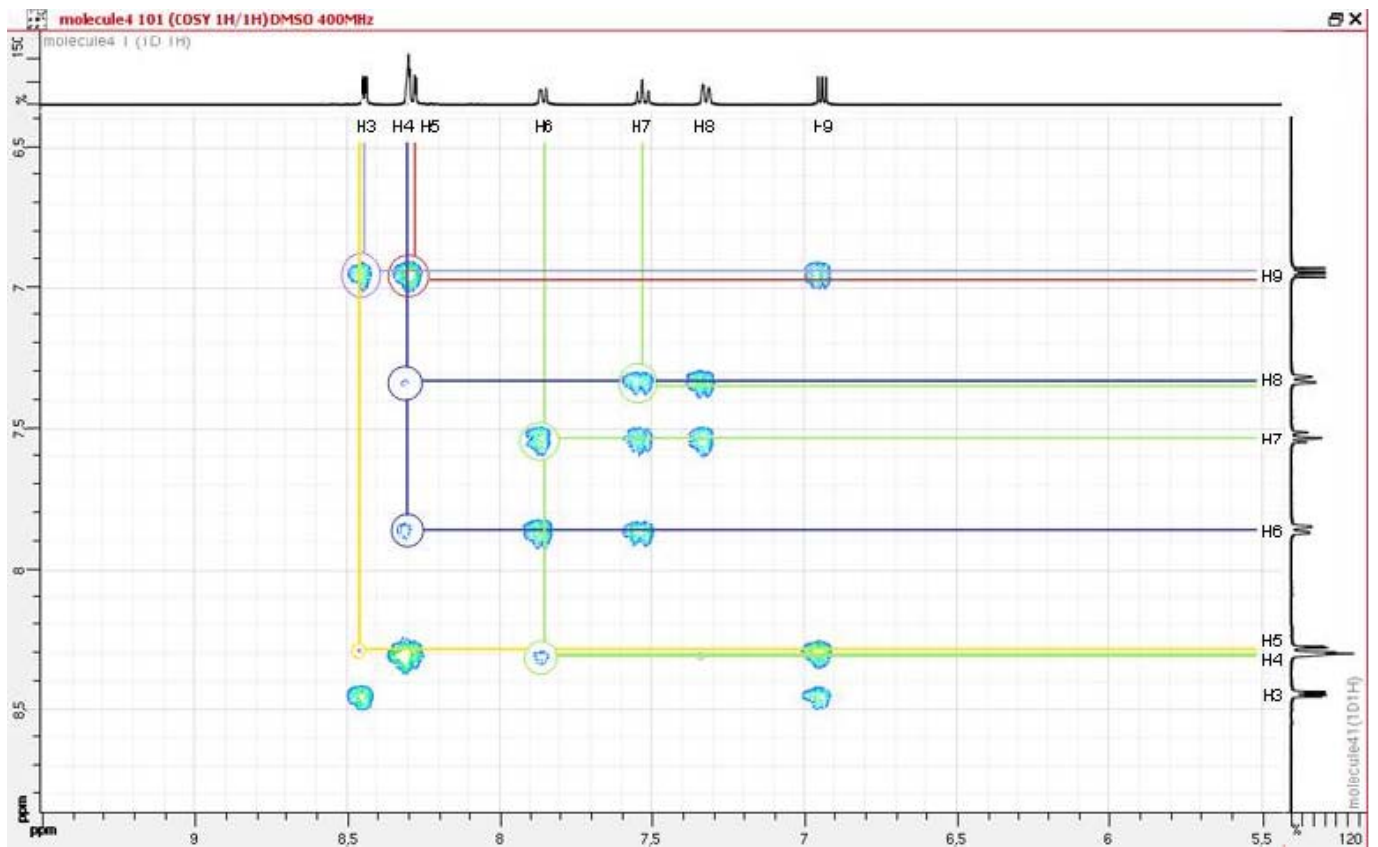
Spectre IRFT :



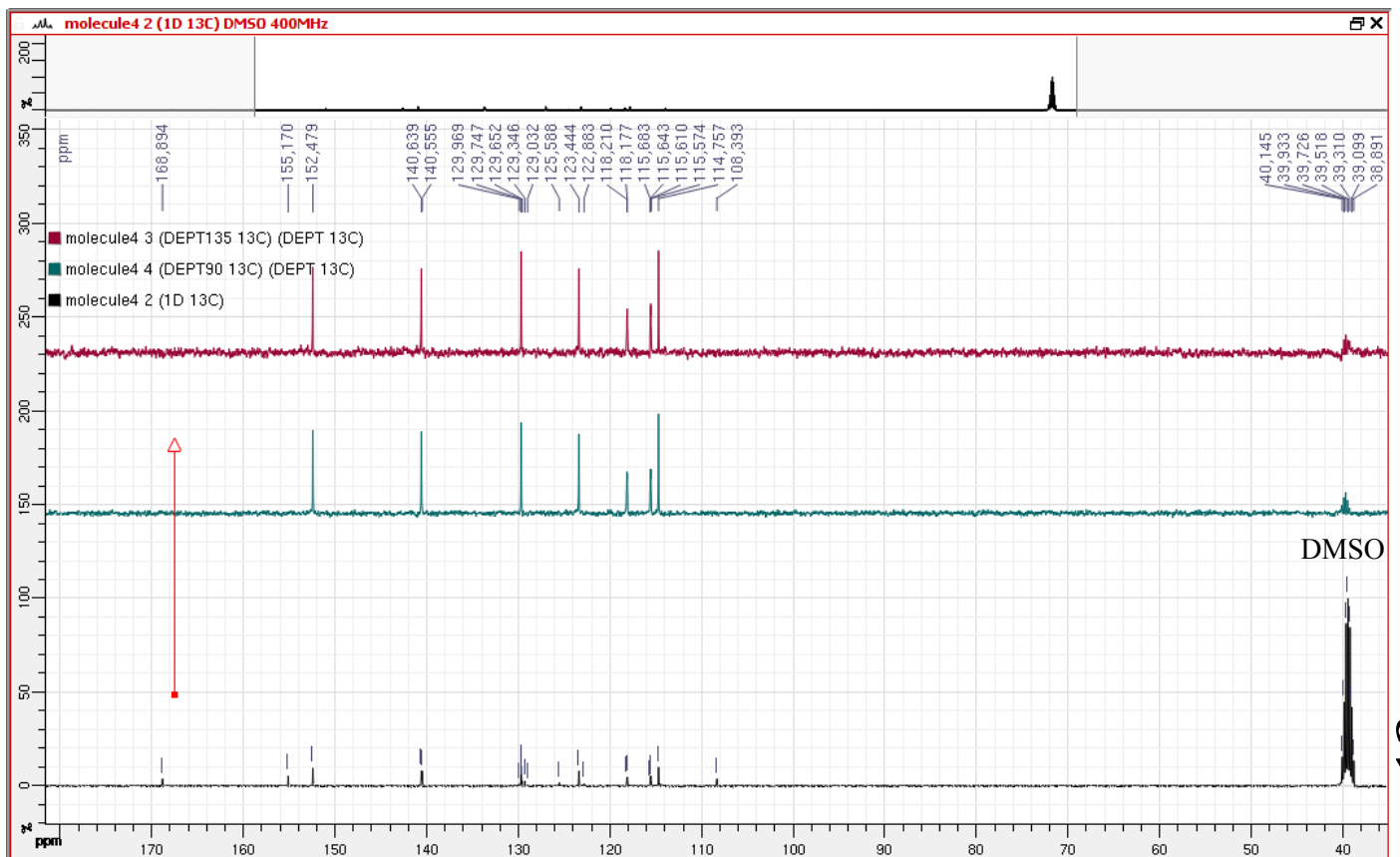
Spectre LC-MS- :**Spectre LC-MS+ :****Spectre MALDI-TOF :**



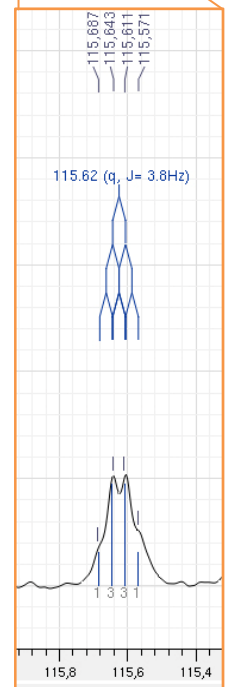
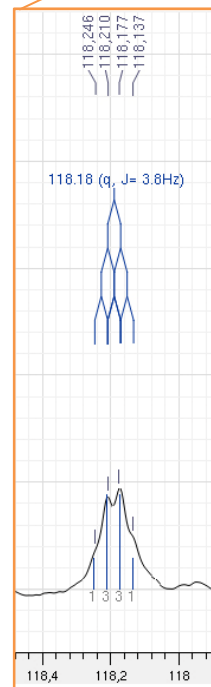
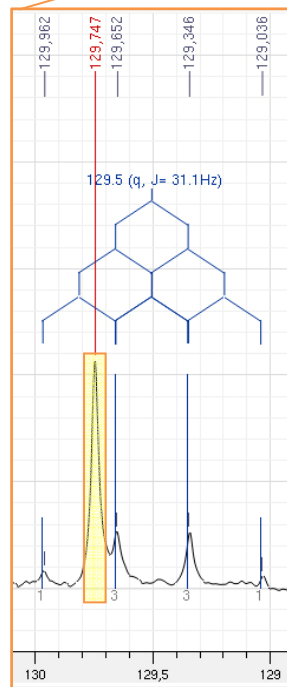
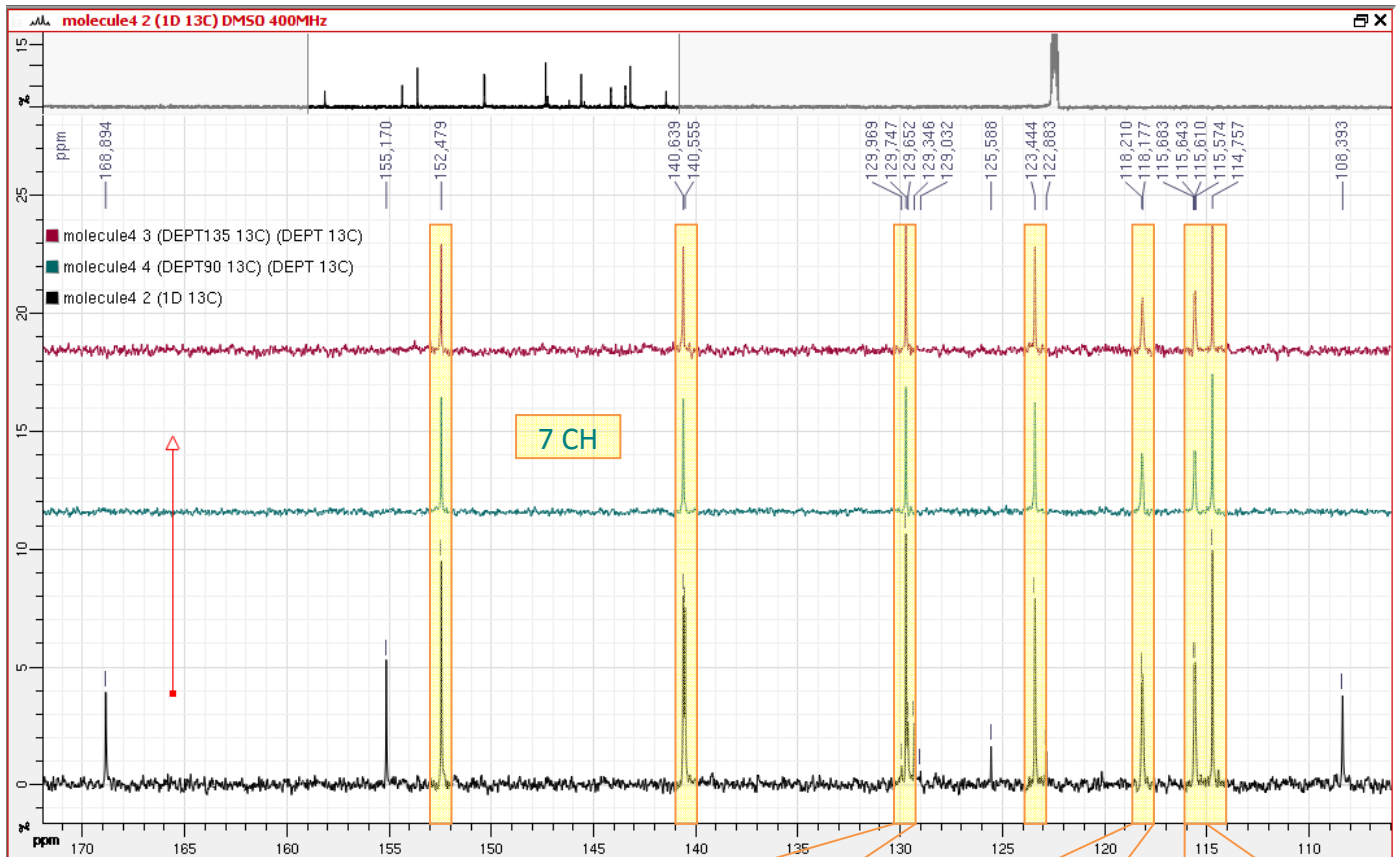
Spectre ¹H bidimensionnel :



Spectres RMN 13C [¹³C-{¹H}, DEPT90, DEPT135] :



Spectres RMN 13C [13C-¹H}, DEPT90, DEPT135] (zoom) :



Spectre $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$:

