

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB –BLIDA 1**

**FACULTE DE MEDECINE**  
**DEPARTEMENT DE PHARMACIE**



Mémoire de fin d'étude  
Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de  
**DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Session : juillet 2021  
Intitulé :

**Apport de la Résonance Magnétique  
Nucléaire dans l'identification des  
principes actifs**

Présenté par :

**BOUDJEMA ZAKARIA**

Encadré par :

- **Dr L.LACEB** Maitre-Assistante en Chimie Thérapeutique

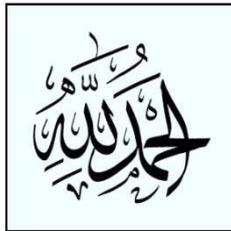
Le Jury d'évaluation :

- Dr. F.REGGABI Maitre-Assistante en biophysique Présidente
- Dr. L.AZZOUZ Maitre-Assistante en Chimie Analytique Examinatrice

**Année universitaire 2020-2021**

## Remerciements

*Je tiens à remercier Allah le tout puissant, le miséricordieux, de m'avoir donné le courage et de m'avoir attribué la faveur d'accomplir ce modeste travail ainsi que de réussir mes études.*



*Je désire aussi remercier mon promoteur **Dr. L.LACEB** Maitre-assistante à l'Université SAAD DAHLAB de BLIDA, pour son suivi et pour son énorme soutien, pour m'avoir orienté et conseillé tout au long du chemin.*

*J'adresse ma gratitude à tous les membres de jury qui m'honorent en acceptant d'examiner mon travail.*

*Mes profonds remerciements vont également à toute personne ayant aidé ou contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicace

*Je tiens à dédier ce modeste travail :*

*À mes chers parents  
à mon petit frère  
et à ma sœur.*

*Et à tous ceux qui sont proches pour moi.*

*Merci d'être toujours là pour moi.  
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux.*

**ZAKARIA**

## Table des matières

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
Table des matières.....	III
Liste des figures : .....	VII
Liste des tableaux : .....	IX
Liste des abréviations.....	X
Introduction générale .....	1
Chapitre I : Généralités sur les médicaments.....	4
I- Le médicament : .....	5
II- Vie d'un médicament : .....	5
II.1. Conception : .....	6
II.2. Composition des médicaments :.....	6
II.3. Principe actif : .....	6
II.3.A. Pharmacocinétique : .....	8
II.3.B. Pharmacodynamie : .....	8
II.3.C. Récepteurs et ligands :.....	9
II.3.D. Interaction PA-récepteur : Agonistes et antagonistes.....	9
II.3.E. Différentes formes de principe actif : .....	9
II.3.F. Origines et natures des principes actifs : .....	10
II.4. Excipients : .....	10
III- Voie d'administration et forme galénique : .....	11
Chapitre II : Méthodes d'identification des principes actifs .....	13
I-Définition et principe de l'identification d'un principe actif : .....	14
II-Différentes méthodes d'identification :.....	15
II-1- Identification par des procédés physiques : .....	16
II.1.A. Procédés physiques sans changement d'état : .....	16
II.1.A.a. Densité :.....	16
II.1.A.b. Indice de réfraction :.....	17
II.1.A.c. Pouvoir rotatoire spécifique :.....	17
II.1.A.d. PH :.....	18
II.1.B. Procédés physiques avec changement d'état : .....	18

II.1.B.a Point de solidification :	18
II.1.B.b. Point de fusion :	18
II.1.B.c. Point d'ébullition :	18
II.1.B.d. Intervalle de distillation :	19
II-1-C- Autres procédés physique :	19
II.1.C.a. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible :	19
II.1.C.b. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge :	20
II.1.C.c. Résonance magnétique nucléaire : Voir Chapitre III.	23
II.1.C.d. Diffraction des rayons X :	23
II.2. Identification par des procédés physicochimiques	23
II.2.A. Chromatographies :	23
II.2.B. Electrophorèse :	26
II.2.C. Autres procédés physicochimiques d'identification dans la Ph. Eur. :	26
II.3. Identification par voie chimique :	26
II.3.a. Réactions chimiques	26
II.4. Identification de l'hydrate :	27
II.4.a. Perte à la dessiccation :	27
II.4.b. Dosage de l'eau :	27
Chapitre III : La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	28
I. Introduction :	29
II. Interaction spin/champ magnétique pour un noyau :	29
III. Les noyaux étudiés par RMN :	30
IV. Théorie de BLOCH pour un noyau dont $I=1/2$ :	31
V. Fréquence de Larmor :	32
VI. Obtention du spectre par RMN :	32
VII. Découplage :	33
VIII. Déplacement chimique :	33
IX. Techniques et paramètres spectraux :	35
X. Appareillage :	36
X.1. Eléments d'un spectromètre RMN haute résolution :	36
X.2. Description de l'appareillage utilisé en RMN :	36
X.3. Critères d'installation d'un spectromètre RMN :	39
X.4. Tests pour le bon fonctionnement de spectromètre RMN :	39
XI. RMN à transformée de Fourier (RMN-FT) :	40

XII. Échantillonnage pour RMN :.....	40
XII.A. Echantillon en solution : .....	40
XII.A.1. Analyse qualitative (voir Chapitre 4) .....	42
XII.A.2. Analyse quantitative: .....	42
XII.B. Echantillon sous forme solide :.....	43
XII.B.1. Rotation à l'angle magique :.....	44
Chapitre IV : Identification des principes actifs par RMN .....	46
I. Généralités :.....	47
II. Identification des principes actifs par RMN : .....	48
II.1. Identification des principes actifs par comparaison des spectres RMN en utilisant une SCR : ....	48
II.1.A. Substance Chimique de Référence de la Pharmacopée Européenne (SCR) :.....	48
II.1.B. Mode opératoire :.....	49
II.1.B.a. Préparation de l'échantillon .....	49
II.1.B.b. Procédure de mesure.....	49
II.1.C. Spectres RMN : .....	50
II.1.D. Identification des principes actifs par comparaison mathématique des spectres (Coefficient de corrélation) :.....	52
II.2. Identification des principes actifs en démontrant la structure de la molécule :.....	56
II.2.A. RMN de proton $^1\text{H}$ : .....	56
II.2.A.a. Notion de blindage :.....	56
II.2.A.b. Relations empiriques : .....	65
II.2.A.c. Couplage spin-spin : .....	67
II.2.A.d. Notion d'équivalence : .....	73
II.2.B. RMN du Carbone $^{13}\text{C}$ : .....	87
III. Paramètres RMN à TF : .....	89
III.a. Largeur d'impulsion $\tau_p$ .....	89
III.b. Temps mort $t_d$ .....	89
III.c. Temps d'acquisition $t_{ac}$ .....	89
III.d. Temps de répétition $t_r$ .....	90
III.e. Gain de réception .....	90
IV. Principes actifs identifiés par RMN selon la Ph. Eur. : .....	90
V- Identification des principes actifs de nature peptidique par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire :.....	94
V.1. Principes généraux : .....	94
V.1.a. Appareillage : .....	94

V.1.b. Conditions d'acquisition spectrale et leur optimisation : .....	94
V.1.c. Référence du déplacement chimique : .....	95
V.1.d. Taille de l'échantillon : .....	95
V.1.e. Préparation de l'échantillon : .....	95
V.2. Confirmation de l'identité : .....	96
V.2.a. Détermination des paramètres spectraux fondamentaux : .....	96
V.2.b. Identification des résonances caractéristiques : .....	96
V.3. Validation des essais : Identification des peptides par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire : .....	96
V.3.a. Stabilité du processus d'obtention des spectres : .....	97
V.3.b. Spécificité : .....	97
V.3.c. Autres facteurs de variabilité : .....	97
VI-Principes actifs de nature peptidique identifiés par RMN selon la Ph. Eur. : .....	97
VII-Quelques complications d'identification des PA par RMN et les solutions : .....	99
Conclusion générale .....	102
Références bibliographiques .....	104

## Liste des figures :

Figure 1: Vie d'un médicament. <sup>2</sup> .....	5
Figure 2: Les composantes d'un médicament. <sup>3</sup> .....	6
Figure 3: Les étapes de développement d'un médicament. <sup>3</sup> .....	7
Figure 4: Identification de l'aspartate de magnésium extrait de la Ph. Eur. <sup>8</sup> .....	14
Figure 5: Première et seconde identification de l'Acéclofénac selon la Ph. Eur. <sup>8</sup> .....	15
Figure 6: Diagramme de spectromètres et analyseurs dans l'IR. <sup>11</sup> .....	21
Figure 7: Effet d'un champ magnétique sur un noyau de nombre de spin 1/2 présent dans un composé en solution. <sup>11</sup> .....	30
Figure 8: Représentation de l'éclatement entre les niveaux énergétiques d'un noyau de nombre de spin I=1/2 placé dans un champ magnétique. <sup>11</sup> .....	31
Figure 9: Echelles de déplacement chimique du proton. <sup>13</sup> .....	35
Figure 10: Spectre <sup>29</sup> Si d'une faujasite (zéolithe). (a) Avec rotation. (b) Sans rotation. <sup>15</sup> .....	45
Figure 11: RMN de rotation à l'angle magique. <sup>16</sup> .....	45
Figure 12: Spectromètre RMN: 200 MHz, multi-noyaux. <sup>17</sup> .....	47
Figure 13: Principe simplifié d'un RMN de paillasse impulsional et à TF. <sup>18</sup> .....	48
Figure 14: Exemple de mode opératoire d'identification de l'héparine calcique. <sup>8</sup> .....	50
Figure 15: Spectres des 4 protons aromatiques de l'aspirine. <sup>11</sup> .....	51
Figure 16: Spectre de RMN <sup>1</sup> H d'un mélange d'acétone (A) et de benzène (B). <sup>11</sup> .....	51
Figure 17: Paramètres d'un spectre RMN. <sup>19</sup> .....	52
Figure 18: Exemples des différentes corrélations possibles. <sup>21</sup> .....	55
Figure 19: Déplacement chimique des protons. <sup>17</sup> .....	56
Figure 20: (a): Le phénomène de déblindage & (b): Le phénomène de blindage ou d'écran. <sup>17</sup> .....	57
Figure 21: Relation entre le blindage des noyaux et le déplacement chimique. <sup>17</sup> .....	58
Figure 22: Quelques molécules et les types de H qu'ils comportent (équivalents ou différents). <sup>17</sup> .....	59
Figure 23: Différentes régions de blindage et de déblindage de quelques molécules. <sup>17</sup> .....	59
Figure 24: Exemple de noyaux H blindés et déblindés. ....	60
Figure 25: Protons blindés et déblindés dans des molécules cycliques. ....	60
Figure 26: Blindage des noyaux H selon le nombre de protons sur le carbone. ....	61
Figure 27: Spectre RMN du proton de 2,2,4-triméthylpentane. <sup>17</sup> .....	61
Figure 28: Effet d'un atome électro-attracteur (Br) sur les déplacements chimiques des protons dans une molécule. <sup>22</sup> .....	62
Figure 29: Effets de déblindage de proton par des groupements électro-attracteurs. <sup>17</sup> .....	62
Figure 30: Spectre RMN du proton de la butan-2-one. <sup>17</sup> .....	63
Figure 31: Spectre RMN du proton de Ph-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>3</sub> . <sup>17</sup> .....	63
Figure 32: Effet déblindeur sur le proton par les insaturations. <sup>17</sup> .....	63
Figure 33: Spectre RMN du proton du benzène. <sup>17</sup> .....	64
Figure 34: Spectre RMN du proton du toluène. <sup>17</sup> .....	64
Figure 35: Spectre RMN ( <sup>1</sup> H) du cis 1-phényl-prop-1-ène. <sup>17</sup> .....	65
Figure 36: Exemples où la règle d'additivité est respectée ou non respectée. ....	66
Figure 37: Couplage spin-spin (gauche) et définition de la constante de couplage J (droite). <sup>22</sup> .....	67

Figure 38: Dédoublément de signal (pic) pour 2 noyaux $^1\text{H}$ couplés. <sup>22</sup> .....	67
Figure 39: Signal d'un proton H couplé à deux protons équivalents. Les chiffres indiquent l'intensité relative de chaque pic. Le signal est donc un triplet. <sup>22</sup> .....	68
Figure 40: Triangle de Pascal et la multiplicité de pic spectroscopique en RMN. <sup>22</sup> .....	69
Figure 41: Triangle de Pascal et le nombre de protons voisins "n" ainsi que la multiplicité de pic. <sup>17</sup> .....	69
Figure 42: Spectre RMN du $^1\text{H}$ du chloroéthane à basse et à haute résolution. <sup>17</sup> .....	70
Figure 43: Interaction spin-spin et la constante de couplage J. <sup>17</sup> .....	71
Figure 44: Différentes combinaisons de spin pour $\text{CH}_2$ . <sup>17</sup> .....	71
Figure 45: Diagramme énergétique de $\text{CH}_3$ . <sup>17</sup> .....	72
Figure 46: Différentes combinaisons de spin pour $\text{CH}_3$ . <sup>17</sup> .....	72
Figure 47: Diagramme énergétique de $\text{CH}_2$ . <sup>17</sup> .....	72
Figure 48: Spectre RMN du proton de chloroéthane selon le triangle de Pascal. <sup>17</sup> .....	73
Figure 49: Quelques molécules et les protons équivalents qu'ils comportent. <sup>17</sup> .....	74
Figure 50: Protons équivalents par rapport à un axe de symétrie (gauche) et par libre rotation (droite). <sup>17</sup> .....	74
Figure 51: Protons équivalents dans le dibromométhane. <sup>22</sup> .....	74
Figure 52: Structure chimique de l'acétonitrile. <sup>22</sup> .....	75
Figure 53: Exemples pour la stéréochimie. <sup>17</sup> .....	75
Figure 54: Couplage géminé. <sup>17</sup> .....	76
Figure 55: H géminés et molécules cycliques ou avec une insaturation. <sup>17</sup> .....	77
Figure 56: Couplage vicinal. <sup>17</sup> .....	77
Figure 57: Exemple d'un spectre pour un couplage à long distance. <sup>17</sup> .....	78
Figure 58: Constante de couplage pour quelques molécules. <sup>17</sup> .....	78
Figure 59: Nature de couplage (Cis ; Trans ; Géminé) et la constante de couplage correspondante. <sup>17</sup> .....	79
Figure 60: Spectre RMN $^1\text{H}$ de dichloroéthane. <sup>17</sup> .....	79
Figure 61: Spectre RMN $^1\text{H}$ de l'acide propanoïque. <sup>17</sup> .....	80
Figure 62: Molécule avec une liaison d'hydrogène intramoléculaire. ....	81
Figure 63: Spectre RMN $^1\text{H}$ de l'éthanol. <sup>17</sup> .....	81
Figure 64: Spectre RMN $^1\text{H}$ de propan-1-ol. <sup>17</sup> .....	82
Figure 65: Spectre RMN $^1\text{H}$ de pentan-3-one. <sup>17</sup> .....	83
Figure 66: Basculement conformationnel de cyclohexane. <sup>17</sup> .....	83
Figure 67: Spectre RMN $^1\text{H}$ du cyclohexane à $25^\circ\text{C}$ . ....	84
Figure 68: Spectre RMN $^1\text{H}$ du cyclohexane à $-90^\circ\text{C}$ . <sup>17</sup> .....	85
Figure 69: Les déplacements chimiques de $^1\text{H}$ . <sup>17</sup> .....	86
Figure 70: La différence entre le nombre des signaux en $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ . ....	87
Figure 71: Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du phénylacétate d'éthyle. <sup>17</sup> .....	88
Figure 72: Déplacements chimiques de $^{13}\text{C}$ . <sup>17</sup> .....	88
Figure 73: Spectre RMN $^{13}\text{C}$ : région du carbonyle de l'huile de foie de morue d'élevage. <sup>8</sup> .....	93
Figure 74: Spectre RMN $^{13}\text{C}$ : région du carbonyle de l'huile de saumon d'élevage. <sup>8</sup> .....	93

## Liste des tableaux :

Tableau 1: Propriétés du PA qu'il faut s'efforcer de connaître avant d'aborder une formulation. <sup>2</sup> .....	7
Tableau 2: Formes galéniques les plus courantes. <sup>2</sup> .....	12
Tableau 3: Informations structurelle à extraire d'un spectre RMN. <sup>10</sup> .....	35
Tableau 4: Table des rapports entre la fréquence spécifique de l'isotope et la fréquence <sup>1</sup> H du TMS. <sup>10</sup> .....	41
Tableau 5: Contribution du substituant au déplacement chimique de proton. <sup>17</sup> .....	66
Tableau 6: Exemples de l'aspect de spectre RMN <sup>1</sup> H selon le nombre "n" et le triangle de Pascal. <sup>23</sup>	69
Tableau 7: Groupes de protons de l'éthanol et la multiplicité de chaque pic correspondante.....	81
Tableau 8: Valeurs de déplacement chimique des différents groupes carbonyle. <sup>17</sup> .....	82
Tableau 9: Principes actifs identifiés par RMN selon la Ph. Eur. <sup>8</sup> .....	90
Tableau 10: Principes actifs de nature peptidique et leurs méthodes d'identification par RMN selon la Ph. Eur. <sup>8</sup> .....	97
Tableau 11: Isotopes identifiés par RMN et leurs caractéristiques. <sup>17</sup> .....	100

## Liste des abréviations

### A

**ACTH** : Adreno CorticoTropic Hormone  
**AMM** : Autorisation de mise sur le marché  
**API** : Active pharmaceutical ingredient

### B

**BPF** : Bonnes pratiques de fabrication

### C

**CCM** : Chromatographie sur couche mince  
**CL** : Chromatographie liquide  
**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse  
**CP** : Cross polarisation, méthode de polarisation croisée

### D

**DHA** : Acide docosahexaénoïque  
**DP** : Data points  
**DSS** : 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate

### E

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique  
**EPA** : Acide eicosapentaénoïque

### F

**FID** : Free induction decay, signal de précession libre  
**FM** : Modulation de fréquence (frequency modulation)  
**FT** : transformée de Fourier

### G

**GABA** : gamma-aminobutyric acid

### I

**IR** : Infra-rouge

### M

**MAS** : magic angle spinning, rotation à l'angle magique

### N

**NOE** : Nuclear Overhauser effects, les effets Overhauser nucléaires

### P

**PA** : Principe actif  
**PF** : Produit fini  
**Ph. Eur** : Pharmacopée européenne  
**PH** : Potentiel hydrogène

### R

**RF** : radiofréquence  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RMN-TF** : Résonance magnétique nucléaire à transformée de Fourier

### S

**SCR** : Substance chimique de référence  
**S/N** : Rapport signal/bruit d'un spectre RMN

### T

**TMS** : Tétraméthylsilane  
**TSP** : 3-(triméthylsilyl)propionate

### U

**USP-NF** : United States Pharmacopeia – National Formulary  
**UV** : Ultra violet

### V

**Vis** : Visible

# **Introduction générale**

Depuis sa découverte, la RMN a connu d'incroyables développements technologiques, motivés par la diversité de ses applications (qui vont de la physique et la chimie à la médecine « imagerie par résonance magnétique »).

En effet, elle a initialement été une méthode physique d'investigation des propriétés magnétiques présentées par certains noyaux atomiques. Les chimistes eux-mêmes ont rapidement été convaincus de l'importance de cette technique après l'établissement de la relation entre les fréquences de résonance des noyaux et la nature de leur environnement chimique (autres noyaux voisins dans la même molécule), ouvrant ainsi la voie vers une nouvelle méthode spectroscopique d'analyse, particulièrement en chimie organique.

Des progrès technologiques substantiels autorisent actuellement l'enregistrement des spectres de différentes molécules, y compris les principes actifs et les molécules de haut poids moléculaire même celles d'origine biologique.

Les techniques expérimentales de la RMN ont considérablement évolué au cours du temps, à la fois vers la recherche de la meilleure sensibilité possible et vers une assistance à l'interprétation.

La mesure de ces progrès peut être prise si on considère, par exemple, qu'il y a quelques décennies les chimistes des substances naturelles vérifiaient à l'aide d'un spectre de RMN à basse résolution les structures obtenues à l'issue de complexes cascades de transformations chimiques. Actuellement des structures de molécules organiques ou de principes actifs sont complètement déduites utilisant la RMN haute résolution.

Ainsi, la RMN peut être utilisée pour l'identification des principes actifs et l'élucidation de la structure moléculaire de ces derniers, ce qu'est un avantage non rencontré dans les autres méthodes d'identification. Sans négliger qu'elle peut être utilisée à des fins d'analyse quantitative.

### **Les objectifs :**

Le but principal de ce mémoire est de montrer la potentialité et l'usage de la RMN dans l'identification des principes actifs.

Ainsi, les objectifs suivants ont été encerclés :

- Explorer systématiquement les différentes méthodes d'identification des principes actifs.
- Apprendre les principes fondamentaux de fonctionnement de la technique spectroscopie RMN et les notions théoriques concernées.
- Apprendre à Identifier un PA par spectroscopie RMN.
- Etudier les bases de l'élucidation des structures moléculaires ou PAs à partir des spectres RMN.
- Valoriser cette technique et la nature des informations qu'elle apporte par rapport aux autres méthodes d'identification des PAs.

# **Chapitre I : Généralités sur les médicaments**

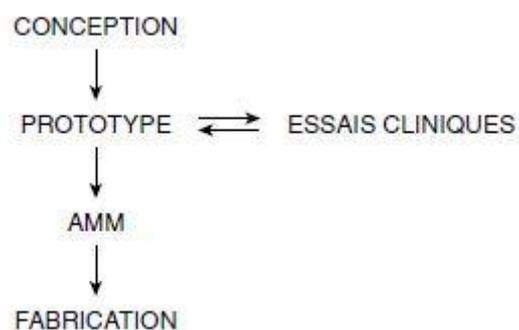
## I- Le médicament :

Le médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger et de modifier ses fonctions physiologiques.<sup>1</sup>

## II- Vie d'un médicament :

Schématiquement, dans la vie d'un médicament, il y a deux temps : celui de la conception et celui de la fabrication. Dans le cas le plus général, c'est-à-dire celui d'une spécialité, la période de la conception aboutit à la réalisation d'un lot rigoureusement défini dont les unités sont soumises à divers essais cliniques. Ces derniers ayant permis de préciser les indications thérapeutiques, une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) est adressée à l'autorité ministérielle compétente. L'AMM obtenue, le fabricant peut aborder la période de fabrication industrielle.<sup>2</sup>

Dans le premier temps, le galéniste, en collaboration étroite avec l'analyste, met tout en œuvre pour réaliser une formule de médicament, la meilleure possible dans l'état des connaissances scientifiques du moment. Dans le second temps, son objectif est de reproduire en quantités industrielles des médicaments conformes à la qualité du lot prototype qui a servi aux essais cliniques. Il le fait en appliquant les bonnes pratiques de fabrication des médicaments (BPF)<sup>2</sup>. On a donc la chronologie suivante :



**Figure 1: Vie d'un médicament.<sup>2</sup>**

## II.1. Conception :

Les composantes de la qualité d'un médicament sont très nombreuses. Tout au long de la mise au point d'un médicament nouveau, il y a des choix à faire en ce qui concerne la voie d'administration, la forme galénique, les excipients et les matériaux de conditionnement, le procédé de fabrication, les contrôles, les articles de conditionnement et les conditions de conservation. Ces choix ne peuvent être faits sans une connaissance aussi complète que possible du principe actif PA.<sup>2</sup>

## II.2. Composition des médicaments :

- **Un ou plusieurs PA** : responsable de l'action pharmacologique.
- Excipients : dépourvu d'action pharmacologique.
- Articles de conditionnement.<sup>2</sup>

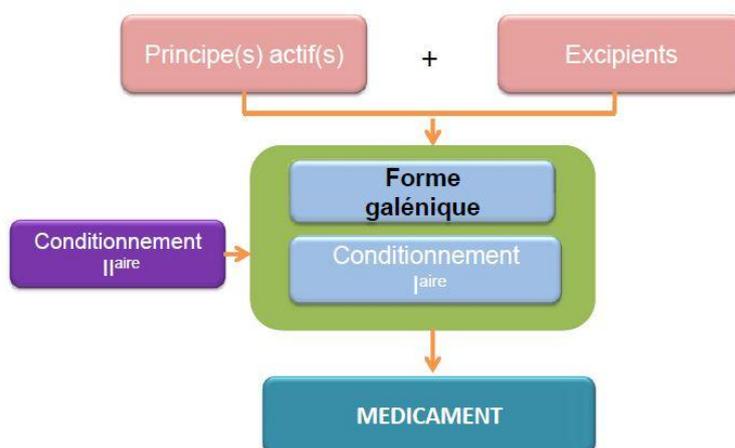


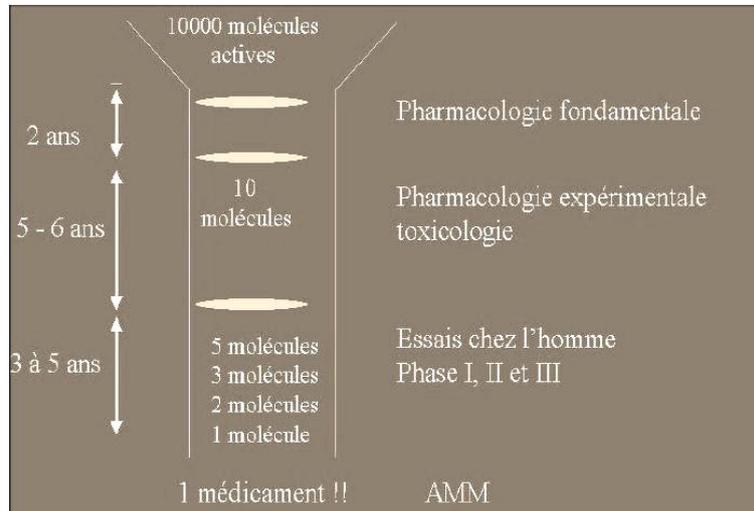
Figure 2: Les composantes d'un médicament.<sup>3</sup>

## II.3. Principe actif :

Au point de départ de la formulation d'un nouveau médicament, il y a le principe actif, c'est-à-dire une substance dont l'activité thérapeutique a été établie et qui a fait l'objet de nombreuses études de la part des chimistes, des toxicologues et des pharmacologues.<sup>2</sup>

Donc, le principe actif est une molécule de nature chimique qui possède une structure particulière lui conférant la capacité de se lier à des récepteurs biologiques, cette structure moléculaire « particulière » permet de distinguer un médicament d'un autre ou de les identifier notamment par La Spectroscopie RMN.

La mise au point ou le développement de principe actif est un processus long, coûteux et complexe.



**Figure 3: Les étapes de développement d'un médicament.** <sup>3</sup>

Le galéniste doit rassembler toutes celles de leurs observations qui peuvent lui être utiles. Il s'agit essentiellement des propriétés physicochimiques du principe actif et de tout ce qui concerne son devenir dans l'organisme (tableau 1). <sup>2</sup>

**Tableau 1: Propriétés du PA qu'il faut s'efforcer de connaître avant d'aborder une formulation.** <sup>2</sup>

Propriétés physico-chimique	Devenir dans l'organisme
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Caractères organoleptiques</li> <li>– Propriétés physiques : Solubilité</li> <li>– Propriétés chimiques : Stabilité et incompatibilité :</li> <li>• Température</li> <li>• Humidité</li> <li>• Oxygène</li> <li>• Lumière</li> <li>• Divers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Pharmacocinétique :</li> <li>• Répartition</li> <li>• Biotransformations</li> <li>• Élimination</li> <li>– Activité thérapeutique</li> <li>• Lieu</li> <li>• Mécanisme</li> <li>• Effets secondaires</li> <li>– Biodisponibilités :</li> <li>• Profil optimal</li> </ul>

### II.3.A. Pharmacocinétique :

La pharmacocinétique est l'étude du devenir ou du sort du PA dans l'organisme. Elle permet de définir le posologie utile en thérapeutique, c'est-à-dire le rythme d'administration et la durée du traitement, à partir de valeurs quantifiées à chacune des quatre grandes étapes suivantes :

- Absorption (résorption) : processus par lequel le PA passe de son site d'application à la circulation générale ;
- Distribution : répartition du principe actif dans le compartiment sanguin et dans les différents tissus et organes de l'organisme ;
- Métabolisme (biotransformation) : transformation biochimique de principe actif, réalisées par l'organisme, C'est-à-dire, transformation de la drogue en métabolites dont l'activité thérapeutique et les propriétés physico-chimique sont modifiées par rapport au principe actif. Le but du métabolisme est de faciliter l'élimination de la molécule ;
- Elimination : sortie de l'organisme du principe actif et de ses métabolites. <sup>4</sup>

### II.3.B. Pharmacodynamie :

La Pharmacodynamie correspond à l'étude des effets des PAs sur l'organisme. C'est la science qui étudie l'interaction entre la drogue et l'organisme sur le plan moléculaire. Elle permet de définir le site d'action, c'est-à-dire la cible : là où le principe actif se fixe sur l'organisme pour provoquer l'effet thérapeutique recherché. <sup>4</sup>

Les principes actifs agissent par des actions non spécifiques ou des actions spécifiques :

#### - **Actions non spécifiques :**

Les médicaments d'action non spécifique agissent grâce à des propriétés physiques (ex : charbon actif par absorption de gaz, laxatifs osmotiques...) ou chimiques (ex : les antiacides locaux comme l'hydroxyde d'aluminium ou de magnésium, l' EDTA chélateur employé comme antidote d'intoxication par le plomb...) et n'ont pas d'affinité pour les récepteurs de l'organisme. Les quantités de drogue nécessaires sont importantes.

#### - **Actions spécifiques :**

Les médicaments à action spécifique agissent à faible dose. Leur action résulte d'une interaction avec une macromolécule protéique à laquelle le principe actif se lie. <sup>4</sup>

### II.3.C. Récepteurs et ligands :

Les récepteurs sont des molécules d'origine protéique réagissant avec les molécules endogènes (adrénaline, dopamine, GABA...) et exogènes (PA). La grande différence avec les sites de fixation non spécifique, c'est que la liaison d'une molécule à un récepteur implique une réponse pharmacologique. Toute molécule se fixant sur un récepteur est appelé « ligand »

Un même organe peut renfermer des récepteurs différents dont la stimulation aura des effets physiologiques variés. <sup>4</sup>

### II.3.D. Interaction PA-récepteur : Agonistes et antagonistes

Pour qu'une substance exerce un effet spécifique après interaction avec un site récepteur, il faut qu'elle puisse non seulement s'y fixer (affinité) mais également posséder la capacité d'agir sur ce récepteur et de déclencher le changement d'une fonction cellulaire. Cette propriété supplémentaire est baptisée activité intrinsèque de la substance. Affinité et activité intrinsèque, ensemble, définissent un agoniste. <sup>5</sup>

Il existe des substances en présence desquelles l'action d'un agoniste est diminuée, ce sont des anti-agonistes, ou antagonistes partiels.

Les antagonistes compétitifs (action de blocage) possèdent également une affinité pour le récepteur, mais leur fixation à ce récepteur n'entraîne aucune modification des fonctions cellulaires. Les antagonistes compétitifs n'ont donc aucune activité intrinsèque. <sup>5</sup>

### II.3.E. Différentes formes de principe actif :

- **Formes cristallines <sup>2</sup>**: Un solide cristallin est constitué par la répétition périodique dans les 3 dimensions de l'espace d'un motif atomique ou moléculaire, contenu dans une unité de répétition périodique appelé maille ; de la même façon qu'un papier peint est constitué de la répétition d'un même motif. La périodicité de la structure d'un cristal est donc représentée par un ensemble de points régulièrement disposés. Cet ensemble est appelé réseau cristallin et les points le constituant sont appelés nœuds du réseau.

- **Formes non cristallines** <sup>2</sup>
- **Sous la forme de dérivés tels que** <sup>2</sup>:

**Sels** <sup>2</sup>: un sel est un composé ionique de cations et d'anions formant un produit neutre et sans charge électrique nette. Ces ions peuvent être aussi bien minéraux (chlorure  $\text{Cl}^-$ ) qu'organiques (acétate  $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ ) et monoatomiques (fluorure  $\text{F}^-$ ) aussi bien que polyatomiques (sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

**Hydrates** <sup>2</sup>: les hydrates sont des composés formés par l'union d'eau et d'une autre substance, union résultant généralement en un corps neutre, comme certains sels cristallisés. Si l'eau est de l'eau lourde, où l'hydrogène est en fait du deutérium, on utilise le terme « deutérate » plutôt qu'« hydrate ». Ces substances dites hydratées peuvent contenir des molécules d'eau chimiquement liées au reste de la structure cristalline, ou bien ses éléments constitutifs (H, O et/ou OH) liés à la structure mais séparément.

Le choix se fait en fonction du mode d'administration et de considérations de stabilité, de solubilité et de biodisponibilité. <sup>2</sup>

#### II.3.F. Origines et natures des principes actifs :

- **Biologique (végétale ou animale)** : De nombreuses médications traditionnelles sont dérivées des plantes, comme l'aspirine, la digitaline extraite de la digitale, l'ergot de seigle, l'opium, la quinine et la réserpine. Des hormones sont également utilisées pour le traitement des maladies (ACTH, insuline). Des nombreuses substances qui provenaient auparavant d'extraits animaux sont à présent fabriquées par génie génétique.
- **Microbiologique** : pénicilline, antibiotique extrait de la moisissure *Penicillium notatum*.
- **Minérale** : comme l'acide borique, le sulfate de magnésium et l'iode.
- **Synthétique (molécules organiques)** : Des médicaments plus récents comme les analgésiques, les sédatifs, les psychotropes et les anesthésiques ont été entièrement développés par synthèse chimique. <sup>6</sup>

#### II.4. Excipients :

Dans la pratique courante, on utilise les trois termes suivants :

- Excipient : tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication. La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients.
- Véhicule : dans les préparations liquides, vecteur du (ou des) principe(s) actif(s). Il est composé d'un ou plusieurs excipients qui assurent une consistance liquide véhiculant les principes actifs.
- Base : dans les préparations solides et semi-solides, vecteur du (ou des) principe(s) actif(s), composé d'un ou plusieurs excipients. <sup>2</sup>

Les principaux excipients :

- Eau
- Autres excipients liquides : Ethanol, Propylène-glycol, Glycérol.
- Glycérides
- Cires : Cire d'abeille blanche, Graisse de laine (lanoléine ou lanoline), Cire de Carnauba.
- Hydrocarbures et silicones : Paraffines et vaseline, Silicones.
- Sucres, dérivés des sucres et macromolécules hydrophiles : Saccharose ou sucre blanc officinal, Lactose, Glucose, Fructose ou lévulose, Sorbitol, Amidons ; Gommés et polyosides divers (Gomme arabique, Gomme adragante); Cellulose et ses dérivés ; Protéines (Gélatine et Caséine) ; Produits de synthèses (Polyvidone...)
- Produits minéraux : Silice, Talc, Silicates divers, Oxyde de titane.
- Surfactifs
- Conservateurs (antioxydants, conservateurs antimicrobien...), colorants et aromatisants. <sup>2</sup>

### **III- Voie d'administration et forme galénique :**

Le choix de la voie d'administration dépend :

- de la biodisponibilité du principe actif ;

- de la vitesse d'action désirée, de la durée du traitement et du nombre de prises par jour ;
- du type de malade, c'est-à-dire de son âge (nourrisson, enfant, adulte, vieillard) et aussi de sa situation (debout ou alité, à domicile ou hospitalisé, traitement ambulatoire ou non).<sup>2</sup>

Le choix de la forme galénique découle de celui de la voie d'administration.

**Tableau 2: Formes galéniques les plus courantes.**<sup>2</sup>

Voies	Formes principales
<b>Orale</b>	Comprimés, gélules, solutions ou suspensions aqueuses
<b>Parentérale</b>	Solutions aqueuses
<b>Rectale</b>	Suppositoires
<b>Vaginale</b>	Comprimés, solutions aqueuses
<b>Ophthalmique</b>	Solutions aqueuses
<b>ORL</b>	Solutions aqueuses pulvérisées ou non
<b>Percutanée</b>	Pommades et solutions

# **Chapitre II : Méthodes d'identification des principes actifs**

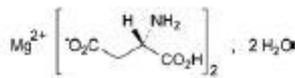
## I-Définition et principe de l'identification d'un principe actif :

Les tests et les réactions d'identification ont pour objectif la confirmation de l'identité d'une substance. Ces procédés analytiques doivent être suffisamment spécifiques pour permettre de distinguer les uns des autres les excipients ou les substances actives possédant des structures voisines.

Les tests d'identification peuvent être groupés dans une seule série (Figure 4) ou en deux séries (Figure 5), on parle ainsi de première et seconde identifications. <sup>7</sup>

**MAGNÉSIUM (ASPARTATE DE)  
DIHYDRATÉ**

Magnesii aspartas dihydricus



$C_8H_{12}MgN_2O_8 \cdot 2H_2O$   $M_r$  324,5

**DÉFINITION**  
Di[(S)-2-aminohydrogénobutane-1,4-dioate] de magnésium dihydraté.  
*Teneur* : 98,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance anhydre).

**CARACTÈRES**  
*Aspect* : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores.  
*Solubilité* : facilement soluble dans l'eau.

**IDENTIFICATION**

- A. Pouvoir rotatoire spécifique (voir Essai).
- B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des substances décelables par la ninhydrine. La tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position, sa coloration et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).
- C. Calcinez 15 mg environ de substance à examiner jusqu'à obtention d'un résidu blanc. Dissolvez le résidu dans 1 mL d'acide chlorhydrique dilué R, neutralisez au papier tournesol rouge R par la solution diluée d'hydroxyde de sodium R et filtrez si nécessaire. La solution donne la réaction du magnésium (2.3.1).

Figure 4: Identification de l'aspartate de magnésium extrait de la Ph. Eur. <sup>8</sup>

## IDENTIFICATION

*Première identification : B.*

*Seconde identification : A, C.*

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25).

*Solution à examiner.* Dissolvez 50,0 mg d'acéclofénac dans du méthanol R et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 2,0 mL de solution et complétez à 50,0 mL avec du méthanol R.

*Région spectrale :* 220-370nm.

*Maximum d'absorption :* à 275 nm.

*Absorbance spécifique au maximum d'absorption :* 320 à 350.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

*Comparaison :* spectre de référence de l'acéclofénac de la Ph. Eur.

C. Dissolvez environ 10 mg d'acéclofénac dans 10 mL d'éthanol à 96 pour cent R. A 1 mL de solution, ajoutez 0,2 mL d'un mélange extemporané à volumes égaux d'une solution de ferricyanure de potassium R à 6 g/L et d'une solution de chlorure ferrique R à 9 g/L. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 5 min. Ajoutez 3 mL d'une solution d'acide chlorhydrique R à 10,0 g/L. Laissez reposer à l'abri de la lumière pendant 15 min. Il se développe une coloration bleue et il se forme un précipité.

**Figure 5: Première et seconde identification de l'Acéclofénac selon la Ph. Eur. <sup>8</sup>**

La Seconde identification d'essais peut être décrite pour certaines substances utilisées dans les pharmacies hospitalières ou en officine.

Un essai décrit dans une Seconde identification doit avoir pour objectif de permettre une confirmation simple de l'identité plutôt qu'une identification nécessitant une instrumentation plus complexe. <sup>7</sup>

Les essais d'identification sont désignés par une lettre : A, B, C, etc., à moins que la monographie ne prescrive qu'une seule identification. <sup>7</sup>

## II-Différentes méthodes d'identification :

➤ Liste des méthodes d'identification des PAs et des excipients (matières premières) :

Dans les monographies de la Ph. Eur. Les méthodes identifications sont données dans l'ordre suivant <sup>9</sup>:

1)-Densité.

2)-Indice de réfraction.

- 3)-Pouvoir rotatoire.
- 4)-pH ou Acidité/alcalinité
- 5)-Point de solidification.
- 6)-Point de fusion [si l'on prépare un dérivé, la détermination est placée parmi les réactions chimiques]
- 7)-Point d'ébullition.
- 8)-Intervalle de distillation.
- 9)-Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible.
- 10)-Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge.
- 11)-Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.**
- 12)-Diffraction des rayons X.
- 13)-Chromatographie / Electrophorèse.
- 14)-Réactions chimiques.
- 15)-Perte à la dessiccation / Eau : Semi-microdosage de l'eau ou Microdosage de l'eau.
- 16)-Réaction de l'anion.
- 17)-Réaction du cation.

➤ Méthodes d'identification des produits finis selon l' USP-NF :

Les méthodes les plus utilisées pour l'identification des PF dans les monographies de l'USP-NF sont :

- Spectroscopie IR
- Spectroscopie UV
- Chromatographie liquide
- Chromatographie gaz
- Chromatographie sur couche mince CCM
- D'autres procédures (moins utilisées) telles que la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) <sup>25</sup>

## **II-1- Identification par des procédés physiques :**

### **II.1.A. Procédés physiques sans changement d'état :**

#### **II.1.A.a. Densité :**

La densité  $d_{t_2}^{t_1}$  d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance à une température  $t_1$  et la masse d'un volume égal d'eau à une température  $t_2$ .

Sauf indication contraire, la densité  $d_{20}^{20}$  est utilisée. La densité est aussi couramment exprimée en  $d_4^{20}$ . La masse volumique  $\rho_{20}$ , définie comme la masse d'une unité de volume de la substance à 20 °C, peut également être utilisée.<sup>10</sup>

#### II.1.A.b. Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide sur la vitesse d'une onde lumineuse dans le milieu. On peut calculer l'indice de réfraction en utilisant la loi de Snell-Descartes : le produit de l'indice de réfraction par le sinus de l'angle d'incidence d'un rayon dans un milieu donné est égal au produit de l'indice de réfraction par le sinus de l'angle de réfraction du deuxième milieu.<sup>6</sup>

#### II.1.A.c. Pouvoir rotatoire spécifique :

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présentent les substances chirales de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée. Le pouvoir rotatoire est considéré comme positif (+) dans le cas de substances dextrogyres (c'est-à-dire, celles qui dévient le plan de polarisation dans le sens des aiguilles d'une montre) et négatif (-) dans le cas de substances lévogyres.<sup>10</sup>

Le **pouvoir rotatoire spécifique**  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  est la rotation, exprimée en radians (rad), mesurée à la température  $t$  et à la longueur d'onde  $\lambda$ , donnée par une couche de 1 m d'épaisseur d'un liquide ou d'une solution contenant la substance optiquement active à raison de 1 kg/m<sup>3</sup> de solution. Pour des raisons pratiques, le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  est exprimé couramment en milliradians-mètres carrés par kilogramme (mrad.m<sup>2</sup>.kg<sup>-1</sup>).<sup>10</sup>

**Identification :** Lorsque la substance examinée est un énantiomère (substance capable de dévier la lumière polarisée), le pouvoir rotatoire spécifique est utilisé pour l'identification.

Lorsqu'une monographie décrit un énantiomère, la section IDENTIFICATION comporte une détermination du pouvoir rotatoire ou renvoie à un essai de pureté énantiomérique figurant dans la section ESSAI. Lorsque le racémate (ou mélange racémique : mélange en proportions égales des énantiomères lévogyre et dextrogyre d'un composé chiral) et l'énantiomère sont tous deux disponibles, la monographie du racémate contient un essai du pouvoir rotatoire auquel renvoie la section IDENTIFICATION. Lorsque seul le racémate est disponible, une détermination du pouvoir rotatoire est prescrite sous ESSAI à condition que le pouvoir rotatoire spécifique de la forme chirale soit connu et suffisamment élevé pour permettre la confirmation du caractère racémique.<sup>7</sup>

### II.1.A.d. PH :

Le pH est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Pour des raisons pratiques, sa définition est expérimentale. Le pH d'une solution à examiner s'exprime alors par rapport à celui d'une solution de référence (pH<sub>s</sub>) suivant l'équation :

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k}$$

dans laquelle  $E$  est la tension, exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution à examiner,  $E_s$  la tension, exprimée en volts, de la cellule renfermant la solution de pH connu (pH<sub>s</sub>) et  $k$  la variation de tension par variation d'une unité pH, exprimée en volts et calculée par l'équation de Nernst. <sup>10</sup>

La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner ; l'une de celles-ci est une électrode sensible aux ions hydrogène (le plus souvent, une électrode de verre) et l'autre une électrode de référence (par exemple, une électrode au calomel saturée). <sup>10</sup>

### II.1.B. Procédés physiques avec changement d'état :

#### II.1.B.a Point de solidification :

Le point de solidification est la température maximale atteinte au cours de la solidification d'un liquide en surfusion (État d'une substance qui reste liquide au-delà de son point de solidification). <sup>10</sup>

#### II.1.B.b. Point de fusion :

Passage (d'un corps) de l'état solide à l'état liquide sous l'action de la chaleur.

La Ph. Eur. préconise les 3 méthodes suivantes :

- . Point de fusion - méthode au tube capillaire.
- . Point de fusion - méthode au tube capillaire ouvert.
- . Point de fusion - méthode de la fusion instantanée. <sup>10</sup>

#### II.1.B.c. Point d'ébullition :

Le point d'ébullition est la température corrigée à laquelle la pression de vapeur d'un liquide est égale à 101,3 kPa. <sup>10</sup>

**Identification : L'utilisation de ces constantes physiques** pour l'identification n'est appropriée que si leur valeur est bien définie et si leur détermination ne s'accompagne pas d'une décomposition risquant de les rendre excessivement tributaires du mode opératoire.

Pour la *Première identification*, la détermination du point de fusion, seule ou combinée à une réaction chimique, n'est pas suffisante pour vérifier l'identité d'une substance. Néanmoins, il suffit souvent de la compléter par une autre identification, telle que la CCM. <sup>7</sup>

#### II.1.B.d. Intervalle de distillation :

L'intervalle de distillation est l'intervalle de température, corrigé pour 101,3 kPa (760 Torr) dans lequel un liquide ou une fraction déterminée d'un liquide distille dans des conditions précises. <sup>10</sup>

#### II-1-C- Autres procédés physique :

##### II.1.C.a. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible :

**Le domaine spectral UV-VIS et l'origine des absorptions :** Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées *proche UV* (185-400 nm), *visible* (400-700 nm) et *très proche infrarouge* (700-1 100 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. <sup>11</sup>

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de l'UV/Visible de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon.

**Le spectre UV-VISE :** Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance ( $T$  : est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise ( $I$ ) et l'intensité incidente ( $I_0$ ) avec  $T = I/I_0$  ou  $\%T = I.100/I_0$ ), ou de l'absorbance ( $A = -\log T$ ), en fonction des longueurs d'onde. <sup>11</sup>

**Instrumentation dans l'UV/VISIBLE :** Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : ceux de la *source* et du *système dispersif* (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la détection. L'ensemble est réuni dans un bâti unique. Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage. <sup>11</sup>

**Utilisation :** L'analyse structurale à partir des spectres électroniques est assez problématique, dans la mesure où leur relative simplicité a pour corollaire un faible apport

d'informations. Il y a une soixantaine d'années cependant, avant l'arrivée des techniques plus puissantes d'identification que nous connaissons maintenant, la spectrométrie UV/Visible a été utilisée dans ce but. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et positions des maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques, dues à Woodward, à Fieser et à Scott, qui concernent les composés carbonylés insaturés, les diènes ou les stéroïdes.

D'une manière générale cette technique apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative (*la loi de Beer et Lambert*). De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV/Visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés. <sup>11</sup>

**Identification :** A la différence de la spectrophotométrie IR, la spectrophotométrie UV est rarement employée seule pour les identifications, cette méthode est habituellement non spécifique (en tant qu'identification), à moins que la courbe d'absorption ne présente plusieurs maximums et minimums, des régions d'absorption inhabituellement fortes ou faibles, etc.

Il est peu fréquent que des substances de référence soient utilisées. Le spectre UV d'une substance peut donc rarement servir à lui seul de critère d'identification.

Il est important de choisir avec soin les solvants prescrits pour la spectrophotométrie UV, et de veiller à leur pureté, afin d'éviter la présence d'impuretés susceptibles d'affecter l'absorbance des substances à examiner. <sup>7</sup>

### II.1.C.b. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge :

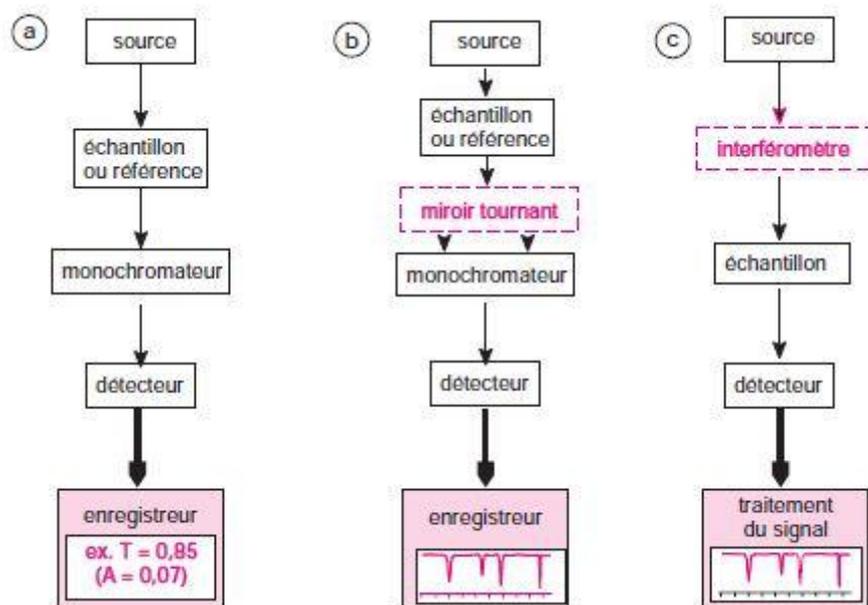
L'infrarouge analytique met à profit la plage des radiations électromagnétiques comprise entre 1 et 50  $\mu\text{m}$  pour identifier ou doser des composés par des procédés basés sur l'absorption ou la réflexion de la lumière par l'échantillon. Cette bande spectrale est divisée en proche infrarouge (de 1 à 2,5  $\mu\text{m}$ ) et en moyen infrarouge (2,5–50  $\mu\text{m}$ ). Bien que le domaine du proche infrarouge soit pauvre en absorptions spécifiques, il a pris une grande importance dans les laboratoires de contrôle comme moyen d'analyse quantitative. Le domaine du moyen infrarouge est, par contre, plus riche en informations sur les structures des composés examinés. De ce fait, il est très utilisé comme procédé non destructif pour identifier les composés moléculaires organiques dont il permet de garder une sorte d'empreinte. <sup>11</sup>

**Origine de l'absorption lumineuse dans l'IR :** Dans le proche et le moyen infrarouge, l'absorption de la lumière par la matière a pour origine l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les **liaisons chimiques**.<sup>11</sup>

**Présentation des absorptions dans l'infrarouge :** L'absorption de l'échantillon, qui varie suivant la longueur d'onde des radiations émises par la source, est présentée sur un document de base obtenu avec le spectromètre, et appelé **spectre infrarouge**. L'ordonnée du graphe représente le rapport des intensités transmises, avec et sans échantillon, calculé pour chaque longueur d'onde inscrite en abscisse. Ce quotient est appelé *transmittance*  $T$ . Sur le graphe il est souvent remplacé par son pourcentage ( $\%T$ ) ou par l'*absorbance*,  $A = \log(1/T)$ .<sup>11</sup>

**Spectromètres et analyseurs infrarouges :** Les instruments se répartissent en deux catégories : les *spectromètres à transformée de Fourier* qui réalisent une analyse simultanée de toute la bande spectrale à partir de mesures interférométriques et les nombreux *analyseurs spécialisés*. Dans le proche infrarouge on trouve également encore quelques *spectromètres de type dispersif*.

La première catégorie est basée sur l'emploi d'un interféromètre de type Michelson ou assimilé, associé à un microprocesseur spécialisé pour calculer le spectre sous forme numérique tandis que la seconde utilise des filtres ou un monochromateur installés dans des montages particuliers en fonction de la plage spectrale étudiée.<sup>11</sup>



**Figure 6: Diagramme de spectromètres et analyseurs dans l'IR.**<sup>11</sup>

a) Analyseur simple faisceau, comportant un monochromateur fixe ou un filtre, utilisé lorsqu'une mesure à longueur d'onde unique suffit ; b) spectromètre double faisceau de type dispersif. Contrairement aux spectrophotomètres de l'UV/Visible, l'échantillon, placé avant le monochromateur, est soumis en permanence à tout le rayonnement de la source. L'énergie des photons dans ce domaine est insuffisante pour briser les liaisons et, par cela même, dégrader l'échantillon ; c) modèle simple faisceau à transformée de Fourier. <sup>11</sup>

**Identification :** La spectrophotométrie IR est généralement considérée comme une **méthode autosuffisante pour la vérification de l'identité** des substances organiques non ionisées autres que les sels d'acides ou de bases organiques. Elle nécessite dans tous les cas d'utiliser une substance ou un spectre de référence. L'emploi de substances de référence est aujourd'hui préféré à celui de spectres de référence. Ceux-ci sont utilisés lorsque la fourniture de substances de référence pose des difficultés pratiques.

Les sels organiques de substances organiques, et certains sels inorganiques de substances organiques (phosphates et sulfates par exemple) sont faciles à différencier les uns des autres. Dans le cas des sulfates, toutefois, il est nécessaire d'étendre à 4000-400 cm<sup>-1</sup> la gamme habituelle d'enregistrement (4000-600 cm<sup>-1</sup>). <sup>7</sup>

Dans certains cas, décrits ci-dessous, le spectre IR seul ne suffit pas à confirmer l'identité de la substance et doit être complété par d'autres essais.

- Sels d'acides ou de bases organiques. Pour certains ions ou groupes fonctionnels faisant partie de substances organiques (contre-ion), plusieurs identifications sont décrites dans les méthodes générales de la Ph. Eur.. Toutefois, il est généralement suffisant d'en utiliser une seule.
- Substances chimiquement apparentées. Certaines substances étroitement apparentées à la substance à examiner peuvent présenter des spectres trop proches de celui de la substance en question pour qu'une identification sans ambiguïté soit possible. Dans ce cas, la spectrophotométrie IR est accompagnée d'un autre essai simple, par exemple le point de fusion ou une chromatographie sur couche mince effectuée par comparaison à une substance de référence.
- Polymorphisme. Le chapitre général 2.2.24. *Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge de la Ph. Eur.* prévoit une recristallisation avant enregistrement du spectre. Lorsqu'une monographie mentionne l'existence d'un polymorphisme, une méthode de recristallisation y est décrite à moins que l'on ne souhaite restreindre le champ d'application de la monographie à la forme cristalline représentée par la substance chimique de référence.

Dans ce dernier cas, la monographie indique que le spectre est enregistré « sans recristallisation ». Si, par exception, la monographie décrit une ou plusieurs formes cristallines spécifiques, et si le spectre IR n'est pas caractéristique, un essai complémentaire est introduit.

- Isomères optiques. Pour identifier un énantiomère particulier ou un racémate (mélange en proportions égales des énantiomères lévogyre et dextrogyre d'un composé chiral), un essai du pouvoir rotatoire spécifique ou de l'angle de rotation optique est introduit. <sup>7</sup>

#### **II.1.C.c. Résonance magnétique nucléaire : Voir Chapitre III.**

#### **II.1.C.d. Diffraction des rayons X :**

La diffraction des rayons X constitue un très puissant moyen d'analyse de la structure des solides. Le réseau des atomes d'un cristal agit sur les rayons X qui le traversent comme une série d'obstacles et d'ouvertures qui les diffractent. Les rayons déviés forment un schéma d'interférence qui sert à déterminer la distance entre les atomes dans le cristal et par conséquent on peut déterminer la nature de ces atomes et on peut obtenir d'autres informations structurales. <sup>6</sup>

## **II.2. Identification par des procédés physicochimiques**

### **II.2.A. Chromatographies :**

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support (ex : CCM) et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie. <sup>11</sup>

### *II.2.A.a. Chromatographie sur couche mince (CCM)*

**Mise en œuvre de la CCM :** La séparation par chromatographie planaire ou CCM des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100–200  $\mu\text{m}$ ) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque. On distingue trois étapes : **Dépôt de l'échantillon** (à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache.) ; **Développement de la plaque** (La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer.) ; **Révélation post-chromatographique et comparaison avec la substance de référence.** <sup>11</sup>

**Identification :** Cette technique chromatographique est largement employée dans la Ph. Eur. pour les identifications. Elle requiert l'emploi de substances de référence.

Il est admis que, pour les identifications, cette technique n'assure pas à elle seule la spécificité, mais elle permet en revanche d'obtenir une bonne discrimination ; elle doit être complétée par d'autres techniques qui assurent concurremment la spécificité. <sup>7</sup>

Il est possible d'en améliorer la spécificité en combinant CCM et réactions chimiques *in situ*, c'est-à-dire en employant des réactifs de pulvérisation appropriés qui permet de différencier des substances similaires d'après leur coloration. Dans ce cas, il n'y a pas lieu de répéter en tube à essai la même réaction ou une réaction similaire.

S'il est très important d'assurer la séparation d'un couple critique dans un essai des substances apparentées, cette séparation ne joue qu'un rôle mineur dans une identification. La séparation d'un couple critique n'est pas exigée dans le cadre des essais individuels d'IDENTIFICATION, mais l'est dans la section ESSAI. <sup>7</sup>

Un essai du pouvoir de séparation chromatographique est décrit dans le chapitre général 4.1.1. *Réactifs* pour les plaques CCM afin de vérifier les performances du type de plaque concerné. Cet essai est conçu comme une procédure de contrôle qualité, mise en oeuvre de temps en temps par l'utilisateur de la plaque CCM. Il est clair qu'une procédure générale de ce type ne peut être adaptée à tous les problèmes de séparation chromatographique, et qu'il est parfois nécessaire de décrire un critère de séparation pour assurer l'identification de la substance. Dans de tels cas, qui restent exceptionnels, un critère de séparation est spécifié dans la section IDENTIFICATION.

Si un système CCM est utilisé dans la monographie pour un essai de pureté, il est recommandé de l'employer également pour l'identification, s'il est approprié. Pour l'identification, la concentration de la solution à examiner et de la solution témoin correspondante est généralement réduite de façon à ce que la quantité déposée sur la plaque soit de l'ordre de 5-20 µg. Il peut également être nécessaire de passer d'un système de détection général à un système plus discriminant.<sup>7</sup>

#### *II.2.A.b Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et chromatographie liquide (CL) :*

CPG : La phase mobile est un gaz inerte. À défaut d'être un gaz, l'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur.

CL : Ici la phase mobile est un liquide.

**Principe d'identification :** L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit :

1. On immobilise dans une *colonne* un solide finement divisé appelé *phase stationnaire*.
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'*échantillon* à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne au moyen de la *phase mobile* afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, et donc on peut mesurer les temps de migration des composés (chaque composé est caractérisé par son temps de rétention  $t_R$ , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié) dans la colonne pour les identifier, à l'aide d'un détecteur (qui fournit un chromatogramme) placé à la fin de la colonne de chromatographie.<sup>11</sup>

**Identification :** Il est admis que, pour les identifications, ces techniques n'assurent pas à elles seules la spécificité, mais qu'on peut en revanche en attendre une bonne discrimination ; elles doivent être complétées par d'autres techniques qui assurent concurremment la spécificité. On peut assurer la spécificité en ayant recours à la spectrométrie de masse pour la détection.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide (CL) sont rarement utilisées pour les identifications et, lorsqu'elles le sont, renvoient à un essai ou un dosage effectué par la même méthode dans la monographie. Ces techniques ne sont utilisées qu'en l'absence d'autre méthode appropriée, et jamais comme unique essai d'identification.<sup>7</sup>

## II.2.B. Electrophorèse :

**Principe :** Sous l'action d'un champ électrique, les particules chargées dissoutes ou dispersées dans une solution électrolytique migrent vers l'électrode de polarité opposée. En électrophorèse sur gel, le déplacement des particules est retardé par les interactions avec la matrice gel qui constitue le milieu de migration et se comporte comme un tamis moléculaire. Le champ électrique et le tamis moléculaire agissent en sens contraire, ce qui produit un effet de vitesse de migration différentielle selon la taille, la forme et la charge des particules. En raison de leurs propriétés physicochimiques différentes, les diverses macromolécules contenues dans un mélange migreront à des vitesses différentes au cours de l'électrophorèse, et se trouveront ainsi séparées en fractions discrètes. Les séparations électrophorétiques peuvent être conduites soit dans des systèmes sans phase support (exemple : électrophorèse capillaire libre en solution) soit dans des milieux stabilisants tels que des plaques à couche mince, des films ou des gels. <sup>10</sup>

**Identification :** Examinez les électrophorégrammes obtenus, si la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (a) est semblable quant à sa position à la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (b), on peut dire que les deux substances (présentent dans les 2 bandes) sont donc identiques. <sup>9</sup>

## II.2.C. Autres procédés physicochimiques d'identification dans la Ph. Eur. :

- Cartographie peptidique.
- Analyse des acides aminés. <sup>9</sup>

## II.3. Identification par voie chimique :

### II.3.a. Réactions chimiques

Plusieurs réactions d'identification de nature chimique couramment utilisées sont décrites dans les méthodes générales de la Ph. Eur., et il convient de les utiliser chaque fois que possible. L'exemple pertinent est le chapitre général 2.3.1. *Réactions d'identité des ions et des groupes fonctionnels Ph. Eur.* (qui inclut : **réaction de l'anion et réaction du cation**).

Les réactions d'identification faisant appel à des réactifs toxiques sont peu à peu éliminées de la Ph. Eur.. Pendant l'élaboration des monographies, Les identifications faisant appel à la reconnaissance d'une odeur ou saveur sont à éviter et chaque réaction chimique doit

être choisie dans l'objectif de démontrer la présence d'une partie différente de la molécule à identifier.<sup>7</sup>

Pour différencier, au sein d'un même groupe (famille), des substances se distinguant par le niveau de condensation ou la longueur de leur chaîne hydrocarbonée (exemple : acides gras), il est nécessaire dans les monographies de renvoyer à un ou plusieurs essais de pureté appropriés portant sur la détermination de certains indices (indice d'iode, indice de saponification, etc.).<sup>7</sup>

## **II.4. Identification de l'hydrate :**

### **II.4.a. Perte à la dessiccation :**

La perte à la dessiccation est la perte de masse exprimée en pourcentage *m/m*. L'essai mesure l'eau mais aussi les autres substances volatiles à la température de dessiccation prescrite. Une température de 105 °C est en règle générale prescrite pour la réalisation de l'essai.<sup>10</sup>

### **II.4.b. Dosage de l'eau :**

Le principe est basé sur une réaction d'oxydoréduction qui consomme une molécule d'eau. La quantité d'eau contenue dans la substance est directement proportionnelle à la quantité d'électricité jusqu'au point de fin de titrage.<sup>12</sup>

#### b-1- Semi-microdosage de l'eau : (Karl Fischer volumétrique) :

Cette méthode se fait par un titrage volumétrique basé sur une réaction quantitative de l'eau avec le réactif de Karl-Fischer : Iode – Dioxyde de soufre – Base (imidazole) – méthanol. Le point de fin de titrage est déterminé par potentiométrie. Ce procédé convient pour des échantillons contenant 2,5-25 mg d'eau.<sup>12</sup>

#### b-2- Microdosage de l'eau : (Karl Fischer coulométrique) :

Le microdosage de l'eau se fait par coulométrie. L'iode est produit de manière électrochimique et réagit immédiatement avec l'eau en présence de dioxyde de soufre, de la base (imidazole) et du méthanol. Le titrage coulométrique est uniquement destiné à la détermination quantitative de faibles quantités d'eau (10 µg et 10 mg).<sup>12</sup>

# **Chapitre III : La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

## I. Introduction :

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode d'analyse qui permet, d'élucider la structure chimique des molécules organiques par interprétation des spectres RMN obtenus, par exemple, pour  $^1\text{H}$  ou les noyaux X de type  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Les spectres peuvent être utilisés à des fins d'analyse qualitative ou quantitative.

Dans des conditions expérimentales appropriées, l'intensité des signaux RMN (obtenue par intégration) est directement proportionnelle au nombre de spins nucléaires que compte le groupe structurel responsable du signal. Ces intégrales peuvent servir à l'analyse quantitative.<sup>10</sup>

Pour comprendre l'origine de ces spectres, très différents des spectres optiques classiques, il faut faire appel au spin des noyaux.<sup>10</sup>

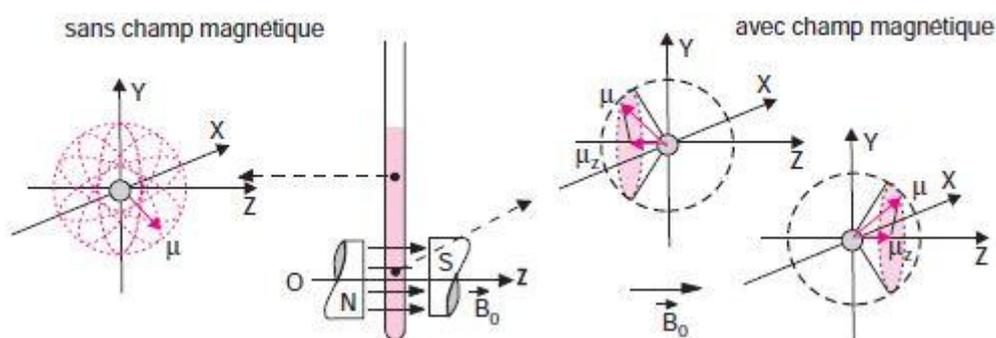
**Le principe générale de la RMN** consiste à : D'abord utiliser un champ magnétique fort pour orienter les "spins" nucléaires des atomes (moment angulaire intrinsèque d'une particule élémentaire). Puis exciter ces spins par une onde radiofréquence RF (perpendiculaire au champ magnétique) à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins, après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial avec émission des radiofréquences absorbés (origine des informations spectrales), c'est la relaxation.<sup>26</sup>

## II. Interaction spin/champ magnétique pour un noyau :

Tout noyau atomique — de même que chaque particule subatomique — est caractérisé par un certain nombre de grandeurs intrinsèques, dont le spin I. Ce paramètre vectoriel introduit en mécanique quantique, sans équivalent classique, permet, entre autres, d'expliquer le comportement des atomes dans les milieux où règne une orientation privilégiée. L'existence d'un champ magnétique crée une telle orientation privilégiée dans l'espace pour tout atome baignant dans ce champ. La norme du spin varie d'un type de noyau à un autre car elle est définie à partir du nombre quantique de spin, caractéristique de chaque noyau, dont la valeur peut être nulle ou un multiple positif de 1/2.<sup>11</sup>

Un noyau isolé dont le nombre de spin n'est pas nul se comporte comme un petit aimant de moment magnétique  $\mu$  ( $\text{J}\times\text{T}^{-1}$ ) tel que :  $\mu = \gamma \cdot I$

Ce moment magnétique nucléaire  $\mu$  est représenté par un vecteur colinéaire à  $I$ , de même sens ou de sens opposé, suivant le signe de  $\gamma$  qui est appelé rapport magnétogyrique (on le désigne aussi par la constante gyromagnétique).<sup>11</sup>



**Figure 7: Effet d'un champ magnétique sur un noyau de nombre de spin 1/2 présent dans un composé en solution.**<sup>11</sup>

Si le noyau est dans la partie supérieure de l'échantillon, non soumise au champ magnétique extérieur,  $\mu$  n'a aucune orientation préférentielle. En revanche, dans la partie centrale baignant dans le champ,  $\mu$  balaie la surface d'un cône de révolution dont l'axe est aligné avec  $B$ . La projection de  $\mu$  est dans le même sens que  $B$  ou dans le sens opposé.<sup>11</sup>

### III. Les noyaux étudiés par RMN :

Un nucléide quelconque représenté par  ${}^A_ZX$  a un nombre de spin  $I$  non nul si les nombres  $Z$  de protons et  $A$  de nucléons ne sont pas tous les deux pairs.  ${}^1_1H$ ,  ${}^{13}_6C$ ,  ${}^{19}_9F$ ,  ${}^{31}_{15}P$  ont, par exemple, un nombre de spin  $I = 1/2$  tandis que  $I = 1$  pour  ${}^2_1H$  (deutérium D) ou  ${}^7_3N$ . Tous ces noyaux donneront un signal en RMN. En revanche, les noyaux  ${}^{12}_6C$ ,  ${}^4_2He$ ,  ${}^{16}_8O$ ,  ${}^{28}_{14}Si$ ,  ${}^{32}_{16}S$  auront un nombre de spin nul et ne pourront pas être étudiés par RMN. Dans l'ensemble, plus de la moitié des nucléides stables connus (au moins un isotope par élément) conduisent à un signal de RMN, mais la sensibilité varie énormément suivant les noyaux. Ainsi le proton, nom commun du noyau  ${}^1H$ , ou bien le  ${}^{19}F$ , sont plus faciles à détecter que le  ${}^{13}C$  (le  ${}^{13}C$  est beaucoup moins sensible que le proton car il présente une abondance naturelle de 1%).<sup>11</sup>

#### IV. Théorie de BLOCH pour un noyau dont $I=1/2$ :

Une population de noyaux possédant un moment cinétique et un moment magnétique, placée dans un champ magnétique statique  $B_0$  (orientation Oz), subit un réarrangement en relation avec l'axe du champ magnétique. Les noyaux prennent alors certaines orientations, régies par la mécanique quantique, auxquelles correspondent des énergies différentes.<sup>10</sup>

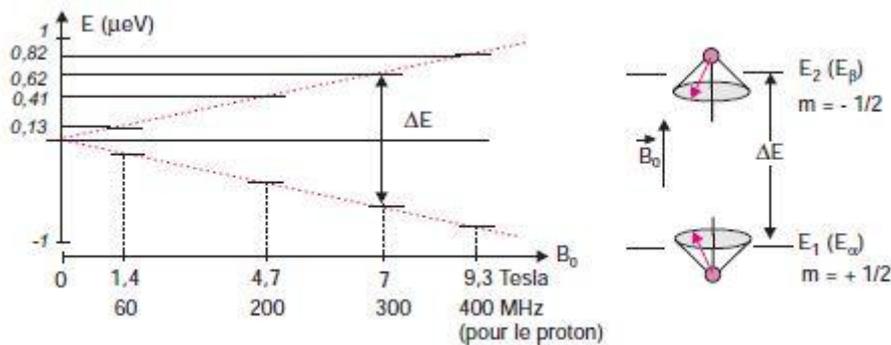
Ainsi, dans le champ magnétique  $B_0$  l'énergie potentielle  $E$  ne peut prendre que  $2I + 1$  valeurs. Dans le cas où  $I = 1/2$ , les deux valeurs possibles de  $E$  (en joules) correspondent à  $m = +1/2$  et  $m = -1/2$ .

Il apparaît donc deux groupes de noyaux dont les énergies correspondent à  $E_1$  ou  $E_2$ , définies selon le sens de la projection de leur vecteur spin sur l'axe Oz.  $\Delta E$  est proportionnel au champ  $B_0$ . Quant au rapport  $(E_2 - E_1)/B_0$ , il ne dépend que de  $\gamma$ , c'est-à-dire du noyau étudié.<sup>11</sup>

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \cdot (h/2\pi) \cdot B_0 \quad \text{avec } h : \text{constante de Plank et } \gamma : \text{constante gyromagnétique}$$

La population, qui rassemble les noyaux situés dans l'état d'énergie  $E_2$  diffère en nombre de l'autre population (noyaux avec état d'énergie  $E_1$ ) et cette différence dépend de la nature de noyau étudié et de champ  $B_0$ , sachant que l'état d'énergie la plus stable est légèrement prépondérant.

De ce fait, seul le léger excès d'une population sera responsable du signal de RMN. En augmentant la valeur du champ fourni par l'aimant de l'appareil, on creusera l'écart entre les deux populations et on aura donc une sensibilité accrue.<sup>11</sup>



**Figure 8: Représentation de l'éclatement entre les niveaux énergétiques d'un noyau de nombre de spin  $I=1/2$  placé dans un champ magnétique.**<sup>11</sup>

Les quatre valeurs choisies du champ  $B_0$  correspondent, pour le proton, à des appareils commerciaux dits à 60, 200, 300 et 400 MHz. ( $B_0$  représente la densité de flux magnétique exprimée en tesla : 1T équivaut à 10 000 gauss).<sup>11</sup>

## V. Fréquence de Larmor :

D'un point de vue analytique, si on peut mesurer la différence d'énergie qui sépare dans un champ  $B_0$  les deux populations (dans le cas où  $I = 1/2$ ), on pourra identifier le noyau correspondant d'après sa constante gyromagnétique  $\gamma$ . Pour évaluer cette différence d'énergie on va, comme en spectroscopie optique, créer les conditions de passage de l'un à l'autre des niveaux (entre  $E_1$  et  $E_2$  pour  $I=1/2$ ), c'est à dire provoquer un signal de résonance. Pratiquement on irradie les noyaux placés dans le champ magnétique avec une source de radiations électromagnétiques de fréquence variable dont la direction de propagation est perpendiculaire au champ extérieur ( $B_0$ ). Il y aura absorption si :  $h\nu = E_2 - E_1$

$$\text{La relation } \Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \cdot (h/2\pi) \cdot B_0$$

conduit alors à **la relation fondamentale de résonance** :  $\nu = (\gamma/2\pi) \cdot B_0$

Cette expression très importante et générale, est appelée relation de Larmor. Elle relie le champ magnétique dans lequel baignent les noyaux considérés et la fréquence de la radiation électromagnétique qui provoque la condition de résonance.<sup>11</sup>

Donc, si l'on applique un champ magnétique oscillant de haute fréquence  $B_1$ , perpendiculaire à  $B_0$ , il se produit, entre les orientations des noyaux, précédemment mentionnés (Figure 15.2), des transitions (ex : de  $E_1$  à  $E_2$  pour  $I=1/2$ ) qui s'accompagnent d'une absorption nette d'énergie. D'après la condition de résonance  $\omega_0 = \gamma B_0$  « à la résonance  $\omega_1 = \omega_0$  » avec ( $\gamma =$  rapport gyromagnétique,  $\omega_0 =$  fréquence de Larmor (pulsation ou fréquence angulaire de rotation du vecteur spin autour de Oz) avec  $\omega = 2\pi \nu$ ).<sup>10</sup>

## VI. Obtention du spectre par RMN :

On peut faire varier « un balayage comme dans la recherche d'une station FM sur un récepteur radio » le champ magnétique  $B_0$  ou la fréquence  $\omega_1$  du champ  $B_1$  de façon à obtenir un spectre (méthode de l'onde continue). De nos jours, l'irradiation  $B_1$  est plutôt exercée au moyen d'une impulsion de radiofréquence (RF) « On expose l'échantillon à une bande de fréquences entourant la valeur  $\nu$ , comme ferait un flash de lumière blanche (pour prendre exemple d'une lumière polychromatique par rapport à une lumière monochromatique) », selon la méthode de la transformée de Fourier (FT) (voir ci-après : RMN À TRANSFORMÉE DE FOURIER (RMN-FT)). Le rayonnement cohérent émis lors du retour à l'état initial est observé sous la forme d'une **courbe de relaxation**, également appelée signal de précession libre (ou **FID**, free induction decay). L'application de la méthode de la

transformée de Fourier fournit ensuite le spectre fréquentiel dont peuvent être extraites des informations sur la structure moléculaire.<sup>10</sup>

## VII. Découplage :

Des champs de radiofréquence auxiliaires peuvent être appliqués lors de l'acquisition du signal FID, pour supprimer les interactions scalaires entre noyaux (interactions s'exerçant par le biais des liaisons chimiques) ; on parle alors de « **découplage** ». <sup>10</sup>

Dans la pratique, pour mener à bien une expérience de découplage de spin, on commence par enregistrer le spectre dans les conditions normales. Ensuite, on ré-enregistre le spectre tout en irradiant à la fréquence de résonance du (ou des) noyau(x) que l'on veut découpler, à l'aide d'un second émetteur de radiofréquence ajustable. On utilise cette technique de double résonance pour identifier les noyaux couplés lorsque l'interprétation du spectre normal ne semble pas évidente, en particulier s'il fait apparaître une superposition de signaux.

**C'est quoi le couplage :** Les spectres de RMN comportent généralement plus de signaux qu'il y a de noyaux ayant des déplacements chimiques différents. Cela est dû à ce que le champ magnétique externe dans lequel baigne tous les atomes du composé étudié provoque une orientation de tous les spins de ses noyaux et que l'orientation prise par un noyau se répercute, d'un point de vue énergétique, aux noyaux voisins par l'intermédiaire des électrons de liaison de cet atome. Ce couplage entre les noyaux s'atténue très vite avec la distance. Les couplages homonucléaires (entre noyaux de même type), ou hétéronucléaires (entre noyaux de types différents) se traduisent par de faibles déplacements des signaux. Cette structure hyperfine du spectre apporte des renseignements complémentaires sur le composé examiné. Le couplage homonucléaire entre protons est très fréquent, la présence de <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P et <sup>19</sup>F conduisant aussi à des couplages hétéronucléaires avec les protons. <sup>11</sup>

## VIII. Déplacement chimique :

Généralement, au sein d'une molécule, chaque atome se trouve dans un environnement rapproché qui lui est propre si bien que la valeur du champ extérieur atteignant son noyau lui est spécifique—à moins qu'il y ait des éléments de symétrie particuliers dans la molécule. Ces variations locales de champ ont pour origine les électrons des liaisons qui par leur circulation créent un très faible champ induit qui s'oppose au champ extérieur  $B_0$  (protection contre ce champ). C'est l'origine du déplacement chimique. Cet effet d'écran magnétique,

appelé blindage et caractérisé par la constante d'écran  $\sigma$  (Voir Chapitre 4 : II-3-A-a-Notion de blindage Page 55), conduit à un décalage de la fréquence de résonance par rapport à celle qu'on observerait pour le même noyau dans le vide (c'est-à-dire hors la molécule). **Cette constatation est à la base de l'exploitation principale de la RMN.**

D'après ce qui précède, les plus faibles variations du champ se répercutent sur les fréquences de résonance. Il serait donc hasardeux de vouloir comparer des spectres ou identifier des composés à partir des fréquences absolues des signaux obtenus à des moments ou avec des appareils différents. Pour cette raison on repère les déplacements chimiques désigné par  $\delta$  (ppm) dans une échelle relative  $\Delta\nu/\nu$  (par rapport à un standard interne) qui, par nature, est indépendante de l'appareil. <sup>11</sup>

$$\delta_{X,\text{échantillon}} = (\nu_{X,\text{échantillon}} - \nu_{X,\text{référence}}) \cdot 10^6 / \nu_0$$

Déplacement chimique ou  $\delta$ , s'exprime en **ppm** (parties par million). Le facteur  $10^6$  permet d'exprimer  $\delta$  par des nombres de l'ordre de l'unité, de la dizaine (RMN  $^1\text{H}$ ) ou de la centaine (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Cette quantité, *sans dimension*, caractérise une propriété intrinsèque de la molécule étudiée, indépendante de  $B_0$  et de  $\nu_0$ . <sup>13</sup>

Cette grandeur expérimentale représente bien une mesure relative du coefficient d'écran, indépendante de  $B_0$ . Dans la pratique, on travaille avec une référence dite interne (la substance de référence est dissoute dans la solution étudiée),  $\delta$  est alors déterminé en mesurant la différence de fréquence ( $\nu_{\text{éch}} - \nu_{\text{réf}}$ ) en Hz, divisée par la fréquence de travail ( $\nu_0$ ) exprimée en MHz.

Pour des raisons historiques, dues au mode de fonctionnement des premiers spectromètres qui opéraient en balayage de champ, les spectres sont présentés de telle sorte que *les fréquences vont en croissant de la droite vers la gauche* (figure 9). Il en va de même de l'échelle  $\delta$ , alors que l'échelle  $\sigma$  varie en sens inverse. On parle d'un "*blindage*" (effet d'écran) plus important pour les résonances situées le plus à droite du spectre. Pour ces mêmes signaux, on parle également de résonance à *champ fort*, toujours par référence au balayage de champ qui serait effectué dans le sens opposé de la variation de fréquence. On choisit généralement comme référence une substance conduisant à un pic unique, facilement soluble et peu sensible aux effets de solvant et résonnant à une extrémité du spectre. Pour les spectroscopies du proton et du carbone-13, le TMS (tétraméthylsilane :  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ), soluble dans la plupart des solvants organiques, est communément utilisé. <sup>13</sup>

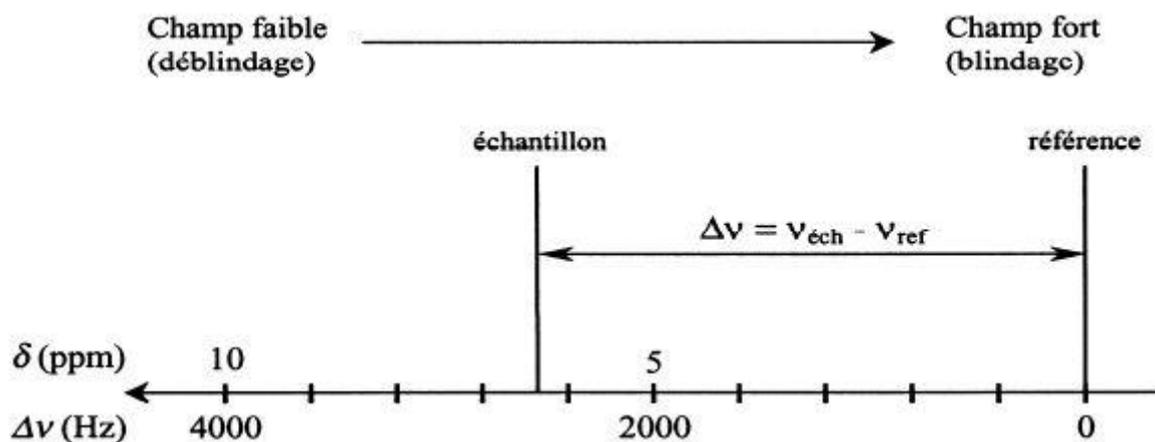


Figure 9: Echelles de déplacement chimique du proton. <sup>13</sup>

## IX. Techniques et paramètres spectraux :

Les techniques utilisées peuvent être unidimensionnelles ou multidimensionnelles, servir à des fins d'analyse qualitative ou quantitative, et être appliquées à des échantillons à l'état liquide ou solide. <sup>10</sup>

On peut, à partir de divers paramètres spectroscopiques, accéder à d'importantes informations structurales :

Tableau 3: Informations structurelle à extraire d'un spectre RMN. <sup>10</sup>

fréquence de résonance	espèce nucléaire observée
nombre des signaux de résonance (singulets, multiplets)	nombre de groupes de noyaux chimiquement distincts
déplacement chimique $\delta$ (ppm)	nature et environnement chimiques du groupe structurel observé
intensité des signaux de résonance	nombre relatif de noyaux résonants par groupe chimique distinct
multiplicité des modes de couplage	nombre de noyaux en interaction scalaire avec le noyau observé
constante de couplage ${}^nJ$ (Hz)	nombre de liaisons impliquées dans le chemin de couplage, et géométrie de ce dernier

Les méthodes homonucléaires et hétéronucléaires, bidimensionnelles ou multidimensionnelles, permettent d'établir des corrélations entre paramètres spectraux différents (par exemple, déplacement chimique et constante de couplage, ou déplacements

chimiques de différents noyaux dans un même système moléculaire). Des expériences appropriées permettent également d'accéder à des informations sur les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ , les effets Overhauser nucléaires (NOE, nuclear Overhauser effects : décrit une interaction entre deux spins à **travers l'espace** et non pas à travers les liaisons chimiques comme le couplage scalaire.) et la cinétique des processus dépendants du temps. <sup>10</sup>

## **X. Appareillage :**

### **X.1. Eléments d'un spectromètre RMN haute résolution :**

Un spectromètre RMN haute résolution comporte au moins les éléments suivants :

- un aimant chargé de générer le champ magnétique constant  $B_0$ ,
- une sonde, contrôlée en température, qui contient l'échantillon, délivre l'impulsion de radiofréquence et détecte le rayonnement émis par l'échantillon,
- une console électronique qui génère les impulsions de radiofréquence haute puissance, collecte et numérise le signal FID ; cette unité assure également la stabilisation de l'électronique instrumentale,
- une unité d'acquisition et de traitement des données (ordinateur).

Il peut également comprendre :

- une cellule en flux continu pour la RMN couplée à la chromatographie liquide ou la RMN par injection en flux continu,
- un système adapté à la RMN à gradient de champ pulsé. <sup>10</sup>

### **X.2. Description de l'appareillage utilisé en RMN :**

La génération du haut champ magnétique est réalisée par une bobine supraconductrice plongée dans un vase Dewar contenant de l'hélium liquide. L'échantillon est en général introduit dans la sonde, dans un tube à essai d'un diamètre extérieur de 5 mm ou dans une cellule de flux, et la sonde est connectée à l'électronique par des câbles RF assurant le transport de la fréquence de stabilisation (lock) et les fréquences des noyaux  $^1\text{H}$  et X. La présence de dispositifs auxiliaires assurant le réglage d'accord et d'adaptation des circuits électroniques est essentielle, et l'emploi de systèmes de contrôle de la température de l'échantillon est fréquent. <sup>10</sup>

D'un point de vue technique, la prise d'un spectre nécessite un matériel relativement complexe du fait de la faible intensité du phénomène mis en jeu. L'échantillon est préparé

dans un tube en verre borosilicaté dans un solvant dépourvus, si possible, d'atomes correspondant à l'isotope étudié. Par exemple, le solvant de choix pour l'étude des spectres protons est le chloroforme deutérié  $\text{CDCl}_3$ . Son choix est issu de plusieurs avantages : le proton du chloroforme est facilement échangé par un deutérium, il est donc peu cher et de plus, le deutérium résonnant à une fréquence différente du proton, il est utilisé pour stabiliser le champ magnétique extérieur, aussi bien dans le temps (stabilité) que dans l'espace (homogénéité). Ces deux aspects du champ sont importants puisque compte tenu de la nature extrêmement ténue du signal, une variation spatiale et/ou une dérive temporelle provoqueront un élargissement important des signaux risquant de faire disparaître les figures de couplage.

La sensibilité d'une expérience de RMN s'améliore avec l'accroissement du champ magnétique ce qui nécessite l'utilisation d'aimants supraconducteurs. Ils permettent de faire circuler un courant très intense (de plusieurs dizaines d'ampère) dans un circuit de résistance nulle. Ainsi aucune perte d'énergie par dissipation thermique n'est à déplorer, alors qu'une bobine en cuivre dans les mêmes conditions dégagerait une énergie qui la ferait fondre ! Le prix à payer est qu'à l'heure actuelle, la plupart des matériaux supraconducteurs ne le sont qu'en dessous d'une certaine température (dite critique) qui est très faible (de l'ordre de  $-270$  °C), ce qui nécessite l'emploi d'hélium liquide (qui bout à  $-269$  °C). Afin d'assurer un minimum de perte thermique, celui-ci est calorifugé à l'aide d'azote liquide (bouillant à  $-196$  °C).<sup>14</sup>

Pour observer le phénomène de résonance, il faut un système permettant d'exciter les spins et capable de détecter la réponse de ceux-ci. Le dispositif permettant ce dialogue s'appelle une sonde.

Il existe deux types de sondes en fonction de la manière dont sont enregistrés les spectres. La méthode classique consistait à balayer la plage de fréquence que l'on désirait étudier, ce qui nécessitait de pouvoir émettre et recevoir en même temps des signaux, sans que ceux-ci interfèrent. La sonde comportait alors, entre autres, deux bobines d'axes orthogonaux à la direction du champ appliqué : une pour l'émission excitatrice et une seconde, d'axe orthogonal à la première pour la réception. Le gros inconvénient de cette technique est qu'il faut beaucoup de temps pour enregistrer un spectre, puisque le balayage doit être lent pour permettre aux spins des noyaux de revenir dans leur état d'équilibre avant de changer la fréquence. C'est pourquoi au début des années 70 est apparue une autre technique qui est beaucoup plus rapide, sensible, et qui est aujourd'hui la seule utilisée.<sup>14</sup>

Cette technique est tout à fait différente puisqu'elle excite toutes les résonances (du moins dans la zone de fréquence étudiée) à la fois puis détecte le signal correspondant aux différents noyaux. Ce processus est à rapprocher de celui qui consiste à taper violemment sur une cloche puis à enregistrer le son qu'elle émet ensuite. Dans cette situation, nous n'avons plus besoin que d'une bobine pour exciter les spins et capter le signal.

La sonde peut alors se décomposer en deux parties : une partie de mesure proprement dite, composée de deux bobines, la première étant utilisée pour exciter les noyaux puis pour mesurer le signal, la seconde, facultative, permet d'irradier en permanence les résonances d'un noyau autre que celui observé. Le spectre de ce dernier est alors simplifié puisque tout effet de couplage avec le noyau irradié est supprimé (technique de découplage). La seconde partie de la sonde est constituée d'une électronique passive délicate à ajuster, pour que les bobines décrites ci-dessus présentent une efficacité maximale (comme l'accord d'un récepteur radio permet de capter une station avec un minimum de bruit).<sup>14</sup>

Le rôle de cette électronique est multiple : dans un premier temps, elle sert à générer le signal d'excitation, aussi bien sa forme, que sa durée, son intensité ou sa fréquence (il s'agit de l'onde électromagnétique dont il a été question plus haut ou plutôt de son champ magnétique qui est créé par la bobine d'émission/réception). Puis elle acquiert la réponse du système de spins (signal RMN), l'amplifie, la démodule par rapport à la fréquence de travail du spectromètre (proche des fréquences de résonance) de manière à se ramener à des signaux basse fréquence qui seront plus facilement et plus précisément numérisés. A une translation de fréquence près, ces signaux représentent bel et bien la réponse du système de spins (fonction du temps) à laquelle on applique (sous forme numérique) une opération mathématique appelée Transformée de Fourier. Cette dernière fournit une fonction qui n'est autre que le spectre conventionnel et joue par conséquent le rôle d'analyseur de fréquence (ce que, s'il s'agit d'ondes sonores, notre oreille fait très bien séparant, par exemple, les différentes voix d'un chœur !).

L'électronique nécessaire est complexe. Mais ces techniques, dites à Transformée de Fourier, ont permis un essor considérable de la résonance magnétique nucléaire, dans un premier temps en réduisant la durée des mesures, puis, en fonction de la préparation du système de spins, en rendant possible la détermination de propriétés moléculaires, par exemple, la manière dont sont liés les carbones entre eux dans la molécule ou quel proton est lié à quel carbone, ou encore combien de protons sont attachés à quel carbone...<sup>14</sup>

### X.3. Critères d'installation d'un spectromètre RMN :

Les critères d'installation des spectromètres RMN varient selon le fabricant et selon le modèle de ces derniers. Ils sont les suivants :

- Accessibilité du Site.
- Taille du site.
- Exigences de hauteur de plafond.
- Résistance structurelle du sol.
- Exigences relatives aux vibrations du sol.
- Exigence de prise en charge des aimants.
- Environnement magnétique.
- Aération.
- Température et humidité ambiantes.
- Environnement radio-fréquence.<sup>27</sup>

En matière de sécurité pour le site d'installation, c'est la présence d'un aimant relativement puissant qui différencie les spectromètres RMN de la plupart des autres équipements de laboratoire<sup>28</sup>. Les dangers potentiels de l'aimant sont dus à :

1- la puissante force attractive qu'il exerce sur les objets ferromagnétiques (il faut séparer l'environnement de l'aimant en zones de sécurité selon la puissance de champ magnétique)

2- son volume élevé en azote et en hélium liquides (à cause de génération des formes gazeuses de ces liquides il faut assurer une ventilation adéquate).<sup>28</sup>

### X.4. Tests pour le bon fonctionnement de spectromètre RMN :

Il convient de démontrer le bon fonctionnement du spectromètre RMN. Les tests appropriés à cet effet sont, typiquement, **la mesure de la largeur de raie à mi-hauteur pour des pics et dans des conditions d'acquisition définies, le rapport signal/bruit (S/N) pour des mélanges de référence, la puissance d'impulsion (mesurée par la largeur de l'impulsion 90°) et la reproductibilité de l'impulsion**. Tous les fabricants d'instruments publient des spécifications et des protocoles de mesure de ces paramètres pour des combinaisons instrument/sonde spécifiques, et la conformité de l'appareillage à ces spécifications doit être démontrée.<sup>10</sup>

## XI. RMN à transformée de Fourier (RMN-FT) :

Les spectromètres contemporains opèrent généralement selon le principe de la transformée de Fourier : après excitation de l'échantillon par une impulsion de radiofréquence  $\nu$ , d'amplitude  $B_1$  et de durée  $\tau_p$  appropriées, puis un temps mort  $t_d$  de courte durée (pour permettre la restauration de l'électronique), le signal FID analogique amplifié est échantillonné au cours du temps d'acquisition  $t_{ac}$ , puis numérisé par un convertisseur analogique-numérique, et les résultats sont stockés dans la mémoire du spectromètre.

L'amplification du signal délivré par le récepteur intervient avant la numérisation, afin d'optimiser la sensibilité sans saturer le convertisseur. Dans le cas de l'observation de noyaux X, l'équipement standard comporte si nécessaire un découplage  $^1\text{H}$  large bande opéré via l'irradiation de tous les protons lors de l'expérience. Pour accroître le rapport S/N, plusieurs signaux FID peuvent être accumulés de façon cohérente, puis sommés. **La transformée de Fourier de ces données temporelles donne le spectre fréquentiel** <sup>10</sup>, c'est-à-dire le signal FID se prête aux calculs de Fourier qui vont permettre de transformer ce signal (I) obtenu en fonction du temps  $I=f(t)$  en un spectre classique établi en fonction des fréquences  $I=f(\square)$ . <sup>11</sup>

## XII. Échantillonnage pour RMN :

### XII.A. Echantillon en solution :

La plupart des mesures de RMN sont effectuées sur des solutions diluées (à environ 1 pour cent) de l'analyte dans un solvant approprié, qui peut être additionné d'un composé de référence approprié destiné à l'étalonnage du déplacement chimique. <sup>10</sup>

**Solvants.** Le solvant doit être capable d'assurer la dissolution de l'analyte sans exercer d'autre interaction, sauf intention contraire. Pour limiter l'interférence des signaux émanant du solvant, il convient de travailler avec des solvants entièrement deutériés (oxyde de deutérium R, chloroforme deutérié R, diméthylsulfoxyde deutérié R, acétone deutériée R, méthanol deutérié R, etc.). Les atomes de solvants donnent des signaux facilement identifiables par leur déplacement chimique, et peuvent être utilisés pour étalonner l'axe des déplacements chimiques (témoin secondaire). <sup>10</sup>

**Références.** La caractéristique spectrale la plus sensible à l'environnement chimique de l'atome au sein de la molécule est le déplacement chimique, désigné par  $\delta$  et exprimé en parties par million. **Le déplacement chimique  $\delta_{X,\text{échantillon}}$**  de la résonance d'un noyau X actif

en RMN s'exprime en parties par million et est mesuré par la différence observée entre la fréquence de résonance  $\nu_{X,\text{échantillon}}$  de ce noyau et la fréquence de résonance  $\nu_{X,\text{référence}}$  d'un témoin interne, toutes deux exprimées en hertz, rapportée à la fréquence de travail  $\nu_{X,\text{référence}}$  du spectromètre, en megahertz, pour un champ  $B_0$  :

$$\delta_{X,\text{échantillon}} = (\nu_{X,\text{échantillon}} - \nu_{X,\text{référence}}) / \nu_{X,\text{référence}}$$

Par convention, la référence utilisée pour déterminer les déplacements chimiques exacts est la raie  $^1\text{H}$  du tétraméthylsilane R (TMS), avec réglage de  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm.<sup>10</sup>

En principe, une fois l'échelle de déplacement du  $^1\text{H}$  établie par référence au TMS, la fréquence exacte de toute autre résonance X peut être calculée et son échelle de déplacement chimique étalonnée. La fréquence  $\nu_{X,\text{référence}}$  d'une référence (**secondaire**) à  $\delta_X = 0$  ppm est calculée à partir de la fréquence  $^1\text{H}$  du TMS,  $\nu_{\text{H,TMS}}$  et de la valeur indiquée dans une table du rapport  $\Xi_{X,\text{référence}}$ , entre la fréquence spécifique de l'isotope et la fréquence  $^1\text{H}$  du TMS<sup>10</sup> :

$$\nu_{X,\text{référence}} = \nu_{\text{H,TMS}} \cdot \Xi_{X,\text{référence}}$$

Les composés de référence à  $\delta_X = 0$  ppm et les rapports  $\Xi_{X,\text{référence}}$  correspondants sont indiqués ci-après :

**Tableau 4: Table des rapports entre la fréquence spécifique de l'isotope et la fréquence  $^1\text{H}$  du TMS.**<sup>10</sup>

Noyau	Eau <sup>a</sup>	$\Xi_{X,\text{référence}}$	Autres solvants	$\Xi_{X,\text{référence}}$
$^1\text{H}$	DSS <sup>b</sup>	1,00000000	TMS	1,00000000
$^{13}\text{C}$	DSS <sup>b</sup>	0,25144953	TMS	0,25145020
$^{15}\text{N}$	NH <sub>3</sub>	0,10132912	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	0,10136767
$^{19}\text{F}$	CF <sub>3</sub> COOH	non indiqué	CCl <sub>3</sub> F	0,94094011
$^{31}\text{P}$	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)	0,40480742	(CH <sub>3</sub> O) <sub>3</sub> PO	0,40480864
<sup>a</sup> Le déplacement chimique dépend du pH				
<sup>b</sup> DSS = 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate de sodium				

En pratique, les déplacements chimiques X sont directement étalonnés à l'aide d'un composé de référence approprié.

En RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ , la principale méthode utilisée est celle de l'étalon interne, où le composé de référence est directement ajouté au système étudié. En RMN du  $^{15}\text{N}$ , du  $^{19}\text{F}$  ou du  $^{31}\text{P}$ , la méthode de l'étalon externe, où l'échantillon et le composé de référence sont contenus séparément dans des tubes cylindriques coaxiaux, est souvent appropriée.<sup>10</sup>

**Stabilisation.** Pour éviter la dérive du spectre dans le temps, une procédure de stabilisation champ-fréquence (lock) est appliquée. Sauf spécification contraire dans la monographie, le signal  $^2\text{H}$  (deutérium) émanant de solvants deutériés est utilisé à cet effet.<sup>10</sup>

### XII.A.1. Analyse qualitative (voir Chapitre 4)

### XII.A.2. Analyse quantitative:

Dans une expérience de RMN basique, l'intensité du signal est l'aire, obtenue par intégration, située sous la courbe du signal enregistré. Ce n'est que lorsque 2 signaux sont de largeur à mi-hauteur et de multiplicité identiques que la hauteur du signal peut servir de mesure de l'intensité. Dans des conditions de relaxation pratiquement complète entre 2 acquisitions, l'intensité  $I_A$  du signal est une mesure vraie du nombre  $N_A$  de noyaux responsables du signal :

$$I_A = K_S \cdot N_A$$

La constante  $K_S$  englobe les constantes fondamentales, les propriétés de l'échantillon et les paramètres du récepteur, et elle peut être éliminée lorsqu'il s'agit de comparer l'intensité de signaux, puisqu'elle exprime la relation de proportionnalité qui existe entre les nombres de noyaux des 2 groupes structurels A et B faisant l'objet de la comparaison :<sup>10</sup>

$$I_A/I_B = N_A/N_B$$

Les nombres  $N_i$  de noyaux appartenant à des groupes structurels différents dans une même molécule sont des petits entiers. Les valeurs mesurées sont arrondies à l'entier le plus proche. Cependant, il est facile de vérifier que le spectromètre effectue correctement les opérations d'acquisition et de traitement en comparant les intensités exactes dans le spectre d'un composé organique approprié de structure connue.

Outre le fait que les intensités des signaux dus à chacun des composés d'un mélange sont liées les unes aux autres par de petits entiers, les quantités molaires relatives de ces composés peuvent être mesurées par comparaison des intensités normalisées des résonances des différents composants. Le rapport molaire entre deux composants d'un mélange est donné par l'équation suivante :<sup>10</sup>

$$n_A/n_B = (I_A/I_B) \cdot (N_B/N_A)$$

La détermination n'est valide que lorsque sont connues les structures moléculaires (ou du moins les valeurs de N pour les groupes structurels observés) pour lesquelles sont déterminés  $I_A$  et  $I_B$ . Elle est effectuée soit au moyen d'un étalon interne soit par normalisation des pics.<sup>10</sup>

**Méthode de l'étalon interne :** On peut déterminer la masse  $m_A$  d'un analyte A en ajoutant à la solution, comme étalon d'intensité, une masse connue  $m_B$  d'une substance B dont on connaît la teneur pour cent  $P_B$ . L'équation précédent devient alors :

$$m_A = (I_A/I_B) \cdot (N_B/N_A) \cdot (M_A/M_B) \cdot m_B \cdot (P_B/100)$$

où  $M_i$  désigne la masse moléculaire.

L'étalon d'intensité doit être soigneusement choisi : il doit être totalement soluble dans le solvant utilisé pour l'analyte, il ne doit produire qu'un petit nombre de signaux, et le « groupe témoin » doit émettre un signal dans une région vide du spectre. L'emploi d'un composé de haute pureté et de masse moléculaire relativement élevée est recommandé.<sup>10</sup>

**Procédé de normalisation :** Les proportions relatives des composants d'un mélange, le degré de substitution d'un polymère structurellement modifié, la teneur d'un contaminant peuvent être déterminés par comparaison de l'intensité relative des résonances.

Il convient de valider la méthode expérimentale utilisée, pour s'assurer de l'absence de chevauchement entre les signaux considérés. Lorsque le contaminant est un composé de structure ou de masse moléculaire mal connue (émulsifiant par exemple), l'addition de petites quantités de ce composé dans le tube RMN permet de construire une courbe d'étalonnage.<sup>10</sup>

## **XII.B. Echantillon sous forme solide :**

L'analyse d'échantillons solides est possible au moyen de spectromètres RMN spécialement équipés à cet effet. Certaines techniques rendent observables les raies individuelles des différents sites atomiques, d'où l'extension possible, et d'un grand intérêt, de l'application de la RMN à des composés inorganiques.

L'une de ces techniques consiste à soumettre l'échantillon pulvérisé à une rotation rapide (4-30 kHz) dans un rotor (d'un diamètre extérieur d'environ 4 mm) incliné d'un angle de  $54,7^\circ$  (l'angle « magique ») par rapport à l'axe du champ magnétique  $B_0$  ; cette technique est appelée rotation à l'angle magique (MAS, magic angle spinning). **Le découplage** haute puissance constitue un autre outil efficace, et une 3<sup>e</sup> méthode, dite de polarisation croisée (CP, cross polarisation), repose sur un transfert de polarisation de noyaux facilement excitables vers des noyaux moins facilement polarisables.<sup>10</sup>

La combinaison de ces techniques permet d'obtenir des spectres de haute résolution apportant une grande quantité d'informations sur les caractéristiques chimiques et structurelles des solides vitreux, amorphes et cristallins, qu'il s'agisse de céramiques, polymères ou minéraux.<sup>10</sup>

### XII.B.1. Rotation à l'angle magique :

Les solides en général sont l'objet de traitements spéciaux en RMN, car plusieurs causes contribuent à élargir considérablement la largeur de leur signal. Ce sont l'anisotropie (État, qualité d'une substance anisotrope, dont les propriétés varient selon la direction considérée.) de déplacement chimique, l'effet dipôle-dipôle et la vitesse de relaxation.

Pour l'anisotropie de déplacement chimique, la constante écran n'est pas une simple valeur arithmétique mais un tenseur, ce qui peut se traduire par le fait qu'elle dépend de l'orientation de la molécule dans le champ magnétique. Ce n'est pas pénalisant pour un liquide, dans lequel le mouvement brownien (mouvement aléatoire..) entraîne un changement très rapide des orientations, trop rapide pour que la RMN (à échelle de temps longue) puisse distinguer autre chose qu'une orientation moyenne, identique pour toutes les molécules. Pour le solide, il en va différemment, et des noyaux identiques peuvent avoir des déplacements chimiques différents, d'où un signal large qui peut couvrir tout le domaine des déplacements chimiques proprement dits.<sup>15</sup>

Pour vaincre cette anisotropie, on utilise la technique dite de « rotation à l'angle magique » (Magic Angle Spinning, MAS en anglais) qui consiste à faire tourner l'échantillon, finement broyé, selon un axe de rotation faisant un angle de  $54^\circ$  avec la direction du champ magnétique. La formulation mathématique de l'anisotropie met en évidence un facteur  $(1 - 3\cos^2 q)$ ,  $q$  étant l'angle que fait la direction du champ magnétique avec l'axe principal du tenseur. On voit effectivement que ce terme s'annule quand  $q$  prend la valeur citée plus haut, à condition toutefois que la fréquence de la rotation soit plus élevée que la valeur de l'anisotropie (selon le champ, de 5 à 15 KHz). La figure 10 montre les spectres silicium d'une zéolithe (cristal) avec et sans rotation.<sup>15</sup>

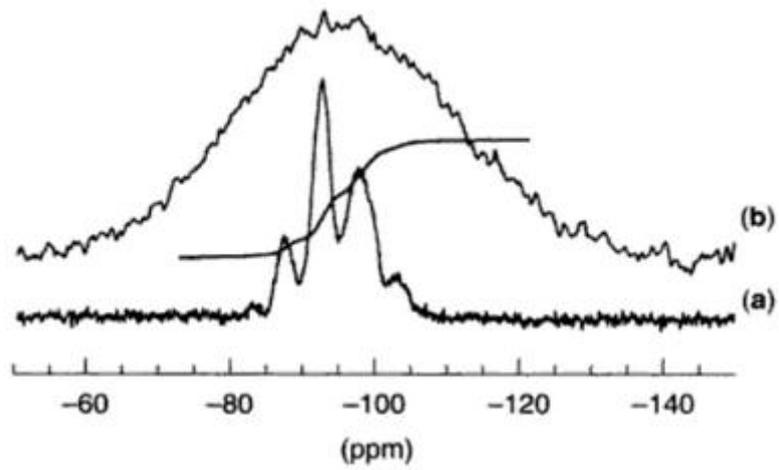


Figure 10: Spectre  $^{29}\text{Si}$  d'une faujasite (zéolithe). (a) Avec rotation. (b) Sans rotation. <sup>15</sup>

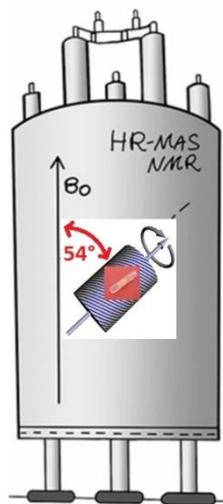


Figure 11: RMN de rotation à l'angle magique. <sup>16</sup>

# **Chapitre IV : Identification des principes actifs par RMN**

## I. Généralités :

Les spectres RMN sont principalement utilisés comme outils d'identification des principes actifs, le spectre  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon à analyser étant alors comparé au spectre d'un composé de référence ou, plus rarement, à un spectre de référence publié. Les spectres du composé à examiner et du composé de référence SCR doivent être acquis par la même procédure et dans les mêmes conditions opératoires. Les pics figurant dans les 2 spectres, ou les régions caractéristiques des spectres, doivent correspondre en position, en intensité et en multiplicité. Dans certains cas, une comparaison mathématique, par exemple par calcul d'un coefficient de corrélation, peut être utile. Ou en démontrant que le spectre RMN d'un PA est intégralement compatible avec la structure déclarée du composé.<sup>10</sup>



Figure 12: Spectromètre RMN: 200 MHz, multi-noyaux.<sup>17</sup>

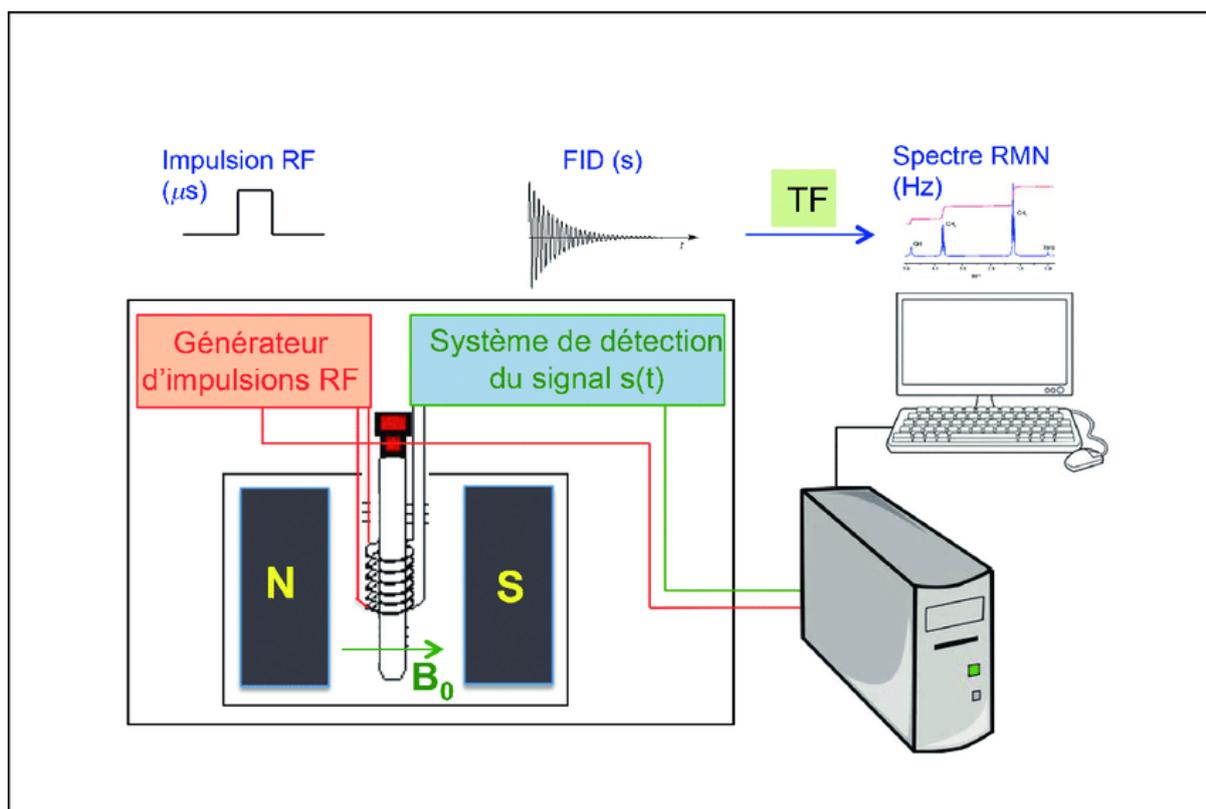


Figure 13: Principe simplifié d'un RMN de paillasse impulsif et à TF. <sup>18</sup>

## II. Identification des principes actifs par RMN :

### II.1. Identification des principes actifs par comparaison des spectres RMN en utilisant une SCR :

#### II.1.A. Substance Chimique de Référence de la Pharmacopée Européenne (SCR) :

Substance ou mélange de substances destinés à être utilisés selon les indications d'une monographie ou d'un chapitre général de la Pharmacopée Européenne.

Les Substances Chimiques de Référence de la Pharmacopée Européenne sont des étalons primaires (Etalon dont il a été établi qu'il disposait de propriétés appropriées à l'usage considéré, la démonstration de sa conformité ayant été faite sans le comparer à un étalon existant), à l'exception de celles (notamment les antibiotiques) qui sont étalonnées en Unités Internationales. Ces dernières sont des étalons secondaires (Etalon établi par comparaison avec un étalon primaire) reliés à l'étalon international. <sup>10</sup>

## **II.1.B. Mode opératoire :**

### **II.1.B.a. Préparation de l'échantillon**

Mettre la substance à examiner en solution dans le solvant éventuellement additionné, selon les indications de la monographie, du composé de référence approprié pour étalonner le déplacement chimique. Après placement de l'échantillon dans un tube et la fermeture de tube, l'introduction dans l'aimant du spectromètre est réalisée, puis le réglage des paramètres expérimentaux et enfin l'exécution de la mesure. Les paramètres opératoires fondamentaux sont indiqués dans les monographies.<sup>10</sup>

### **II.1.B.b. Procédure de mesure**

Après équilibration de l'échantillon contenu dans la sonde, les réglages instrumentaux doivent être optimisés afin d'obtenir des conditions de résonance optimales et un rapport S/N maximal par réglage d'accord et d'adaptation de la sonde, ensuite les ajustements nécessaires pour maximiser l'homogénéité du champ magnétique à travers l'échantillon (shimming) doivent être également réalisés. Les réglages utilisés doivent être notés ou enregistrés dans l'ordinateur. Une expérience peut être composée de multiples séquences d'impulsion-acquisition-latence, et les signaux FID correspondants sont sommés dans la mémoire de l'ordinateur, avec calcul du bruit aléatoire moyen. Lorsqu'un rapport S/N convenable a été obtenu, le signal FID est mis en mémoire et le spectre fréquentiel est généré par transformation de Fourier des signaux FID sommés.<sup>10</sup>

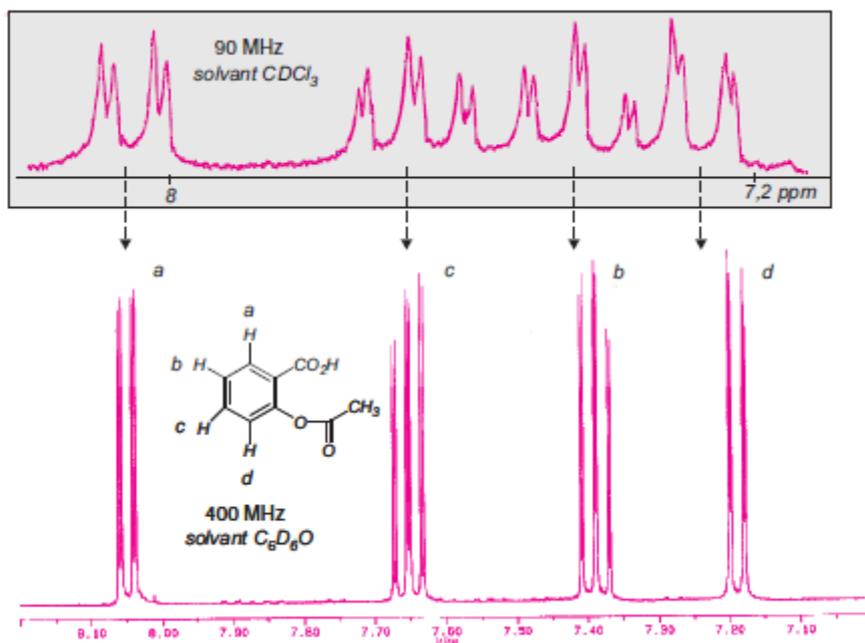
- B. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (2.2.33).
- Préparation* : dissolvez 20 mg d'héparine calcique dans 0,7 mL d'une solution de triméthylsilylpropionate de sodium deutérié R à 20 µg/mL dans de l'oxyde de deutérium R.
- Comparaison* : dissolvez 20 mg d'héparine calcique pour identification RMN SCR dans 0,7 mL d'une solution de triméthylsilylpropionate de sodium deutérié R à 20 µg/mL dans de l'oxyde de deutérium R.
- Appareillage* : spectromètre opérant à au minimum 300 MHz.
- Acquisition des spectres RMN <sup>1</sup>H* :
- *nombre d'impulsions* : au minimum 16 ; ajustez ce nombre de façon à obtenir un rapport signal/bruit d'au moins 1000:1 pour le signal méthyle de l'héparine à 2,04 ppm ;
  - *température* : environ 25 °C ; les spectres de l'échantillon à examiner et de la substance de référence sont enregistrés à la même température ;
  - *temps d'acquisition* : au minimum 2 s ;
  - *temps de répétition* (acquisition plus relaxation) : au minimum 4 s ;
  - *largeur spectrale* : 10-12 ppm, centrée sur environ 4,5 ppm ;
  - *largeur d'impulsion* : donnant un angle de basculement compris entre 30° et 90°.
- Traitement* :
- *fenêtre exponentielle décroissante* : 0,3 Hz,
  - transformée de Fourier,
  - *réglage du 0,00 ppm* : avec le signal de référence du triméthylsilylpropionate.

Figure 14: Exemple de mode opératoire d'identification de l'héparine calcique. <sup>8</sup>

### II.1.C. Spectres RMN :

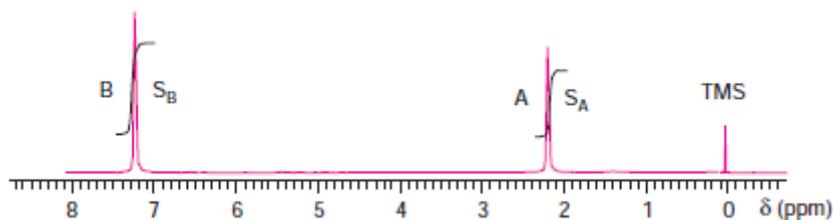
Le document de base, fourni par les appareils RMN (figures 4.1 et 4.2), est le *spectre de RMN* (figure 4.4 et 4.5). Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance.

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, **d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur.** <sup>11</sup>



**Figure 15: Spectres des 4 protons aromatiques de l'aspirine.** <sup>11</sup>

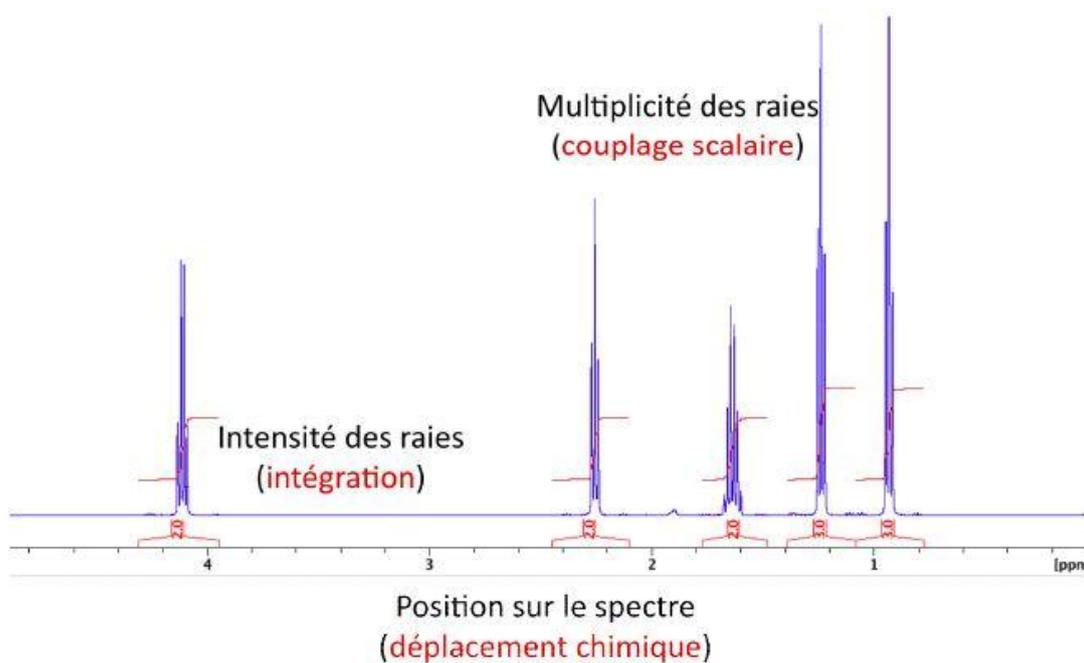
La figure reproduit le spectre d'un échantillon d'aspirine, obtenu sur deux appareils, l'un fonctionnant à 90 (solvant  $\text{CDCl}_3$ ) et l'autre à 400 MHz (solvant  $\text{C}_6\text{D}_6\text{O}$ ).



**Figure 16: Spectre de RMN  $^1\text{H}$  d'un mélange d'acétone (A) et de benzène (B).** <sup>11</sup>

Si  $S_A = 111$  et  $S_B = 153$  (unités arbitraires), on trouvera, sachant que  $M_A = 58$  et  $M_B = 78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $C_A = 35 \%$  et  $C_B = 65 \%$  en masse.

Sur un spectre RMN, on observe des signaux dont on analyse la position, la forme et l'intensité. La position est définie par le déplacement chimique  $\delta$  et la forme par le nombre, l'intensité relative et la distance (couplage scalaire  $J$ ) entre les raies. Ces données traduisent directement le voisinage électronique des noyaux étudiés. <sup>19</sup>



**Figure 17: Paramètres d'un spectre RMN.** <sup>19</sup>

Pour comprendre la signification des différents paramètres spectroscopiques cités dans la figure précédente voir : **En résumé Page 84.**

#### **II.1.D. Identification des principes actifs par comparaison mathématique des spectres (Coefficient de corrélation) :**

La corrélation, pour sa part, définit un indice permettant de mesurer le degré de liaison ou l'intensité de la relation entre deux variables.

Le **coefficient de corrélation  $r$**  est une mesure de l'intensité de la relation et plus précisément de l'intensité de la relation linéaire entre deux variables. <sup>20</sup>

Ainsi, la corrélation se définit comme une relation linéaire entre deux variables et le coefficient de corrélation comme une mesure qui exprime l'intensité de cette relation. <sup>20</sup>

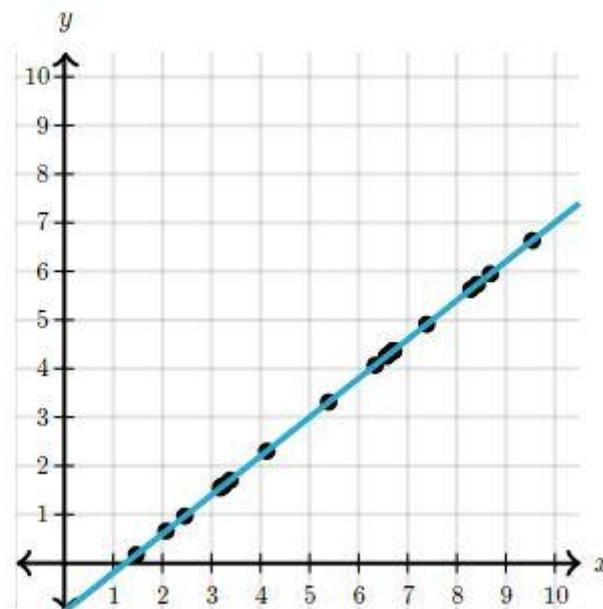
Son calcul est assez complexe, c'est pourquoi on utilise souvent la calculatrice ou un logiciel. On s'intéresse ici à son interprétation.

Comment interpréter  $r$  :

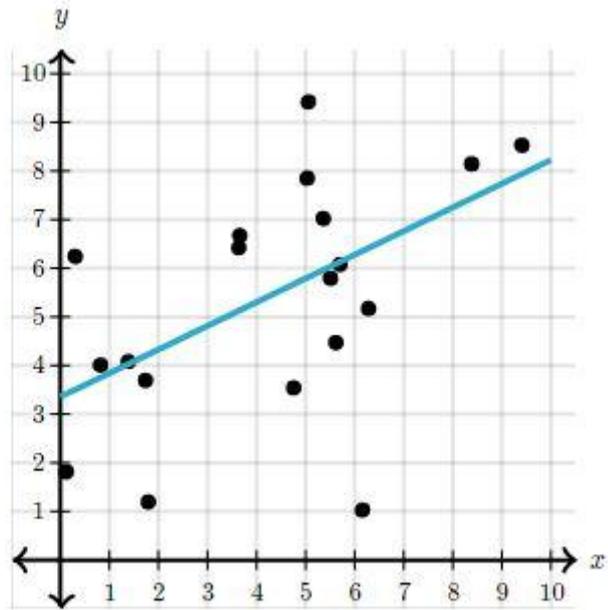
- Les valeurs possibles du coefficient de corrélation vont de +1 à -1.

- Ces deux valeurs extrêmes représentent une relation parfaite entre les variables, positive dans le premier cas et négative dans l'autre.
- La valeur 0 (zéro) signifie l'absence de relation : ce qui veut dire que chaque variable varie "indépendamment" de l'autre.
- Une **relation positive** (+) signifie que les deux variables varient dans le même sens. Si les individus obtiennent des scores élevés à la première variable (par exemple la variable conceptualisée comme indépendante), ils auront tendance à avoir également des scores élevés à la deuxième variable (dépendante). L'inverse est également vrai.
- Une **relation négative** (-) signifie que les individus qui ont des scores élevés pour la première variable auront tendance à obtenir des scores faibles pour la deuxième et inversement.<sup>20</sup>

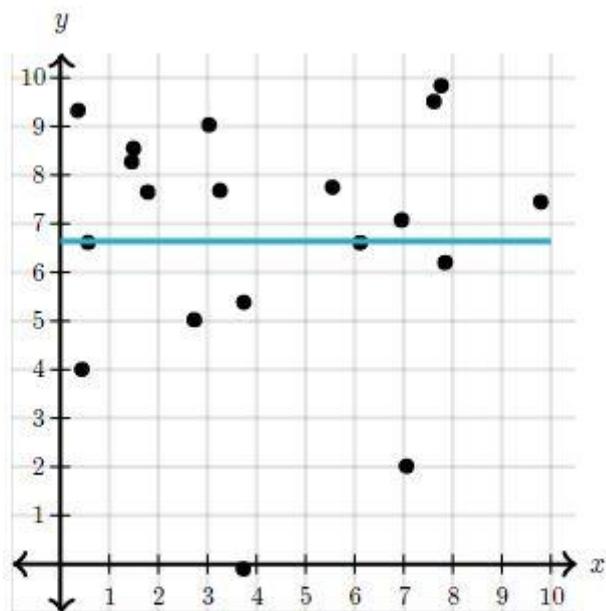
Des exemples :



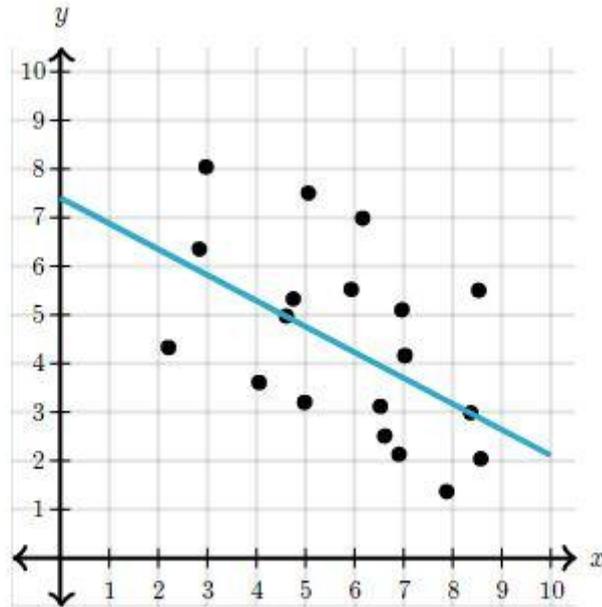
ici,  $r = 1$  : corrélation positive parfaite entre les deux variables



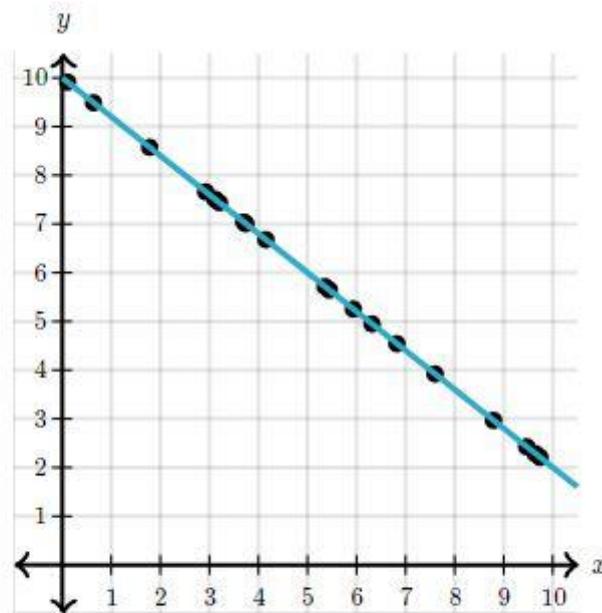
ici,  $r = 0,5$  : corrélation positive faible entre les deux variables



ici,  $r = 0$  : absence totale de corrélation, les deux variables sont linéairement indépendantes



ici,  $r = -0,5$  : corrélation négative faible entre les deux variables



ici,  $r = -1$  : corrélation négative parfaite entre les deux variables

**Figure 18: Exemples des différentes corrélations possibles.** <sup>21</sup>

**Intérêt de cette méthode :** le coefficient de corrélation apporte une preuve ou une mesure mathématique de la similarité des spectres de la substance à examiner et de la SCR plutôt qu'une simple comparaison à l'œil nu.

## II.2. Identification des principes actifs en démontrant la structure de la molécule :

La RMN est la meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie Infrarouge (spectroscopie IR : permet de identifier la présence de certaines fonctions chimiques ou certains types de liaisons) et de la spectrométrie de masse (SM : méthodes permettant d'identifier la formule brute de la molécule), elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. <sup>11</sup>

### II.2.A. RMN de proton <sup>1</sup>H :

#### Déplacement chimique des protons :

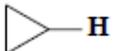
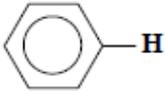
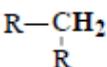
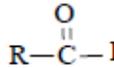
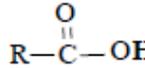
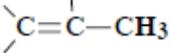
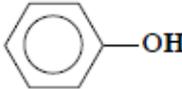
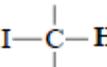
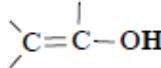
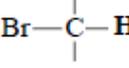
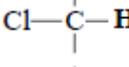
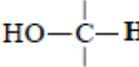
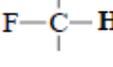
Type de proton	$\delta$ en ppm	Type de proton	$\delta$ en ppm
Cyclopropane	 0,2	Amine	R-NH <sub>2</sub> 1 - 5
Alcane primaire	R-CH <sub>3</sub> 0,9	Aromatique	 6 - 8,5
Alcane secondaire	 1,3	Aldéhyde	 9 - 10
Alcane tertiaire	R <sub>3</sub> C-H 1,5	Acide carboxylique	 10,5 - 12
Allylique	 1,7	Phénolique	 4 - 12
Iode	 2 - 4	Enolyque	 15 - 17
Bromure	 2,5 - 4		
Chlorure	 3 - 4		
Alcool	 3,4 - 4		
Fluorure	 4 - 4,5		

Figure 19: Déplacement chimique des protons. <sup>17</sup>

#### II.2.A.a. Notion de blindage :

La notion la plus importante dans cette partie est l'effet d'écran ou le blindage des noyaux (voir Chapitre III : Déplacement chimique), qui est caractérisé par la constante

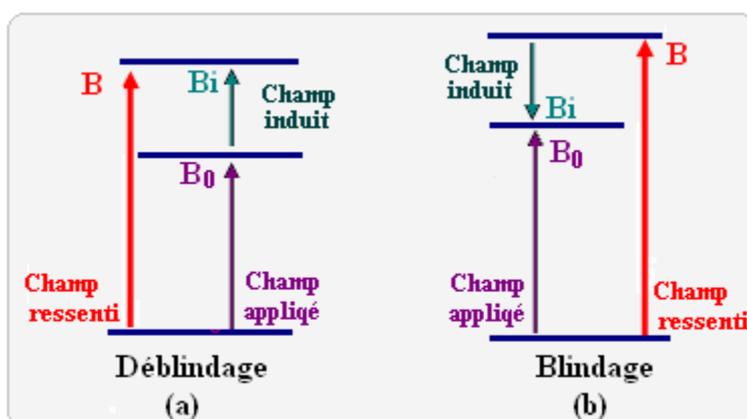
d'écran  $\sigma$  qui apparaît dans la formule suivant reliant le champ effectif qui atteint le noyau avec le champ extérieur  $B_0$  : <sup>11</sup>

$$B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma)$$

$$\text{Ou bien } \nu_{\text{eff}} = \nu_0 (1 - \sigma)$$

Dans une molécule, tous les protons  $^1\text{H}$  ne possèdent pas la même fréquence de résonance (et heureusement ! sinon la technique de RMN n'aurait pas d'intérêt dans la détermination de structures). <sup>22</sup>

Ainsi, La spectroscopie RMN est utile parce que les H ne changent pas tous de spin au même champ extérieur, car l'énergie absorbée dépend de l'environnement chimique de H. Le champ magnétique ressenti (B) par H n'est pas nécessairement celui appliqué ( $B_0$ ) par l'aimant, car les électrons de la liaison H et les électrons de la liaison  $\pi$  (liaison chimique covalente qui est créée entre deux atomes par recouvrement d'orbitales de nombre quantique secondaire  $\geq 1$ ) avoisinante induisent leurs propres champs magnétiques. Le champ induit ( $B_i$ ) peut s'opposer ou renforcer le champ magnétique appliqué. Le champ ressenti par le proton H est alors celui qui résulte des champs appliqués et induits. <sup>17</sup>



**Figure 20: (a): Le phénomène de déblindage & (b): Le phénomène de blindage ou d'écran.**<sup>17</sup>

Plus le blindage est intense, plus le proton doit être soumis à un champ extérieur fort pour que se produise la résonance. Ceci se traduit par un déplacement des pics d'absorption vers la droite du spectre. L'inverse dans le cas du déblindage. L'intensité du blindage ou du déblindage dépend de l'environnement du proton et de la structure chimique de composé étudié, en particulier est très sensible à la présence d'électrons  $\pi$  ou d'électrons libres. Si les protons ont le même environnement chimique ils résonnent pour le même champ : ils sont

dits équivalents. Tous les H qui ne sont pas équivalents donnent lieu à un pic individuel ou un groupe de pic. Afin de déterminer si 2 H sont équivalents, on les remplace successivement par un groupe X. si les dérivés avec 1X sont les mêmes, les H sont équivalents. Et si les dérivés avec 1 X ne sont pas les mêmes (diastéréoisomères) les H ne sont pas équivalents.<sup>17</sup>

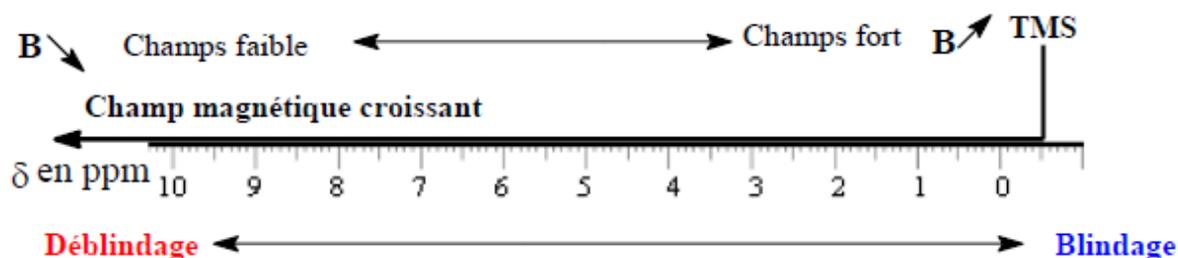


Figure 21: Relation entre le blindage des noyaux et le déplacement chimique.<sup>17</sup>

- Quand  $^1\text{H}$  est **enrichi en électron**,  $\sigma$  est grande donc  $\nu_{\text{eff}}$  **diminue**. Le proton est alors **blindé** (on parle de blindage du proton).
- Quand  $^1\text{H}$  est **appauvri en électron**,  $\sigma$  est faible donc  $\nu_{\text{eff}}$  **augmente**. Le proton est alors **déblindé** (déblindage du proton).<sup>22</sup>

Où la constante d'écran  $\sigma$  est une grandeur adimensionnée de l'ordre de  $10^{-5}$ .

Exemple : Combien de type de H existe-t-il dans :

- CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>
- CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>
- CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>
- CH<sub>3</sub>-CH=CH<sub>2</sub> : Dans ce molécule du propène, les 2 H de CH<sub>2</sub> ne sont pas équivalents car l'un est cis par rapport au groupement -CH<sub>3</sub> alors que l'autre est trans. La substitution de H<sub>c</sub> par un atome X conduit au diastéréoisomère trans, tandis que la substitution de H<sub>d</sub> par X conduit au diastéréoisomère cis.<sup>17</sup>

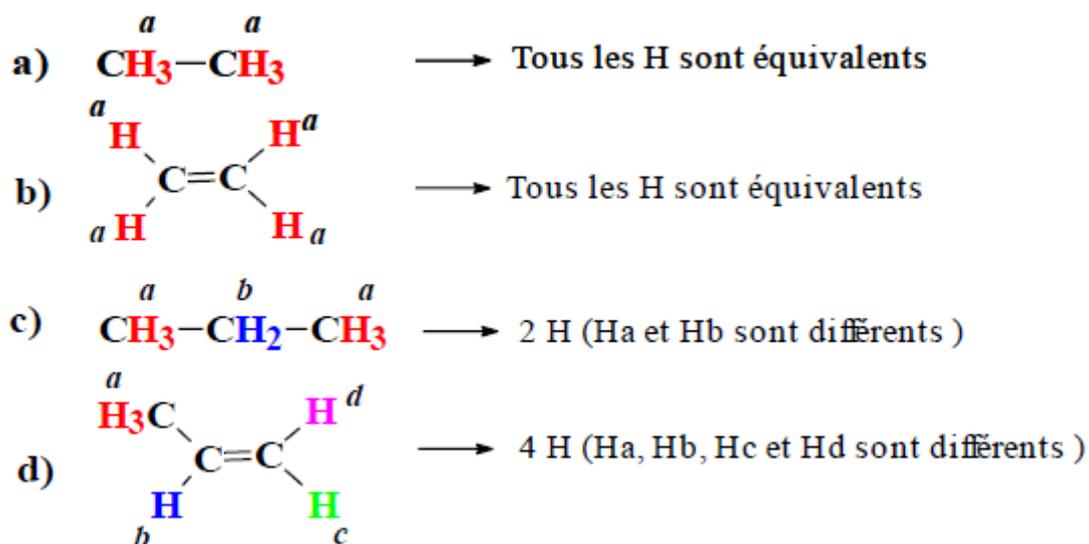


Figure 22: Quelques molécules et les types de H qu'ils comportent (équivalents ou différents).<sup>17</sup>

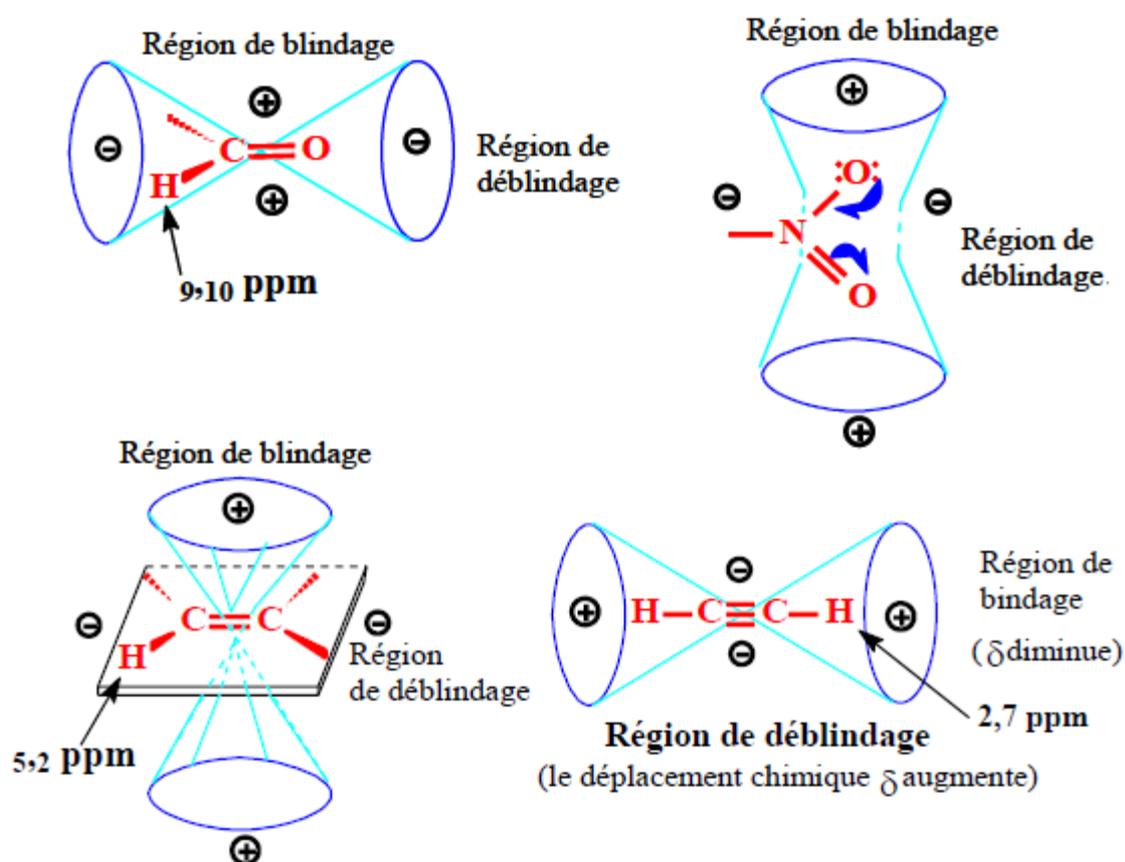


Figure 23: Différentes régions de blindage et de déblindage de quelques molécules.<sup>17</sup>

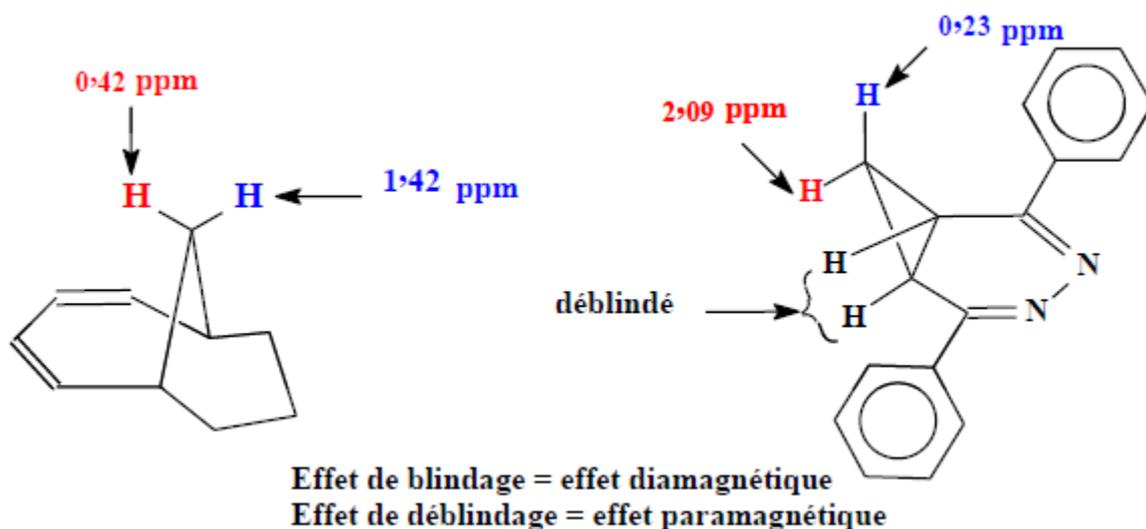


Figure 24: Exemple de noyaux H blindés et déblindés.

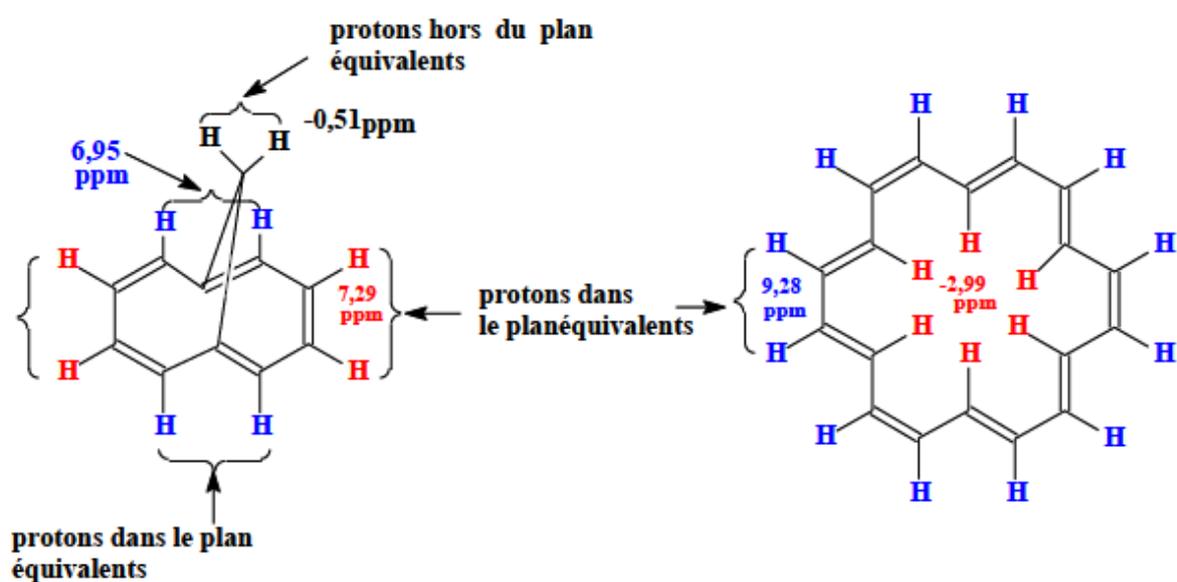


Figure 25: Protons blindés et déblindés dans des molécules cycliques.

Les protons situés à l'intérieur du cycle (figure 21) sont très blindés alors que ceux placés à l'extérieur sont très déblindés. En présence d'insaturation, il existe des électrons peu liés et donc très sensibles à un champ magnétique extérieur. L'effet diamagnétique est d'autant plus fort que les électrons peuvent circuler librement sur une grande distance.<sup>17</sup>

1. Plus il y d'atomes d'hydrogène sur le carbone, plus le noyau observé est blindé.<sup>17</sup>

Exemples :

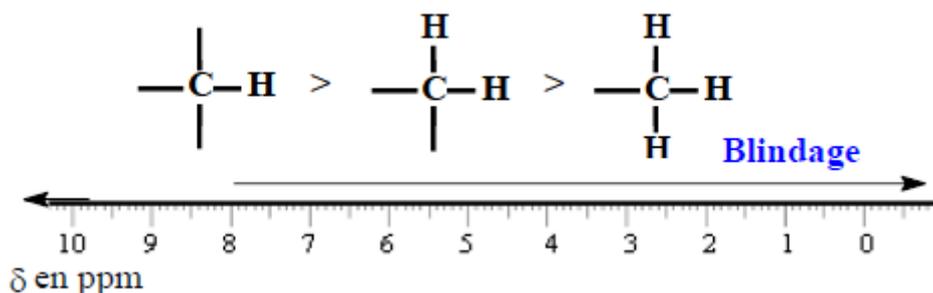


Figure 26: Blindage des noyaux H selon le nombre de protons sur le carbone.

Le spectre RMN de 2,2,3-triméthylpentane présente trois massifs attribués respectivement aux groupement  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$  et  $-\text{CH}-$  dont les déplacements chimiques sont  $\delta = 1,55$  ;  $1,20$  et  $0,87$  ppm.<sup>17</sup>

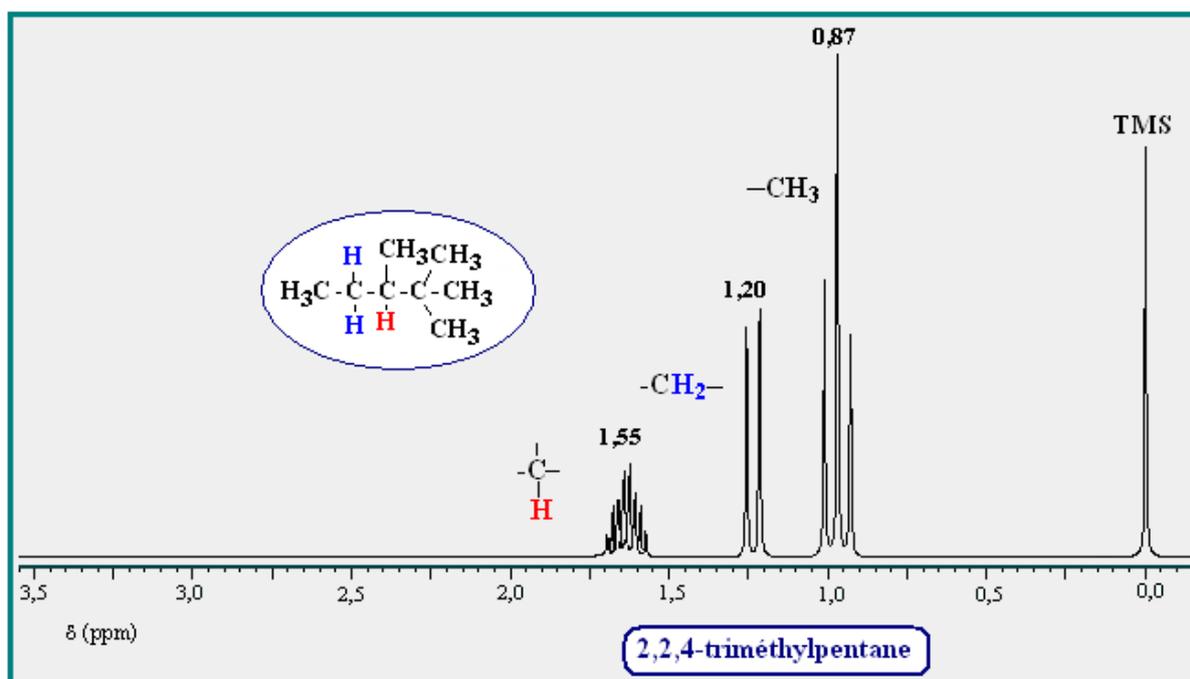


Figure 27: Spectre RMN du proton de 2,2,4-triméthylpentane.<sup>17</sup>

2. Les groupements électroattracteurs donnent un effet déblindeur sur le noyau.<sup>17</sup>

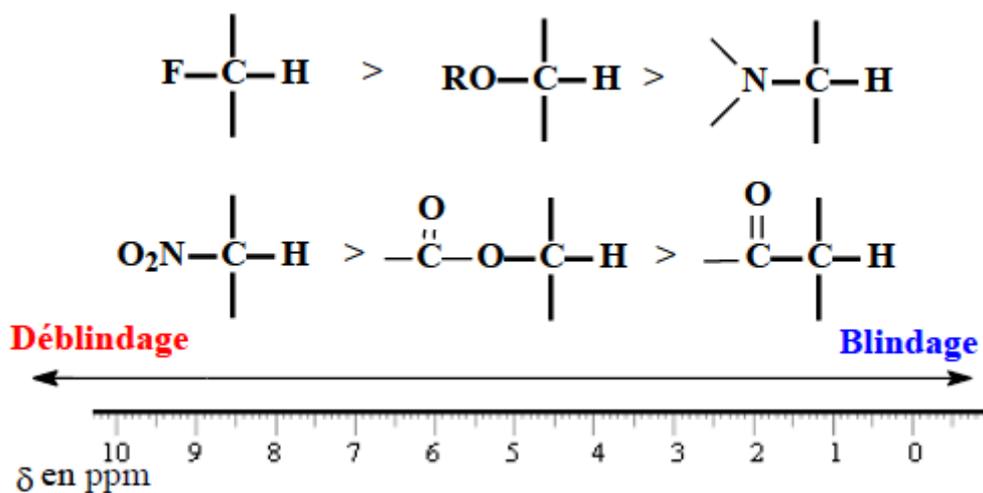
Tout effet appauvrissant la densité électronique dans l'environnement du proton conduit à abaisser la constante d'écran ( $v_{\text{eff}}$  augmente) et donc augmenter son déplacement

chimique. Un atome ou groupe d'atomes **électro-attracteurs** (**électronégativité élevée**) à proximité du proton **déblindent** donc ce dernier. Plus l'élément attracteur est éloigné du proton, plus l'effet diminue. <sup>22</sup>

Exemples :



**Figure 28: Effet d'un atome électro-attracteur (Br) sur les déplacements chimiques des protons dans une molécule.** <sup>22</sup>



**Figure 29: Effets de déblindage de proton par des groupements électro-attracteurs.** <sup>17</sup>

3. Les groupements électrodonneurs vont produire un effet blindeur.
4. Les insaturations ont un effet déblindeur. <sup>17</sup>

Les protons portés par une liaison double C=C sont très déblindés (vers 5 ppm). Leur signal se trouve vers 7 ppm s'ils sont de type benzénique. <sup>22</sup>

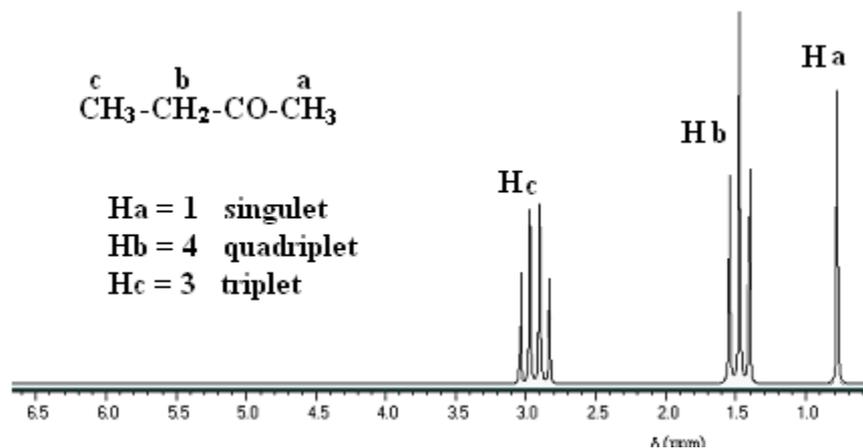


Figure 30: Spectre RMN du proton de la butan-2-one. <sup>17</sup>

Le spectre RMN ci-dessous est celui de la molécule Ph-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> qui possède deux groupements attracteurs (O-CH<sub>3</sub> et Ph-).

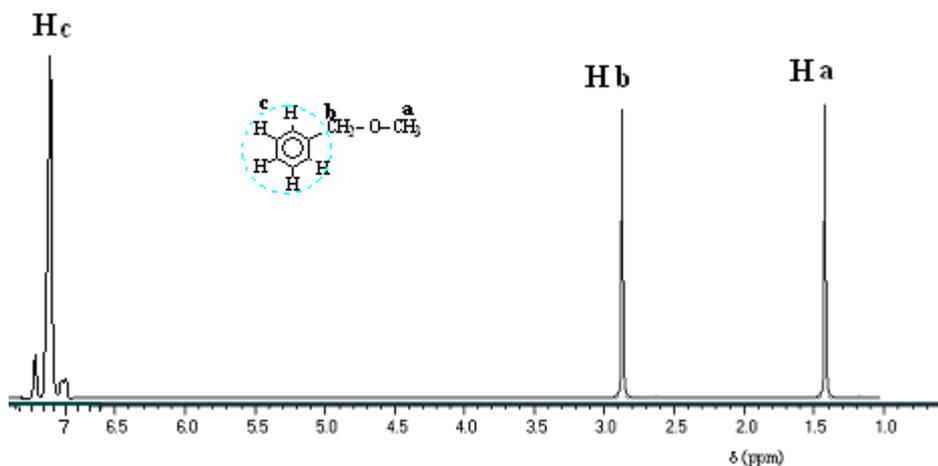


Figure 31: Spectre RMN du proton de Ph-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>. <sup>17</sup>

Autre exemple :

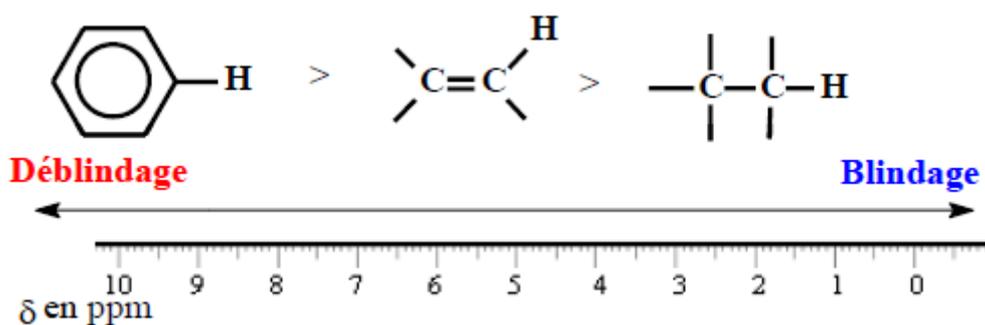


Figure 32: Effet déblindeur sur le proton par les insaturations. <sup>17</sup>

Ainsi, le spectre RMN du benzène présente un seul pic du fait de l'équivalence de 6 H.

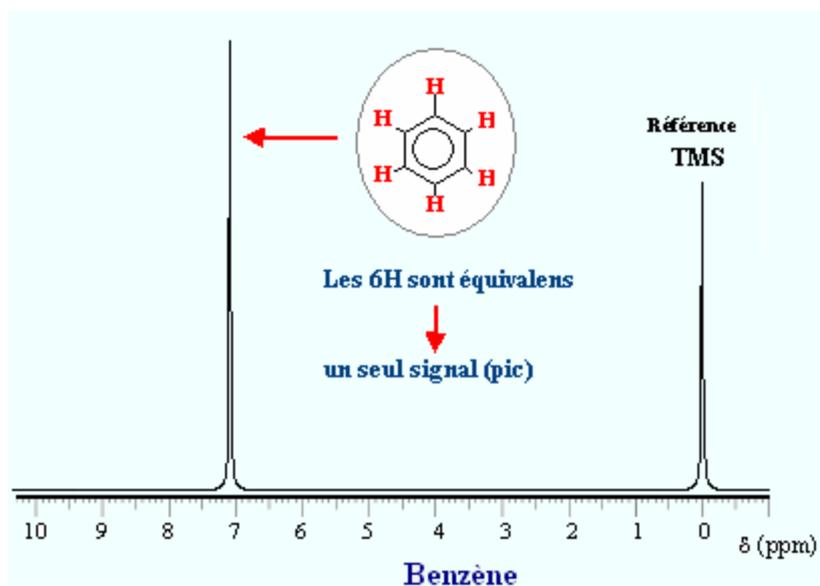


Figure 33: Spectre RMN du proton du benzène. <sup>17</sup>

Le spectre RMN du  $^1\text{H}$  du toluène présente deux massifs : un à  $\delta = 7,1$  ppm attribué aux 5H du noyau aromatique (multiplet) et le deuxième à  $\delta = 2,4$  ppm correspond au groupement  $-\text{CH}_3$  (singulet). <sup>17</sup>

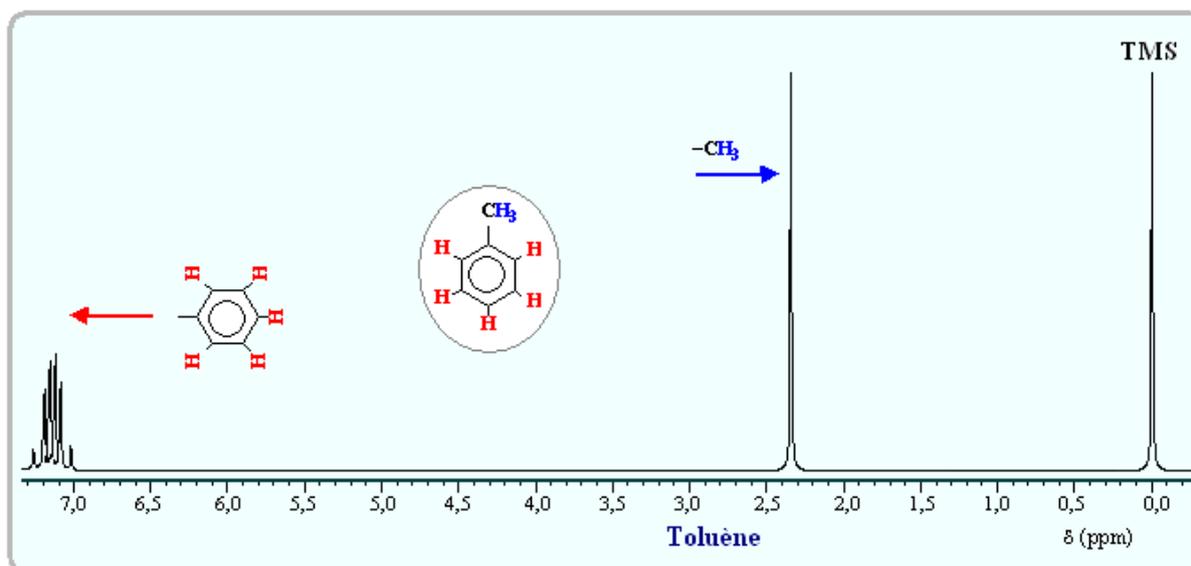


Figure 34: Spectre RMN du proton du toluène. <sup>17</sup>

Le spectre RMN ( $^1\text{H}$ ) du cis 1-phényl-prop-1-ène présente quatre massifs attribués aux quatre protons qui se trouvent dans un environnement différents.

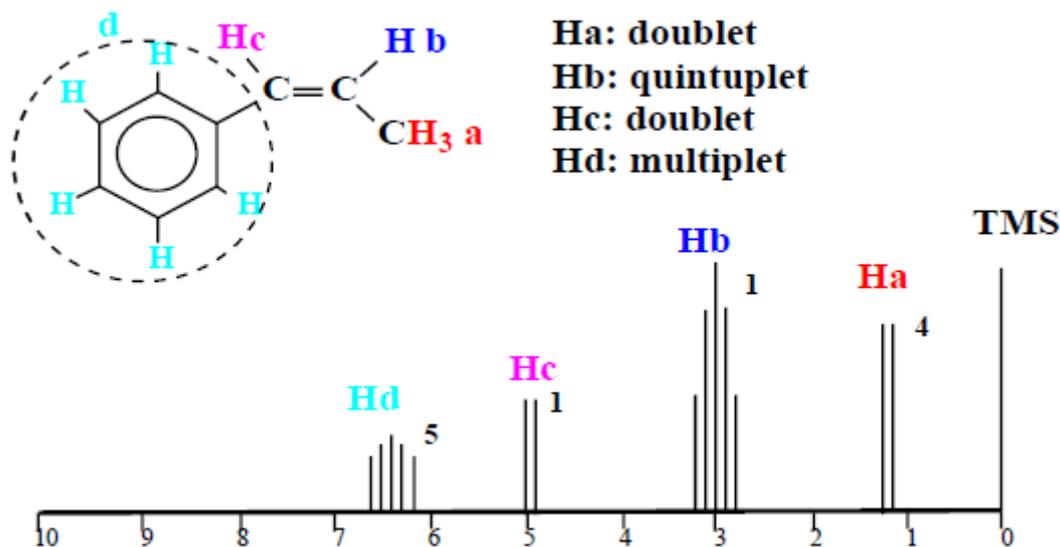


Figure 35: Spectre RMN ( $^1\text{H}$ ) du cis 1-phényl-prop-1-ène.<sup>17</sup>

### II.2.A.b. Relations empiriques :

- L'influence des substituants sur le déplacement chimique  $\delta$  est additive.
- Molécule non substituée son déplacement chimique est  $\delta_{\text{H}}^0$ .
- Molécule substituée par un atome X son déplacement chimique est  $\delta_{\text{H}}^{\text{X}}$ .
- Molécule substituée par un atome Y son déplacement chimique est  $\delta_{\text{H}}^{\text{Y}}$ .
- Molécule substituée par deux atomes X et Y son déplacement chimique est  $\delta_{\text{H}}^{\text{X,Y}}$ .
- Le déplacement chimique  $\delta$  de chaque molécule substituée peut être calculé, en utilisant les relations empiriques suivantes<sup>17</sup> :

$$\delta_{\text{H}}^{\text{X}} = \delta_{\text{H}}^0 + \sigma_{\text{X}}$$

$$\delta_{\text{H}}^{\text{Y}} = \delta_{\text{H}}^0 + \sigma_{\text{Y}}$$

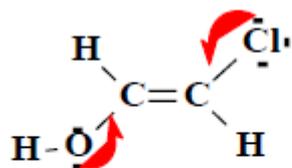
- Pour calculer le déplacement chimique d'une molécule à deux substituants ( $\delta_{\text{H}}^{\text{X,Y}}$ ) on fait l'approximation suivante<sup>17</sup> :

$$\delta_{\text{H}}^{\text{X,Y}} \approx \delta_{\text{H}}^0 + \sigma_{\text{X}} + \sigma_{\text{Y}}$$

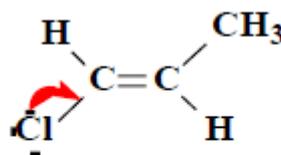
$\sigma_{\text{X}}$  et  $\sigma_{\text{Y}}$  représentent les contributions de X et Y respectivement. Obtenus empiriquement à partir d'un très grand nombre de spectres déjà connus.

Sur Cette base on peut déterminer la contribution empirique de différents substituants, en général la règle d'additivité est respectée.

Exceptions : Cette règle ne s'applique pas lorsque les substituants ne sont pas indépendants <sup>17</sup> comme :



Conjugaison  $\Rightarrow$  groupements dépendants  
la règle d'additivité ne sera pas vérifiée.

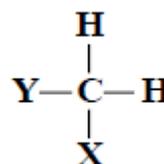


Ici la règle sera vérifiée car  
les groupements sont indépendants

Figure 36: Exemples où la règle d'additivité est respectée ou non respectée.

Exemple :

Règle de Shoolerg : dérivés du méthane  $\text{CH}_4$



$$\delta_{\text{H}}^0 = 0,23 \text{ ppm}$$

$$\delta_{\text{H}} = 0,23 + \sum S(\delta) \text{ ppm}$$

$S(\delta)$  : Contribution du substituant

Tableau 5: Contribution du substituant au déplacement chimique de proton. <sup>17</sup>

Substituant	$S(\delta)$ ppm
-Cl	2,53
-Br	2,33
-I	1,82
-OH	2,56
-C $\equiv$ N	1,70
-CH <sub>3</sub>	0,47
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	1,85

$$\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \delta_{\text{H}}^{\text{calc}} = 0,23 + (2,53 \times 2) = 5,29 \text{ ppm}$$

$$\delta_{\text{H}}^{\text{expérimental}} = 5,3 \text{ ppm}$$

$$\text{CHCl}_3 : \delta_{\text{H}}^{\text{calc}} = 0,23 + (2,53 \times 3) = 7,82 \text{ ppm}$$

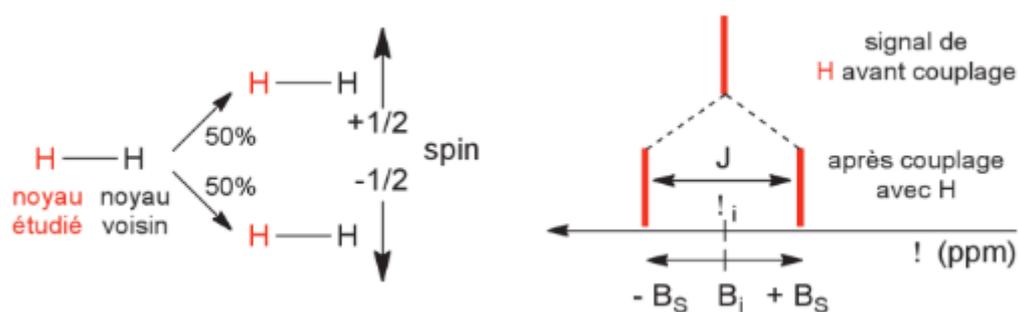
$$\delta_{\text{H}}^{\text{expérimental}} = 7,27 \text{ ppm}$$

## II.2.A.c. Couplage spin-spin :

C'est le dédoublement des signaux en plusieurs raies. Il est aussi appelé **couplage scalaire**.

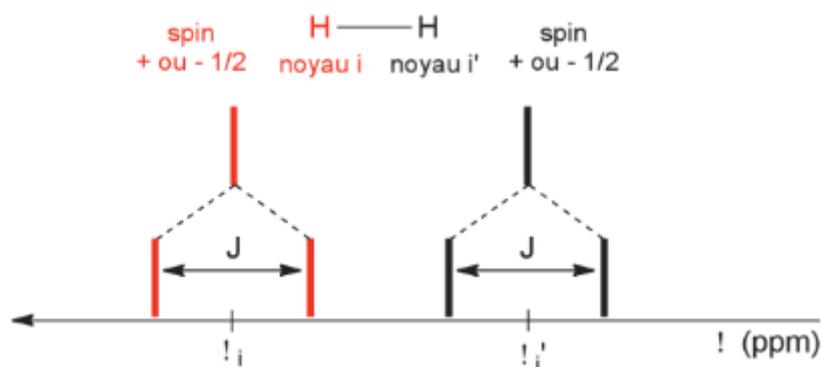
Des protons non équivalents portés par des carbones différents sont susceptibles d'interagir entre eux, ce qui modifie également leurs fréquences de résonance. Il en résulte un signal comportant plusieurs pics.<sup>17</sup>

Le spin d'un noyau donné perçoit le spin de ses voisins, qui sont dans un état  $m_s = \pm 1/2$ . Le noyau voisin est à l'origine d'un champ supplémentaire  $B_s$ , se superposant au champ déjà existant  $B_i$  ( $B_0$  corrigé de l'écrantage électronique). Etant donnée l'équiprobabilité des deux états de spin du voisin, le signal de l'atome étudié sera scindé en deux pics de même intensité. On appelle **constante de couplage, notée J**, l'écart en Hertz entre les deux pics.<sup>22</sup>



**Figure 37: Couplage spin-spin (gauche) et définition de la constante de couplage J (droite).<sup>22</sup>**

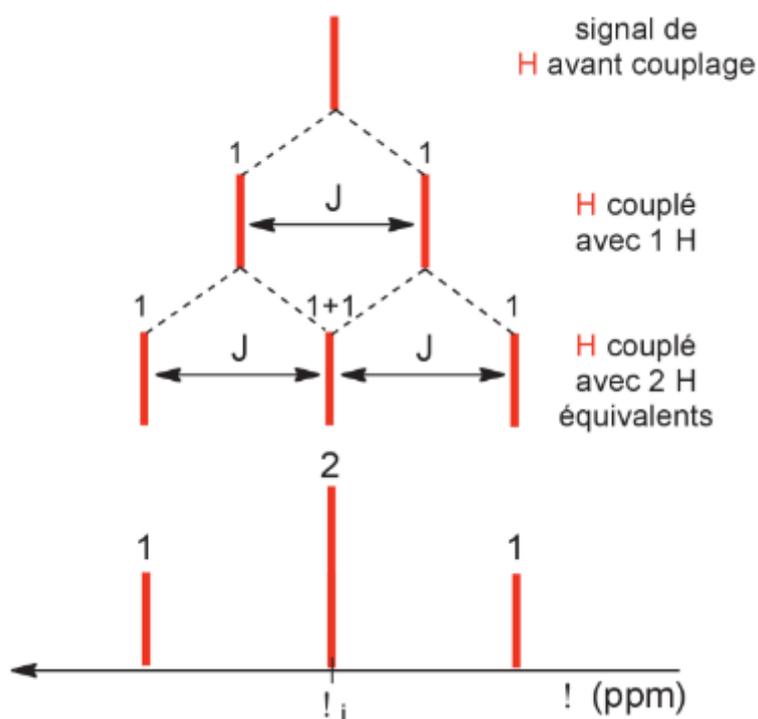
Le déplacement chimique du proton  $i$  se situe au milieu des deux pics du signal. Les effets d'interaction étant réciproques, le signal du noyau voisin est aussi dédoublé, avec le même écart  $J$  :



**Figure 38: Dédoublé de signal (pic) pour 2 noyaux  $^1\text{H}$  couplés.<sup>22</sup>**

**Généralisation : Si un proton est porté par un atome de carbone dont le ou les atomes de carbone voisins portent au total un nombre  $n$  de protons alors le signal obtenu comporte  $n + 1$  pics d'intensité différentes.**

**Un proton n'est pas couplé avec les protons qui lui sont équivalents.** Les protons labiles (rapidement échangeables avec le deutérium et leur déplacement chimique peut varier d'une acquisition à l'autre) portés par les hétéroatomes N, O, S ne couplent généralement pas avec les protons voisins.<sup>22</sup>



**Figure 39: Signal d'un proton H couplé à deux protons équivalents. Les chiffres indiquent l'intensité relative de chaque pic. Le signal est donc un triplet.**<sup>22</sup>

**Triangle de Pascal :**

Si l'on se cantonne à des spins  $1/2$ , l'intensité relative des pics d'un multiplet suit donc le [triangle de Pascal](#).<sup>22</sup>

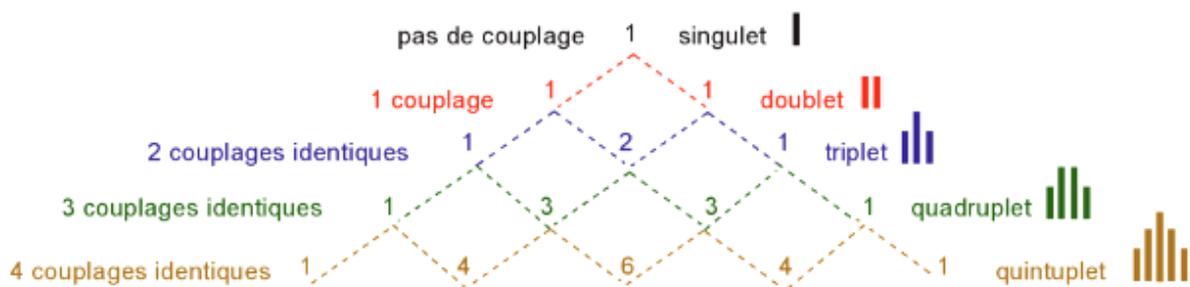


Figure 40: Triangle de Pascal et la multiplicité de pic spectroscopique en RMN. <sup>22</sup>

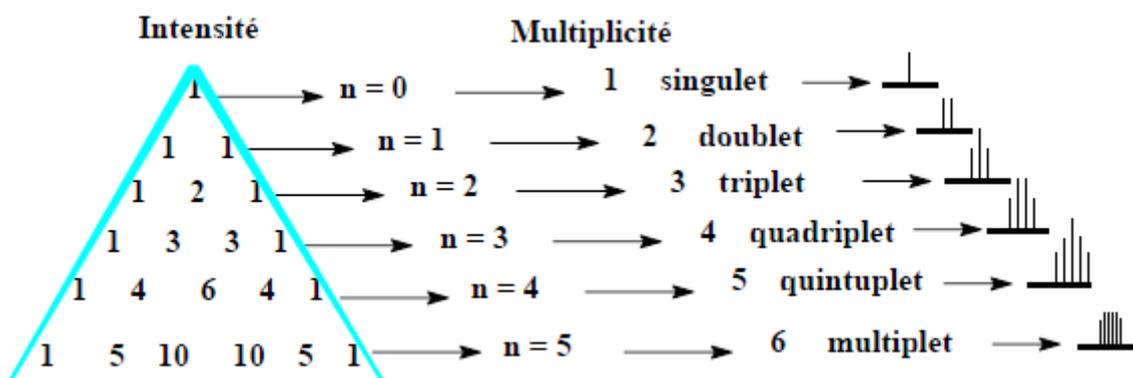
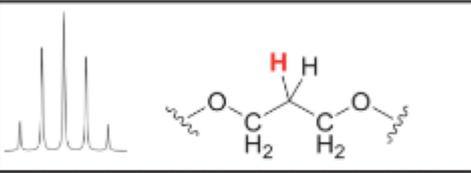
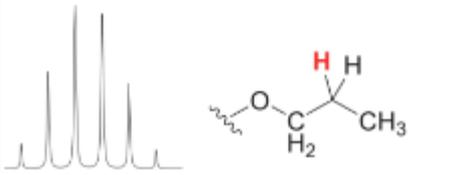


Figure 41: Triangle de Pascal et le nombre de protons voisins "n" ainsi que la multiplicité de pic. <sup>17</sup>

Tableau 6: Exemples de l'aspect de spectre RMN <sup>1</sup>H selon le nombre "n" et le triangle de Pascal. <sup>23</sup>

n	n + 1	Triangle de Pascal	Type de signal	Exemple
4	5	1 4 6 4 1	Quintuplet	
5	6	1 5 10 10 5 1	Sextuplet	

Dans le tableau précédent, c'est le proton en rouge qui donne le signal représenté (singulet, doublet, etc.)

Exemple de CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl :

La molécule présente deux massifs bien distincts à  $\delta = 1,5$  et  $3$  ppm attribués respectivement aux groupements  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-$  respectivement.

A basse résolution chaque groupement présente un seul pic (singulet) large.

A haute résolution le groupement  $-\text{CH}_2-$  montre quatre pics fin séparés entre eux d'une distance de  $J$ , le groupement  $-\text{CH}_3$  quand à lui montre trois pics bien résolus distant de  $J$ .

L'éclatement des pics en trois ou en quatre raies nous renseigne sur l'environnement des protons. <sup>17</sup>

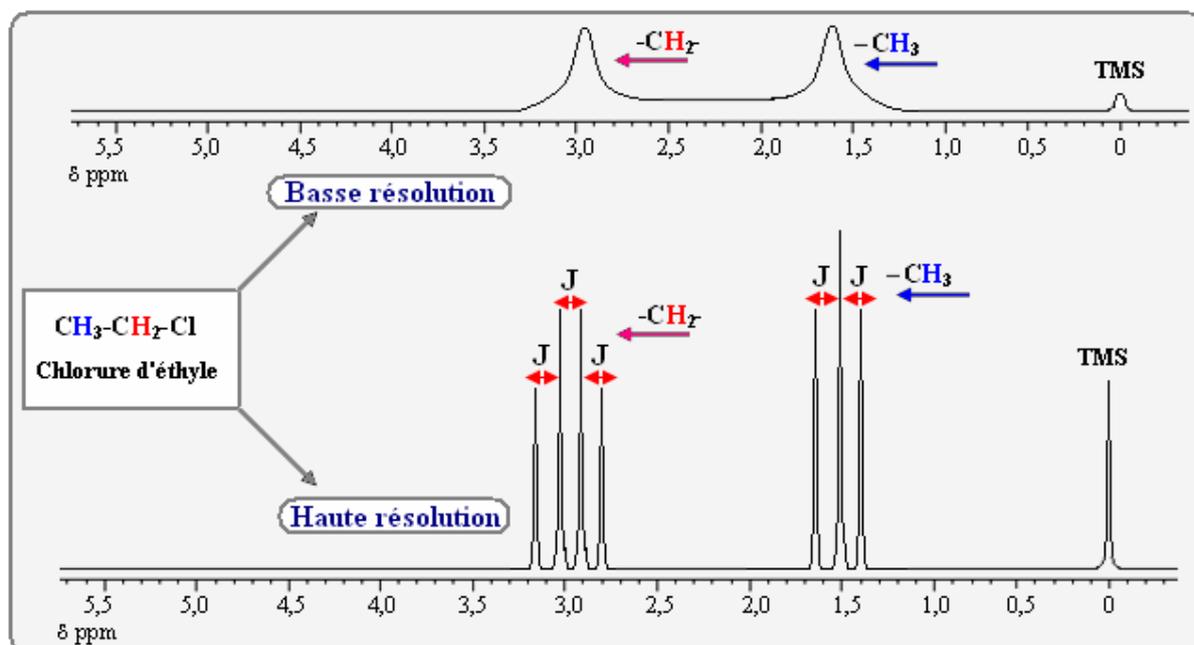


Figure 42: Spectre RMN du  $^1\text{H}$  du chloroéthane à basse et à haute résolution. <sup>17</sup>

La multiplicité des signaux est due à l'interaction spin-spin.  $J$  = constante de couplage est indépendante de la valeur  $\nu_0$  et elle est exprimée en Hz. <sup>17</sup>

Soient deux noyaux A et B avec une liaison covalente :  $\nu_1 - \nu_2 = J_{1,2}$

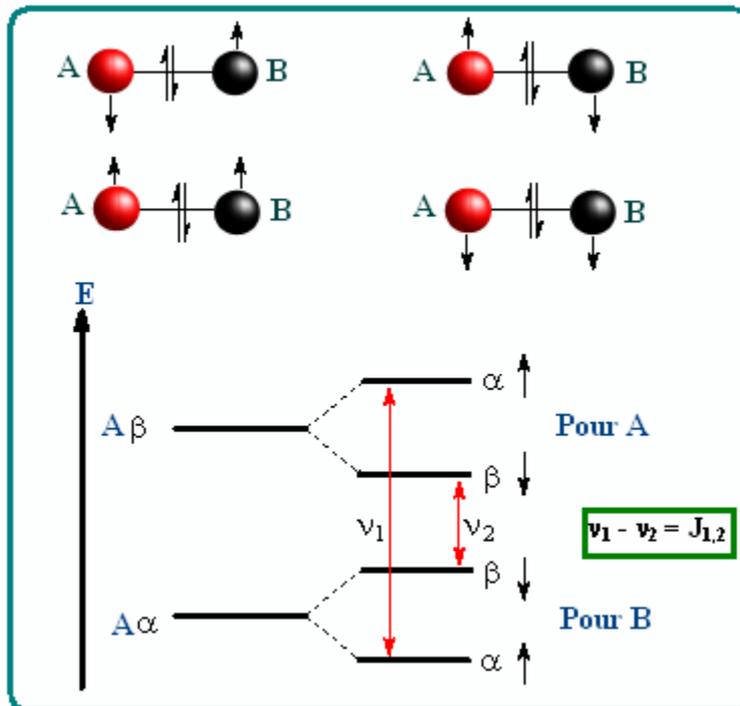


Figure 43: Interaction spin-spin et la constante de couplage J. <sup>17</sup>

La constante de couplage J en Hz est une constante indépendante du champ appliqué  $B_0$ . <sup>17</sup>

**Comment va sortir un CH<sub>2</sub> ?**

On a différentes combinaisons :

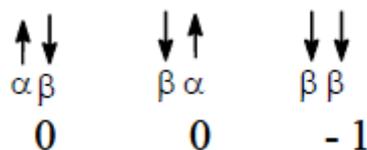


Figure 44: Différentes combinaisons de spin pour CH<sub>2</sub>. <sup>17</sup>

La valeur globale du spin des protons du méthylène,  $m_{CH_2} = +1, 0, -1$  ; mais la probabilité d'avoir zéro deux fois plus importante (diagramme énergétique de CH<sub>3</sub>) car CH<sub>3</sub> subit l'influence de CH<sub>2</sub>. <sup>17</sup>

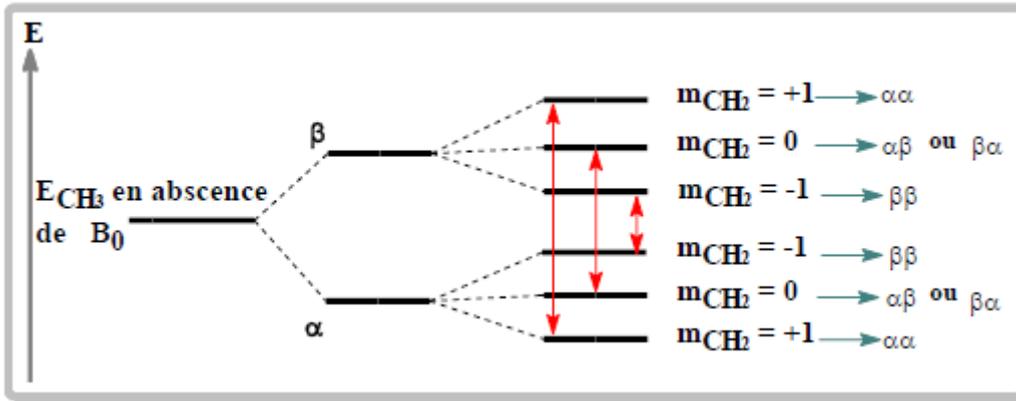


Figure 45: Diagramme énergétique de CH3. <sup>17</sup>

L'atome A passe de  $\alpha \rightarrow \beta$ , le groupement voisin B doit garder sa forme ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha$ ,  $\beta\beta$ ). Il y'a donc trois signaux qui apparaissent. <sup>17</sup>

Comment va sortir un CH3 ?

On a les combinaisons suivantes :

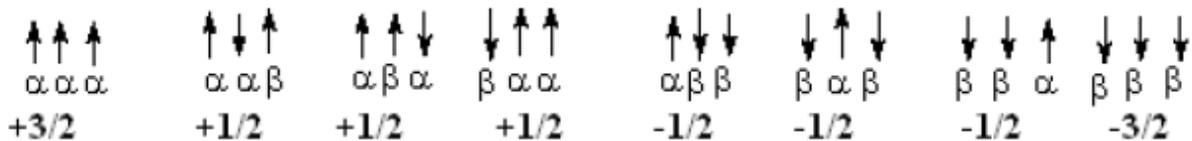


Figure 46: Différentes combinaisons de spin pour CH3. <sup>17</sup>

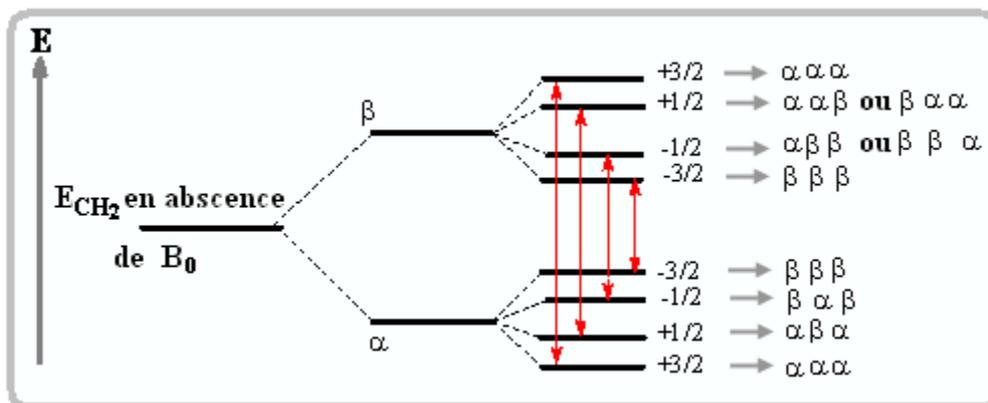


Figure 47: Diagramme énergétique de CH2. <sup>17</sup>

Il y'a quatre signaux :

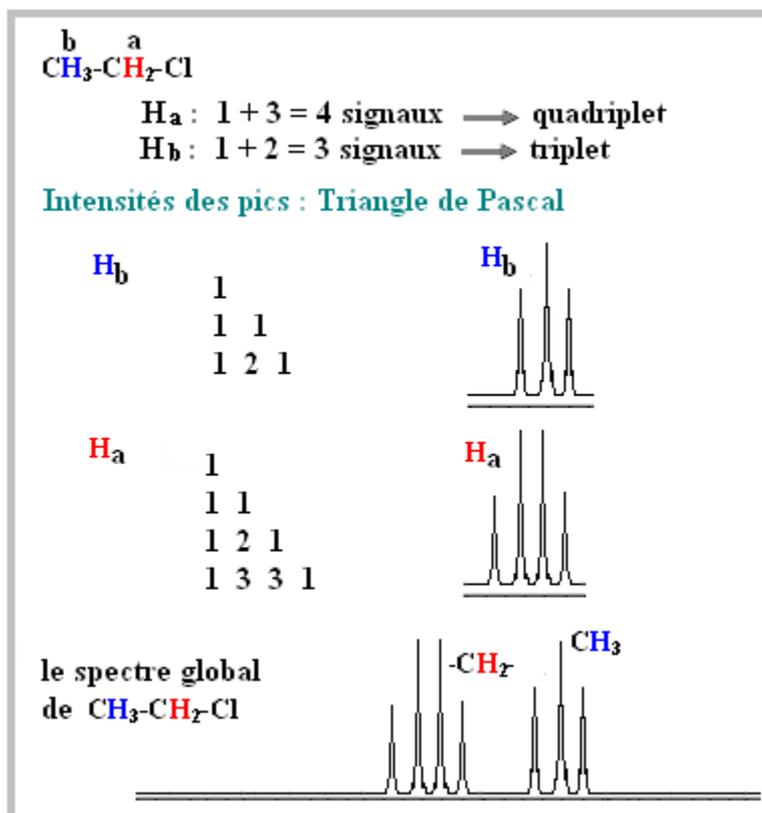


Figure 48: Spectre RMN du proton de chloroéthane selon le triangle de Pascal. <sup>17</sup>

#### II.2.A.d. Notion d'équivalence :

On dit que deux noyaux sont équivalents s'il possède le même déplacement chimique. Il faut cependant diviser cette appellation en deux catégories. <sup>17</sup>

- On appelle noyaux chimiquement équivalents deux noyaux de même déplacement chimique et qui possèdent les mêmes propriétés chimiques, à savoir le même environnement électronique ( la même constante d'écran  $\sigma$  ). S'ils résonnent à la même fréquence on dit qu'ils sont **isochrones** : protons 2 et 6 d'un benzène 1,4-disubstitué, protons de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et  $\text{CH}_2=\text{CCl}_2$  .
- On appelle noyaux magnétiquement équivalents des noyaux qui en plus sont couplés de façon identique avec les autres noyaux : dans les exemples précédents seuls  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  possède des protons magnétiquement équivalents. <sup>17</sup>

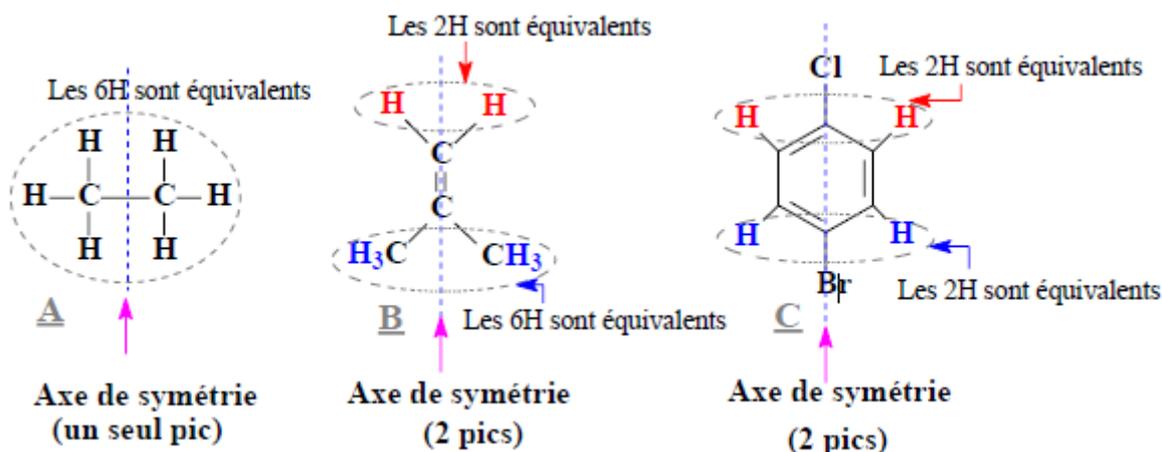


Figure 49: Quelques molécules et les protons équivalents qu'ils comportent. <sup>17</sup>

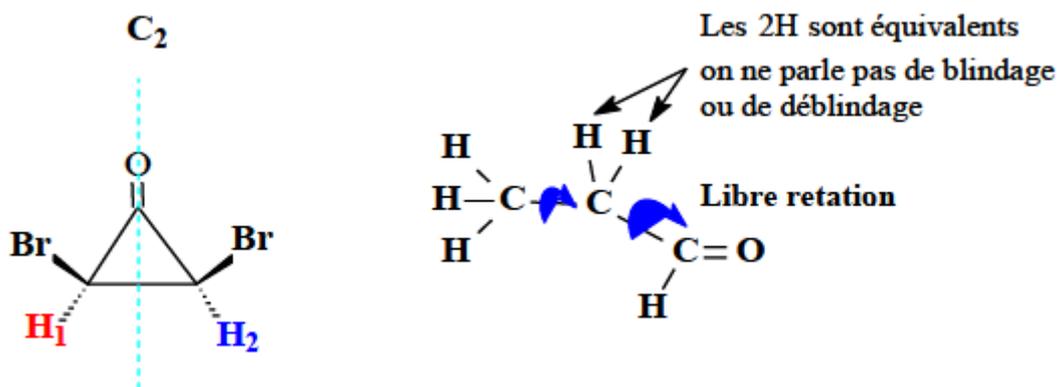


Figure 50: Protons équivalents par rapport à un axe de symétrie (gauche) et par libre rotation (droite). <sup>17</sup>

$H_1$  et  $H_2$  sont énantiotopiques ( si l'un ou l'autre est remplacé, il y'aura un composé chiral non superposable à son image dans un miroir)

Dans le cas du dibromométhane, un seul signal RMN est obtenu pour les deux protons : ceux-ci sont chimiquement équivalents car échangeables par un plan de symétrie. <sup>22</sup>

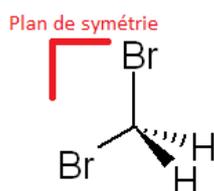


Figure 51: Protons équivalents dans le dibromométhane. <sup>22</sup>

Dans le cas de l'acétonitrile, un seul signal RMN est obtenu pour les trois protons : ceux-ci sont chimiquement équivalents car échangeables par rotation autour d'une liaison simple.<sup>22</sup>

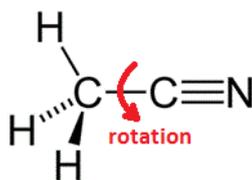


Figure 52: Structure chimique de l'acétonitrile.<sup>22</sup>

### Stereochimie :

Pour savoir si deux protons situés sur le même carbone possède le même déplacement chimique, on peut se prêter à l'expérience de pensée suivante : remplacer un des protons par un deuteron et identifier la stéréochimie. Si la molécule est achirale les protons sont **homotopiques** (la molécule reste la même quand les 2 groupements concernés dans la molécule sont interchangés), si on obtient des énantiomères **énantiotopiques** (quand un ou l'autre des groupements d'une molécule est remplacé il y'a création d'un centre chiral), des diastéréoisomères **diastéréotopiques** (2 groupements liés au même atome dans une molécule contenant au moins un centre chiral). Dans ce dernier cas seulement, les déplacements chimiques seront différents. Pour deux protons séparés par deux atomes de carbones tétraédriques, il existe une dépendance de  $^3J$  en fonction de l'angle  $\phi$  entre les deux liaisons C-H élucidée par Karplus<sup>17</sup>

$$^3J = 4.0 - 0.5 \cos(\phi) + 4.5 \cos(2\phi) \text{ en Hz}$$

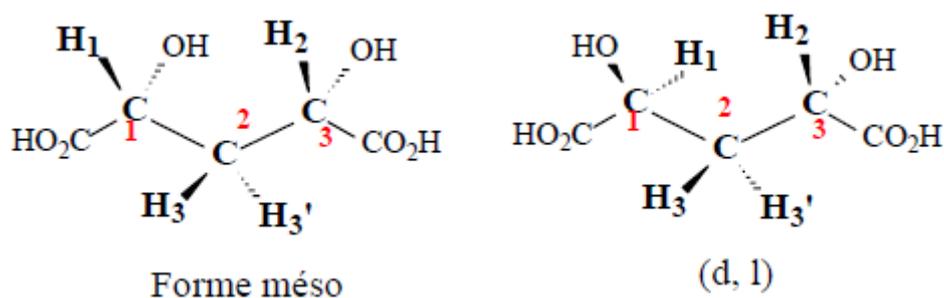


Figure 53: Exemples pour la stéréochimie.<sup>17</sup>

Dans la configuration méso les hydrogènes portés par le carbone 2 sont diastéréotopiques, ceux portés par les carbones 1 et 3 sont énantiotopiques (chimiquement non équivalents dans un solvant chiral mais chimiquement équivalent dans un solvant achiral).

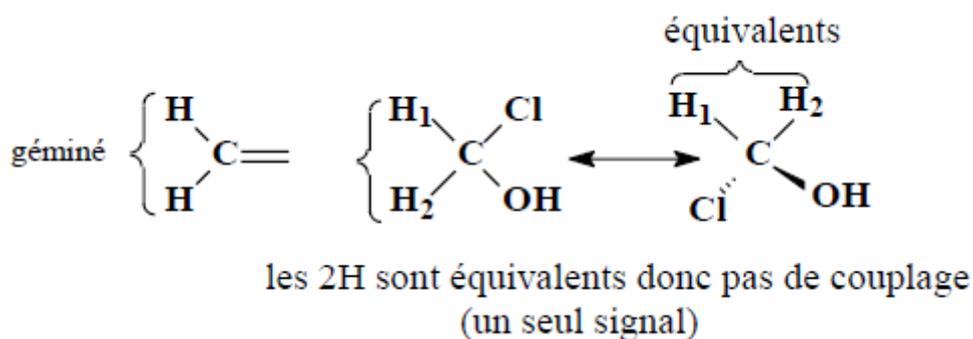
Dans la configuration d, 1 tous les hydrogène des carbones sont homotopiques (chimiquement équivalent dans n'importe quel solvant).<sup>17</sup>

### Classification des couplages :

La classification des couplages se fait en fonction du nombre de liaisons

**$^nJ$  : n c'est le nombre de liaisons qui sépare les noyaux couplés.**

- $n = 1 \Rightarrow ^1J$  H-H
- $n = 2 \Rightarrow ^2J$  couplage géminé



**Figure 54: Couplage géminé.**<sup>17</sup>

Les H géminés ne sont pas équivalents dans le cas des molécules cycliques et celles qui possèdent une insaturation.<sup>17</sup>

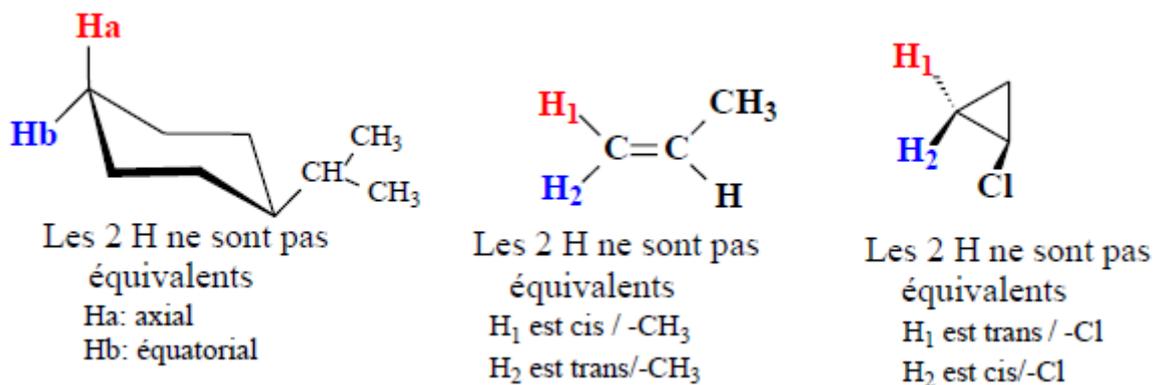


Figure 55: H géminés et molécules cycliques ou avec une insaturation. <sup>17</sup>

- $n = 3 \Rightarrow {}^3J$  couplage vicinal (J peut être positif ou négatif)

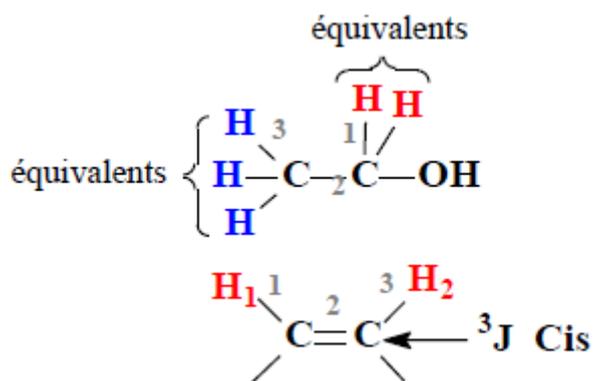


Figure 56: Couplage vicinal. <sup>17</sup>

- Couplage à long distance <sup>17</sup> :
  - Dans les molécules saturées  $n \geq n \Rightarrow {}^nJ \approx 0$  (on parle de  ${}^2J$  et  ${}^3J$ )
  - Dans le cas des molécules insaturées on peut aller jusqu'à  ${}^6J$
  - L'interaction spin-spin se transmet grâce aux électrons  $\pi$

Exemple :

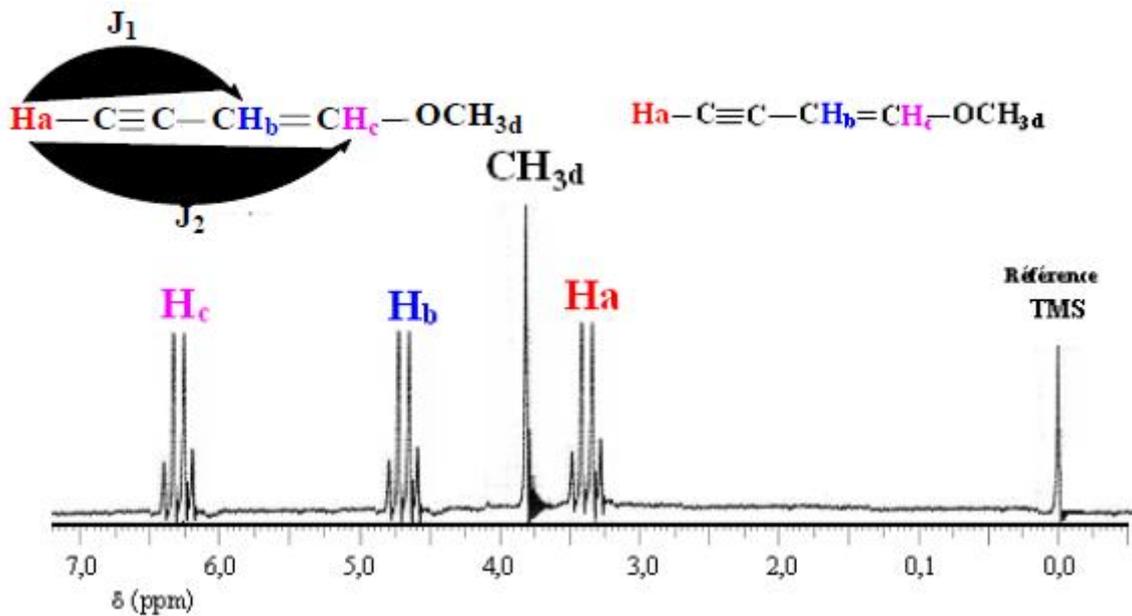


Figure 57: Exemple d'un spectre pour un couplage à long distance. <sup>17</sup>

- Effets des substituants :

Les couplages dépendent en général des positions  $\alpha$  et  $\beta$ , ils dépendent également de l'hybridation de l'atome de carbone. <sup>17</sup>

$^3J$  toujours positive

$^5J$  en générale positive

$^2J$  et  $^4J$  peuvent être positive ou négative.

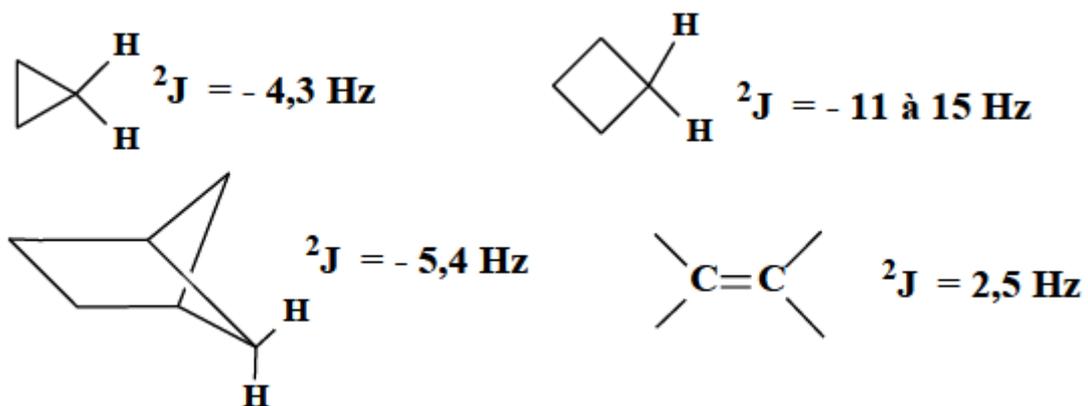


Figure 58: Constante de couplage pour quelques molécules. <sup>17</sup>

Si  $n > 3 \Rightarrow J$  est faible, en effet le couplage est faible.



- Efficacité d'un couplage : un couplage est d'autant plus fort que les deux protons sont reliés par un faible nombre de liaisons. Généralement, au-delà des couplages  $^3J$ , les couplages ne sont pas observés. **L'efficacité d'un couplage diminue avec la distance entre protons.**<sup>22</sup>
- Les couplages  $^4J$  peuvent être observés s'ils sont relayés par des liaisons multiples (alcène, alcyne, groupement aromatique)
- Les couplages  $^2J$  sont assez rares, parce que généralement les protons portés par le même carbone sont équivalents entre eux.<sup>22</sup>

### Spectre de RMN de $^1H$ de l'acide propanoïque.

Sur le spectre du proton de l'acide propanoïque on aperçoit trois massifs dont les déplacements chimiques sont dans les gammes de  $\delta = 5,8$  ; 2,9 et 1,5 ppm.<sup>17</sup>

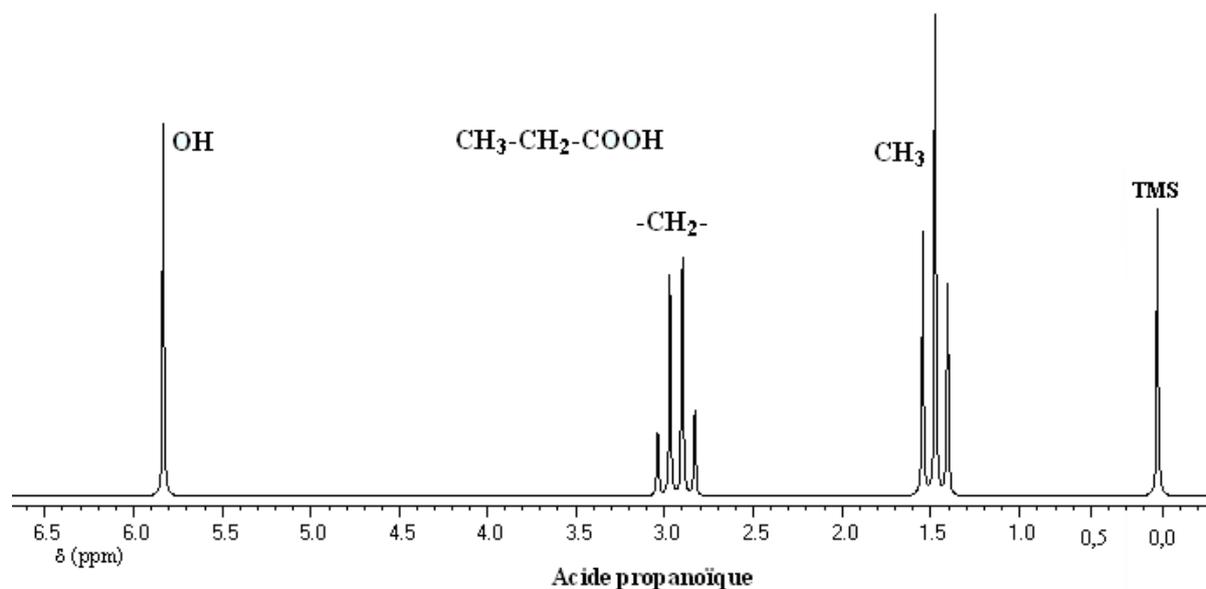


Figure 61: Spectre RMN  $^1H$  de l'acide propanoïque.<sup>17</sup>

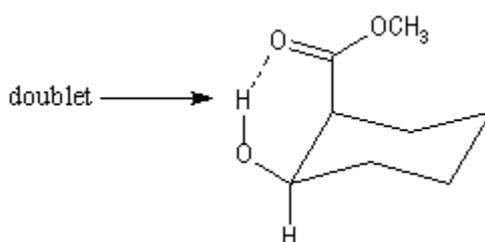
### Spectre de RMN de l'éthanol :

Le spectre de l'éthanol très pur effectué à haute résolution présente trois groupes de protons : les protons du méthylène  $CH_2$  ( $M_2$ ) sont couplés à la fois avec ceux du méthyle ( $CH_3$ ) et le proton du groupe  $-OH$ .<sup>17</sup>

**Tableau 7: Groupes de protons de l'éthanol et la multiplicité de chaque pic correspondante.**

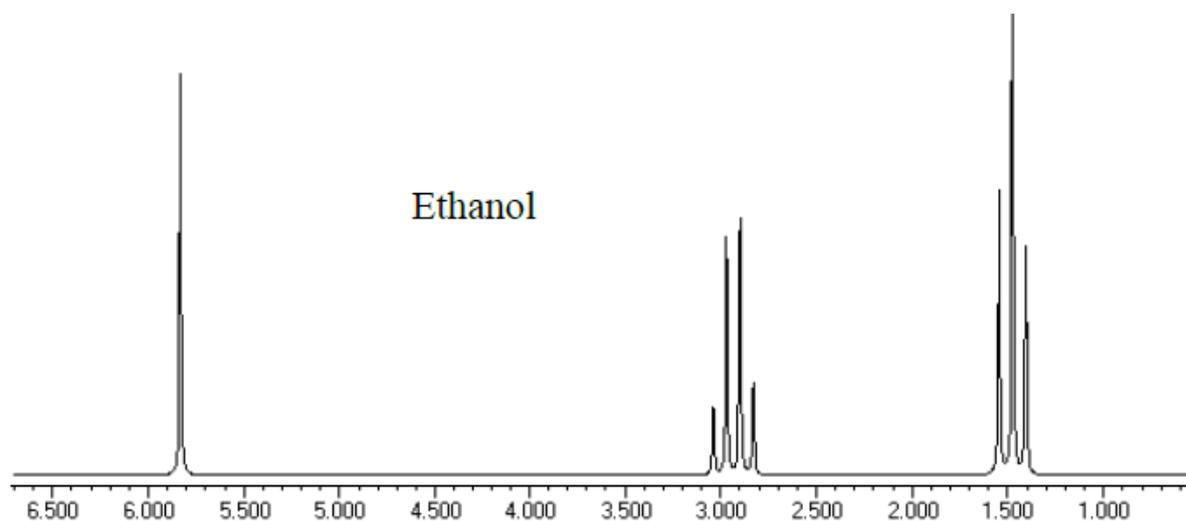
Groupe de protons	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	-OH
Signal	Triplet	Quadruplet	Singulet

On peut observer un signal dû au proton de OH sous forme de multiplet dans une structure possédant une liaison d'hydrogène intramoléculaire. L'échange du proton qui partage son affinité entre deux sites est suffisamment ralenti vis-à-vis du phénomène RMN pour que le couplage redevienne observable<sup>17</sup> comme dans la structure ci-dessous :



**Figure 62: Molécule avec une liaison d'hydrogène intramoléculaire.**

De telles informations sont extrêmement précieuses pour préciser la stéréochimie des molécules complexes.

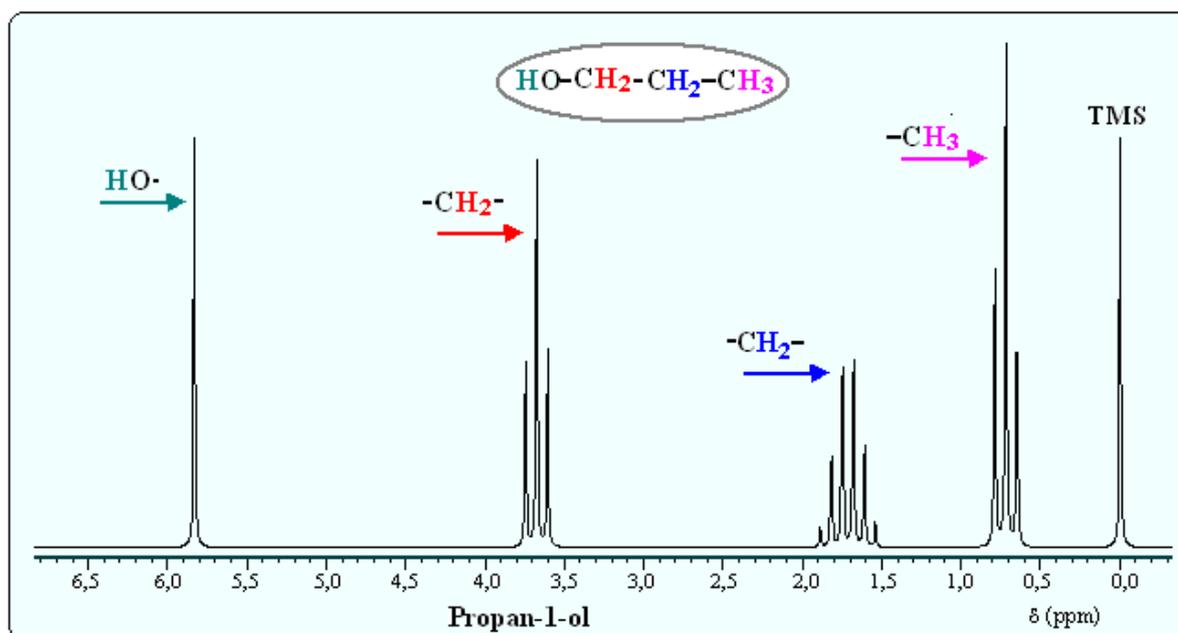


**Figure 63: Spectre RMN <sup>1</sup>H de l'éthanol.<sup>17</sup>**

### Spectre de RMN du propan-1-ol

Concluons sur le spectre du propan-1-ol.

- Singulet  $\delta = 5,8$  ppm (1H) : très déblindé et non couplé (proton de l'hydroxyde)
- Triplet  $\delta = 3,6$  ppm (2H) moyennement déblindé, couplé à 2H équivalents (protons du groupe  $\text{CH}_2$  situé en position  $\alpha$  du groupement  $-\text{OH}$ )
- Multiplet  $\delta = 1,8$  ppm moyennement blindé, couplé à 2H équivalents (protons du groupe  $\text{CH}_2$  situé en position  $\alpha$  du groupement  $-\text{OH}$ ) et à 3H du groupement  $\text{CH}_3$  (proton du  $\text{CH}_2$  situé en position  $\beta$  du groupement  $-\text{OH}$ ).
- Triplet  $\delta = 0,8$  ppm (3H) : blindé, couplé à 2H équivalents (protons du méthyle terminal).<sup>17</sup>



**Figure 64: Spectre RMN  $^1\text{H}$  de propan-1-ol.**<sup>17</sup>

L'effet inductif attracteur du groupe carbonyle (double liaison entre un atome de carbone et un atome d'oxygène) diminue la densité électrique autour du noyau d'hydrogène<sup>17</sup>. Voici quelques valeurs de déplacement chimique :

**Tableau 8: Valeurs de déplacement chimique des différents groupes carbonyle.**<sup>17</sup>

Protons	$\text{H}_3\text{C-CO-}$	$-\text{CH}_2\text{-CO-}$	$\text{H-CO-}$
$\delta$ (ppm)	2	2,5	10

L'exemple suivant concerne la pentan-3-one.

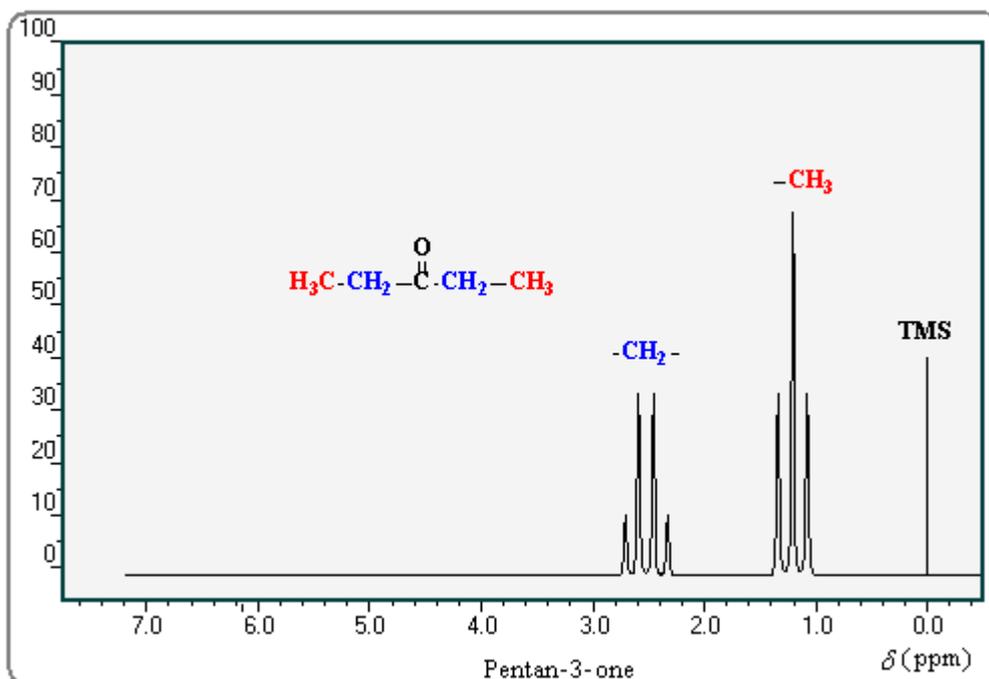


Figure 65: Spectre RMN  $^1\text{H}$  de pentan-3-one. <sup>17</sup>

### Basculement conformationnel :

Le passage d'une conformation chaise à une autre, inverse les positions axiales et équatoriales. A 300K le passage d'une forme à l'autre s'effectue environ 100 000 fois par seconde. <sup>17</sup>

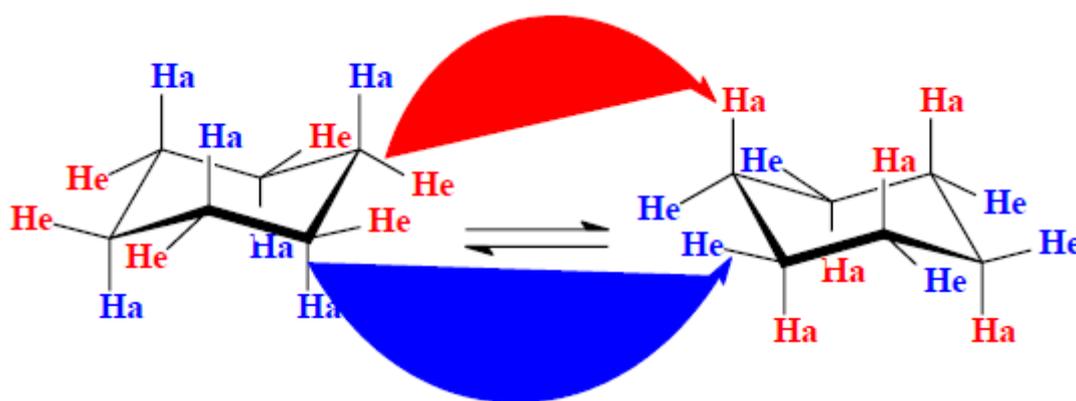
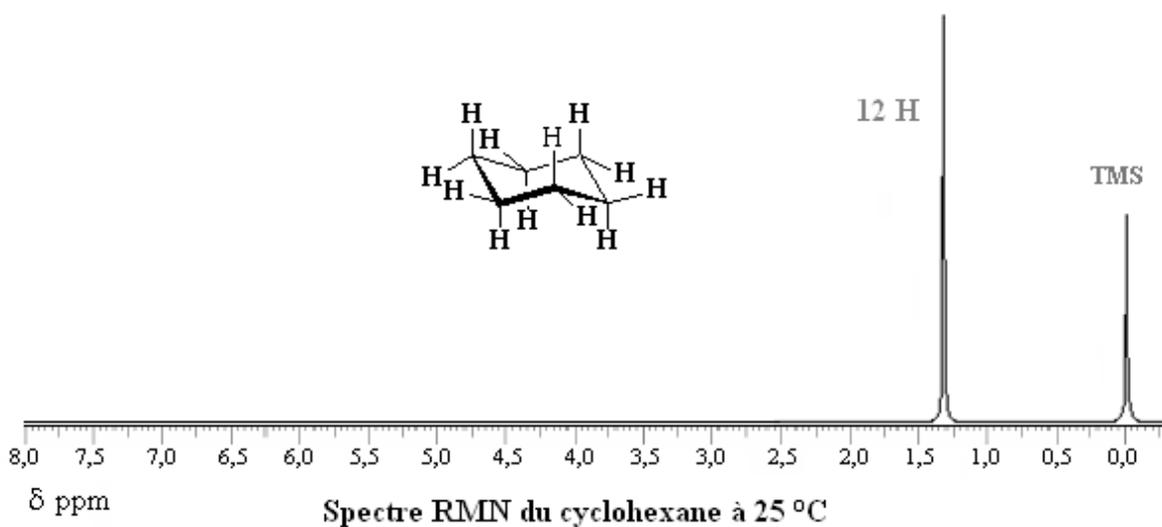


Figure 66: Basculement conformationnel de cyclohexane. <sup>17</sup>

L'allure du spectre RMN du cyclohexane dépend de la température de travail :

- A la température ordinaire, le spectre RMN du cyclohexane donne un signal unique à  $\delta = 1,36$  ppm pour les 12 atomes d'hydrogène car la vitesse d'interconversion entre les positions axiales et équatoriales est très rapide, le spectrographe n'enregistre qu'un signal moyen <sup>17</sup>;



**Figure 67: Spectre RMN <sup>1</sup>H du cyclohexane à 25°C.**

- Lorsque la température diminue, le signal s'élargit et commence à se dédoubler à partir de la température de coalescence (désigne un phénomène où deux choses, naturellement séparées, viennent s'unir de nouveau)  $T_c = - 66,7$  °C, à cette température le basculement conformationnel est suffisamment ralenti pour que le spectrographe distingue les deux catégories d'atomes d'hydrogène. <sup>17</sup>
- A  $- 90$  °C, le basculement conformationnel est bloqué et l'on observe alors deux pics nettement séparés. L'un relatif aux atomes d'hydrogène axiaux à  $\delta = 1,12$  ppm et l'autre, relatif aux atomes d'hydrogène équatoriaux à  $\delta = 1,60$  ppm. <sup>17</sup>

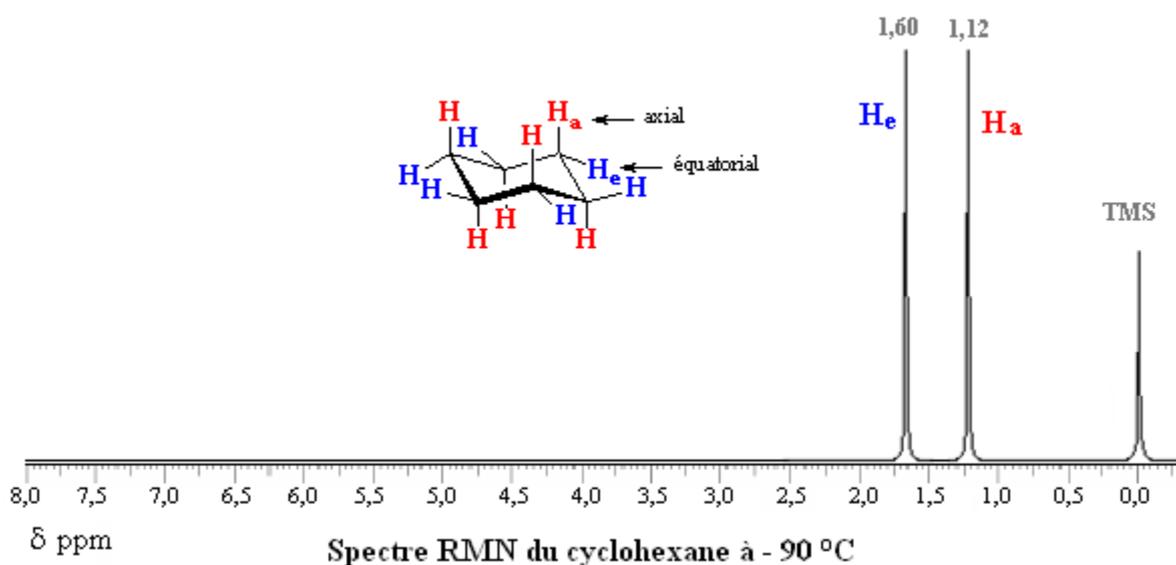


Figure 68: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du cyclohexane à  $-90^\circ\text{C}$ .<sup>17</sup>

**En résumé, nous pourrions extraire d'un spectre RMN de protons les importantes informations suivantes :**

- Le déplacement chimique ( $\delta$ ) d'un pic nous renseigne sur l'environnement chimique du proton (la nature de l'atome lié à l'hydrogène).<sup>17</sup>
- L'intégration des signaux : nombre de  $^1\text{H}$  équivalents.<sup>22</sup>
- La multiplicité (M) (ou nombre) du pic nous renseigne sur le nombre de protons voisins non équivalents couplés (non isolés) par la multiplicité.
- Les constantes de couplage (couplage scalaire, noté J) nous permettent d'attribuer les hydrogènes voisins responsables de la multiplicité d'un pic.<sup>17</sup>

**Tableau des déplacements chimiques  $^1\text{H}$  :**

SPECTROSCOPIE R.M.N.

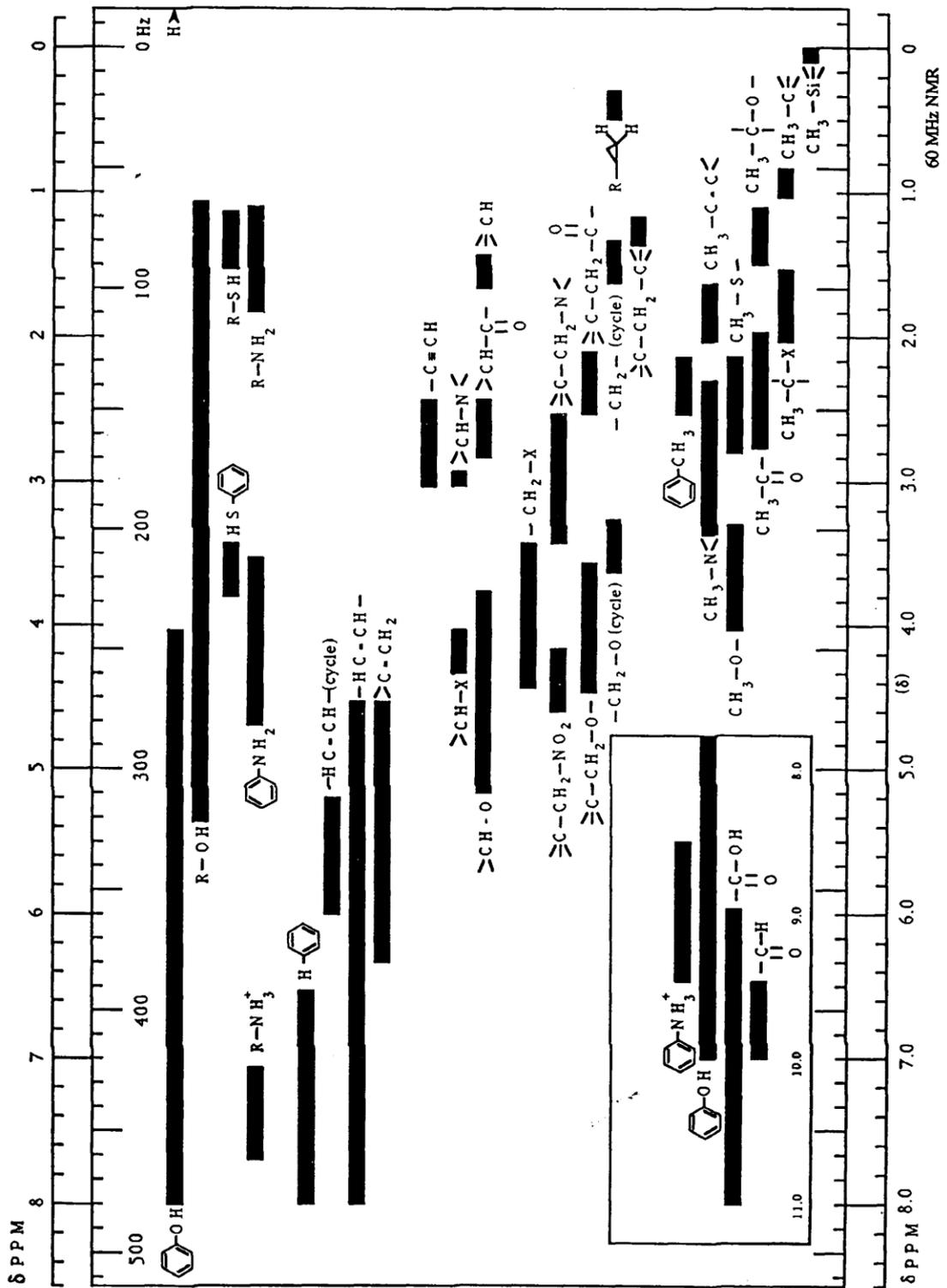


Figure 69: Les déplacements chimiques de  $^1\text{H}$ . <sup>17</sup>

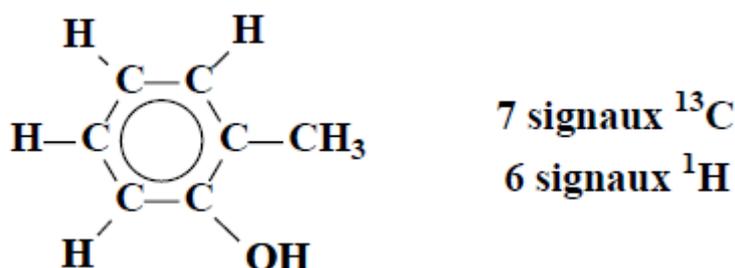
## II.2.B. RMN du Carbone $^{13}\text{C}$ :

Du point de vue théorique elle est identique à celle de la RMN du proton.

$I = \frac{1}{2} \Rightarrow$  deux états. La fréquence d'absorption du  $^{13}\text{C}$  est différente de celle  $^1\text{H}$ , car le rapport géromagnétique ( $\gamma_{^{13}\text{C}} \neq \gamma_{^1\text{H}}$ ) sont différents. <sup>17</sup>

Spectres : les signaux comprenant plusieurs raies à des déplacements chimiques différents ( $\delta_c$ ) à cause de l'environnement. <sup>17</sup>

Exemple :



**Figure 70: La différence entre le nombre des signaux en  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .**

En règle générale, une étude RMN au carbone 13, permet juste de déterminer si l'on a bien un carbone éthylénique ( $\text{C}=\text{C}$ ). Sachant qu'un carbone quaternaire en générale d'intensité plus faible que les autres (c'est à cause de son temps de relaxation). Les déplacements chimiques pour les carbones oléfiniques ( $\text{C}=\text{C}$ ), sont entre 95 et 160 ppm. Par contre pour les alcènes (oléfines  $\text{C}=\text{C}$ ) conjugués les carbones se trouvent entre 140 et 170 ppm. La résonance étant plus faible, les signaux du  $^{13}\text{C}$  sont environ 6000 fois plus faibles que ceux de  $^1\text{H}$ .

La faible abondance des noyaux de  $^{13}\text{C}$ , il est très peu probable qu'un noyau donné possède un voisin  $^{13}\text{C}$  plutôt qu'un voisin  $^{12}\text{C}$ . Il en résulte une absence presque totale de couplage et **les spectres de RMN- $^{13}\text{C}$  ne montrent que des singulets.** <sup>17</sup>

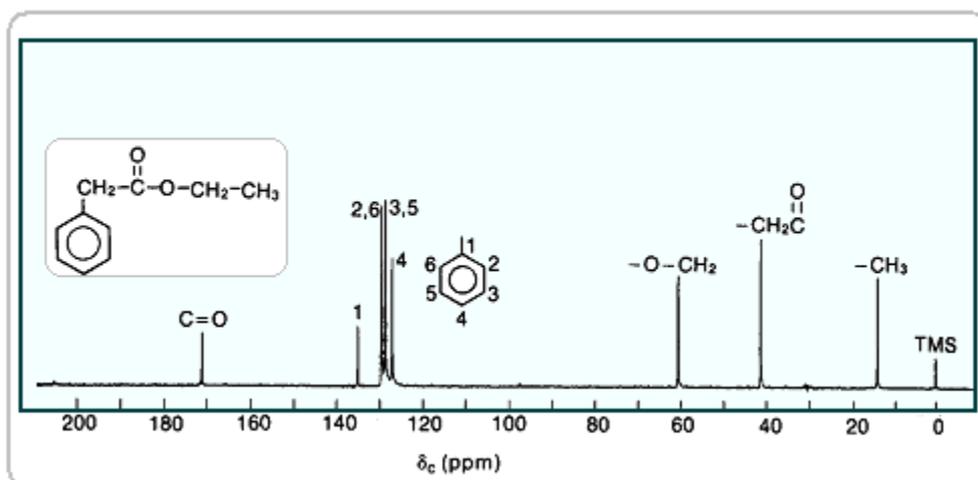


Figure 71: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du phénylacétate d'éthyle. <sup>17</sup>

Tableau des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  :

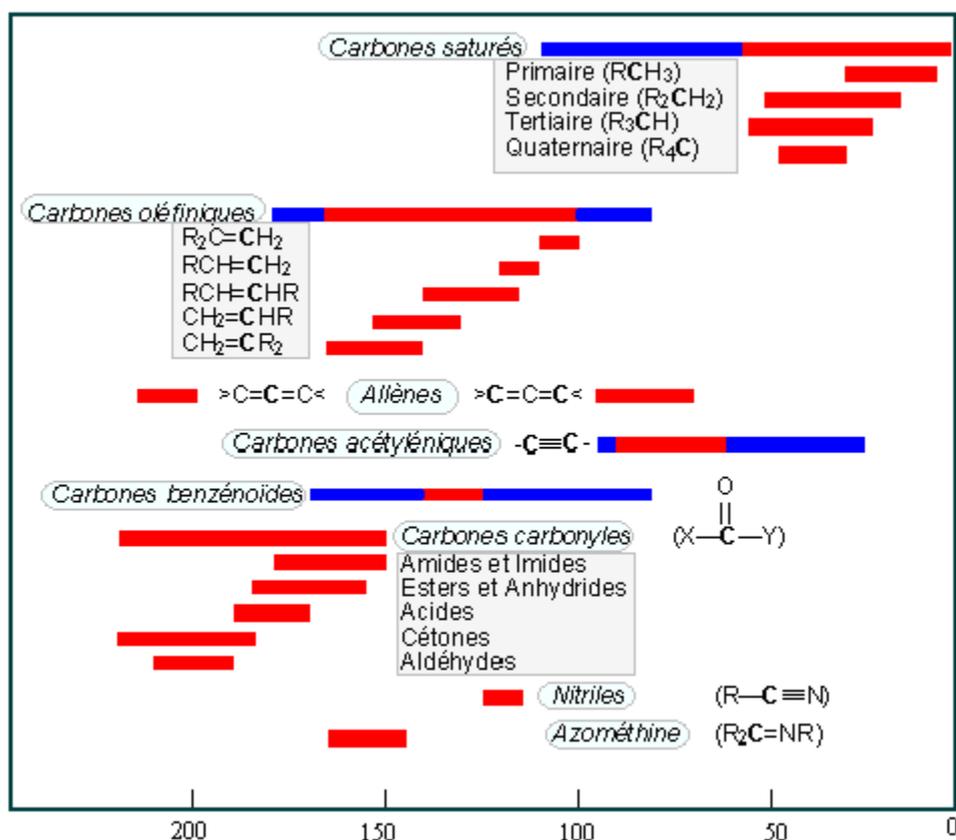


Figure 72: Déplacements chimiques de  $^{13}\text{C}$ . <sup>17</sup>

### III. Paramètres RMN à TF :

En RMN à transformée de Fourier, différents paramètres d'acquisition influencent les résultats et doivent être ajustés et contrôlés.

#### III.a. Largeur d'impulsion $\tau_p$

L'impulsion d'excitation est orientée selon l'axe des x du repère tournant, sa **durée (ou « largeur »  $\tau_p$ )** détermine l'angle de basculement  $\theta$ , et donc l'intensité I du signal de résonance :

$$\theta = \gamma' \cdot B_1 \cdot \tau_p$$

$$M_y = M_0 \cdot \sin \theta$$

La magnétisation observée  $M_y$  est maximale à  $\theta = 90^\circ$ . La durée d'impulsion doit être courte afin que tous les signaux de la fenêtre spectrale SW présentent un degré d'excitation similaire. La magnétisation décroît par suite du processus de relaxation.<sup>10</sup>

#### III.b. Temps mort $t_d$

Le temps mort est l'intervalle de temps séparant **la fin de l'impulsion du début de l'acquisition** ; il répond à des impératifs techniques, mais il faut prendre garde à son influence possible sur l'intensité du signal et la phase du pic. La réduction d'intensité liée au temps mort affecte davantage les signaux à décroissance rapide (qui donnent des raies spectrales larges) que les signaux à décroissance lente (qui donnent des raies spectrales étroites).<sup>10</sup>

#### III.c. Temps d'acquisition $t_{ac}$

Le temps d'acquisition  $t_{ac}$  est en relation avec la fenêtre spectrale (largeur totale de la région observée) et le nombre de données numériques (DP, data points) collectées lors de l'acquisition du signal.

$$t_{ac} = (DP) / (2SW)$$

L'intensité du signal et le rapport signal/bruit atteignent leur maximum lorsque  $t_{ac} \approx 1,2 / (\pi \nu_{1/2})$ ,  $\nu_{1/2}$  étant la largeur à mi-hauteur, mais il convient d'opérer avec un  $t_{ac}$  d'au moins  $5 / (\pi \nu_{1/2})$  pour limiter la distorsion du signal.<sup>10</sup>

### III.d. Temps de répétition $t_r$

Le temps de relaxation spin-réseau  $T_1$  détermine **le temps requis pour le retour de l'aimantation à sa valeur d'équilibre** après une impulsion. Il est possible de réduire le temps de relaxation à l'aide de réactifs spéciaux. Pour les analyses quantitatives, le temps de répétition utilisé doit être fixé en fonction de  $T_1$  et  $\theta$  afin d'éviter les effets de saturation.<sup>10</sup>

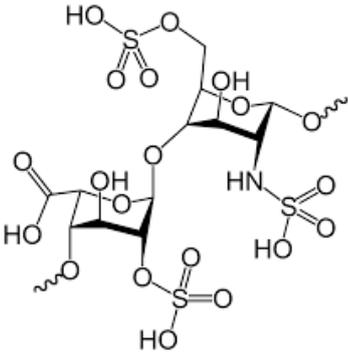
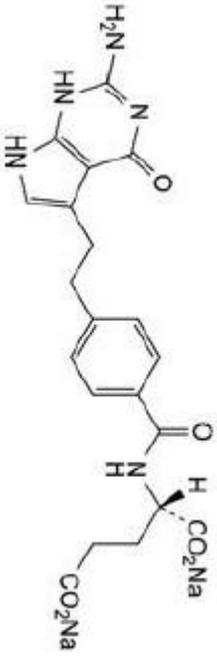
### III.e. Gain de réception

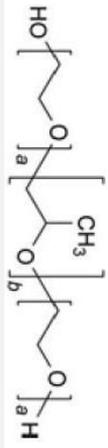
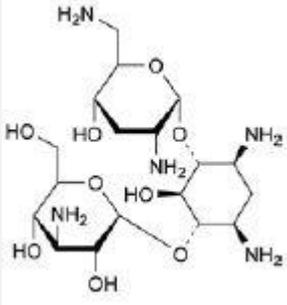
Le signal analogique détecté par la sonde est amplifié avant d'être numérisé et mis en mémoire. **L'amplification**, ou gain de réception, doit être réglée (de façon automatique ou manuelle) de telle sorte que le signal ne sature pas le convertisseur analogique-numérique, ce qui entraîne une distorsion du signal, mais permette au bruit aléatoire généré dans la sonde d'être numérisé (bruit non nul).<sup>10</sup>

## IV. Principes actifs identifiés par RMN selon la Ph. Eur. :

Tableau 9: Principes actifs identifiés par RMN selon la Ph. Eur.<sup>8</sup>

<b>PA :</b>	<b>Composition/ structure :</b>	<b>RMN de :</b>	<b>Méthode :</b>
<b>HUILE DE FOIE DE MORUE D'ÉLEVAGE -poisson-</b>	-Omega 3 type : EPA et DHA. -vitamine A et D 3	RMN de $^{13}\text{C}$	Comparaison des spectres. Les spectres présentent des pics entre 172 ppm et 173 ppm avec des déplacements semblables à ceux présents dans le spectre de la figure 2398.-1 Ph.Eur (voir ci-après : Figure 69).
<b>HÉPARINE CALCIQUE</b>	Sel calcique ou sodique d'un glycosaminoglycane	RMN de $^1\text{H}$	-Comparaison des spectres avec les

<p>et <b>HÉPARINE SODIQUE</b></p>	<p>sulfaté</p> 		<p>spectres des SCR. -Largeur spectrale : 10-12 ppm, centrée sur environ 4,5 ppm.</p>
<p><b>HÉPARINES DE BASSE MASSE MOLÉCULAIRE</b></p>	<p>Sels de glycosaminoglycanes sulfates dont la masse moléculaire relative moyenne en masse est inférieure à 8000 et au moins 60 pour cent de la masse totale a une masse moléculaire relative inférieure à 8000.</p>	<p>RMN de <math>^{13}\text{C}</math></p>	<p>Comparaison : le spectre RMN <math>^{13}\text{C}</math> obtenu est semblable au spectre RMN <math>^{13}\text{C}</math> obtenu avec l'étalon de référence d'héparine de basse masse moléculaire appropriée.</p>
<p><b>PÉMÉTREXED DISODIQUE HEPTAHYDRATÉ</b> É (2S)-2-[[4-[2-(2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)éthyl]benzoyl]amino]pentanedioate de disodium heptahydraté</p>	 <p><math>\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_6, 7\text{H}_2\text{O}</math></p>	<p>RMN de <math>^1\text{H}</math></p>	<p>le spectre RMN <math>^1\text{H}</math> obtenu est qualitativement semblable au spectre RMN <math>^1\text{H}</math> obtenu avec le pémétrexed disodique heptahydraté SCR.</p>

<p><b>POLOXAMÈRES</b></p> <p>Copolymères synthétiques formés d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène.</p>		<p>-</p>	<p>Rapport oxypropylène:oxyéthylène</p>
<p><b>HUILE DE SAUMON D'ÉLEVAGE</b></p> <p>Huile grasse purifiée</p>	<p>somme des teneurs en EPA et DHA (exprimées en triglycérides) : 10,0 pour cent à 28,0 pour cent.</p>	<p>RMN de <sup>13</sup>C</p>	<p>Les spectres présentent des pics entre 172 ppm et 173 ppm avec des déplacements semblables à ceux présents dans le spectre type (figure 1910.-2 Ph. Eur). (voir ci-après : Figure 70)</p>
<p><b>TOBRAMYCINE</b></p> <p>4-O-(3-Amino-3-désoxy-α-D-glucopyranosyl)-2-désoxy-6-O-(2,6-diamino-2,3,6-tridésoxy-α-D-ribohexopyranosyl)-Lstreptamine</p>	 <p><chem>C18H37N5O9</chem></p>	<p>-</p>	<p>Comparaison des spectres : avec tobramycine SCR.</p>

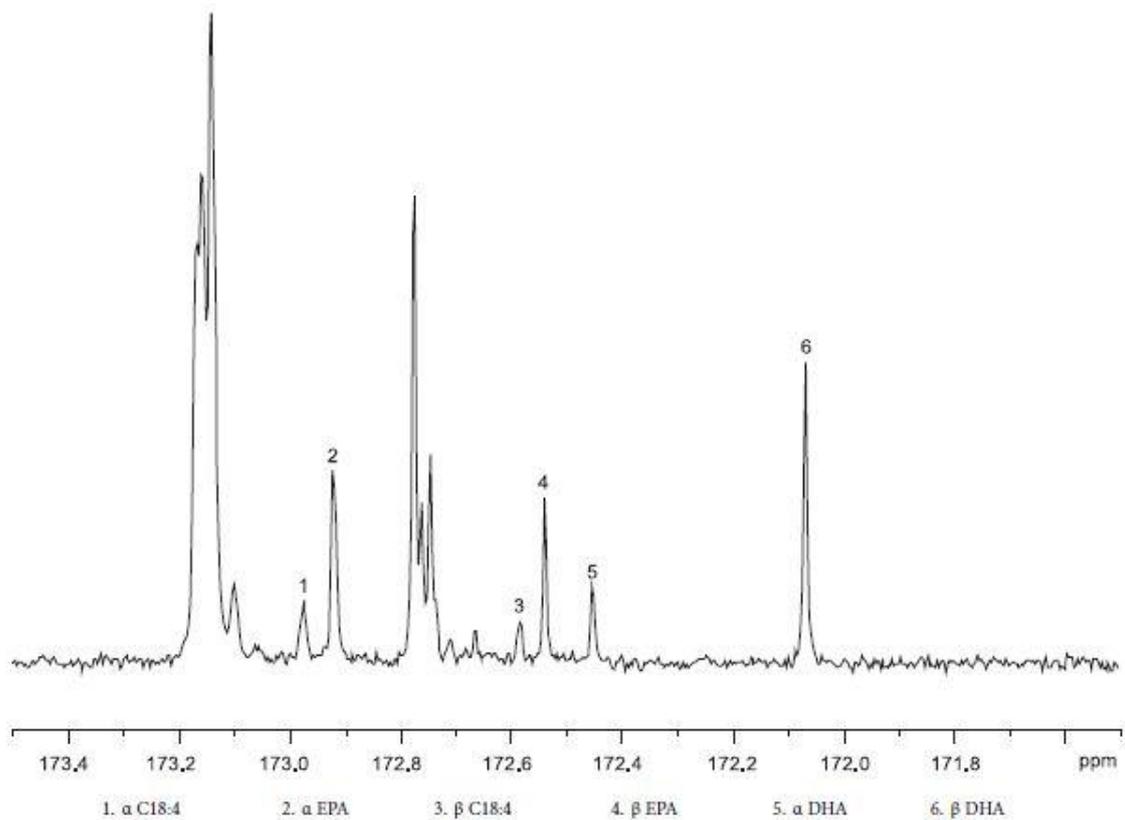


Figure 2398.-1. – Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  : région du carbonyle de l'huile de foie de morue d'élevage

Figure 73: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ : région du carbonyle de l'huile de foie de morue d'élevage.<sup>8</sup>

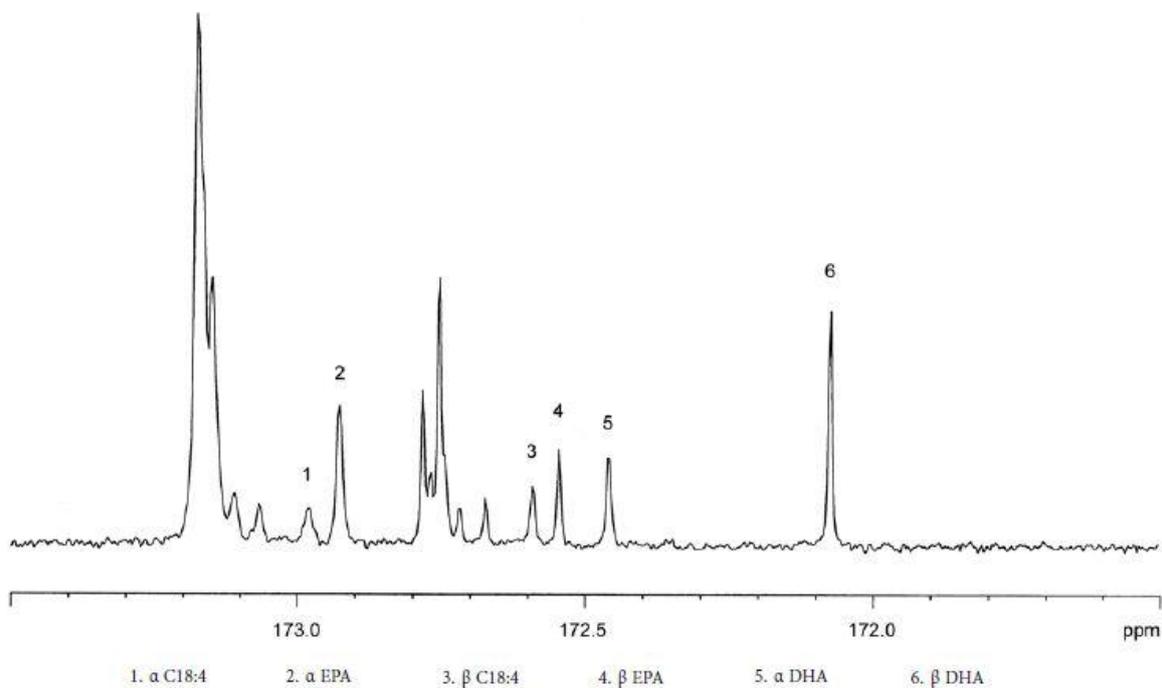


Figure 1910.-2. – Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  : région du carbonyle de l'huile de saumon d'élevage

Figure 74: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  : région du carbonyle de l'huile de saumon d'élevage.<sup>8</sup>

## V- Identification des principes actifs de nature peptidique par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire :

L'approche à suivre est qualitative et consiste à comparer le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'échantillon à analyser avec celui d'un composé de référence, enregistré dans des conditions identiques.

Cette partie s'applique principalement à l'utilisation de la RMN du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) aux fins de confirmation de l'identité des petits peptides (jusqu'à une quinzaine d'acides aminés). Il est également applicable, avec quelques modifications, pour la RMN  $^{13}\text{C}$ . Seule est envisagée la RMN unidimensionnelle. <sup>10</sup>

### V.1. Principes généraux :

#### V.1.a. Appareillage :

Sauf exception justifiée, un spectromètre RMN à intensité de champ permettant d'obtenir une fréquence de travail d'au moins 300 MHz pour la RMN du proton. <sup>10</sup>

#### V.1.b. Conditions d'acquisition spectrale et leur optimisation :

Après introduction de l'échantillon dans l'aimant, il convient de laisser s'établir l'équilibre thermique, en particulier si l'analyse est effectuée à une température significativement différente de la température ambiante ; l'observation du signal du système de stabilisation (**lock signal**) constitue souvent un guide visuel utile pour suivre la progression de ce processus.

La fenêtre spectrale doit couvrir l'intégralité du spectre du peptide, avec une région spectrale vide à chaque extrémité. Une fenêtre spectrale de 12 ppm ou 16 ppm est généralement appropriée. <sup>10</sup>

On peut optimiser les paramètres suivants pour améliorer la résolution des pics caractéristiques : température et/ou pH en premier lieu, concentration du tampon et du peptide. Il est recommandé, mais non obligatoire, d'assurer un contrôle en température de l'échantillon. A défaut, il conviendra de valider l'effet de faibles variations de température sur l'allure du spectre.

Le nombre des données numériques (data points) collectées doit permettre une définition adéquate des pics.<sup>10</sup>

La suppression du solvant n'est pas recommandée mais, si elle est néanmoins utilisée, une validation est nécessaire pour vérifier qu'elle n'affecte pas l'intensité des pics au voisinage de la résonance du solvant, lorsque l'on compare les spectres.<sup>10</sup>

#### **V.1.c. Référence du déplacement chimique :**

Pour les échantillons en solution aqueuse, on peut utiliser comme référence, par exemple, le 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) de sodium, le 3-(triméthylsilyl)propionate (TSP) de sodium ou un analogue deutérié (TSP-d<sub>4</sub>), et on règle souvent le zéro (déplacement chimique de 0 ppm) sur le signal du méthyle.

On peut soit ajouter le composé de référence en quantité appropriée (de l'ordre de 10-100 ppm) à l'eau deutériée utilisée pour dissoudre l'échantillon final, soit utiliser comme référence secondaire une résonance interne systématiquement présente et facile à reconnaître (par exemple l'ion acétate).<sup>10</sup>

Dans ce cas, un spectre de validation obtenu dans les mêmes conditions spectrales sert à définir le déplacement chimique de la référence secondaire.<sup>10</sup>

#### **V.1.d. Taille de l'échantillon :**

Elle est habituellement de quelques milligrammes. Si la taille de l'échantillon varie, il convient de valider les effets de ces variations sur l'allure du spectre.<sup>10</sup>

#### **V.1.e. Préparation de l'échantillon :**

Les échantillons à analyser et les échantillons de référence doivent être comparables en termes de concentration, de pH et de composition du tampon. En règle générale, les échantillons en solution sont lyophilisés puis le lyophilisat est remis en solution dans de l'eau deutériée ou dans un tampon à l'eau deutériée. Il peut être utile de procéder à une ou plusieurs lyophilisations d'une solution dans l'eau deutériée, car l'échange de deutérium qui en résulte permet d'atténuer l'intensité des signaux dus aux solvants ; les impuretés volatiles liées au procédé, comme l'éthanol, disparaissent également. L'emploi d'un tampon pour la préparation de l'échantillon final peut diminuer l'agrégation et améliorer la reproductibilité spectrale en réduisant les variations de pH d'un lot à l'autre. Certaines sondes supportent mal les fortes concentrations salines, mais des forces ioniques allant jusqu'à 200 mM de chlorure

de sodium sont généralement tolérées. Les fortes concentrations salines tendent à accroître la longueur des impulsions à 90°. <sup>10</sup>

## **V.2. Confirmation de l'identité :**

### **V.2.a. Détermination des paramètres spectraux fondamentaux :**

En analyse qualitative, les exigences s'exerçant sur les paramètres spectraux ne sont pas très strictes (on peut, par exemple, appliquer les impulsions avec une fréquence de répétition élevée, puisque la relaxation totale n'est pas nécessaire). L'emploi de largeurs d'impulsion brèves (impulsions de 30° par exemple) et de fréquences de répétition élevées n'a pas d'effet délétère significatif sur les spectres, et permet une acquisition plus rapide avec des rapports signal/bruit acceptables. La largeur d'impulsion et le temps d'acquisition peuvent varier sur un large intervalle sans que soit compromise la possibilité de comparer les spectres. Le nombre de balayages (répétitions) collectés doit permettre d'obtenir un rapport signal/bruit convenable pour les résonances de faible intensité ; un rapport signal/bruit au minimum de 50:1 est par conséquent recommandé. <sup>10</sup>

### **V.2.b. Identification des résonances caractéristiques :**

La comparaison peut porter sur le spectre dans sa totalité, ou sur une portion du spectre. La comparaison des spectres d'échantillons pertinents mettra en évidence les régions ayant un caractère distinctif, et la comparaison pourra ensuite être circonscrite à ces régions. Il est important de définir les résonances correspondant aux impuretés, telles que les solvants résiduels, qui n'ont pas nécessairement de conséquences sur la qualité du produit et peuvent varier en intensité d'un lot à l'autre. <sup>10</sup>

## **V.3. Validation des essais : Identification des peptides par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire :**

Cette partie décrit les procédures à appliquer pour valider les essais prescrits dans les monographies de la Ph. Eur.

Les études de validation doivent notamment porter sur les paramètres suivants.

### V.3.a. Stabilité du processus d'obtention des spectres :

Il s'agit de démontrer que, dans des limites raisonnables, le spectre obtenu est indépendant de la taille de l'échantillon, de son pH, de la température de travail (erreur d'étalonnage ou modifications liées au réétalonnage) ou d'un réglage erroné de certains paramètres d'acquisition spectrale comme la largeur d'impulsion. L'effet de légères variations des procédures de préparation des échantillons (échange de deutérium par exemple) est à considérer également. L'analyse de plusieurs lots différents du produit à examiner est nécessaire pour démontrer la stabilité du processus d'obtention des spectres.<sup>7</sup>

### V.3.b. Spécificité :

Le spectre de l'échantillon à analyser doit être comparé à celui d'autres produits similaires traités sur le même site de fabrication, et cette comparaison doit établir son caractère distinctif et l'existence de différences spectrales manifestes. On peut évaluer les spectres des impuretés potentielles (particulièrement les impuretés spécifiées). Il peut s'agir de formes désamidées, de variantes contenant un « mauvais » énantiomère d'un acide aminé, ou de formes de séquence incorrecte. L'approche à suivre est similaire à celle utilisée pour évaluer la spécificité des essais d'identification par chromatographie.<sup>7</sup>

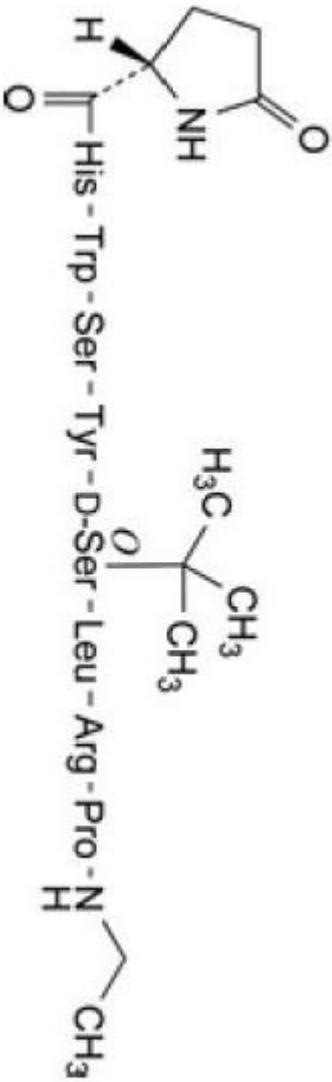
### V.3.c. Autres facteurs de variabilité :

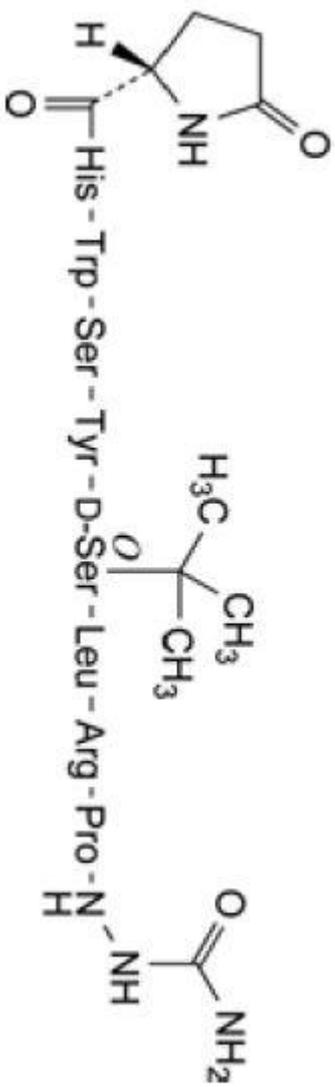
- la variabilité liée à l'opérateur, normalement faible, doit être confirmée si plusieurs opérateurs doivent effectuer l'essai,
- la dérive temporelle du spectromètre, probablement négligeable.<sup>7</sup>

## VI-Principes actifs de nature peptidique identifiés par RMN selon la Ph. Eur. :

**Tableau 10: Principes actifs de nature peptidique et leurs méthodes d'identification par RMN selon la Ph. Eur.**<sup>8</sup>

<b>PA :</b>	<b>Structure :</b>	<b>RMN de :</b>	<b>Méthode :</b>
-------------	--------------------	---------------------	------------------

<p><b>BUSÉRÉLINE</b>  <b>5-Oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-O-(1,1-diméthyléthyl)-D-séryl-L-leucyl-L-arginyl-N-éthyl-L-prolinamide.</b></p> <p><b>( Nonapeptide synthétique analogue de la GnRH, l'hormone humaine stimulant la libération de gonadotrophine. La buséréline possède une activité agoniste vis-à-vis de la gonadoréline. Elle est obtenue par synthèse chimique et existe sous forme d'acétate.)</b></p>		<p>RMN de <math>^1\text{H}</math></p>	<p>examinez le spectre RMN<math>^1\text{H}</math> entre 0 et 9 ppm.  Le spectre RMN <math>^1\text{H}</math> obtenu est qualitativement semblable au spectre RMN <math>^1\text{H}</math> obtenu avec la buséréline SCR.</p>
<p><math>\text{C}_{60}\text{H}_{86}\text{N}_{16}\text{O}_{13}</math></p>			

<p><b>GOSÉRÉLINE</b>  <b>1-Carbamoyl-2-[5-oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-O-(1,1-diméthyléthyl)-D-séryl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl]hydrazine.</b></p> <p>( Nonapeptide synthétique analogue de la gonadoréline, un décapeptide hypothalamique. La goséréline est obtenue par synthèse chimique et existe sous forme d'acétate.)</p>	 <p style="text-align: center;"><math>C_{59}H_{84}N_{18}O_{14}</math></p>	<p>RMN de <math>^1H</math></p>	<p>examinez le spectre RMN <math>^1H</math> entre 0 ppm et 9 ppm. Le spectre RMN <math>^1H</math> obtenu est qualitativement similaire au spectre RMN <math>^1H</math> obtenu avec la goséréline SCR.</p>
---	---	--------------------------------	---

## VII-Quelques complications d'identification des PA par RMN et les solutions :

La RMN du  $^{13}C$  a un certain nombre de complications qui ne sont pas rencontrées en RMN du proton. Notamment, la RMN du  $^{13}C$  est beaucoup moins sensible, puisque l'abondance naturelle est faible et que le carbone 13 est intrinsèquement moins sensible (la sensibilité de  $^{13}C$  est que 1,6% de celle de  $^1H$ ). Le nombre quantique de spin (spin) est de 1/2 (comme  $^1H$ ). En outre, le rapport gyromagnétique  $\gamma$  est seulement 1/4 de celui du proton ( $\gamma_{^1H}=26,753 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$  par contre  $\gamma_{^{13}C}=6,728 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), ce qui réduit encore la

sensibilité (à  $B_0$ ) ainsi, La fréquence d'absorption du  $^{13}\text{C}$  est différente de celle  $^1\text{H}$  « elle est plus faible », car ( $\gamma_{1\text{H}} \neq \gamma_{13\text{C}}$ ). La sensibilité relative à celle du proton est de 4 ordre de grandeur plus faible <sup>24</sup>.

Rappelons que : 
$$\nu = (\gamma/2\pi) \cdot B_0$$

les signaux du  $^{13}\text{C}$  sont environ 6000 fois plus faibles que ceux de  $^1\text{H}$ . <sup>17</sup>

Une autre difficulté potentielle est la présence de fort couplage scalaire J avec les protons des hydrogènes liés (typiquement  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  110 à 320 Hz). Des techniques de découplage permettent cependant de supprimer les chevauchements des multiplets des résonances liées à ces couplages <sup>24</sup>.

Une fois ceci réalisé, les spectres de RMN du carbone 13, présentent des raies uniques puisque les couplages entre différents  $^{13}\text{C}$  sont pratiquement inexistant compte tenu de la faible abondance naturelle. <sup>17</sup>

Avec 1,1 % (0,011) d'abondance naturelle, la probabilité pour qu'un autre atome de  $^{13}\text{C}$  soit lié varie entre 1 et 4 (nombre de liaison de carbone) fois  $0,011^2$  soit entre 1,2 et 4,8 pour 10 000 ! (par simple calcul)

Il faut alors adapter la mesure pour compenser cette faible abondance : **augmenter la concentration (besoin d'une quantité plus grandes de la substance à analyser) ; augmenter le temps de mesure ; appareils plus précis.** <sup>24</sup>

Ainsi, comme l'hydrogène  $^1\text{H}$  (proton) est un élément très répandu, la résonance magnétique de l'hydrogène (dite aussi RMN du proton) est une des plus utilisées.

**Tableau 11: Isotopes identifiés par RMN et leurs caractéristiques.** <sup>17</sup>

Isotope	Abondance Naturelle %	Spin I ( $h/2\pi$ )	Fréquence RMN (MHz) $B_0 = 23,5\text{k Gauss}$	Sensibilité relative
$^1\text{H}$	99,98	$\frac{1}{2}$	100	1
$^2\text{H}$	0,016	1	15,35	0,01
$^{13}\text{C}$	1,108	$\frac{1}{2}$	25,19	0,016

$^{14}\text{N}$	99,63	1	7,22	0,001
$^{15}\text{N}$	0,37	$\frac{1}{2}$	10,1	0,001
$^{15}\text{F}$	100	$\frac{1}{2}$	94,08	0,83

# **Conclusion générale**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale (analyse qualitative), mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance.

L'analyse qualitative ou bien l'identification des principes actifs par RMN peut être réalisée selon deux méthodes :

- Identification des principes actifs par comparaison des spectres RMN en utilisant une SCR où on peut utiliser le coefficient de corrélation.
- Identification des principes actifs en démontrant la structure de la molécule à partir de son spectre RMN.

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur.

C'est la meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie Infrarouge (spectroscopie IR : permet de identifier la présence de certaines fonctions chimiques ou certains types de liaisons) et de la spectrométrie de masse (SM : méthodes permettant d'identifier la formule brute de la molécule), elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. Elle est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux.

Les spectromètres RMN tel un 950 MHz sont souvent localisés dans les laboratoires de recherche pour la détermination de la structure moléculaire complexe des nouveaux produits chimiques synthétiques ou médicaments éventuels, mais il existe d'autres appareils (spectromètre RMN 200 MHz par exemple) de mise en œuvre simplifiée faisant appel au même phénomène pour des applications de routine, par exemple la simple confirmation de l'identité d'un PA.

# **Références bibliographiques**

# Références bibliographiques

---

1. Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire Loi n° 18-11.
2. Alain Le Hir, Jean-Claude Chaumeil, Denis Brossard : « Pharmacie galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments » 9<sup>e</sup> édition, MASSON, Paris 2009.
3. O.Benaziz, « Développement d'un médicament » Cours Pharmacie industrielle, Université de Blida 1, 5<sup>e</sup> année pharmacie, 2019-2020.
4. Isabelle Claverie, Hélène Hedde : « Pharmacologie générale Toxicologie mécanismes fondamentaux » 2<sup>e</sup> édition, Wolters Kluwer, France 2008.
5. Heinz Lullmann, Klaus Mohr, Albrecht Ziegler : « Atlas de poche de pharmacologie » 2<sup>e</sup> édition, Flammarion, Paris 1998.
6. Encyclopédie Encarta 2008.
7. Guide technique pour L'ELABORATION DES MONOGRAPHIES, Pharmacopée Européenne, 7<sup>e</sup> Edition, EDQM, 2015.
8. Pharmacopée Européenne 8<sup>e</sup> édition Tome II.
9. Guide de rédaction de la Pharmacopée Européenne, EDQM, 2017.
10. Pharmacopée Européenne 8<sup>e</sup> édition Tome I.
11. Francis Rouessac, Annick Rouessac, Daniel Cruché : « ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes » 6<sup>e</sup> édition , DUNOD, Paris 2004.
12. Dr. L.Azzouz : « Contrôle qualité matière première/produit fini », Cours de pharmacie industrielle Université Blida 1, 2020.

13. Daniel Canet, Jean-Claude Boubel, Emmanuelle Canet-Soulas : « La RMN Concepts, méthodes et applications » 2<sup>e</sup> édition, Dunod, Paris 2002.
14. Dominique Gennet : « Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) », culturesciences.chimie.ens.fr, Paris 2002.
15. John Lynch : « Analyse physico-chimique des catalyseurs industriels. Manuel pratique de caractérisation », Editions TECHNIP, Paris 2001.
16. <https://irmage.univ-grenoble-alpes.fr/equipements/metabolomique-rmn/spectroscopie-rmn-hrmas> , « RMN de rotation à l'angle magique ».
17. Smain HOCINE : « Méthodes d'analyse spectroscopique en chimie organique UV-Visible, IR, RMN, Spectroscopie de masse, RPE », Office des publications universitaires, 2017.
18. <https://www.researchgate.net/>, « Principe simplifié d'un RMN de paillasse impulsif et à TF »
19. Cours RMN : Bases de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), ESPCI Paris (L'École supérieure de physique et de chimie industrielles).
20. Yadolah Dodge : « Premiers pas en statistique », Springer, Paris 2006.
21. <https://fr.khanacademy.org/math/>, « Figures : Exemples des différentes corrélations possibles »
22. Schott, Valentin, Magadur, Clede, Lefevre, Altmayer-Henzien : « Chimie PCSI/MPSI - 1<sup>ère</sup> année Tout-en-un » 1<sup>re</sup> édition, De Boeck Supérieur, Louvain-la-Neuve 2014.
23. Nicolas Rabasso : « Chimie organique: Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques » 3<sup>e</sup> édition, De Boeck Supérieur, Louvain-la-Neuve 2020.
24. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle : « Spectrometric Identification of Organic Compounds » Seventh edition, John Wiley and Sons Inc, United States of America 2005.

25. The United States Pharmacopeia USP 43 - NF 38.
  
26. René Lafont, « Techniques spectroscopiques : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) », ([www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)), Biologie et Multimédia - Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie.
  
27. Everett Schreiber « Installation Planning Guide Varian, Inc. NMR Systems », Varian, Inc, California 2005.
  
28. Eamonn Butler « BURKER AVANCE - Génération de fréquence SGU - Guide du débutant » version 003, BRUKER BIOSPIN, 2004.

**Résumé :**

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans des divers secteurs notamment le domaine pharmaceutique.

Le présent travail vise à explorer les différentes méthodes d'identification des principes actifs et en particulier la spectroscopie RMN qui peut être utilisée à des fins d'analyse quantitative ou qualitative (analyse structurale). L'étude de cette technique spectroscopique a permis de conclure que l'identification des PAs par RMN à transformée de Fourier se fait principalement : soit par la comparaison de spectre de la substance à examiner (PA) avec le spectre d'une SCR où on peut utiliser le coefficient de corrélation qui est considéré comme outil mathématique de comparaison, soit par l'élucidation de la structures de PA en démontrant que le spectre RMN d'une substance est intégralement compatible avec la structure déclarée du composé.

**Mots clés :** PA ; La résonance magnétique nucléaire ; Spectroscopie ; SCR.

**Abstract:**

Nuclear magnetic resonance or NMR is a versatile spectroscopic method that is irreplaceable in various sectors, in particular the pharmaceutical field.

This work aims to explore the different active pharmaceutical ingredient API identification methods and in particular NMR spectroscopy which can be used for quantitative or qualitative analysis (structural analysis). The study of this spectroscopic technique allowed to conclude that the identification of APIs by Fourier transform NMR is done mainly: either by comparing the spectrum of the substance to be examined (API) with the spectrum of a Chemical Reference Substance CRS where we can use the correlation coefficient which is considered as a mathematical tool for comparison, or by elucidating the structure of the active pharmaceutical ingredient API by demonstrating that the NMR spectrum of the substance is fully compatible with the declared structure of the compound.

**Keywords:** API; Nuclear magnetic resonance; Spectroscopy; CRS.