

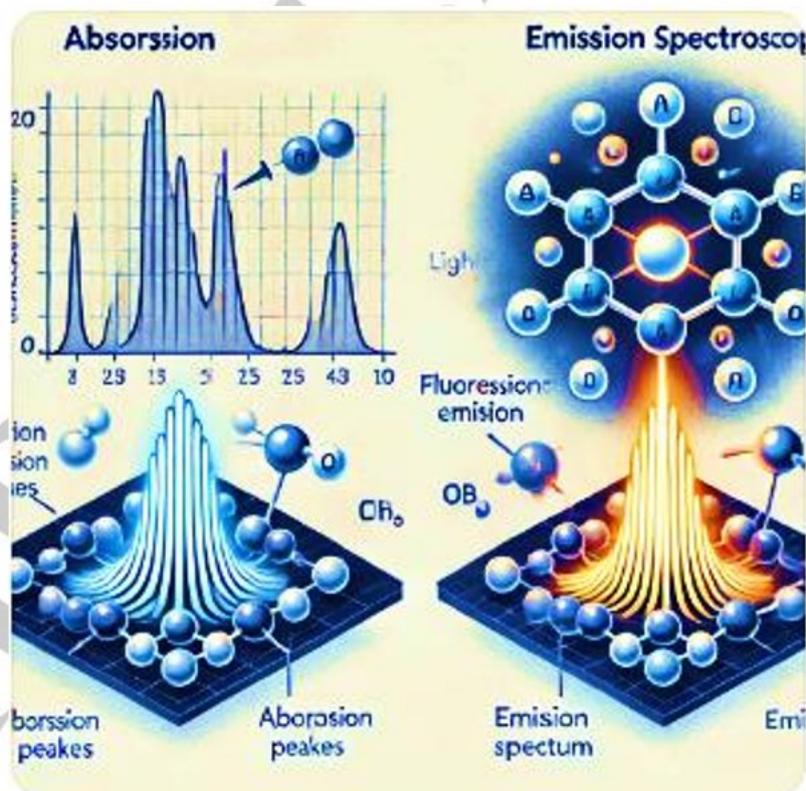


Cours 2

Les techniques de spectrométrie pour les étudiants de Master en chimie pharmaceutique

❖ Plan du cours

- Analyse qualitative et quantitative par spectrométries d'absorption et d'émission, en particulier greffage de groupements chromophores et fluorophores et domaines d'application.
- IR –UV –Vis Spectrométrie de masse (fragmentations préférentielles, réarrangements, sources d'ionisation, analyseurs, spectrométrie de masse tandem).





I. Introduction

Les méthodes spectrométriques sont essentielles pour l'analyse qualitative et quantitative des molécules en chimie pharmaceutique. Parmi ces techniques, la spectrométrie d'absorption et d'émission, l'IR (infrarouge), l'UV-Vis (ultraviolet-visible) et la spectrométrie de masse jouent un rôle clé dans l'étude des molécules et de leurs propriétés.

Ce cours se concentrera sur l'utilisation de ces techniques, avec une attention particulière sur le greffage de groupements chromophores et fluorophores, ainsi que les domaines d'application spécifiques.

II. Définition de l'Analyse qualitative et quantitative par spectrométries d'absorption et d'émission

II. 1. Analyse Qualitative par Spectrométrie d'Absorption et d'Émission

L'analyse **qualitative** fait référence à l'identification des composants chimiques présents dans un échantillon. Elle permet de déterminer la structure moléculaire et d'identifier les groupes fonctionnels en fonction des interactions de la lumière avec la matière.

- **Spectrométrie d'absorption** : Elle mesure la quantité de lumière absorbée par une substance lorsqu'elle est exposée à un faisceau lumineux. Cette absorption dépend de la nature de la molécule (ses groupes fonctionnels) et de la longueur d'onde de la lumière. Chaque molécule possède un **spectre d'absorption** unique qui permet son identification.
- **Spectrométrie d'émission** : Elle repose sur l'émission de lumière par une substance lorsqu'elle est excitée par une source externe (lumière, chaleur, ou énergie électrique). L'émission de cette lumière peut être mesurée et utilisée pour identifier les éléments ou groupes présents dans l'échantillon. Par exemple, la spectroscopie de fluorescence est une forme d'émission où la substance émet de la lumière après avoir absorbé un photon.



II. 2. Analyse Quantitative par Spectrométrie d'Absorption et d'Émission

L'analyse **quantitative** consiste à mesurer la concentration d'un composé dans un échantillon en se basant sur l'intensité de la lumière absorbée ou émise par ce dernier.

- **Spectrométrie d'absorption (quantitative)** : Cette technique repose sur la loi de **Beer-Lambert**, qui stipule que l'absorption de la lumière est proportionnelle à la concentration de la substance dans la solution et à la longueur du trajet optique. Ainsi, en mesurant l'absorption à une longueur d'onde spécifique, on peut déterminer la concentration d'une molécule cible dans l'échantillon.
- **Spectrométrie d'émission (quantitative)** : De manière similaire à l'absorption, l'intensité de la lumière émise (fluorescence ou luminescence) est directement liée à la concentration du composé analysé. En mesurant l'intensité de l'émission, on peut quantifier la quantité de la substance présente dans l'échantillon.

En résumé :



- **Analyse qualitative** : Identification des molécules ou groupes fonctionnels présents dans l'échantillon par mesure de leur capacité à absorber ou émettre de la lumière.
- **Analyse quantitative** : Détermination de la concentration d'un composé dans un échantillon par la mesure de l'intensité de l'absorption ou de l'émission lumineuse.



Les spectrométries d'absorption et d'émission sont des méthodes puissantes et couramment utilisées dans les laboratoires pour étudier les médicaments, les substances chimiques et biologiques, ainsi que pour le contrôle de qualité dans l'industrie pharmaceutique.

Voici un tableau (Tableau II.1) de comparaison détaillé entre **l'analyse qualitative** et **quantitative** par spectrométrie d'absorption et d'émission :

Tableau II.1 : comparaison détaillé entre l'analyse qualitative et quantitative par spectrométrie d'absorption et d'émission

Critère	Analyse Qualitative	Analyse Quantitative
Objectif principal	Identifier la présence de composés ou de groupes fonctionnels.	Mesurer la concentration d'un composé dans un échantillon.
Méthode d'analyse	Spectrométrie d'absorption : Mesure des longueurs d'onde absorbées par la substance. Spectrométrie d'émission : Mesure de la lumière émise par la substance après excitation.	Spectrométrie d'absorption : Utilisation de la loi de Beer-Lambert pour relier l'absorption à la concentration. Spectrométrie d'émission : Relier l'intensité de l'émission à la concentration.
Principe	L'absorption ou l'émission lumineuse est utilisée pour identifier des groupes fonctionnels ou des structures moléculaires spécifiques.	L'intensité de l'absorption ou de l'émission lumineuse est proportionnelle à la concentration de la substance dans l'échantillon.
Relation avec la concentration	Aucune relation directe avec la concentration ; permet d'identifier les substances présentes.	La concentration des substances est déterminée par la mesure de l'intensité de l'absorption ou de l'émission.
Techniques spécifiques	- Spectrométrie IR (Identification des groupes fonctionnels par absorption infrarouge).	- Spectrométrie UV-Vis (Quantification par absorption, loi de Beer-Lambert).



	<ul style="list-style-type: none"> - Spectrométrie UV-Vis (Identification des chromophores par absorption dans la gamme UV et visible). - Spectroscopie de fluorescence (Mesure de l'émission lumineuse après excitation). 	<ul style="list-style-type: none"> - Spectroscopie de fluorescence (Quantification par l'intensité de la fluorescence émise).
Applications typiques	<ul style="list-style-type: none"> - Identification de médicaments dans des échantillons complexes. - Étude de la structure chimique des molécules. - Identification de groupes fonctionnels dans les composés organiques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dosage de médicaments et autres composés chimiques dans des solutions. - Analyse de la pureté des substances. - Contrôle de qualité dans les industries pharmaceutique et chimique.
Exemples d'utilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Identifier un médicament à partir d'un extrait. - Détecter un groupe fonctionnel comme C=O dans une molécule. 	<ul style="list-style-type: none"> - Quantifier la concentration de principe actif dans un médicament. - Mesurer la concentration de contaminants dans une solution.
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Identification rapide et fiable des composés. - Permet une analyse qualitative dans des mélanges complexes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Permet de quantifier avec précision les concentrations des substances analytiques. - Sensibilité élevée, permettant l'analyse de faibles concentrations.
Limites	<ul style="list-style-type: none"> - Ne fournit pas de données quantitatives sur la concentration. - Peut nécessiter des méthodes complémentaires pour la quantification. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une calibration précise pour obtenir des résultats exacts. - Sensibilité influencée par la matrice de l'échantillon



Conclusion :

- **Analyse qualitative** : Se concentre sur l'identification des composés ou groupes fonctionnels sans se préoccuper de la quantité.
- **Analyse quantitative** : Mesure précise de la concentration des composés, en utilisant des relations physiques (telles que la loi de Beer-Lambert pour l'absorption) ou l'intensité de la fluorescence pour déterminer la quantité.

Ce tableau (Tableau II.1) résume les différences fondamentales entre ces deux types d'analyses, permettant ainsi de choisir la méthode appropriée selon l'objectif de l'étude.

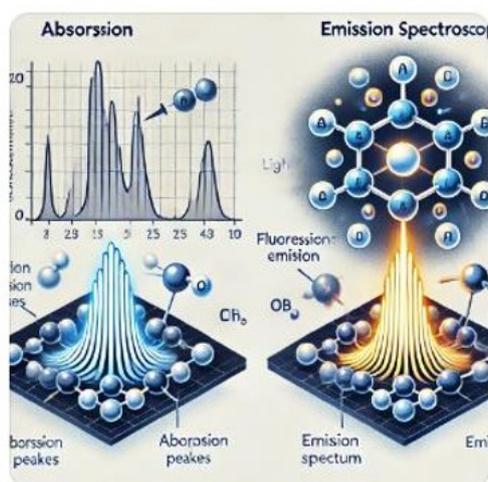


Figure II.1 : Comparaison entre la spectrométrie d'absorption et d'émission

Voici une illustration détaillée (Figure II.1) qui montre la différence entre la **spectrométrie d'absorption** et la **spectrométrie d'émission**.

- À gauche, on voit l'absorption lumineuse par une molécule, avec un graphique montrant les pics d'absorption caractéristiques.
- À droite, une molécule absorbe de la lumière et émet de la lumière à une longueur d'onde plus grande (émission de fluorescence), avec le spectre d'émission correspondant.

Cela illustre bien les deux processus et la différence entre l'absorption et l'émission dans les analyses spectroscopiques.



II. Spectrométrie d'absorption et d'émission

La spectrométrie d'absorption et d'émission repose sur l'interaction de la lumière avec la matière. Ces techniques permettent de mesurer la façon dont les molécules absorbent ou émettent de la lumière dans différentes gammes de longueurs d'onde. La spectrométrie d'absorption mesure l'absorption de la lumière par une substance à des longueurs d'onde spécifiques, tandis que la spectrométrie d'émission analyse la lumière émise par la substance après excitation.

a. Greffage de groupements chromophores et fluorophores :

Le greffage de groupements chromophores (absorbant dans le visible ou l'UV) ou fluorophores (qui émettent de la lumière après excitation) sur une molécule permet d'améliorer la détection ou l'analyse par spectrométrie d'absorption ou d'émission. Ces groupements peuvent être utilisés pour marquer des molécules, facilitant ainsi leur détection dans des matrices complexes.

- **Chromophores** : Ce sont des groupes chimiques responsables de l'absorption de la lumière dans les régions UV-Visible. Par exemple, les groupements carbonyles (C=O), amines (NH₂) et les systèmes aromatiques peuvent agir comme chromophores.
- **Fluorophores** : Ce sont des groupes qui émettent de la lumière après avoir absorbé des photons. Par exemple, le fluorophore aminocoumarine est couramment utilisé dans les analyses biomoléculaires.

b. Domaines d'application :

- **Analyse pharmacologique** : Ces techniques sont utilisées pour analyser des médicaments, leurs métabolites et les interactions médicamenteuses.
- **Suivi de réactions chimiques** : Le greffage de fluorophores ou de chromophores permet de suivre les changements dans des réactions chimiques complexes, comme la formation de complexes de coordination ou de polymères.



2. Spectrométrie Infrarouge (IR)

La spectrométrie infrarouge (IR) est utilisée pour déterminer la structure moléculaire de composés en analysant les vibrations des liaisons chimiques. Elle fournit des informations sur les groupes fonctionnels présents dans une molécule, ce qui est crucial dans l'identification des substances pharmaceutiques.

- **Principe** : L'IR repose sur l'absorption de l'énergie infrarouge par les liaisons chimiques dans la molécule, entraînant des vibrations. Ces vibrations se manifestent sous forme de pics dans le spectre IR, chaque pic correspondant à une fréquence vibratoire spécifique.
 - **Applications en pharmacie** : L'IR est utilisé pour confirmer l'identité d'un principe actif, détecter les impuretés et analyser la pureté des médicaments.
-

3. Spectrométrie UV-Vis

La spectrométrie UV-Visible est une méthode d'analyse qui exploite l'absorption de la lumière dans les régions ultraviolette et visible du spectre électromagnétique. Elle est largement utilisée pour l'analyse quantitative des composés.

- **Principe** : Les molécules absorbent la lumière dans la gamme UV-Vis en fonction de leurs structures électroniques. L'absorption dépend de la présence de chromophores et de leur capacité à exciter des électrons à partir de niveaux d'énergie bas.
 - **Applications pharmaceutiques** : Cette technique est utilisée pour quantifier des médicaments dans des formulations complexes, mesurer la stabilité des médicaments dans des solutions et évaluer les interactions entre molécules.
-



4. Spectrométrie de Masse (MS)

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de mesurer la masse des ions et leur fragmentation. Elle offre une excellente résolution pour identifier des molécules et déterminer leur structure.

a. Fragmentation préférentielle et réarrangements : Lorsqu'une molécule est ionisée dans un spectromètre de masse, elle peut se fragmenter en ions plus petits. La fragmentation préférentielle se produit lorsque certaines liaisons se cassent plus facilement que d'autres, produisant des ions caractéristiques qui aident à déterminer la structure de la molécule.

Les réarrangements structuraux peuvent aussi se produire, où l'ion formé subit un réarrangement interne avant de fragmenter. Ces informations sont cruciales pour l'interprétation des spectres de masse.

b. Sources d'ionisation : Les principales sources d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse sont :

- **Ionisation par impact électronique (EI) :** Utilisée principalement pour les petites molécules.
- **Ionisation par électrospray (ESI) :** Idéale pour les molécules biomoléculaires et les complexes macromoléculaires.
- **Ionisation par matrice assistée par laser (MALDI) :** Utilisée pour des analyses de biomolécules et des polymères.

c. Analyseurs :

Les spectromètres de masse utilisent différents types d'analyseurs pour séparer les ions selon leur rapport masse/charge (m/z). Les principaux types d'analyseurs sont :

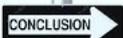
- **Quadripôle :** Permet une séparation rapide des ions.
- **Temps de vol (TOF) :** Permet une analyse de haute résolution des ions.
- **Orbitrap :** Offre une résolution et une précision de masse très élevées.



d. Spectrométrie de masse tandem (MS/MS) : La spectrométrie de masse tandem combine deux spectromètres de masse pour analyser les fragments d'un ion père. Cette technique permet de confirmer l'identité d'un composé en obtenant des informations détaillées sur ses produits de fragmentation. Elle est utilisée pour l'analyse de composés complexes dans des matrices biologiques, comme les protéines et les peptides.

- **Applications :** MS/MS est couramment utilisée dans la pharmacocinétique pour étudier les métabolites d'un médicament, dans les études de biomarqueurs et pour la quantification de substances à faible concentration.

Conclusion



Les techniques de spectrométrie sont des outils puissants en chimie pharmaceutique, permettant l'analyse précise et détaillée de composés pharmaceutiques. Que ce soit pour l'identification, la quantification, ou l'étude des interactions moléculaires, ces méthodes jouent un rôle clé dans la recherche et le développement des médicaments.

❖ Références bibliographiques :

1. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., & Morrill, T.C. (2019). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (8th ed.). Wiley.
2. Holler, F.J., & Skoog, D.A. (2021). *Principles of Instrumental Analysis* (7th ed.). Cengage Learning.
3. Gross, M.L., & Caprioli, R.M. (2017). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer.
4. Atkin, J.M., & Farley, R.S. (2020). "Applications of UV-Vis Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis." *Pharmaceutical Analysis Journal*, 45(1), 23-30.



Introduction

Les spectrométries d'absorption et d'émission sont des techniques fondamentales dans l'analyse chimique et pharmaceutique, permettant la caractérisation de structures moléculaires, l'identification des composants et la quantification des substances dans des matrices complexes. Ces techniques reposent sur l'interaction de la lumière (dans différentes gammes de longueurs d'onde) avec la matière, en analysant l'absorption, l'émission ou la diffusion de la lumière.

Nous aborderons ici :

1. Spectrométrie d'absorption (IR, UV-Vis)
2. Spectrométrie de masse
3. Greffage de groupements chromophores et fluorophores
4. Domaines d'application

1. Spectrométrie d'Absorption : IR, UV-Vis

1.1 Spectrométrie d'Absorption IR (Infrarouge)

La spectrométrie infrarouge (IR) repose sur l'absorption de rayonnement infrarouge par les molécules, entraînant des transitions vibratoires des liaisons chimiques. Cela permet de déterminer les groupes fonctionnels présents dans une molécule.

Principe

- **Intervalles de fréquence** : L'IR est divisé en trois régions :
 - ☞ **IR proche (0.8–2.5 μm)** : Interaction avec des vibrations de liaisons simples.
 - ☞ **IR moyen (2.5–50 μm)** : Interaction avec des vibrations des liaisons chimiques.
 - ☞ **IR lointain (50–1000 μm)** : Interactions plus profondes, souvent moins utilisées.



Applications

- **Identification de groupes fonctionnels** : Les bandes d'absorption caractéristiques (par exemple, C=O, N-H) sont utilisées pour identifier des groupes fonctionnels dans les médicaments.
- **Analyse qualitative des médicaments** : Identification de la composition chimique de substances actives dans un médicament.

1.2 Spectrométrie UV-Vis (Ultraviolet-Visible)

La spectrométrie UV-Vis mesure l'absorption de lumière ultraviolette ou visible par une molécule, souvent liée à des transitions électroniques dans des molécules chromophores.

Principe

- La lumière UV-Vis excite les électrons dans les molécules, provoquant des transitions électroniques. L'absorption est fonction de la structure de la molécule, ce qui permet de déterminer des informations sur celle-ci.

Applications

- **Quantification de composés chimiques** : Utilisée pour la quantification des médicaments par la loi de Beer-Lambert.
- **Suivi de réactions chimiques** : Surveillance de la progression des réactions chimiques grâce à l'absorption de substances spécifiques.

Table comparant IR et UV-Vis :

Table II.2 : Table comparant IR et UV-Vis

Critère	Spectrométrie IR	Spectrométrie UV-Vis
Type de transition	Vibrations des liaisons chimiques	Transitions électroniques
Plage de longueur d'onde	4000 à 400 cm^{-1} (2.5 à 50 μm)	200 nm à 800 nm



Critère	Spectrométrie IR	Spectrométrie UV-Vis
Utilisation principale	Identification des groupes fonctionnels	Quantification et analyse qualitative
Applications	Identification de médicaments, groupes fonctionnels	Dosage des médicaments, étude de réactions chimiques

2. Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse (SM) est une technique de mesure de la masse des ions produits en fragmentant une molécule. Elle permet d'identifier des molécules et d'obtenir des informations détaillées sur leur structure.

2.1 Principe

- **Ionisation** : Les molécules sont ionisées, généralement par des sources comme l'**ionisation par électrospray (ESI)** ou l'**ionisation à impact électronique (EI)**.
- **Analyse des ions** : Les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) et détectés.
- **Fragmentation et réarrangements** : Après ionisation, la molécule peut se fragmenter de manière prévisible, fournissant un spectre de masse caractéristique.

2.2 Types de sources d'ionisation

- **Ionisation par impact électronique (EI)** : Les électrons bombardent la molécule pour l'ioniser. Elle est couramment utilisée pour les petites molécules.
- **Ionisation par électrospray (ESI)** : Utilisée pour des molécules plus grosses et complexes, notamment dans les analyses de peptides et de protéines.

2.3 Analyseurs et Spectrométrie de Masse Tandem (MS/MS)

- **Analyseurs** : Ces dispositifs séparent les ions en fonction de leur m/z , comme les analyseurs quadripolaires, à temps de vol (TOF), ou trap à ions.



- **MS/MS** : Une technique qui consiste à fragmenter les ions parent et analyser les fragments, permettant une identification plus précise.

Table des principales méthodes de spectrométrie de masse :

Table II.3 : principales méthodes de spectrométrie de masse

Méthode	Source d'ionisation	Avantages	Applications
EI (Ionisation par impact électronique)	Électronique	Haute résolution pour petites molécules	Identification de petites molécules
ESI (Electrospray Ionization)	Electrospray	Idéal pour les grosses molécules	Analyse de protéines, peptides
CI (Ionisation chimique)	Réactifs chimiques	Plus doux que EI, préserve la structure	Analyse de médicaments complexes

2.4 Fragmentations préférentielles et réarrangements

Les molécules ionisées peuvent subir des fragmentations spécifiques, utiles pour déterminer leur structure.

- **Fragmentation de type cleavage** : Clivage de certaines liaisons, souvent en fonction de la structure chimique de la molécule.
- **Réarrangements** : Certains ions peuvent subir des réarrangements structuraux avant de se fragmenter, générant des spectres de masse complexes mais informatifs.

3. Greffage de Groupements Chromophores et Fluorophores

3.1 Greffage de Groupements Chromophores

Les **chromophores** sont des groupes fonctionnels capables d'absorber de la lumière dans la gamme UV-Vis. Leur greffage à une molécule permet de rendre cette molécule détectable par



spectrométrie UV-Vis. Exemples de groupes chromophores : nitriles ($C\equiv N$), cétones ($C=O$), ou azotes ($N=N$).

Applications

- **Marquage de biomolécules** pour faciliter leur détection par spectrométrie UV-Vis.
- **Suivi des réactions chimiques** en ajoutant un chromophore pour rendre la réaction visible.

3.2 Greffage de Groupements Fluorophores

Les **fluorophores** sont des groupes capables d'émettre de la lumière après absorption d'un photon (fluorescence). Leur greffage permet d'améliorer la sensibilité des analyses par spectroscopie de fluorescence.

Applications

- **Imagerie cellulaire** : Utilisation de fluorophores pour marquer et visualiser des molécules spécifiques dans des cellules vivantes.
- **Analyse quantitative** : Quantification de composés en solution par leur fluorescence.

Table comparative des groupements chromophores et fluorophores :

Table II.4 : Table comparative des groupements chromophores et fluorophores

Critère	Chromophores	Fluorophores
Propriété principale	Absorption de la lumière	Émission de lumière après excitation
Applications	Identification, quantification	Sensibilité améliorée, imagerie
Exemples	$C=O$, $C\equiv N$, $N=N$	Fluorescéine, Rhodamine



4. Domaines d'Application

Les techniques d'absorption, d'émission et de spectrométrie de masse trouvent des applications variées, en particulier dans l'analyse des médicaments, des produits biologiques, et dans le contrôle de qualité.

Applications principales :

- **Pharmacie** : Identification et quantification des médicaments.
- **Biotechnologie** : Suivi des interactions protéine-protéine, des biomolécules marquées.
- **Environnement** : Analyse des polluants chimiques dans l'air et l'eau.

Conclusion

CONCLUSION

Les spectrométries d'absorption et d'émission, combinées à la spectrométrie de masse, sont des outils puissants pour l'analyse et la quantification dans la chimie pharmaceutique.

Le greffage de groupes chromophores et fluorophores permet d'élargir leur spectre d'applications, en particulier dans les analyses sensibles et spécifiques.

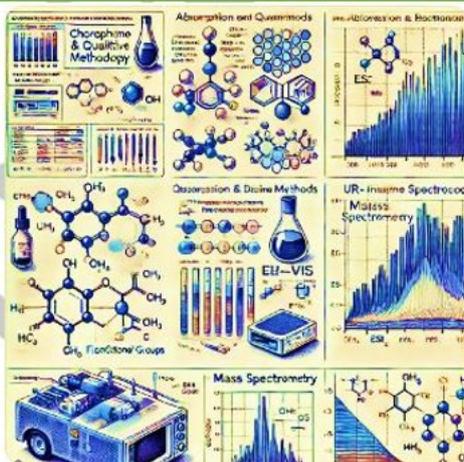


Figure II.2 : Illustrations des méthodes analytiques en chimie pharmaceutique

Voici les illustrations et figures représentant les différentes méthodes analytiques en chimie pharmaceutique (Figure II.2), telles que la spectroscopie d'absorption et d'émission, l'IR, l'UV-Vis, et la spectrométrie de masse. Ces images incluent également des tableaux résumant les méthodes



Analyse physicochimique et instrumentation
qualitatives et quantitatives ainsi que les sources d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse. Ces
ressources visuelles seront utiles pour la compréhension des concepts abordés.

❖ **Références bibliographiques**

1. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Brooks/Cole.
2. McLafferty, F. W., & Tureček, F. (2003). *Interpretation of Mass Spectra* (4th ed.). University Science Books.