

Chimie analytique

↳ Analyses

- qualitative ↔ identification
- quantitative ↔ dosage

↳ Différents niveaux du circuit du médicament

- Contrôle des matières premières
- Contrôle du produit fini
- R&D : pKa, logP...



UFR Pharmacie - Rennes

Méthodes spectrales : spectrophotométrie

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Nicolas GOUAULT/ UFR Pharmacie / Rennes

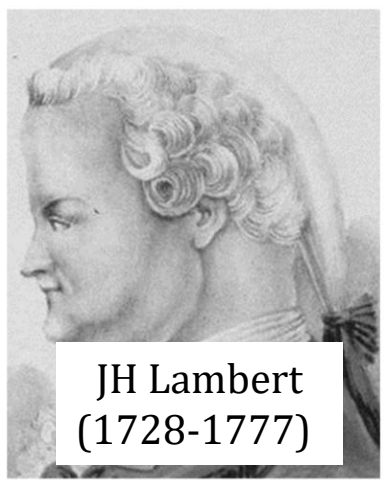
Acidimétrie

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Marylène CHOLLET-KRUGLER/ UFR Pharmacie / Rennes



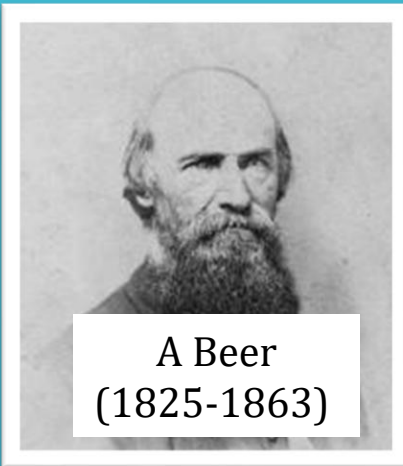
UFR Pharmacie - Rennes

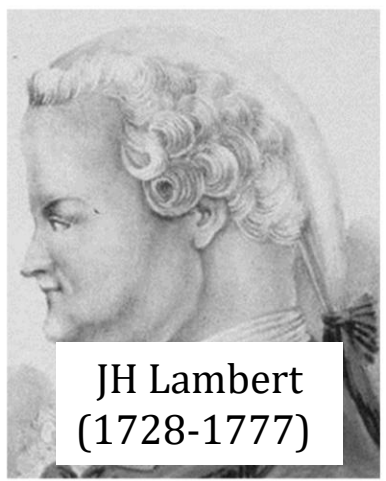


Spectrophotométrie

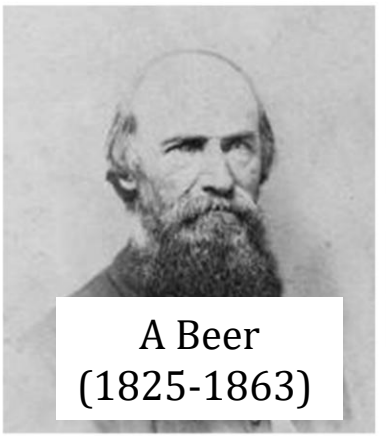
Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

- Introduction
- Absorption moléculaire : spectrophotométrie UV-visible
- Absorption atomique
- Infra - Rouge (N. Gouault)





JH Lambert
(1728-1777)



A Beer
(1825-1863)

Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

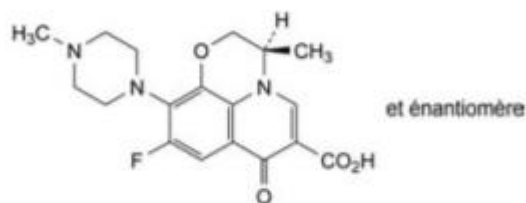
- **Introduction**
- Absorption moléculaire : spectrophotométrie UV-visible
- Absorption atomique

Spectrophotométrie dans la pharmacopée



OFLOXACINE

Ofloxacinum



$C_{18}H_{20}FN_3O_4$
[82419-36-1]

M_r 361,4

DÉFINITION

Acide (3*RS*)-9-fluoro-3-méthyl-10-(4-méthylpipérazin-1-yl)-7-oxo-2,3-dihydro-7*H*-pyrido[1,2,3-*de*][1,4]benzoxazine-6-carboxylique.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline jaune pâle ou jaune vif.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acide acétique glacial, peu soluble ou soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans le méthanol.

IDENTIFICATION

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

01/2021:1455 examiner, puis complétez à 50 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec le mélange de solvants.

Colonne :

- dimensions : $l = 0,15$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,
- phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R (3 μ m),
- température : 38 °C.

Phase mobile :

- phase mobile A : acétonitrile pour chromatographie R, solution tampon (16:84 V/V),
- phase mobile B : méthanol R1, acétonitrile pour chromatographie R, solution tampon (20:30:50 V/V/V),

| Intervalle (min) | Phase mobile A (pour cent V/V) | Phase mobile B (pour cent V/V) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 - 5 | 100 | 0 |
| 5 - 10 | 100 → 82 | 0 → 18 |
| 10 - 15 | 82 → 40 | 18 → 60 |
| 15 - 30 | 40 | 60 |

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 294 nm et, pour l'impureté A, à 240 nm.

Injection : 10 μ L.

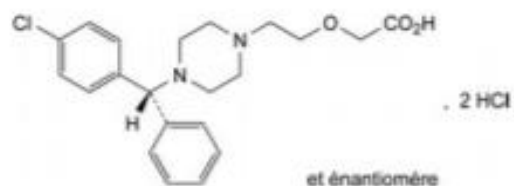
Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier le pic dû à l'impureté A ; utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier les pics dus aux impuretés D et E.

Rétention relative par rapport à l'ofloxacin (temps de rétention = environ 10 min) : impureté D = environ 0,7 ;

Pharmacopée :
IR : analyse qualitative (identification)
UV : analyse quantitative (dosage)

CÉTIRIZINE (DICHLORHYDRATE DE)

Cetirizini dihydrochloridum



$C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$
[83881-52-1]

M_r 461,8

DÉFINITION

Dichlorhydrate d'acide (RS)-2-[2-[4-[(4-chlorophényl)phényl-méthyl]pipérazin-1-yl]éthoxy]acétique.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 10.0

Cétirizine (dichlorhydrate de)

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.

IDENTIFICATION

Première identification : B, D.

Seconde identification : A, C, D.

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

Solution à examiner. Dissolvez 20,0 mg de dichlorhydrate de cétirizine dans 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique R à 10,3 g/L et complétez à 100,0 mL avec le même acide. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec une solution d'acide chlorhydrique R à 10,3 g/L.

Région spectrale : 210-350 nm.

Maximum d'absorption : à 231 nm.

Absorbance spécifique au maximum d'absorption : 359 à 381.

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

Comparaison : dichlorhydrate de cétirizine SCR.

Solution témoin (b). Prélevez 1,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (c). Dissolvez le contenu d'un flacon de cétirizine pour identification des pics SCR (contenant les impuretés B, C, D, E et F) dans 5,0 mL de phase mobile.

Colonne :

– *dimensions* : $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,

– *phase stationnaire* : gel de silice pour chromatographie R (5 μ m).

Phase mobile : acide sulfurique dilué R, eau R, acétonitrile R (0,4:6,6:93 V/V/V).

Débit : 1 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 230 nm.

Injection : 20 μ L.

Enregistrement : 3 fois le temps de rétention de la cétirizine.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme fourni avec la cétirizine pour identification des pics SCR et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier les pics dus aux impuretés B, C, D, E et F, utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour identifier le pic dû à l'impureté A.

Pharmacopée :

IR et UV : analyse qualitative

Molécule caractérisée par λ_{\max} et ϵ

A propos du rayonnement électromagnétique

Onde électromagnétique

- une composante magnétique \Rightarrow RMN
- une composante électrique \Rightarrow phénomènes de transmission, réflexion, réfraction et absorption.

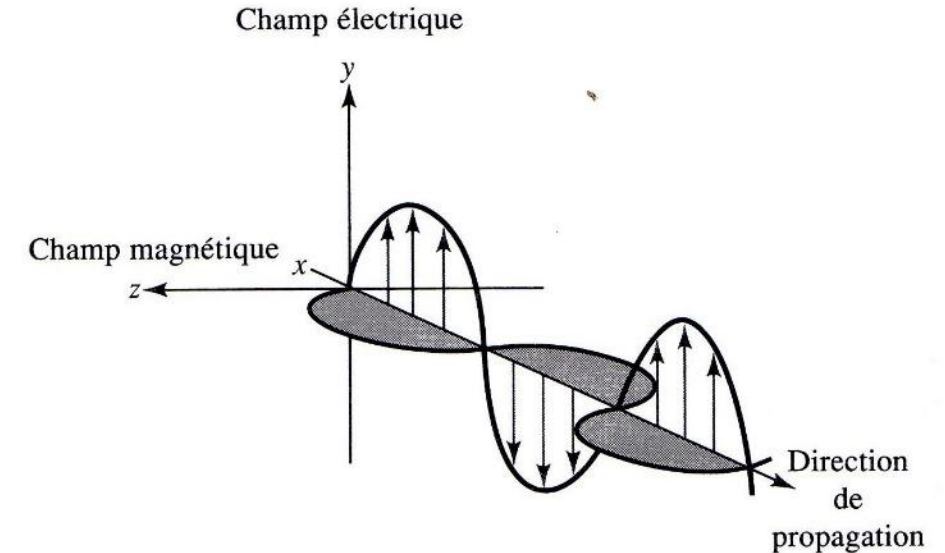
- permet de transporter de l'énergie dans le vide

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

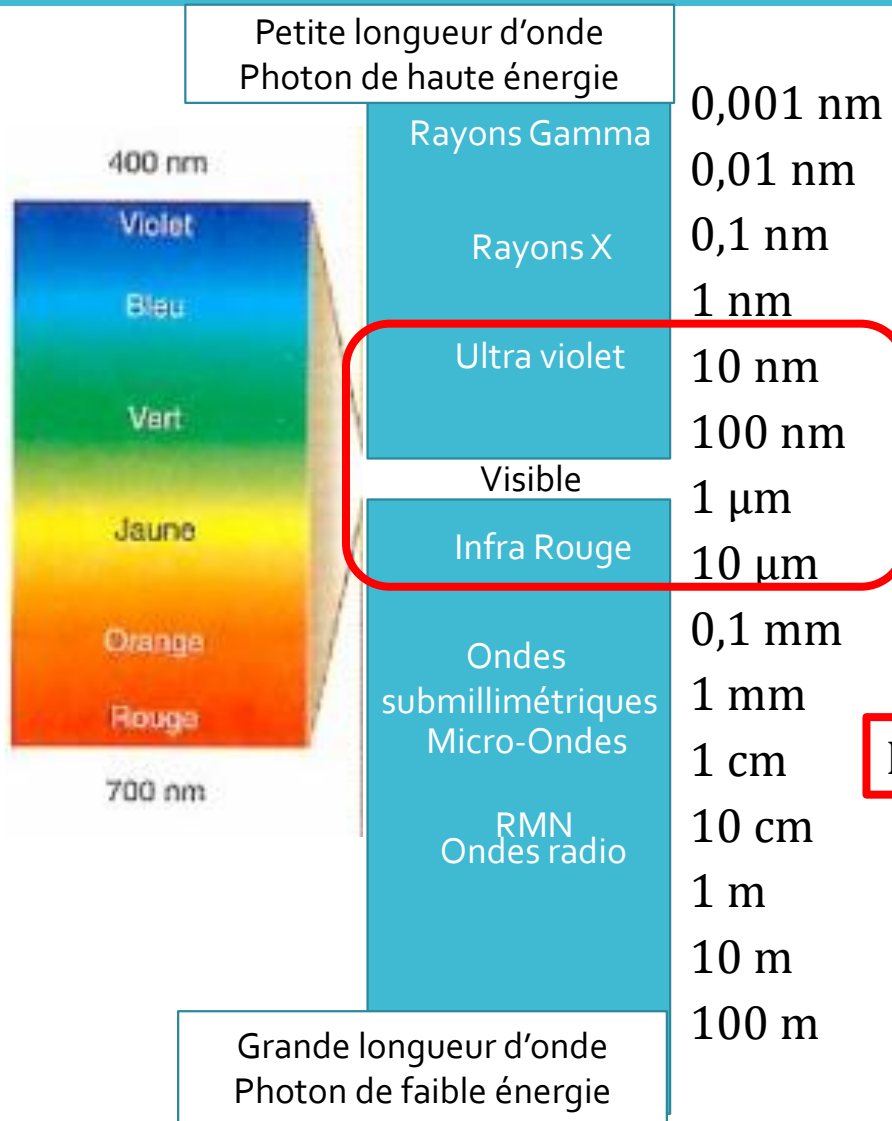
h = constante de Planck = $6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s

c = vitesse de la lumière = $3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹

λ = longueur d'onde en m



Spectre électromagnétique



Le rayonnement est classé dans différents domaines en fonction des longueurs d'onde ou niveau d'énergie

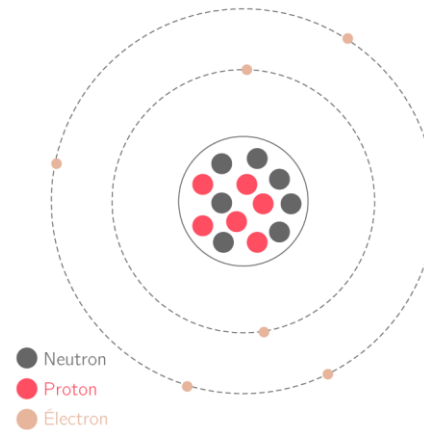
Ex : Ultra violet entre 200 et 400 nm
Visible entre 400 et 800 nm.

Méthodes étudiées

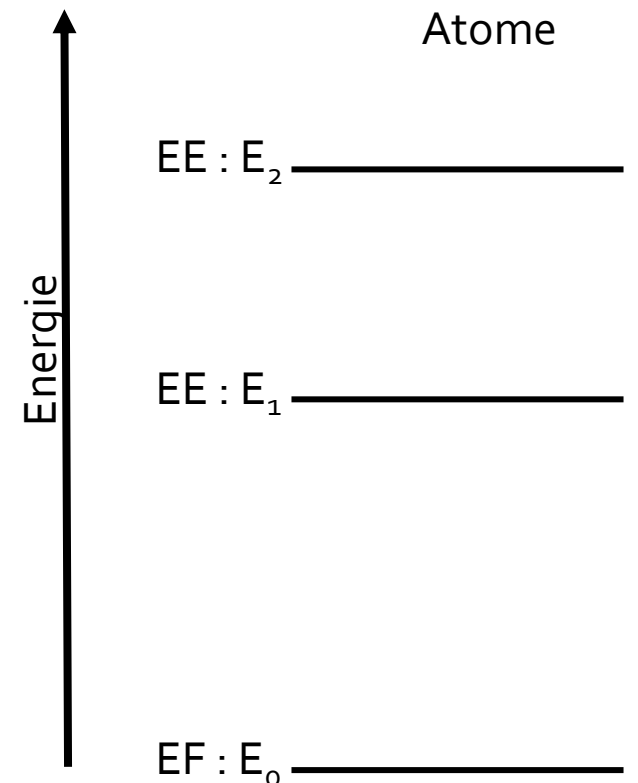
A propos de l'énergie à l'échelle atomique

Matière = assemblage de particules élémentaires = non continue

⇒ énergie non continue = valeurs discrètes.



Les électrons sont répartis sur des niveaux d'énergie quantifiés, répartis les uns par rapport aux autres sur une échelle d'énergie



A propos de l'énergie à l'échelle moléculaire

Molécule : mise en commun d'électrons \Leftrightarrow liaisons entre atomes + formation l'orbitales moléculaires

L'énergie totale propre d'une molécule peut se mettre sous la forme de la somme suivante : $E = E_{\text{élec}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}}$

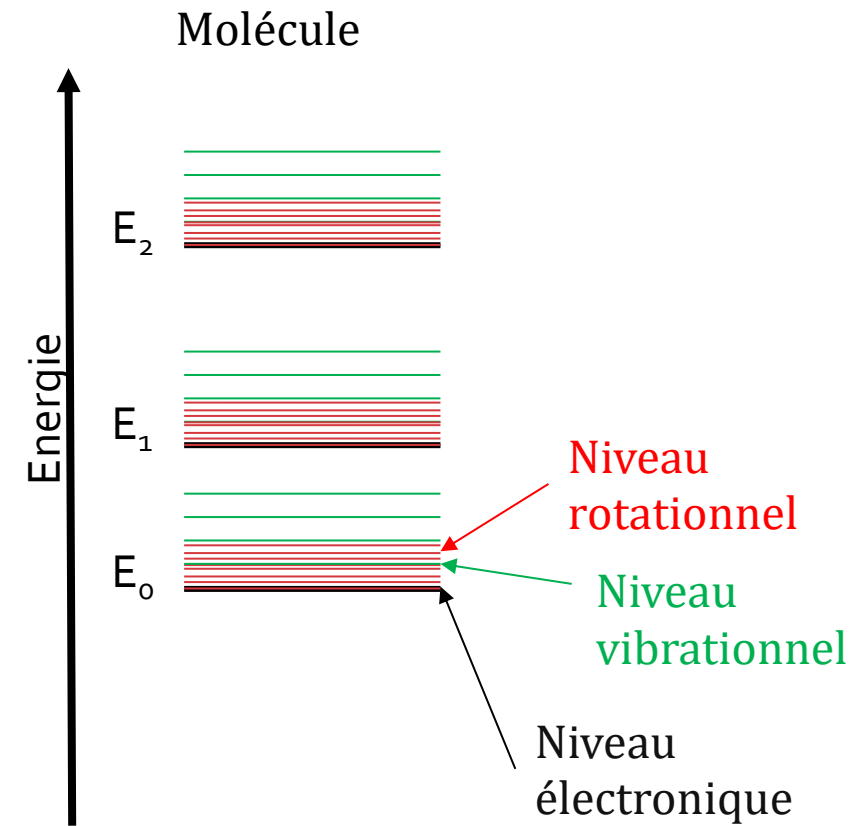
Avec $E_{\text{élec}}$: énergie électronique \Leftrightarrow mouvements des e- des OM

E_{vib} : énergie vibrationnelle \Leftrightarrow modes de vibrations des liaisons moléculaires

E_{rot} : énergie rotationnelle \Leftrightarrow modes de rotation des molécules autour de leur centre de gravité

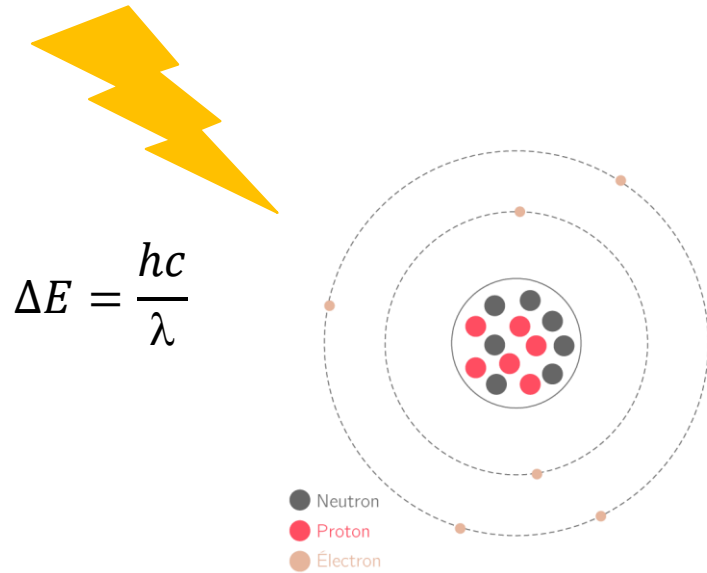
Etat d'Énergie quantique = niveaux quantifiés

$$E_{\text{élec}} = 10 \quad E_{\text{vib}} = 100 \quad E_{\text{rot}}$$



Disposition relative des niveaux énergétiques

Effet d'une onde électromagnétique sur l'édifice atomique

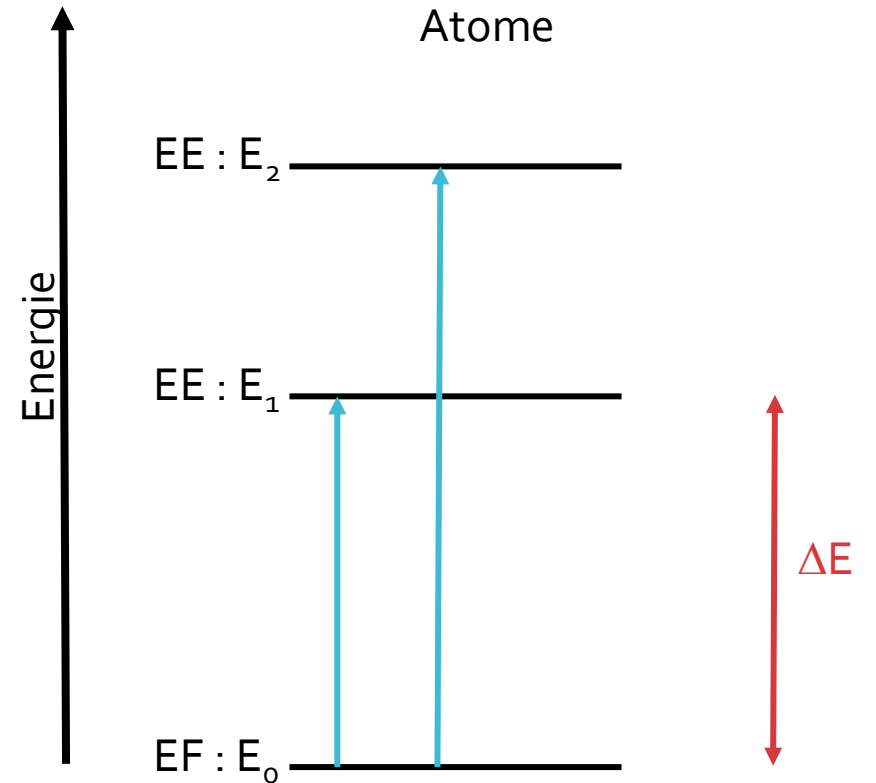


Réaction de l'atome face à l'apport d'énergie ?

Modification de l'énergie de l'édifice si l'énergie apportée est suffisante pour passer d'un niveau à un autre

⇒ Excitation des électrons : Niveau d'énergie fondamentale (EF) à niveau d'état excité (EE)

↳ Il y a absorption de l'énergie



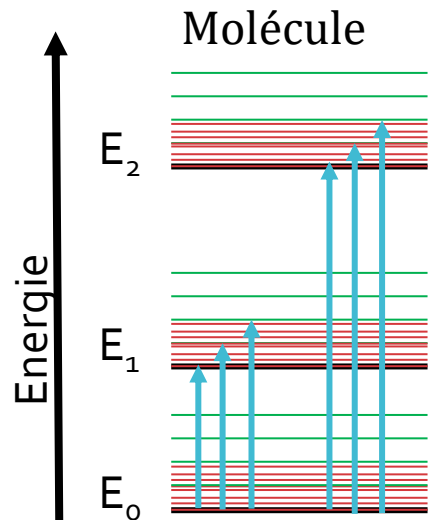
Effet d'une onde électromagnétique sur l'édifice moléculaire

PASS – LAS / Pharmacie

Réaction de la molécule face à l'apport d'énergie ?

Effet si ΔE correspond à transition permise :

- Si ΔE dans le domaine IR : transitions roto-vibrationnelles
- Si ΔE dans le domaine UV-vis : transitions électroniques auxquelles peuvent d'ajouter des transitions roto-vibrationnelles



| | Transition électronique | Transition vibrationnelle |
|--|-------------------------|---------------------------|
| Ordre de grandeur de ΔE (en eV) | 1 - 10 | 0,1 - 1 |
| Ordre de grandeur de ΔE (en kJ.mol^{-1}) | 100 - 1000 | 10 - 100 |
| Longueur d'onde du rayonnement | 200 - 800 nm | 1 μm |
| Domaine spectral | UV - Visible | Infrarouge |

L'énergie apportée par la radiation $E = \frac{hc}{\lambda}$ permet de passer d'un E_1 à un niveau E_2

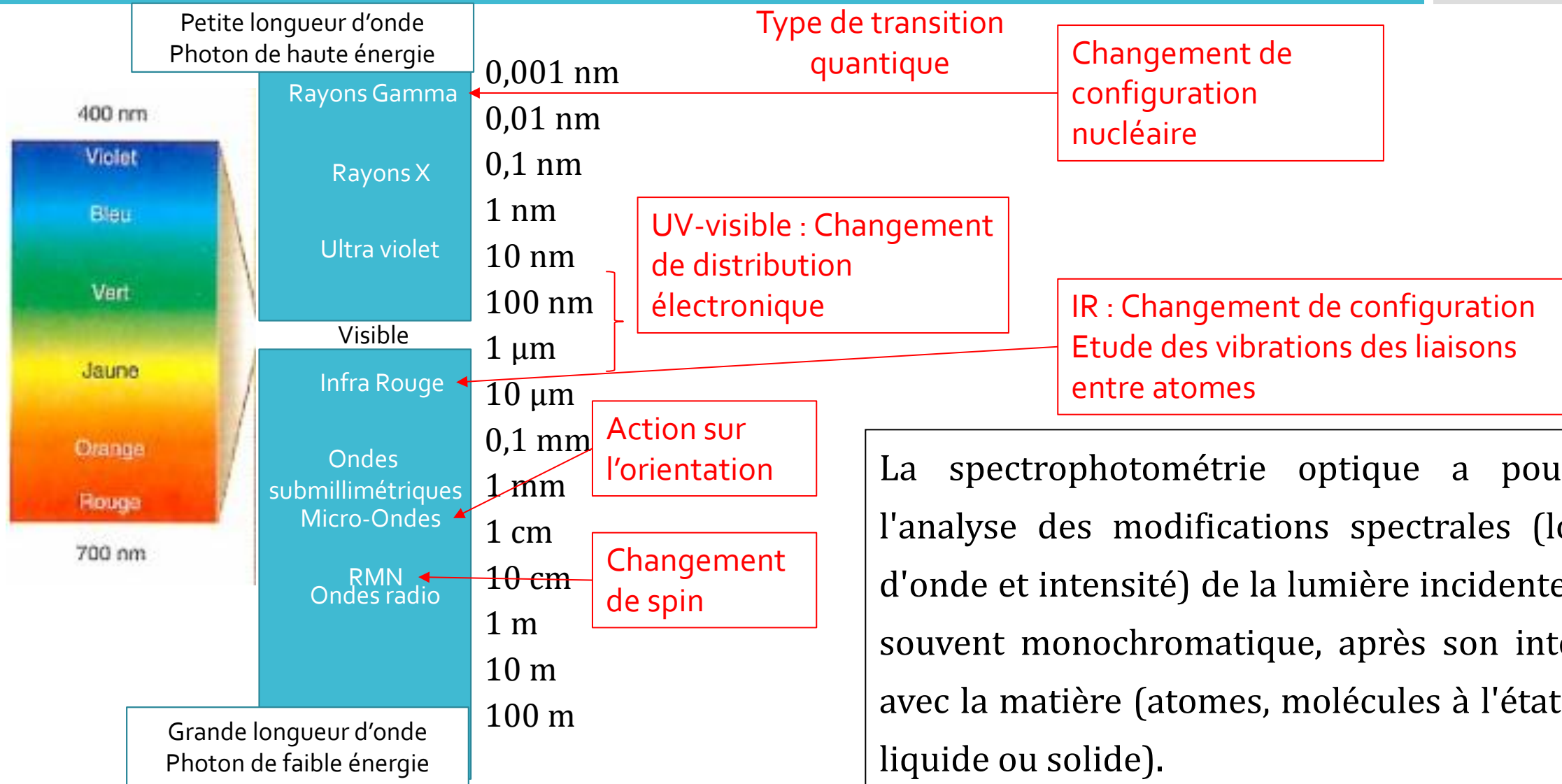
$$E_2 - E_1 = \Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

A une longueur d'onde absorbée correspond une transition entre 2 niveaux énergétiques

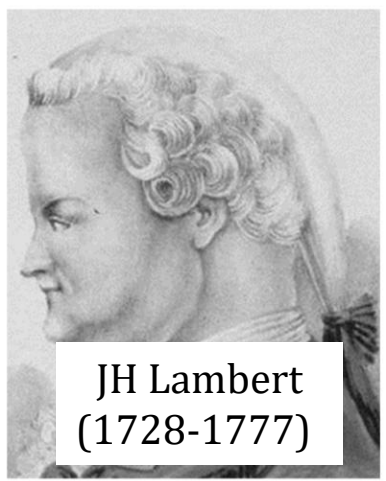
A un atome ou une molécule ne correspondent que des niveaux d'énergies donnés \Leftrightarrow transitions permises \Leftrightarrow longueurs d'onde données \Leftrightarrow spectre donné

Absorption : Phénomène au cours duquel l'énergie photonique est transmise aux électrons de valence leur permettant de passer d'un niveau électronique à un autre de plus haute énergie

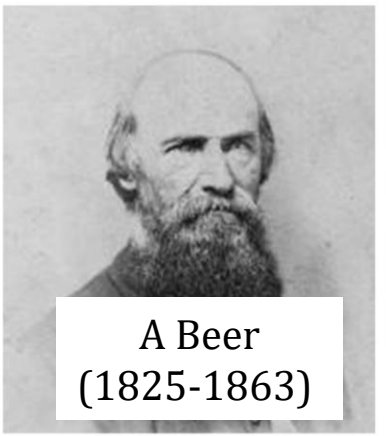
Spectrophotométrie et spectre électromagnétique



La spectrophotométrie optique a pour objet l'analyse des modifications spectrales (longueur d'onde et intensité) de la lumière incidente, le plus souvent monochromatique, après son interaction avec la matière (atomes, molécules à l'état gazeux, liquide ou solide).



JH Lambert
(1728-1777)



A Beer
(1825-1863)

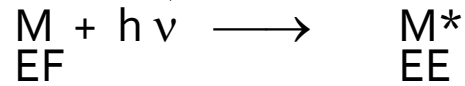
Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

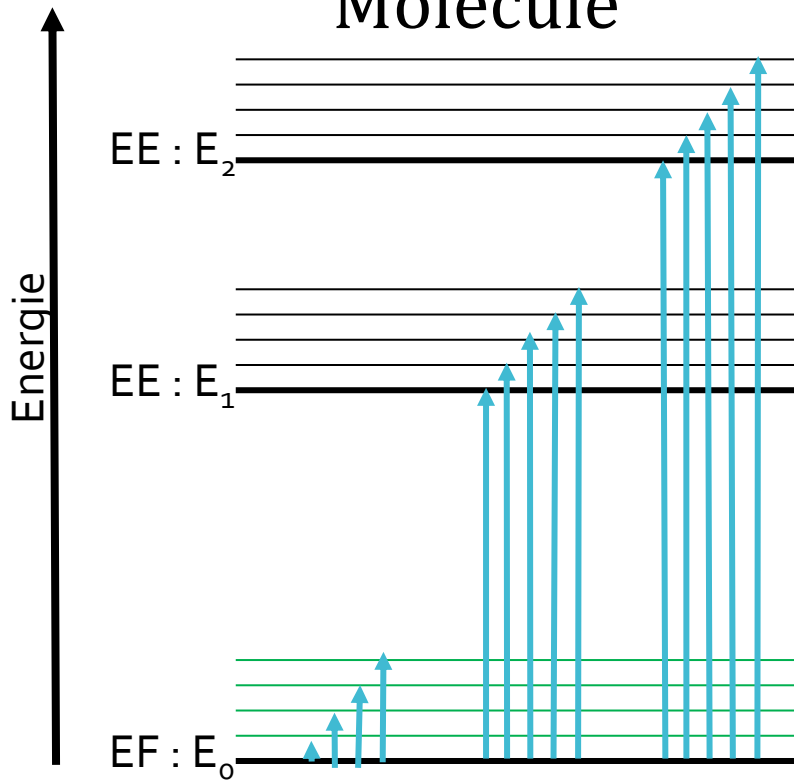
- Introduction
- **Absorption moléculaire**
- Absorption atomique

Absorption moléculaire

Absorption de l'énergie du photon
⇒ passage de l'état fondamental EF
à l'état excité EE



Molécule



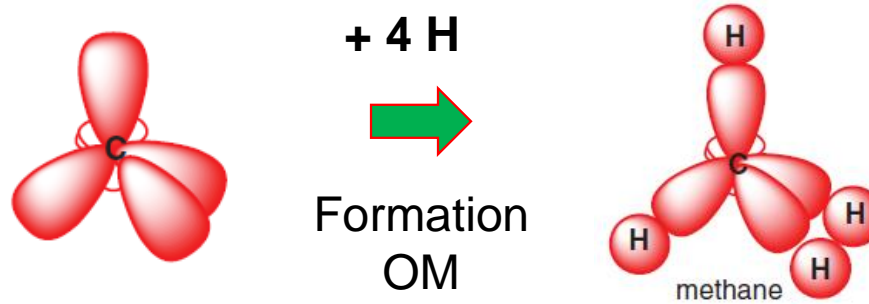
- ✓ Seules certaines transitions sont permises ⇔ niveaux discrets d'énergie ⇔ règles de sélection
- ✓ Les échanges de chaleur sont peu intenses : pas de perturbation du milieu, méthode non destructrice
- ✓ Concerne les électrons de valence ou les électrons externes ⇔ niveaux énergétiques occupés vers des niveaux d'énergie vacants

↳ Diagrammes orbitaux

Diagramme orbitalaire CH₄

Cas des orbitales (2)s et 2p

Exemple 2 : CH₄



Hybridation sp^3
=> tétraèdre
pyramidal,
angle $109,5^\circ$

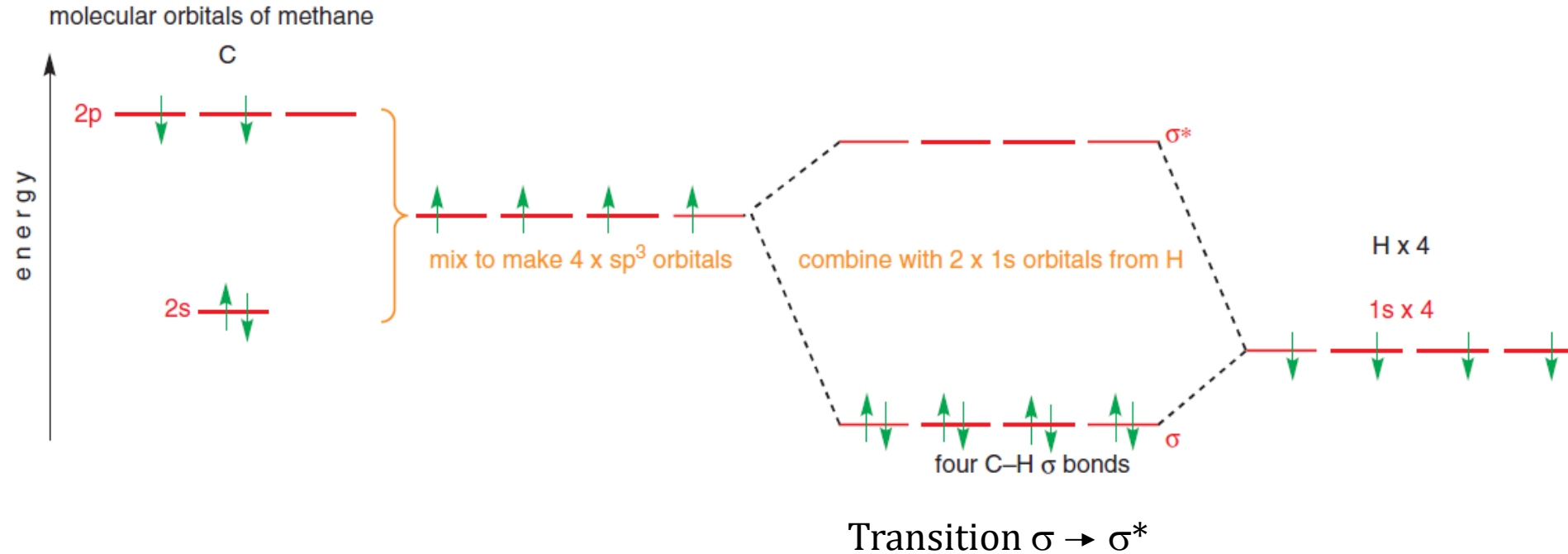


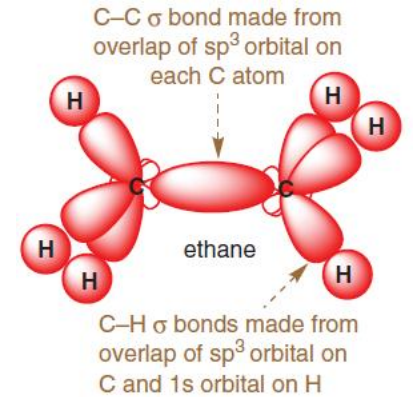
Diagramme orbitalaire C_2H_6

Cas des orbitales (2)s et 2p

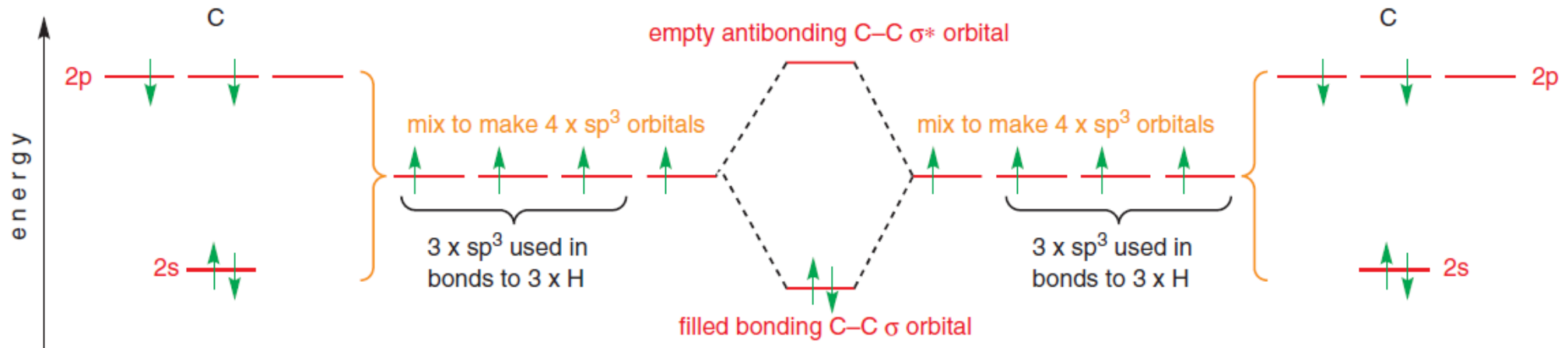
Exemple 3 : **éthane** C_2H_6

➔ Hybridation sp^3 (tétraèdre)

Ethane : Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ des liaisons C-H et C-C



molecular orbitals of ethane (just C-C bond shown)



Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

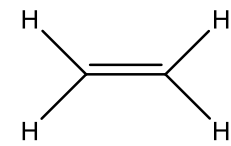
Diagramme orbitalaire C₂H₄

Cas des orbitales (2)s et 2p

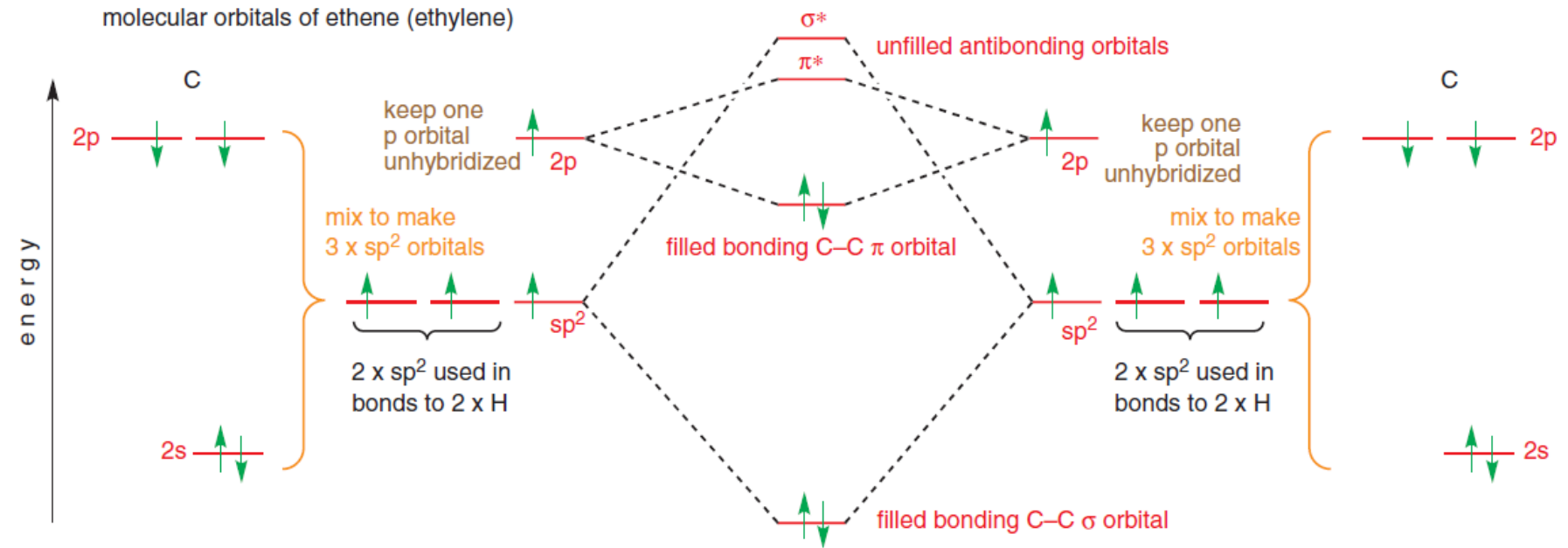
Exemple 4 : **éthylène** C₂H₄

Ethylène :

Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ des liaisons C-H et C-C
Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de la liaison C-C



1s + 2p = sp²



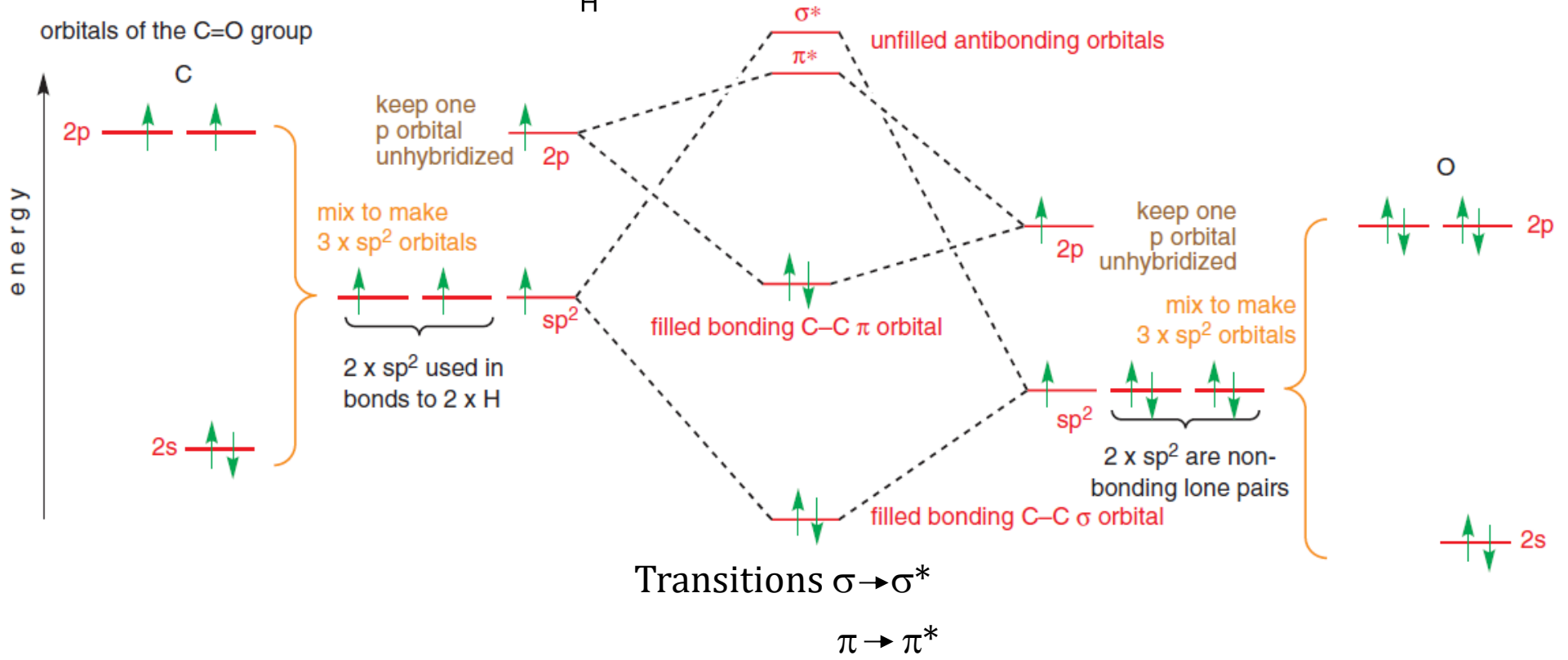
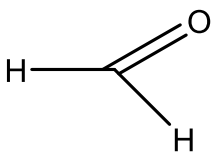
Transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$
 $\pi \rightarrow \pi^*$

Diagramme orbitalaire HCHO

Cas de la fonction CO

Exemple : **formaldéhyde HCHO**

Formaldéhyde : Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ des liaisons C-H et C-C
 Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de la liaison C-O
 Transitions $n \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ dues au doublet libre de l'O



Bilan des transitions observées

L'observation des ces diagrammes énergétiques montre que :

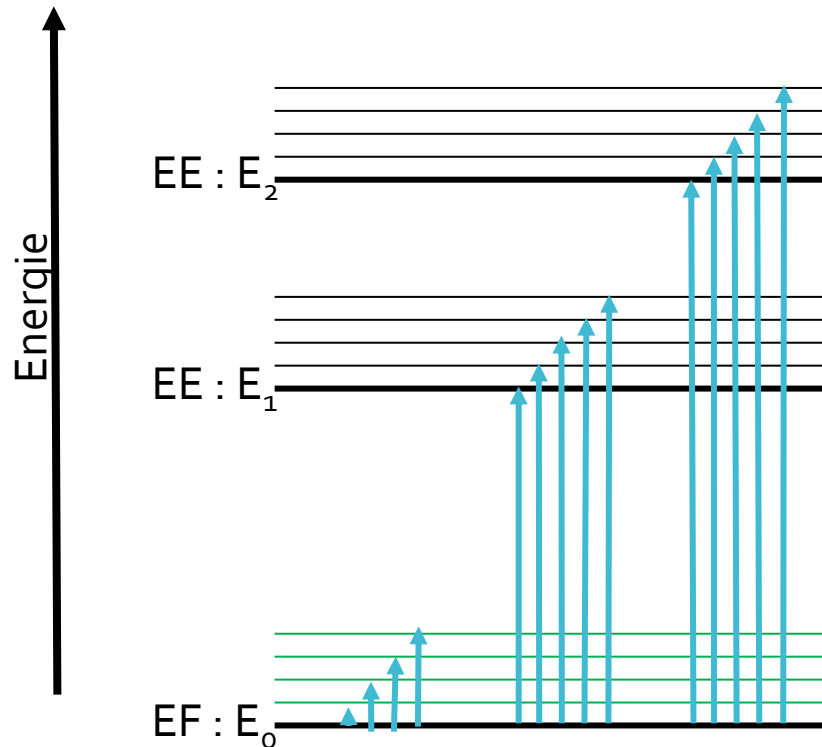
Liaison simple : Transition d'orbitale $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Liaison double : Transition d'orbitale $\sigma \rightarrow \sigma^*$
Transition d'orbitale $\pi \rightarrow \pi^*$

Présence d'un hétéroatome (doublet libre) : Transition d'orbitale $n \rightarrow \sigma^*$
Transition d'orbitale $n \rightarrow \pi^*$

Plus la différence d'énergie entre l'OM liante et l'OM antiliante sera importante, plus la longueur d'onde associée sera faible

Molécule



✓ Concerne les électrons de valence ou les électrons externes

✓ Seules certaines transitions sont permises : Transitions d'OM occupées vers des OM vacantes :

$\sigma \longrightarrow \sigma^* : \lambda \leq 130 \text{ nm}$

$n \longrightarrow \sigma^* :$

- molécule saturée avec paire d'électrons non liantes (N, O) : alcools, amines, halogénés
- $150 \leq \lambda \leq 250 \text{ nm}$

$n \longrightarrow \pi^* :$

- Molécules insaturées avec paires libres (aldéhydes, cétones, esters, acides)
- $200 \leq \lambda \leq 300 \text{ nm}$

$\pi \longrightarrow \pi^* :$

- Molécules insaturées sans paires libres (alcènes conjugués, aromatiques, alcynes)
- Liaison double non conjuguée autour de 170 nm
- alcènes conjugués, aromatiques : $180 \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$

✓ Bandes observées sont \pm intenses $\Leftrightarrow \epsilon$, coeff d'extinction molaire

Chromophores

Chromophore : groupement fonctionnel d'une molécule permettant l'absorption

Molécules conjuguées, aromatiques, comprenant des hétéroatomes

| Chromophore | Exemple | Solvant | transition | λ_{\max} (nm) | $\epsilon^{\lambda_{\max}}$ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹) |
|-----------------|---------------------------|------------|-----------------------------|-----------------------|--|
| Alcène | <chem>C6H13CH=CH2</chem> | n-heptane | $\pi \longrightarrow \pi^*$ | 177 | 13 000 |
| Alcène conjugué | <chem>CH2=CHCH=CH2</chem> | n-heptane | $\pi \longrightarrow \pi^*$ | 217 | 21 000 |
| Carbonyle | <chem>CH3(C=O)CH3</chem> | n-hexane | $\pi \longrightarrow \pi^*$ | 186 | 1000 |
| | | | $n \longrightarrow \pi^*$ | 280 | 16 |
| | <chem>CH3CH=O</chem> | n-hexane | $\pi \longrightarrow \pi^*$ | 180 | > 15 000 |
| | | | $n \longrightarrow \pi^*$ | 293 | 12 |
| Carboxyle | <chem>CH3CO2H</chem> | Éthanol | $n \longrightarrow \pi^*$ | 204 | 41 |
| Nitro | <chem>CH3NO2</chem> | Iso-octane | $n \longrightarrow \pi^*$ | 214 | 60 |

λ_{\max} et $\epsilon^{\lambda_{\max}}$ sont des caractéristiques d'une molécule donnée

Les transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ donne des absorptions plus intenses, visibles ou non en fonction de la longueur d'onde

Les transitions $n \longrightarrow \pi^*$ donnent des absorptions peu intenses, très peu visibles sur les spectres

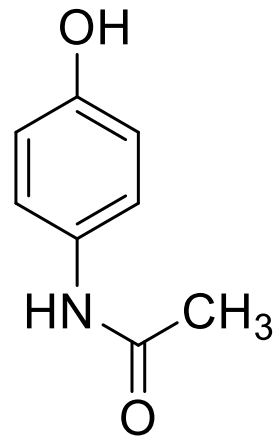
Exercice 1 : Identifier les molécules présentant un spectre d'absorption dans l'UV-visible

CH_3COOH
Acide acétique

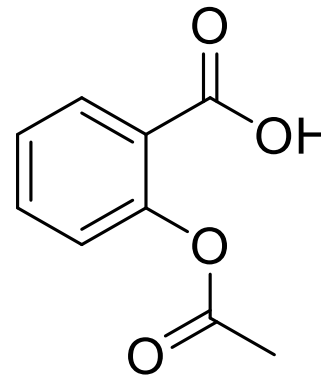
CO_3^{2-}
Ion carbonate

H_2PO_4^-
Ion dihydrogénophosphate

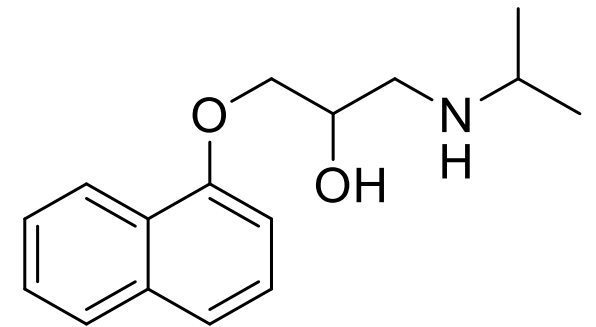
NH_4OH
Ammoniaque



Paracétamol

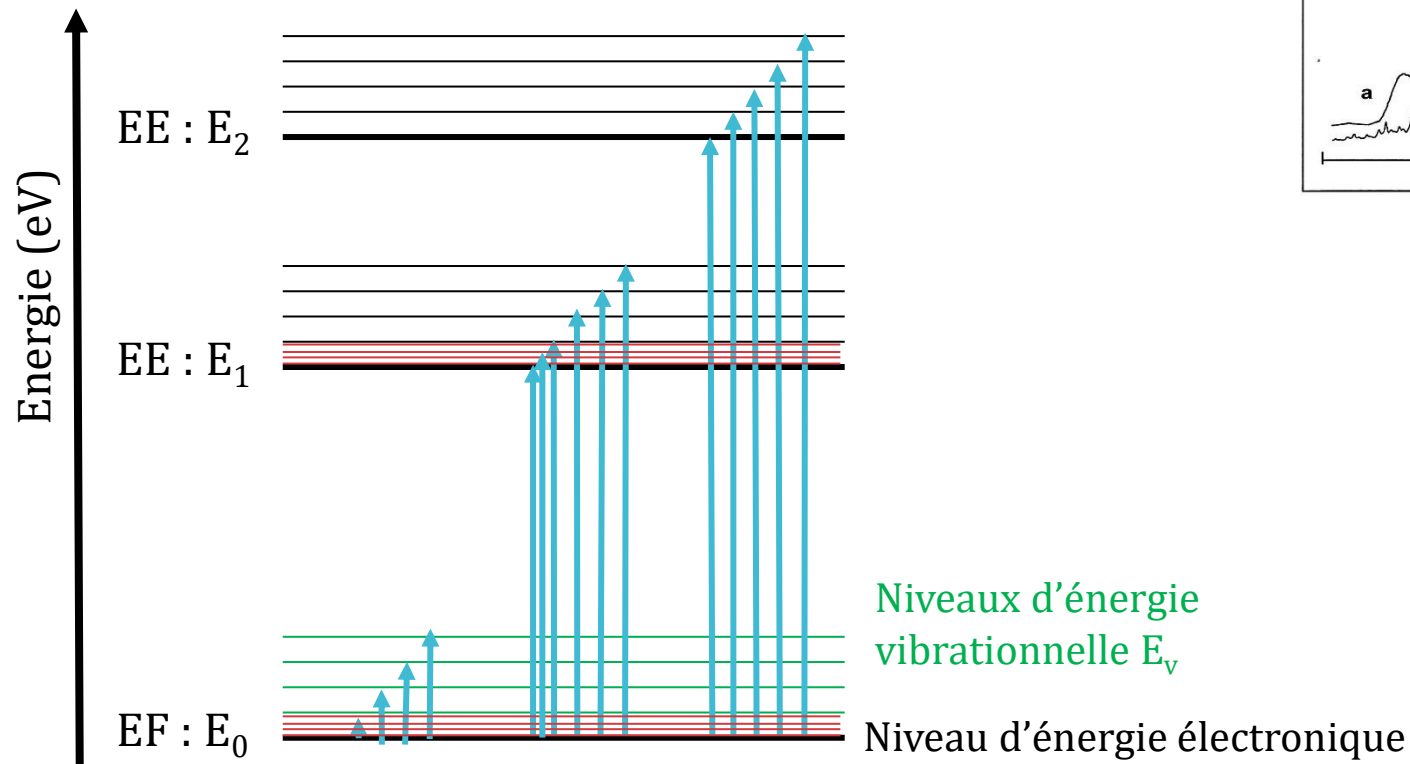


Acétyl
salicylique
(Aspirine)

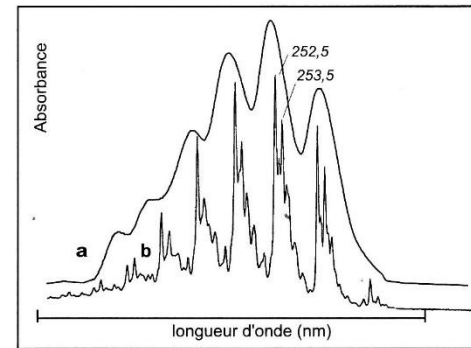


Propranolol
(béta bloquant)

Molécule



Absorption moléculaire

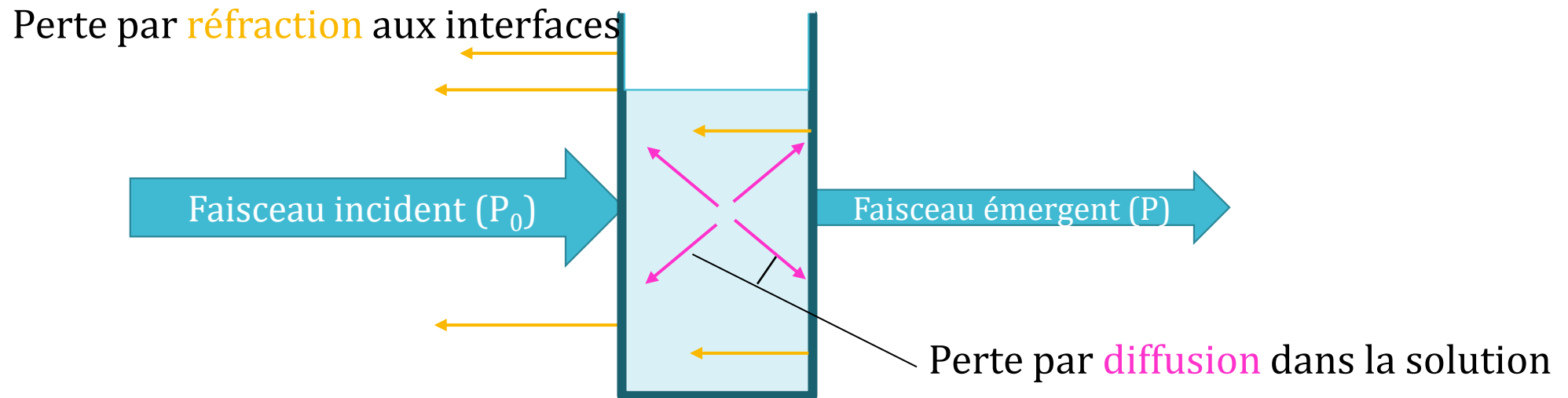


a : benzène en solution
b : benzène état gazeux

- Pour une transition permise plusieurs niveaux d'énergie vibrationnels accessibles
⇔ nombreuses raies accolées non distinguables ⇒ **bande**
- Plusieurs électrons excitable, plusieurs transitions possibles ⇒ **plusieurs bandes**
⇓ **spectre de bandes**

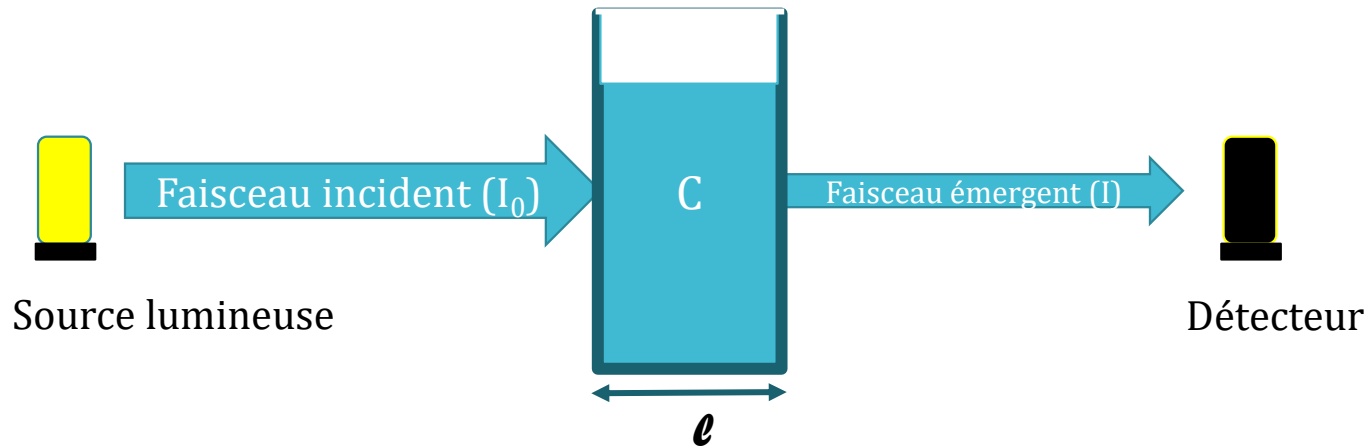
Etat gazeux : bandes fines ($E_{elec} + E_v$)
Etats solide et liquide : bandes larges

Définition : Phénomène au cours duquel une espèce chimique atténue sélectivement la puissance P_0 (l'intensité I_0) du rayonnement électromagnétique incident. La puissance du faisceau incident est donc plus forte que celle du faisceau émergent P (intensité émergente I). Elle mesure donc la capacité de la substance à absorber la lumière qui la traverse.



$P < P_0$: - effets mineurs : réfraction et diffusion
- effet majeur : absorption de l'énergie par le soluté présent en solution

Absorption moléculaire : mesure



I_0 : intensité du faisceau incident
 I : intensité du faisceau émergent
 l : largeur de la cuve
= longueur du trajet optique, en cm
 C : concentration molaire du soluté

T : transmittance :

- fraction du rayonnement incident qui est transmis par le milieu suite aux interactions entre photons et particules absorbantes.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad T\% = \frac{I}{I_0} \times 100$$

- Plus l'atténuation du signal est forte plus la transmittance est faible.
- Comprise entre 0 et 1 ou 0 et 100%.
- Sans unité

A : Absorbance

- définie comme $-\log T$.
- Plus l'atténuation du signal est forte plus l'absorbance est forte.

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}$$

Absorption moléculaire : Aspect quantitatif

⇒ Loi de Beer-Lambert

A une longueur d'onde λ donnée, $A^\lambda = \varepsilon^\lambda \ell C$

ε^λ : coefficient d'extinction molaire (L/cm/mol ou L/cm/g)

C : Concentration soluté (mol/L ou g/L)

ℓ : trajet optique (cm)

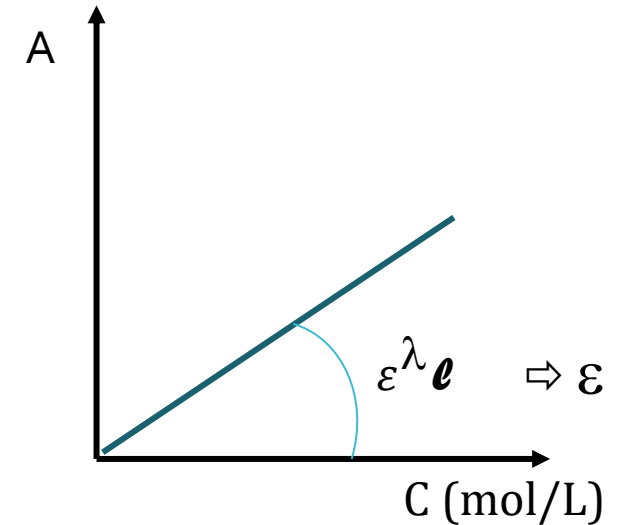
A^λ n'a pas d'unité

ε : coefficient d'extinction molaire

- Ou absorptivité molaire
- défini à une longueur d'onde donnée, pour un solvant donné et à une T° donnée
- Unité : L.cm⁻¹.mol⁻¹
- Cas particulier : coefficient d'extinction spécifique qd concentration exprimée en g/L.

$A^{1\%}$: absorbance spécifique

absorbance de la solution à 1g pour 100 mL ou 10 g/L qd le trajet optique est de 1 cm



Remarques :

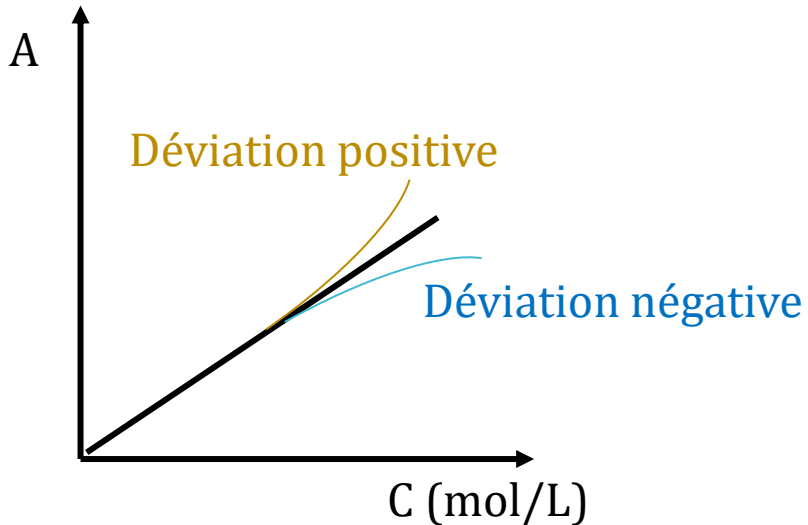
1- pour simplifier l'écriture, on peut omettre $\lambda \Rightarrow A = \varepsilon \ell C$

2- le plus souvent, $\ell = 1$ cm \Rightarrow la pente du diagramme $A=f(C)$ correspond à ε

Exercice 2 : Une solution contenant le complexe formé par la thiourée et le Bi^{III} a un coefficient d'absorption molaire de $9\,320 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ à 470 nm

- 1- Quelle est l'absorbance d'une solution à $6,24\cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ du complexe à 470 nm dans une cellule de 1 cm ?
- 2- Quelle est la transmittance de la solution?
- 3- Quelle est la concentration du complexe dont la transmittance est le double de celle trouvée en (2)?
- 4- Quelle est la concentration du complexe dans une solution qui a l'absorbance trouvée en (1) dans une cellule de 5 cm ?

Loi de Beer-Lambert : limites d'application



Erreurs chimiques :

- Instabilité de la solution due
 - au pH : (pp acido basique du soluté ou réactivité du soluté aux acides/bases)
 - à la température
- En cas de complexation nécessaire : excès de complexant nécessaire pour que l'équilibre soit complètement déplacé ⇔ éviter les interférences.
- Effet solvant : spectre diffère dû
 - aux interactions intermoléculaires possibles
 - aux pp acidobasiques éventuelles du soluté dans l'eau
Ex : acide acétique
 - absorption du solvant (cut-off)

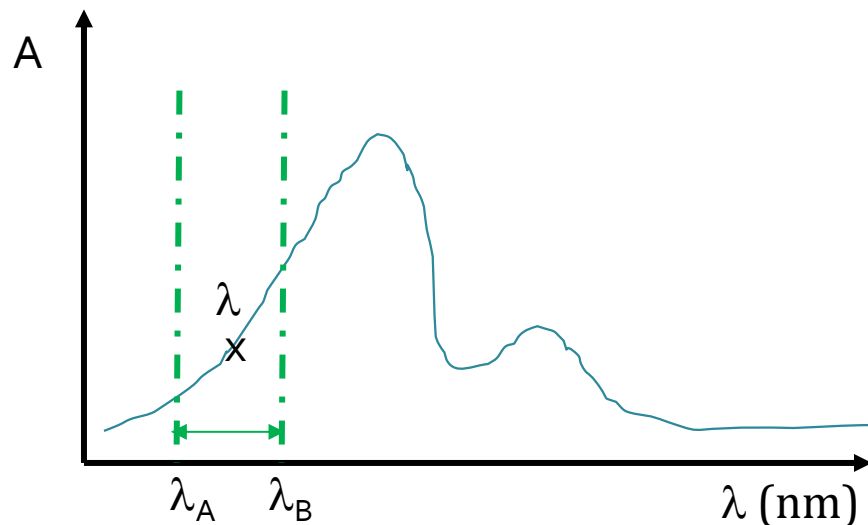
| Solvant | Acétone | Toluène | Acétate d'éthyle | CH ₃ Cl | Glycérol | EtOH | MeOH | Hexane |
|----------------|---------|---------|------------------|--------------------|----------|------|------|--------|
| λ Cut off (nm) | 330 | 290 | 260 | 250 | 230 | 220 | 210 | 200 |

Loi de Beer-Lambert : limites d'application

Erreurs instrumentales :

- Usure de l'appareillage (cellule photoélectrique, lampe)
- Rayonnement parasite
- Mauvais entretien \Leftrightarrow Étalonnage des longueurs d'onde et de l'absorption
- Absorption de cuve en verre dans le domaine des UV
- Bande passante trop large

$$A = \log \frac{I_0 + S}{I + S} \quad \text{où } S : \text{ intensité du rayonnement parasite}$$



Bande passante

Transmittance mesurée en $\lambda =$ moyenne des transmittances mesurées entre λ_A et $\lambda_B \Rightarrow$ Absorbance calculée à partir de T

Absorbance calculée < Absorbance réelle $\Rightarrow \Delta A$

ΔA est d'autant plus gd que solution est concentrée et que la pente du spectre est forte.

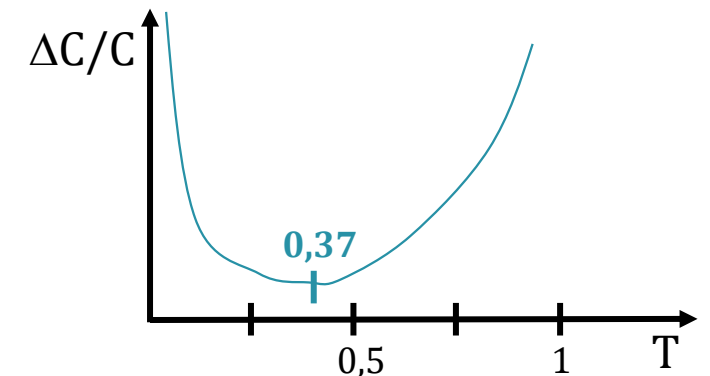
Loi de Beer-Lambert : limites d'application

Conditions d'application :

- Lumière monochromatique (Absorbance pour une longueur d'onde donnée)
- Bande passante la plus faible
- Solutions suffisamment diluées. Sauf exception $C \leq 10^{-2}$ mol/L. (ex : bleu de méthylène ou éosine – $C \leq 10^{-5}$ mol/L)
- Etre au maximum d'absorption
- Soluté stable en solution et sous l'effet de l'irradiation
- Solution limpide (évite la diffusion)
- Utilisation de cuves transparentes aux UV

Remarques:

- Erreur minimale sur C si transmission optimale $\Leftrightarrow T = 0,368 \Leftrightarrow A = 0,434$
- T mesurable = $10^{-3} \Leftrightarrow A_{\max} = 3$



Loi de Beer-Lambert : Loi d'additivité

Qd plusieurs espèces absorbent, l'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée est la somme des absorbances de chacune des espèces.

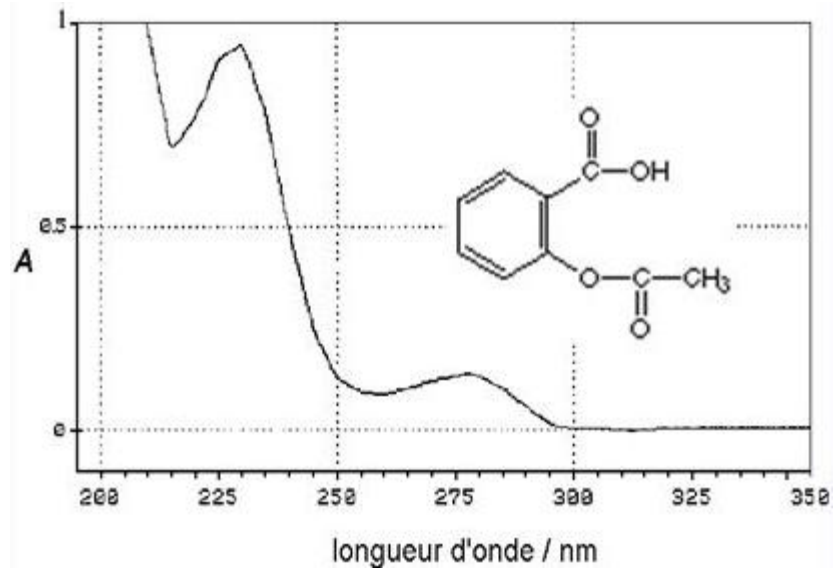
$$A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda$$

Si chacune des espèces suit la loi de Beer-Lambert alors :

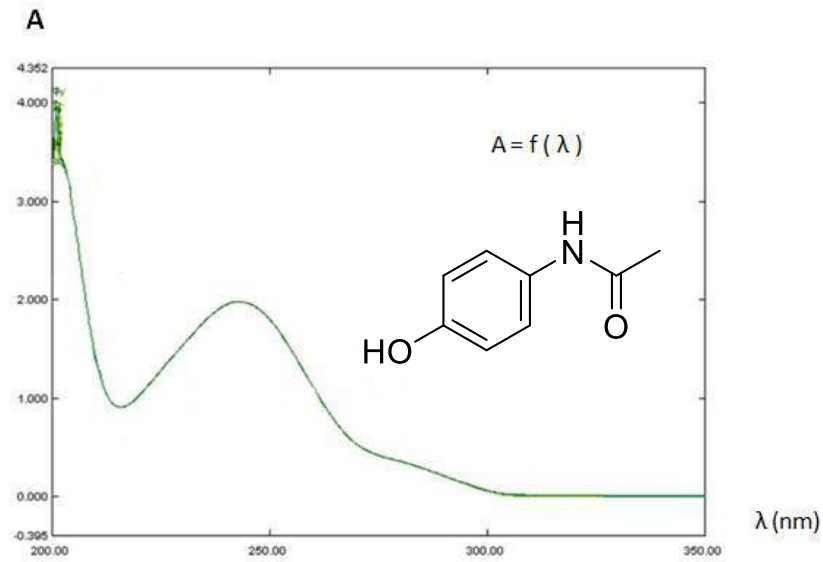
$$A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda = \sum_i (\varepsilon_i^\lambda \cdot C_i)$$

Espèces moléculaires absorbantes

Espèces organiques : excitation des électrons qui participent à la formation des liaisons.
Les groupements fonctionnels organiques responsables de l'absorbance sont appelés : **chromophores**.



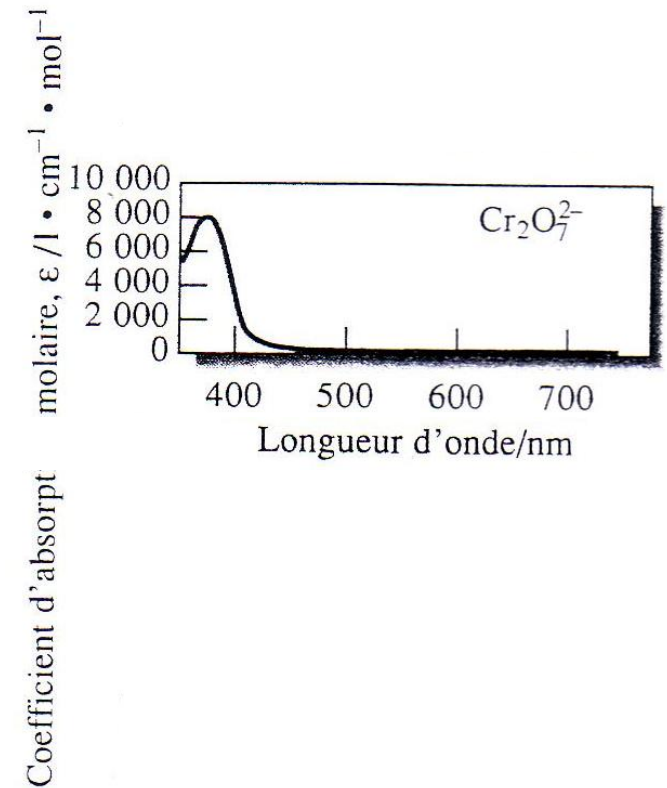
Acide acétylsalicylique



Paracétamol

Espèces moléculaires absorbantes

Espèces inorganiques : pour les ions complexes ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, MnO_4^-) des 2 premières séries de transitions, excitations des e^- de la couche d. L'absorption se fait plutôt dans le domaine du visible.

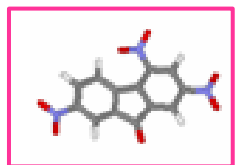
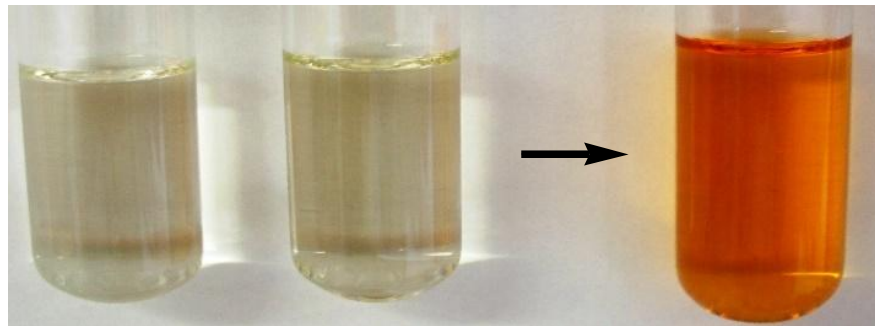


Espèces moléculaires absorbantes

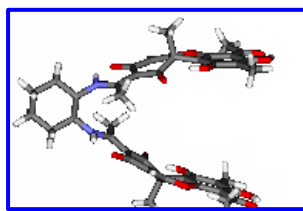
Complexe à transfert de charge : entre un groupement donneur d' e^- lié à un groupement accepteur d' e^- . L'électron passe du donneur à une orbitale associée à l'accepteur (\approx transition électronique intermoléculaire), ce qui diffère de la transition électronique intramoléculaire.

Ex : cas du complexe Fe^{2+} - ortho-phénantroline

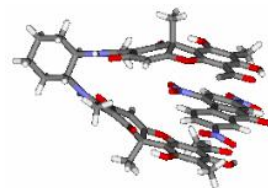
Phénomène de π - π stacking



1

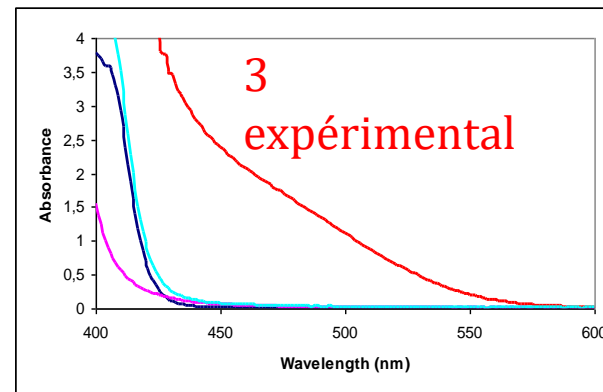


2



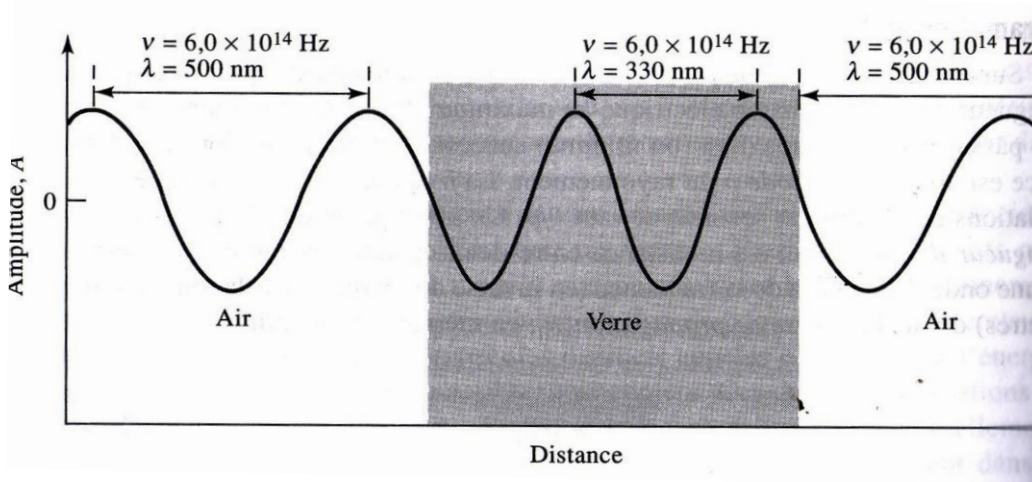
3

3 calcul



Influence du milieu

λ est fonction du milieu et de l'indice de réfraction, une même molécule peut donc avoir des spectres différents en fonction du solvant et de sa polarité (interactions solvant – soluté).



Transition $n \longrightarrow \pi^*$: $\lambda \searrow$ qd polarité \nearrow

Transition $\pi \longrightarrow \pi^*$: $\lambda \nearrow$ qd polarité \nearrow

Le pH du milieu peut entraîner l'ionisation d'un groupement. Spectre diffère si les 2 formes n'absorbent pas de la même façon.

Point isobestique \Leftrightarrow Seules 2 espèces sont en solution et ont le même ϵ .

Ici A^- et AH

Loi d'additivité :

$$A = A_{AH} + A_{A^-}$$

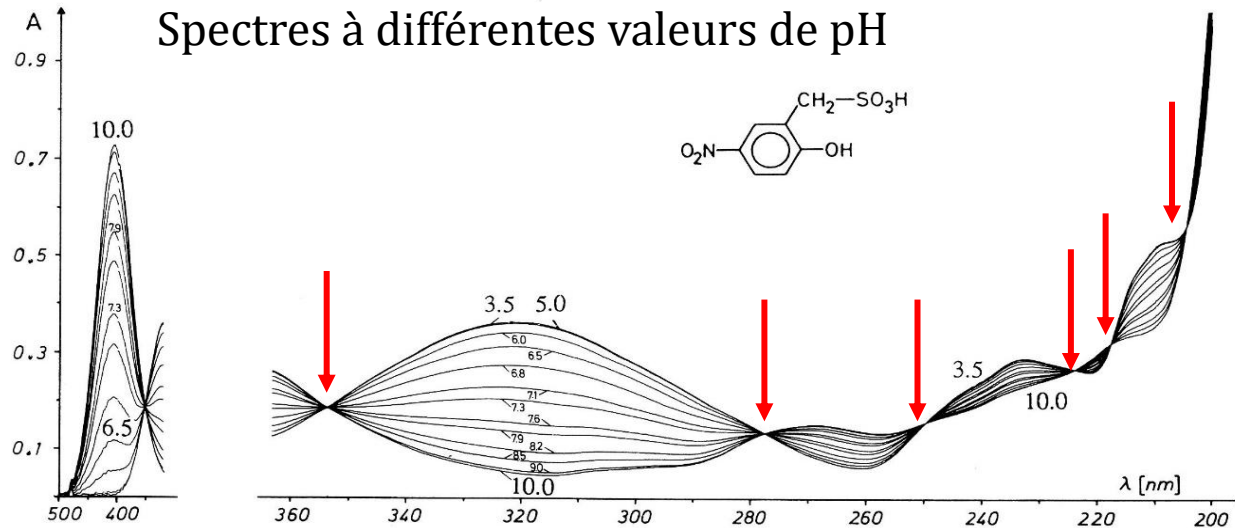
$$A = \epsilon_{AH} \mathbf{e}[AH] + \epsilon_{A^-} \mathbf{e}[A^-]$$

Si $\epsilon_{AH} = \epsilon_{A^-} = \epsilon$

$$A = \epsilon \mathbf{e}[AH] + \epsilon \mathbf{e}[A^-] = \epsilon \mathbf{e}([AH] + [A^-])$$

En fonction du pH, les proportions de A^- et AH varient mais $[A^-] + [AH] = C = Cte$

$$A = \epsilon \mathbf{e}C = cte$$




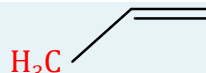
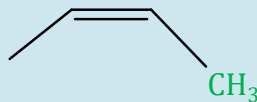
H.Lachmann, Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 148-149 (1980)

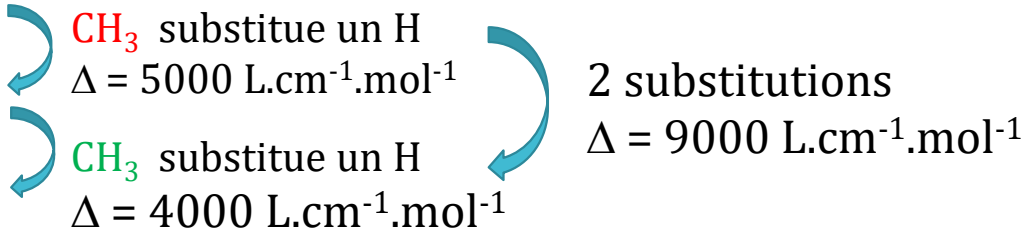
Influence de la substitution sur les chromophores

Auxochrome : groupement qui n'absorbe pas seul mais qui modifie l'absorption du chromophore auquel il est lié en longueur d'onde et intensité. Ex. : OH, NH₂, Cl... A différencier des chromophores (groupements insaturés covalents responsables de l'absorption – ex :C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N, C=S, N=N ...).

Substitution des chromophores par groupements donneurs ou accepteurs : effet sur la longueur d'onde et l'intensité d'absorption

Ex sur transition $\pi \longrightarrow \pi^*$


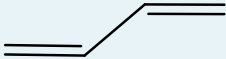
| Composé | Formule | λ_{\max} | $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹) |
|-----------|---|------------------|--|
| Ethylène |  | 165 | 15000 |
| Propène |  | 170 | 20000 |
| But-2-ène |  | 174 | 24000 |



↳ déplacement vers le visible

Conjugaison : l'enchaînement d'insaturations a un effet sur la longueur d'onde : plus le nb est gd plus les niveaux d'énergie sont proches $\Rightarrow \Delta E$ faible $\Rightarrow \lambda \nearrow$

Ex sur transition $\pi \longrightarrow \pi^*$

| Composé | Formule | λ_{\max} (nm) | $\epsilon^{\lambda_{\max}}$ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹) |
|-----------|---|-----------------------|--|
| Ethylène |  | 165 | 15000 |
| Butadiène |  | 217 | 20900 |

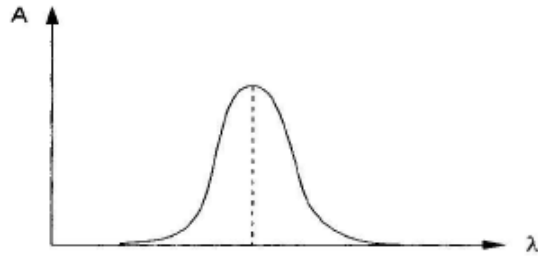
 **Effet hyperchrome**

 **effet bathochrome**

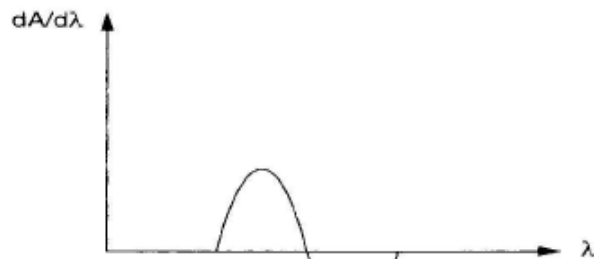
Les différents effets observés sont :

- **effet bathochrome** = glissement vers les plus grandes longueurs d'onde \Leftrightarrow vers le domaine visible
- **effet hypsochrome** = glissement vers les plus faibles longueurs d'onde \Leftrightarrow vers le domaine UV
- **effet hyperchrome** = augmentation de l'intensité lumineuse
- **effet hypochrome** = diminution de l'intensité lumineuse

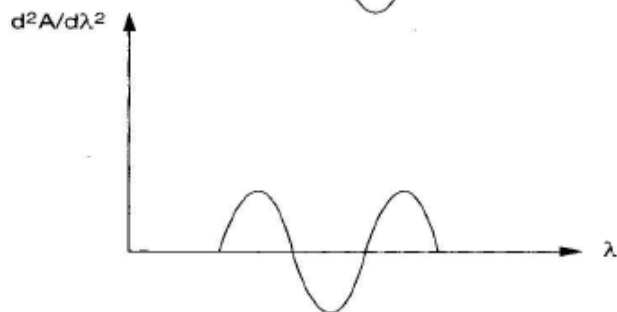
Spectre dérivé



Spectre d'ordre zéro
 $A = f(\lambda)$



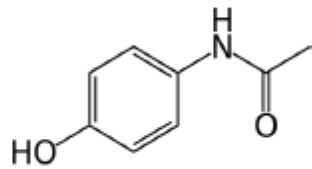
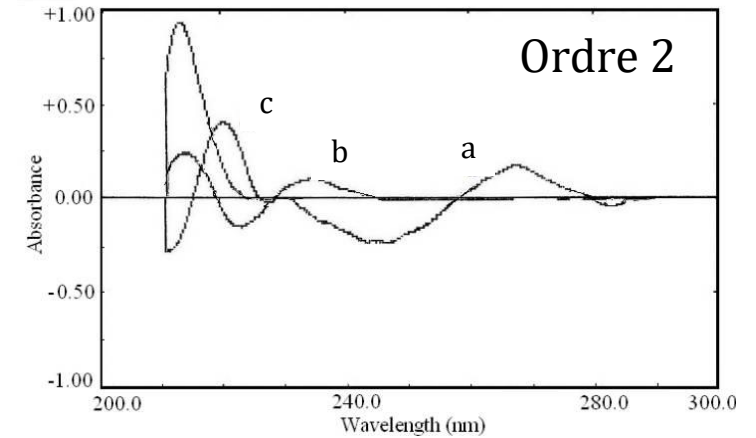
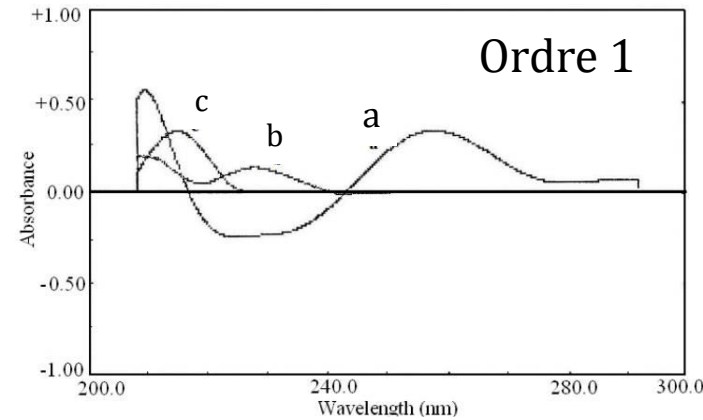
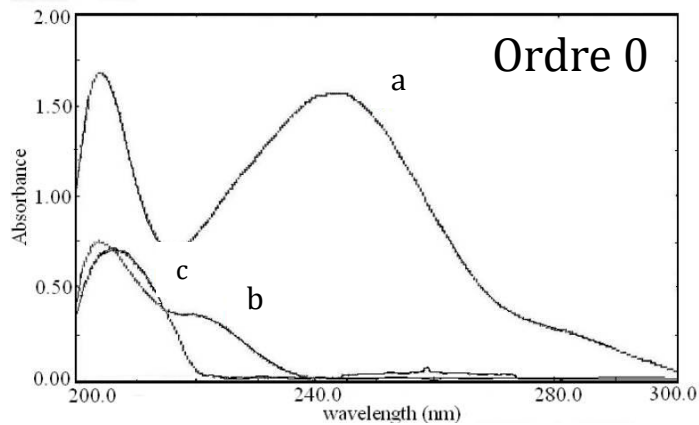
Spectre d'ordre un
 $dA/d(\lambda) = f(\lambda)$



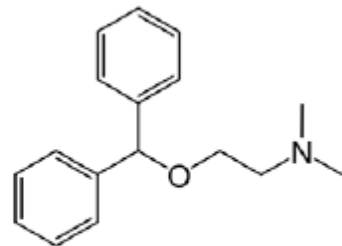
Spectre d'ordre deux
 $d^2A/d^2(\lambda) = f(\lambda)$

Development of a Rapid Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Acetaminophen, Diphenhydramine and Pseudoephedrine in Tablets

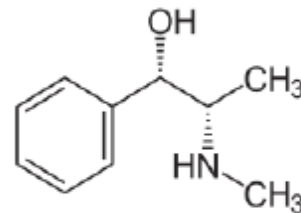
Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2015), 14 (2): 435-442



(a) Acetaminophen

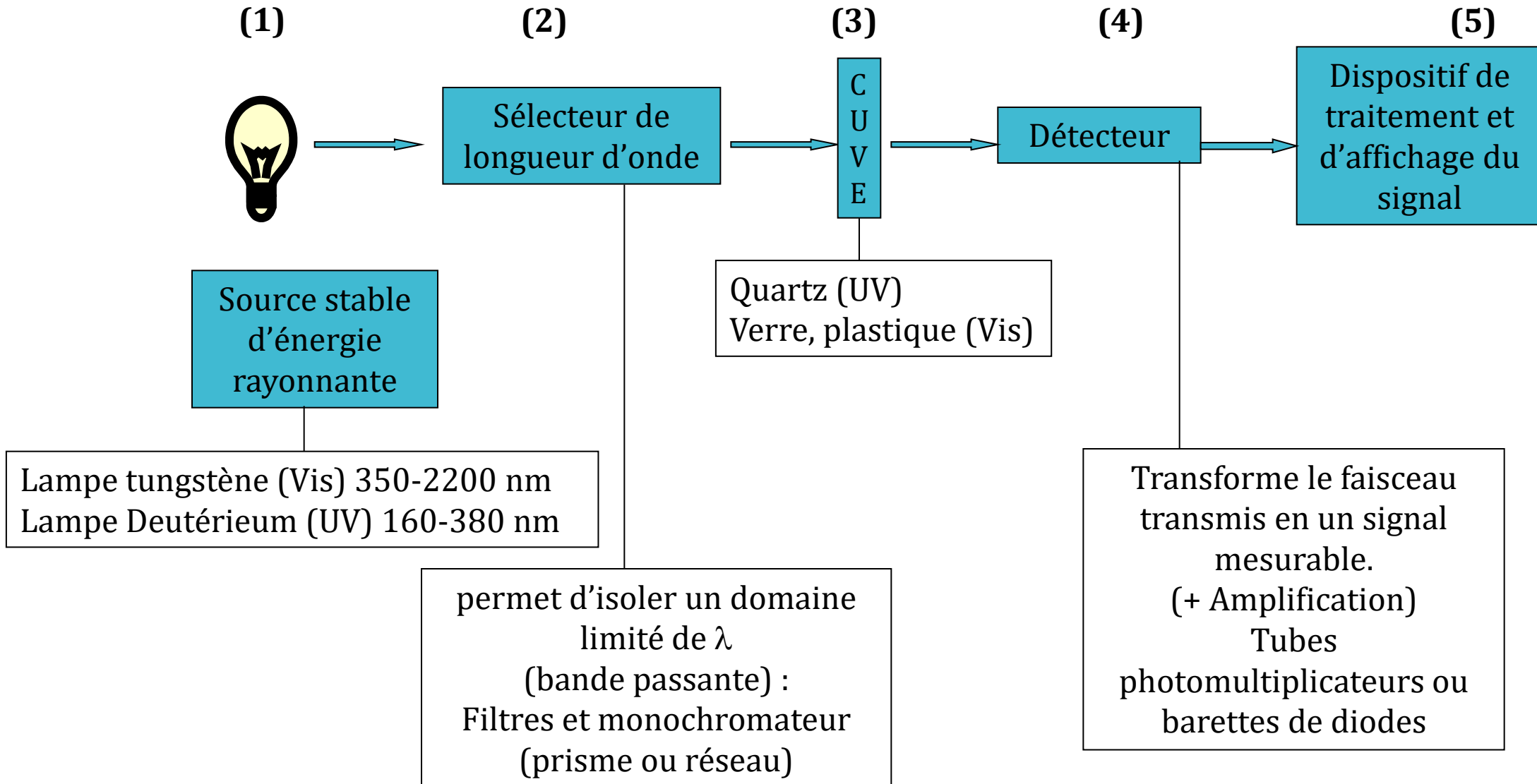


(b) Diphenhydramine



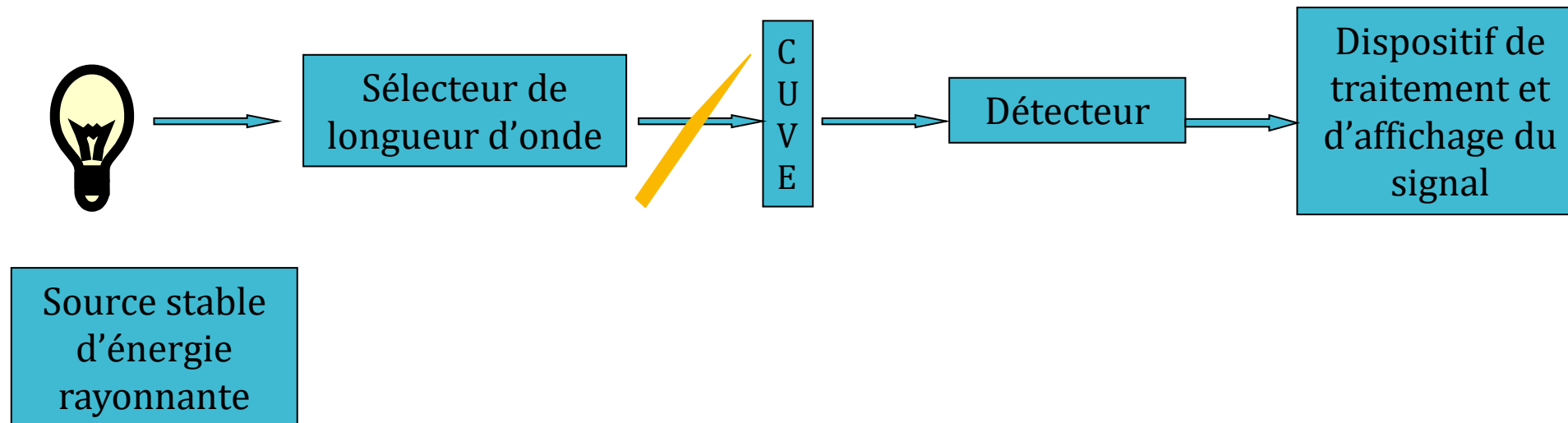
(c) Pseudoephedrine

Spectrophotomètre : principe



Spectrophotomètre : monofaisceau

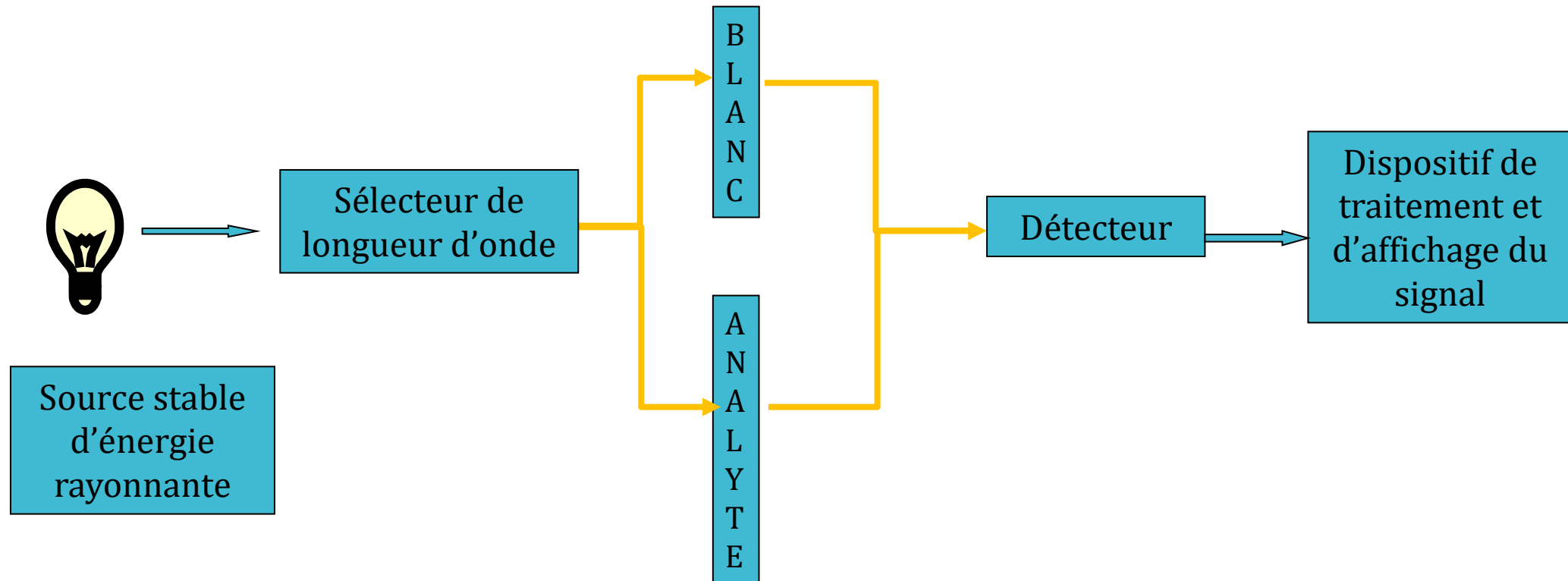
- (1) Obturateur \Leftrightarrow réglage $T = 0$
- (2) Cuve contient blanc = matrice sans analyte $\Leftrightarrow T = 100\%$
- (3) Cuve contient la solution à analyser $\Leftrightarrow T$ de l'échantillon



- peu coûteux
- pratique pour analyses quantitatives à 1 longueur d'onde. Le réglage de la référence pour chaque longueur d'onde \Rightarrow lourd qd balayage spectral.

Spectrophotomètre : double faisceau

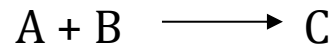
- (1) 2 cuves contiennent le blanc
- (2) Cuve contient blanc + Cuve contient la solution à analyser



Avantage : compense les fluctuations à court terme du signal rayonnant de la source, la dérive du détecteur et de l'amplificateur ainsi que les variations d'intensité de la source.

Analyse quantitative

- Titration spectrophotométrique : on suit l'apparition ou la disparition de l'absorbance d'une des espèces de la réaction suivie.

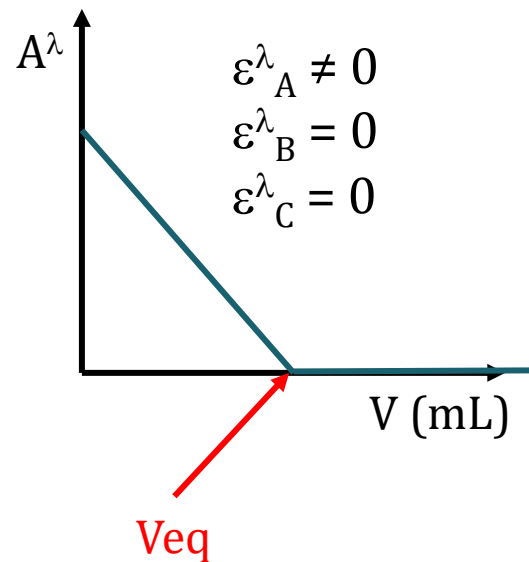


$$A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$$

A : espèce à doser

B : titrant

C : produit de la réaction



$t=0$: seule espèce A en solution : $A^\lambda = A^\lambda_A = [A]\epsilon^\lambda_A$ $A^\lambda \neq 0 \Leftrightarrow \epsilon^\lambda_A \neq 0$

$t < E_{q}$: $[A] \searrow$, $[B] = 0$ et $[C] \nearrow$ donc $A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_C$

$t > E_{q}$: $[A] = 0$, $[B] \nearrow$ et $[C] = cte$ donc $A^\lambda = A^\lambda_B + A^\lambda_C = [B]\epsilon^\lambda_B + [C]\epsilon^\lambda_C = 0 \Leftrightarrow \epsilon^\lambda_B = 0$ et $\epsilon^\lambda_C = 0$

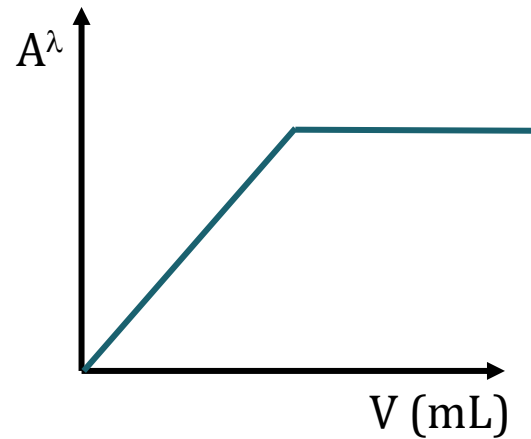
Exercice 3 : Au cours d'un titrage spectrophotométrique, on suit la réaction : $A + B \longrightarrow C$

A : espèce à doser

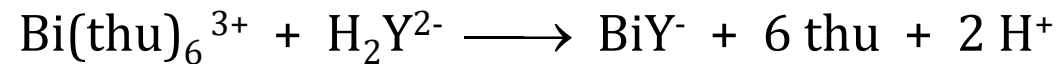
B : titrant

C : produit de la réaction

Sachant que la loi d'additivité est suivie ($A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$) et au vu de la courbe de titrage, indiquer en argumentant si une ou plusieurs espèces possèdent un coefficient d'extinction molaire nul.



Exercice 4 : L'acide éthylènediaminetétraacétique (H_2Y^{2-}) extrait le bismuth (III) de son complexe avec la thiourée :



Où thu : thiourée $(NH_2)_2CS$

Prédire l'allure d'une courbe de titrage photométrique basée sur cette réaction, sachant que le complexe Bi(III)/thiourée est la seule espèce dans le système qui absorbe à 465 nm, la longueur d'onde choisie pour l'analyse.

- Dosage \Leftrightarrow étalonnage
Ex : dosage du fer Fe^{2+} ou dosage enzymatique ou immuno-essais
- Détecteurs en chromatographie et électrophorèse capillaire
- Utilisation des spectres dérivés dans le cas de mélanges complexes

Analyse qualitative

- Identification : comparaison du spectre avec celui de référence (Pharmacopée européenne)
- Contrôle de pureté des matières premières : rapports d'absorbance à plusieurs longueurs d'onde pour le spectre de l'échantillon (Pharmacopée européenne)
- Détermination de constantes thermodynamiques (pKa, constante de complexation)
- Détermination de la stœchiométrie d'un complexe

- Facilité de mise en œuvre : bien s'assurer des conditions opératoires et du nettoyage des cuves
- Possibilité d'automatisation (plaque 96 puits), et de flux continu
- Bonne exactitude, entre 1 et 5%
- Bonne sensibilité : concentration entre 10^{-4} et 10^{-5} mol/L
- Grand champ d'applications
- Dans un mélange, si seul un analyte est absorbant, pas de séparation préalable
- Faible coût pour l'achat et pour l'entretien
- Vérifications des performances peu contraignantes :
 - $\lambda \Leftrightarrow$ oxyde d'holmium ou grâce à la lampe à deutérium
 - $A \Leftrightarrow$ solution étalon de $K_2Cr_2O_7$ dans H_2SO_4 0,02 mol/L pour $\lambda = 235$ nm, 257 nm, 313 nm et 350 nm.

Ce document est la propriété exclusive de B Gargadennec-Legouin et ne saurait être utilisé, reproduit, représenté, transmis ou divulgué sans son accord préalable et explicite.

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes



UFR Pharmacie - Rennes

Une question...
Une précision...
RDV sur le forum

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes



UFR Pharmacie - Rennes