

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen  
Faculté SNV & STU  
Département de biologie  
Master Biochimie Appliquée  
2020-2021

## **Master 1 Biochimie Appliquée**

### **Semestre 2: Unité Méthodologie**

### **Méthodes d'identification et d'analyse structurale**

**Cours: Dr. Benariba N.**

## **Partie 2: Méthodes d'identification et d'analyse structurale**

### Méthodes d'identification et de détermination de la structure chimique des molécules

#### **1-** Les Méthodes spectroscopiques

**1-1** La Spectroscopie moléculaire UV-Visible: dosage des biomolécules

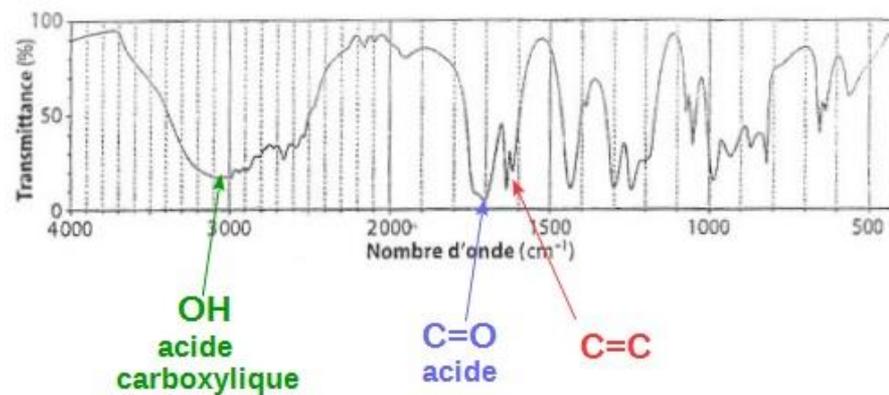
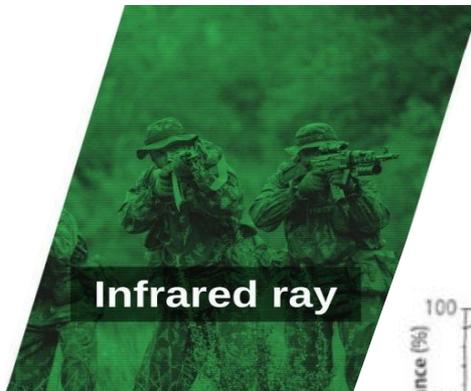
**1-2** La Spectroscopie moléculaire infrarouge: caractérisation des groupements fonctionnels

**1-3** La cristallographie par diffraction des rayons X : caractérisation de la structure des molécules cristallisées

**1-4** La spectrométrie de masse : caractérisation de la masse des molécules

**1-5** La Spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) : caractérisation de la structure des molécules (squelette carbonique) par la RMN du proton H et du carbone-13

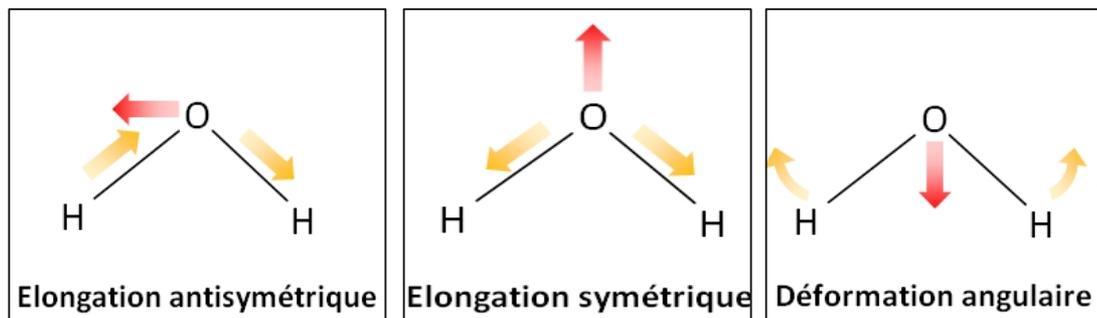
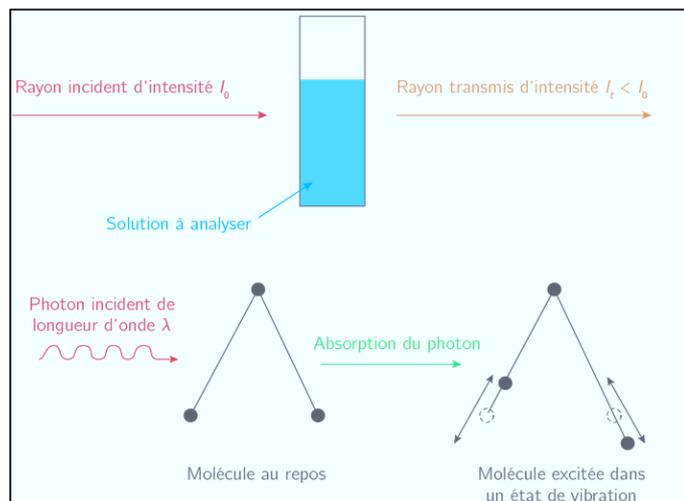
# Chapitre 2: Spectroscopie infrarouge



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

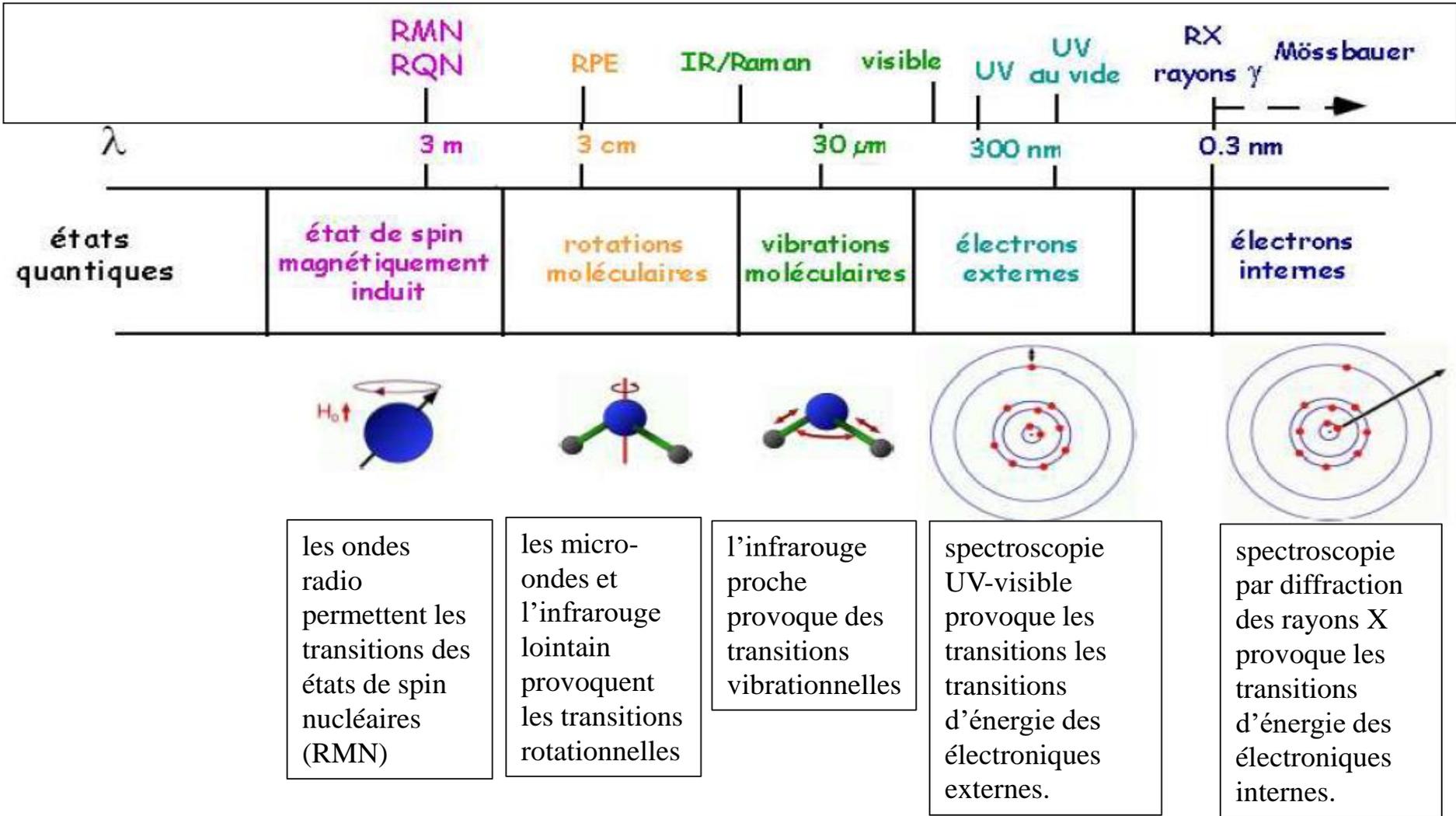
La spectrométrie infrarouge est l'un des outils les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques.

**Principe:** Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption des rayons infrarouges (**800nm à 1mm**) par les molécules. Cette absorption, qui correspond spécifiquement aux liaisons chimiques présentes dans la molécule (**C=O; C-O, O-H, C-N, N-H, ...**), est responsable des états de vibration moléculaire (état de transition énergétique). Les énergies mises en jeu sont principalement des énergies de **vibration** (dans l'infrarouge proche) mais aussi de **rotation** (infrarouge lointain). L'analyse de ces vibrations au spectromètre-IR est à l'origine du spectre infrarouge qui détermine les groupements fonctionnels de la molécule à analyser.



vibration moléculaire (état de transition énergétique).

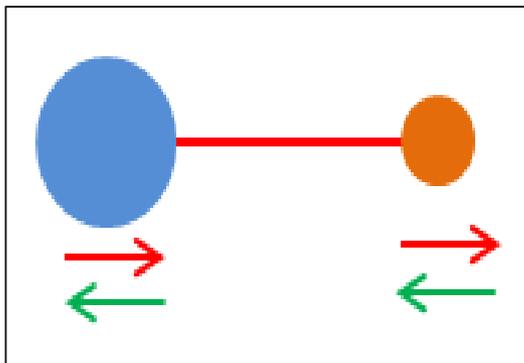
# Etats de transition de l'énergie



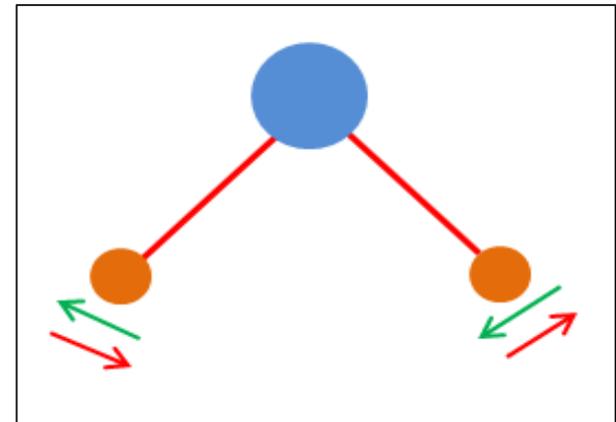
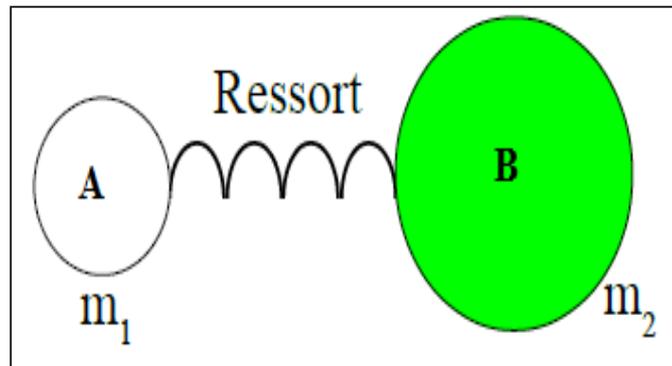
## La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

Dans la spectroscopie IR on distingue deux modes fondamentaux de vibration :

- **la vibration d'élongation** (stretching), qui correspond à une variation de la longueur des liaisons chimiques.
- **la vibration de déformation** (bending), correspond à une variation des angles de valence entre les liaisons chimiques.



vibration d'élongation

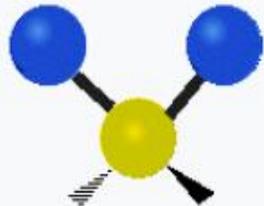


vibration de déformation

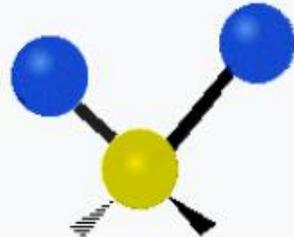
variation d'un angle de valence.

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

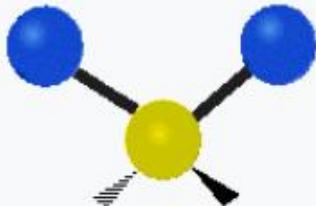
## Mode de vibration moléculaire



Étirement symétrique



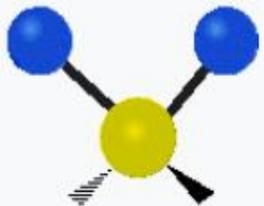
Étirement antisymétrique



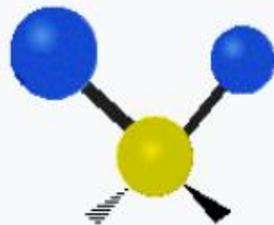
Cisaillement



Bascule



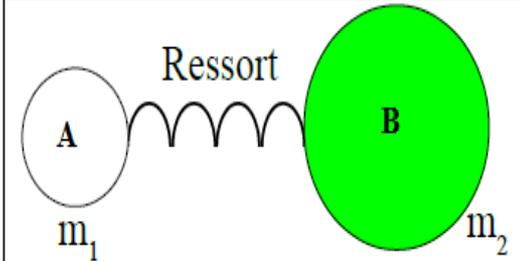
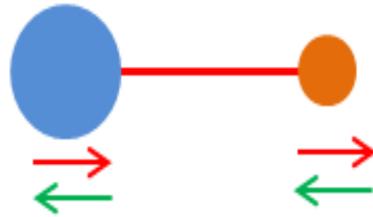
Agitation



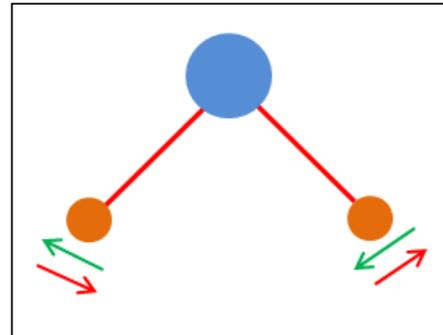
Torsion

Exemple de vibrations atomiques de chaîne hydrocarbonée

Les vibrations peuvent correspondre à une élongation longitudinale



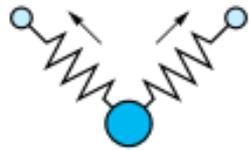
Les vibrations peuvent correspondre à une déformation angulaire



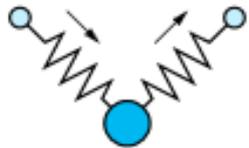
# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Mode de vibration moléculaire

### Modes d'élongation

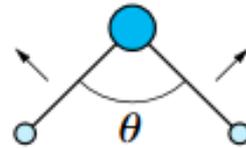


Symétrique  
( $\bar{\nu} = 2\,853\text{ cm}^{-1}$ )

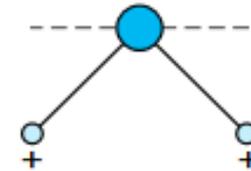


Asymétrique  
( $\bar{\nu} = 2\,926\text{ cm}^{-1}$ )

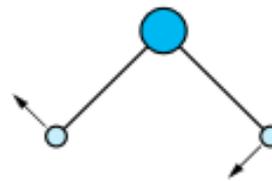
### Modes de déformation



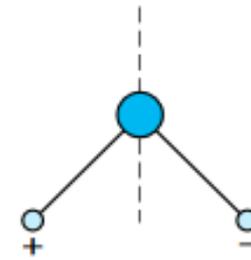
Cisaillement  
( $\bar{\nu} = 1\,467\text{ cm}^{-1}$ )



Balancement  
( $\bar{\nu} \approx 1\,300\text{ cm}^{-1}$ )



Rotation pure  
( $\bar{\nu} = 720\text{ cm}^{-1}$ )



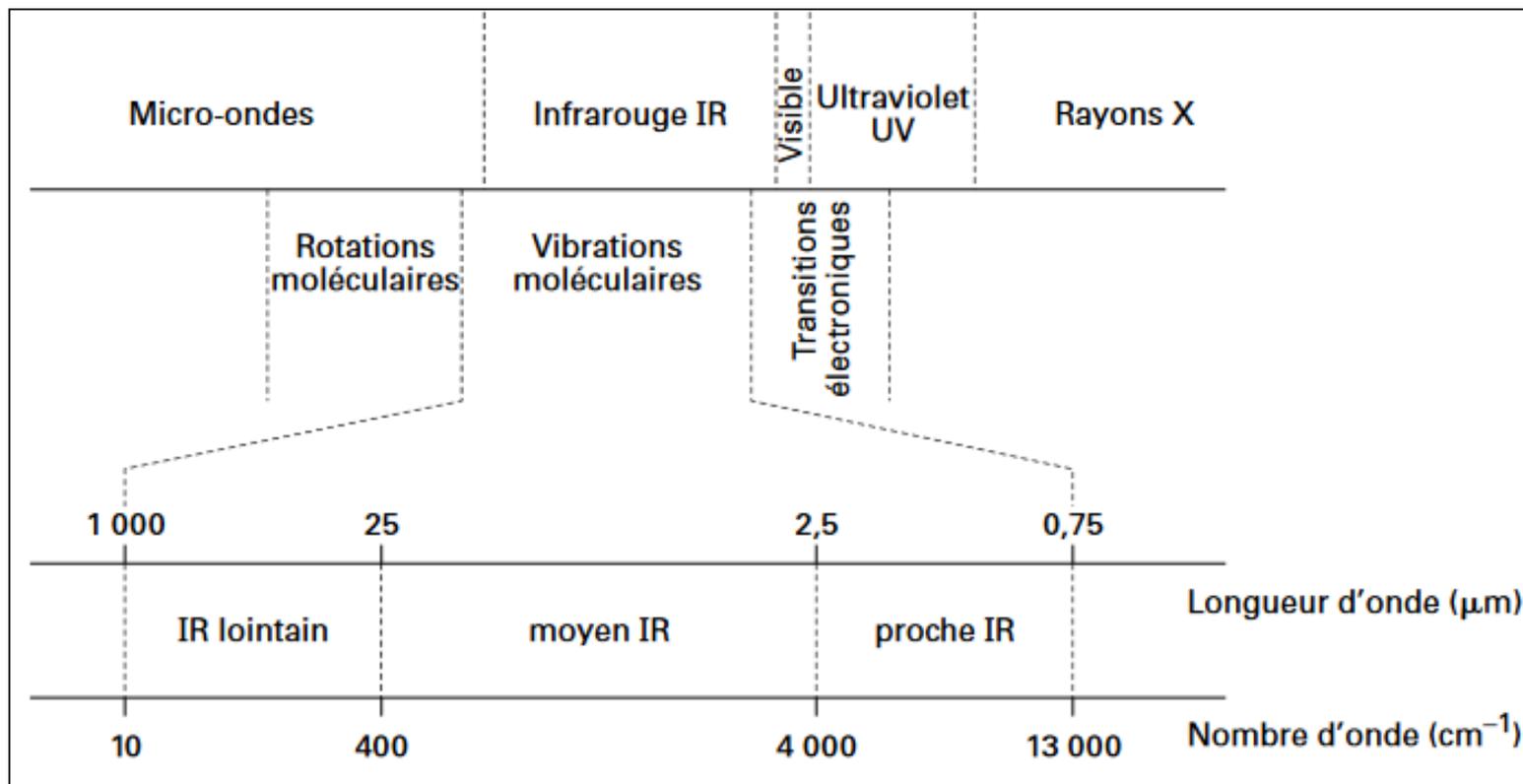
Torsion  
( $\bar{\nu} = 1\,250\text{ cm}^{-1}$ )

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre des ondes Infrarouge

Le domaine infrarouge est arbitrairement divisé en 3 catégories :

- le **proche infrarouge** (  $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  )
- le **moyen infrarouge** (  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  )
- le **lointain infrarouge** (  $400-10 \text{ cm}^{-1}$  ).



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre infrarouge

L'analyse de ces vibrations au spectromètre-IR est à l'origine du spectre infrarouge qui détermine les groupements fonctionnels présent dans la molécule à analyser.

Le spectre Infrarouge est représenté en transmission T (en ordonnée) en fonction du nombre d'onde  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

$$\sigma = \frac{1}{\lambda}$$

Le domaine infrarouge est arbitrairement divisé en 3 catégories :

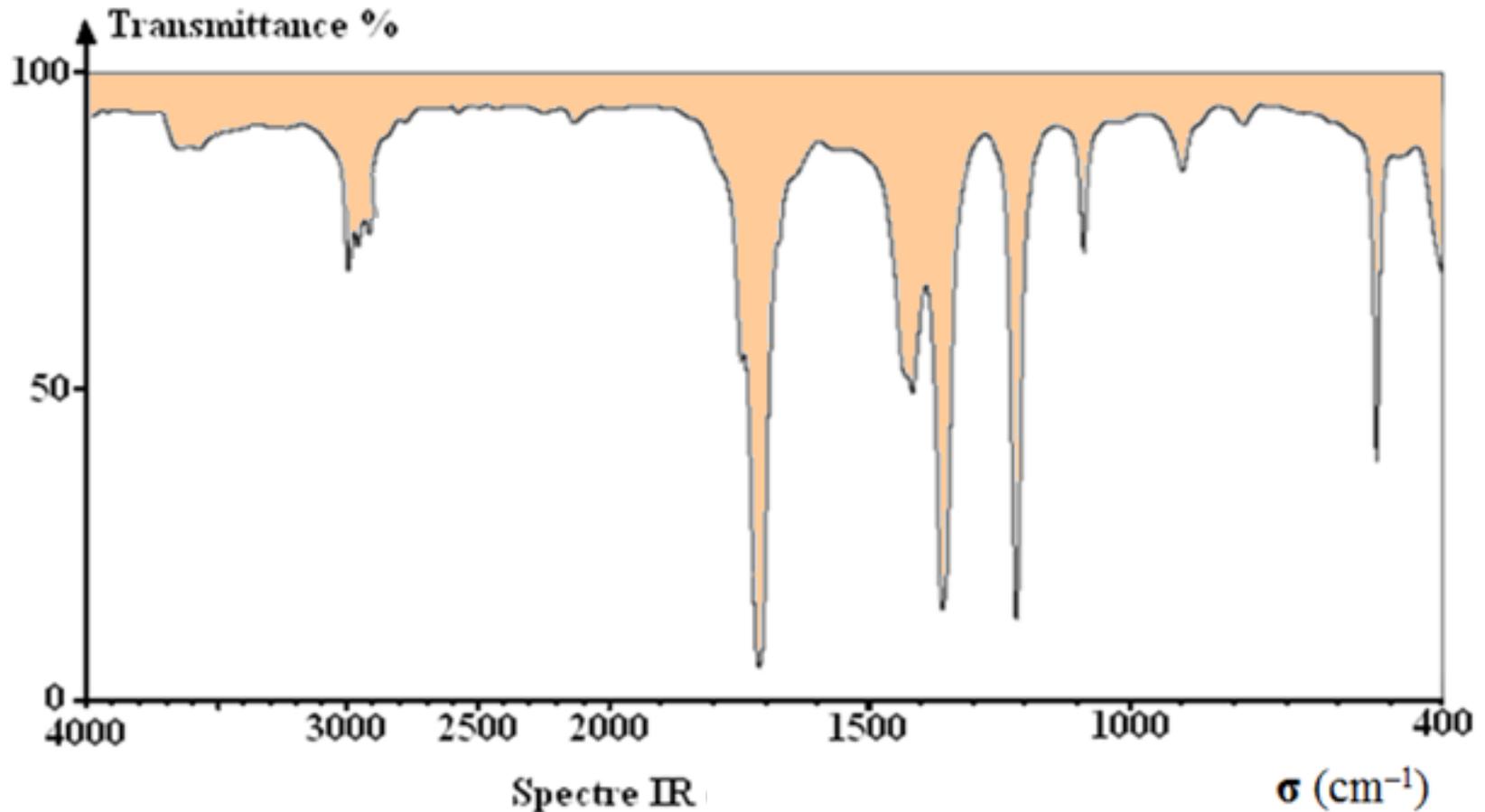
- le **proche infrarouge** ( 12500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ )
- le **moyen infrarouge** ( 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ )
- le **lointain infrarouge** ( 400-10  $\text{cm}^{-1}$ ).

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre infrarouge

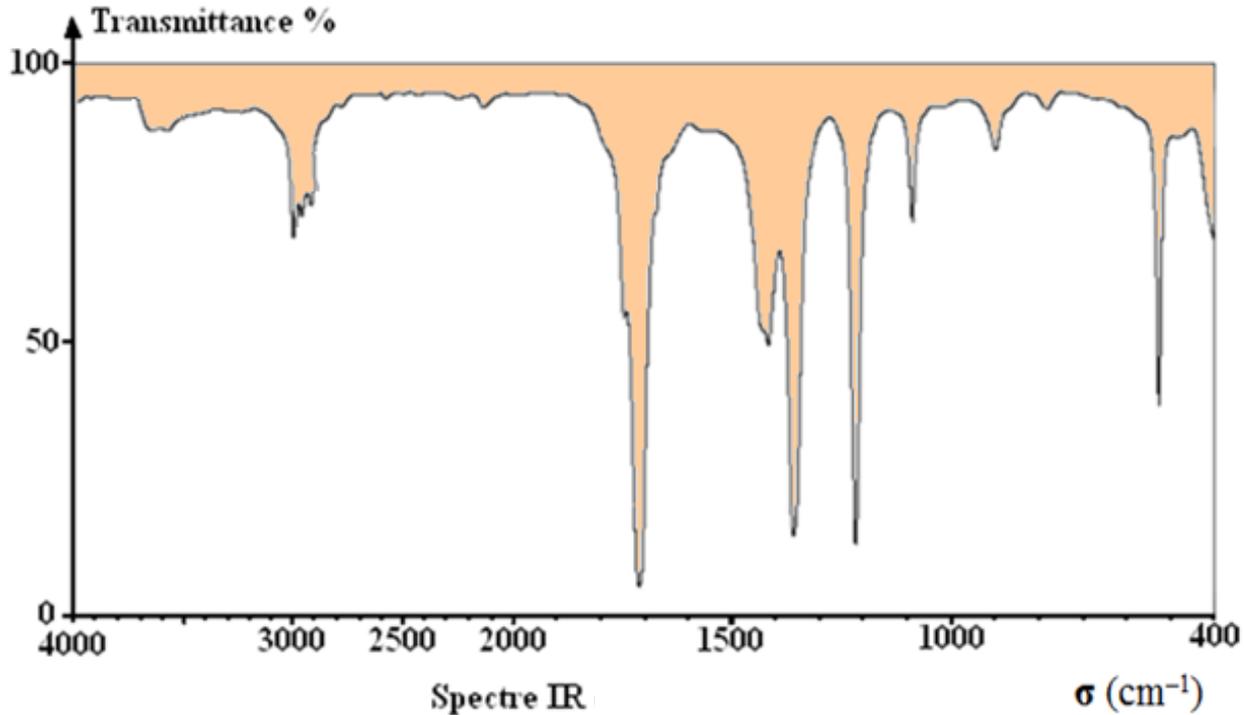
Le spectre IR d'une molécule donnée sera un spectre en transmittance  $T$  en fonction du nombre d'onde  $\sigma$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

$$\sigma = \frac{1}{\lambda}$$



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre infrarouge

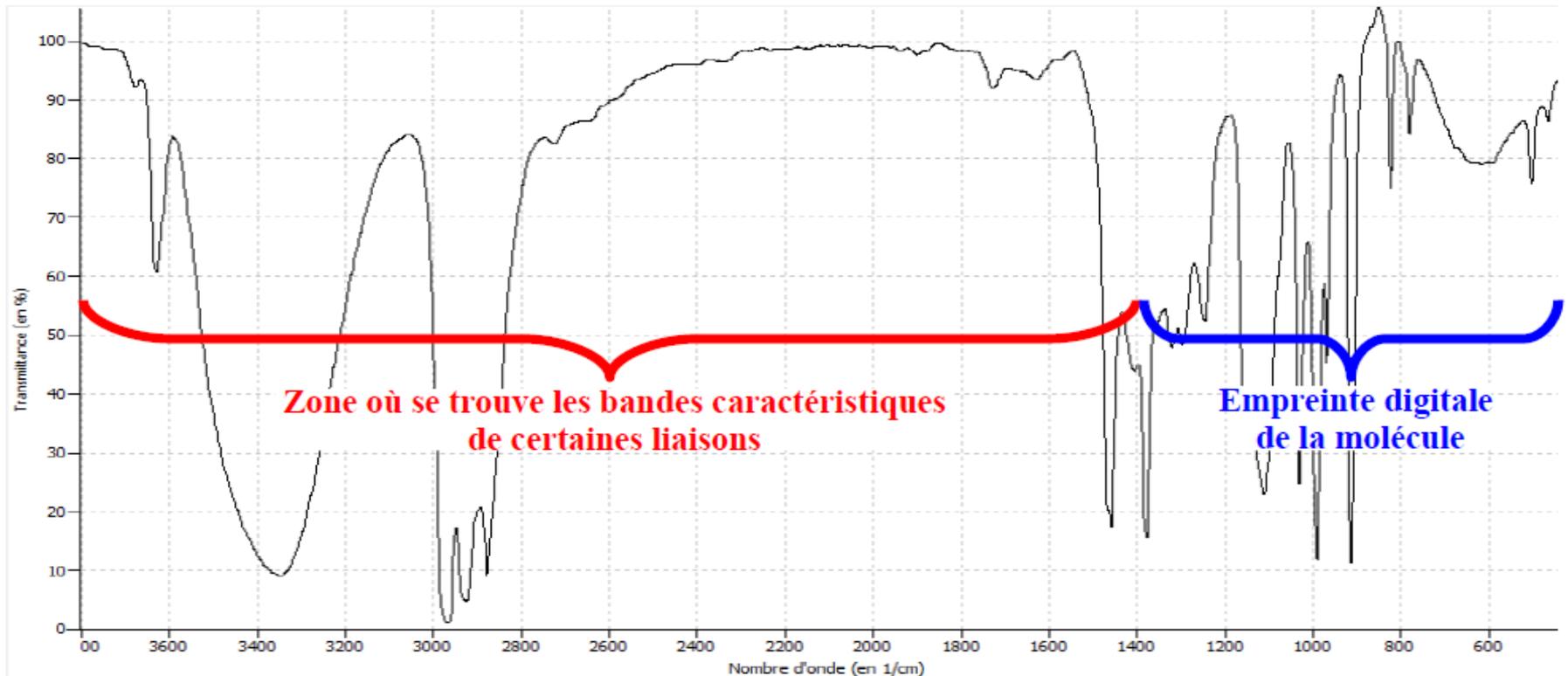


### Les caractéristiques de spectre Infrarouge

- Une faible valeur de transmittance correspond à une forte absorption.
- Les bandes d'absorption sont orientées vers le bas.
- L'axe des abscisses est orienté vers la gauche.
- Deux zones principales sont distinguées dans le spectre IR.

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre infrarouge

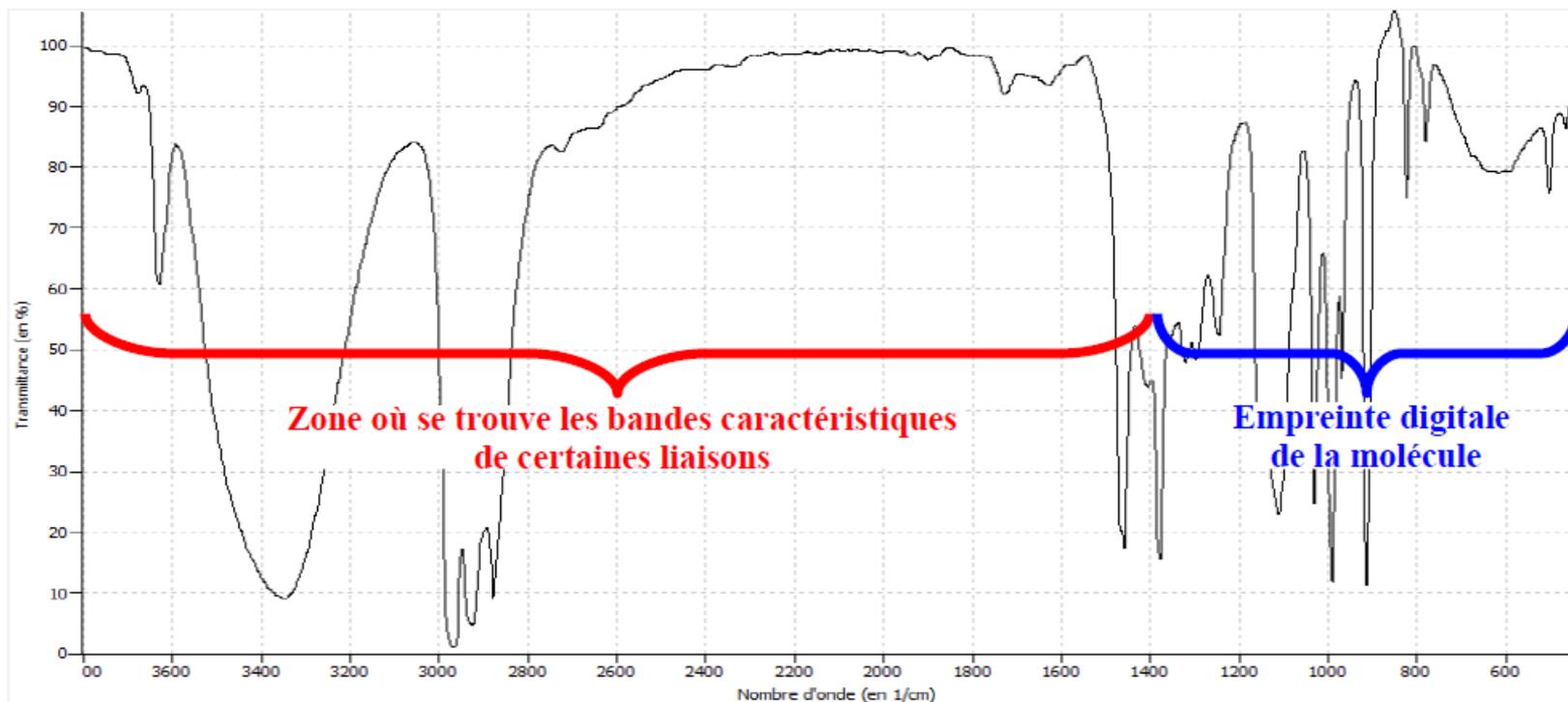


### **Zone d'empreinte digitale: le nombre d'onde compris entre 400 et 1500 $\text{cm}^{-1}$**

Il s'agit d'une zone très riche en bandes d'absorption pour les molécules organiques possédant un ou plusieurs atomes de carbone. Elle est généralement exploitée qu'en comparaison avec un spectre de référence. Cette zone s'appelle l'empreinte digitale de la molécule.

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Spectre infrarouge



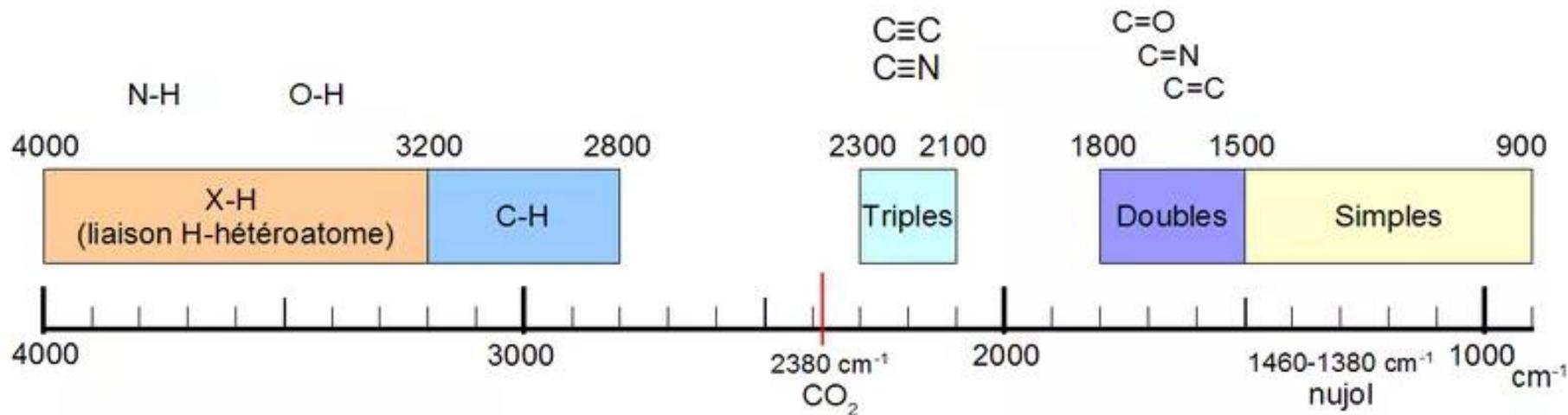
### **Zone de bandes caractéristiques: le nombre d'onde compris entre 1500 et 4000 $\text{cm}^{-1}$**

Cette zone ne contient qu'un nombre limité de bandes, correspondant à des types de liaisons particuliers. Chaque bande est caractérisée par : **Sa position dans le spectre** (la valeur du nombre d'onde du minimum de transmittance), **Sa largeur** (bande large ou fine), **Son intensité** (faible, moyenne ou forte) correspondant à la valeur minimale de la transmittance. **C'est la partie à étudier en priorité.**

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Zone de bandes caractéristiques du spectre infrarouge

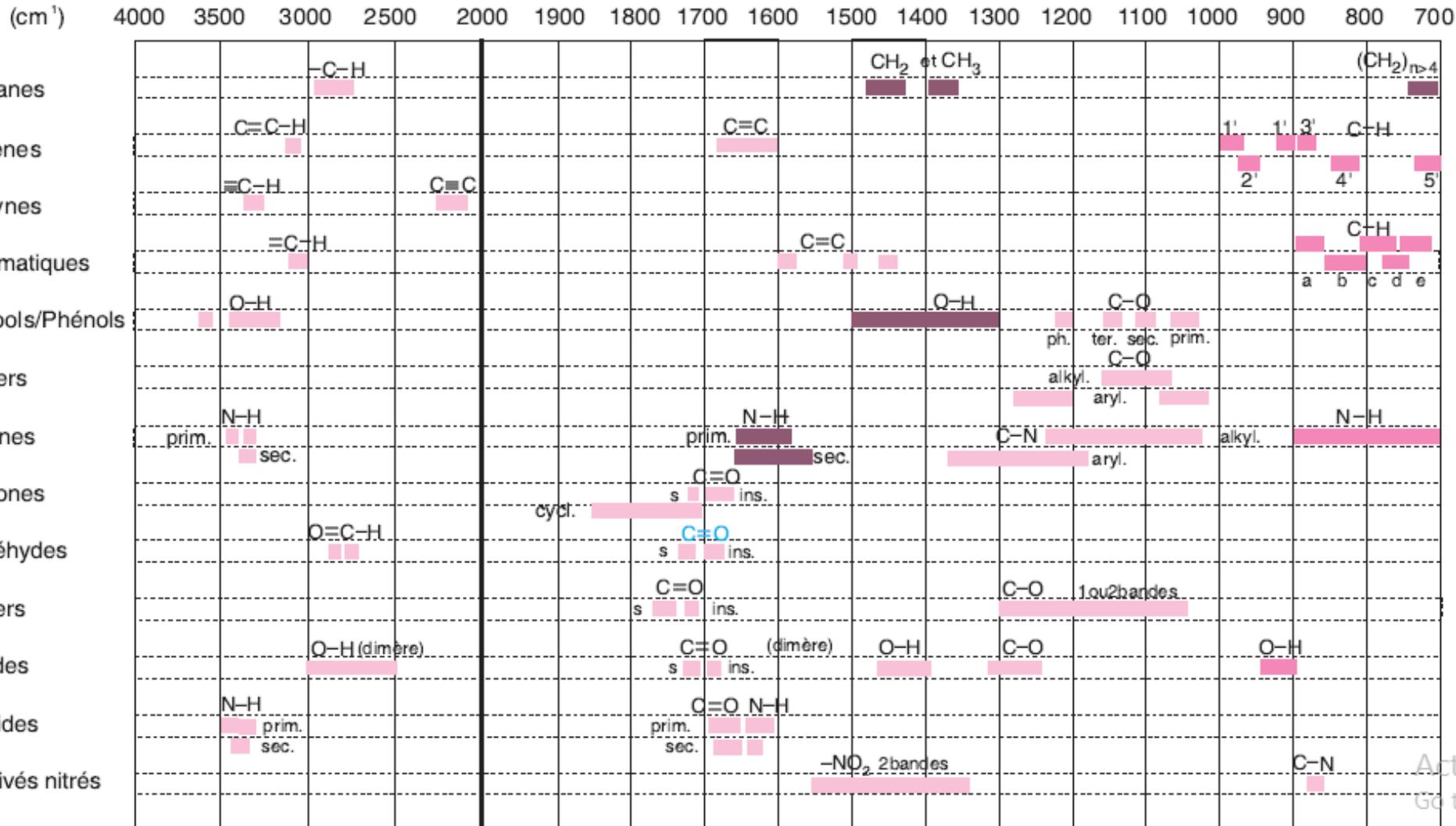
### Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaisons chimiques



Sur le spectre IR la comparaison des bandes à des fréquences proches des bandes caractéristiques permet la détermination des liaisons chimiques entre les atomes, l'enchaînement des atomes, et les groupements fonctionnelles présents dans la molécule à analyser: alcool, aldéhyde, cétone, acide, chaîne saturée, insaturée, caractère aromatique,...

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Les bandes caractéristiques dans l'IR de certaines liaisons chimiques.



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

Tables correspondant aux nombres d'ondes correspondant au maximum d'absorption des liaisons chimiques

Liaison	Famille chimique	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )
C-H	Alcane	2800 – 3000 et 1350 – 1450
	Alcène	1650
	Aldéhyde	2650 – 2850
C=C	Alcène	1700 – 1725
C=O	Aldéhyde	1725 – 1750
	Cétone	1700 – 1725
	Ester	1730 – 1750
	Acide carboxylique	1740 – 1800
	Amide	1600 – 1700

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

Tables correspondant aux nombres d'ondes correspondant au maximum d'absorption des liaisons chimiques

<b>C-O</b>	<b>Alcool</b>	<b>1000 – 1200</b>
	<b>Ester</b>	<b>1050 – 1300</b>
	<b>Acide carboxylique</b>	<b>1100 – 1200</b>
<b>C-N</b>	<b>Amine</b>	<b>1000 – 1200</b>
<b>N-H</b>	<b>Amine</b>	<b>1550 – 1650</b>
	<b>Amide</b>	<b>3300 – 3500</b>
<b>O-H</b>	<b>Alcool</b>	<b>3200 – 3500 (bande large)</b>

**En identifiant les bandes caractéristiques d'un spectre, il est possible d'en déduire la famille chimique de la molécule.**

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

Tables correspondant aux nombres d'ondes correspondant au maximum d'absorption des liaisons chimiques

liaison	nature	nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	intensité
O-H alcool libre	valence	3 580 – 3 670	F ; fine
O-H alcool lié	valence	3 200 – 3 400	F ; large
N-H amine	valence	3 100 – 3 500	m
imine			
N-H amide	valence	3 100 – 3 500	F
C <sub>di</sub> -H	valence	3 300 – 3 310	m ou f
C <sub>tri</sub> -H	valence	3 000 – 3 100	m
C <sub>tri</sub> -H aromatique	valence	3 030 – 3 080	m
C <sub>tét</sub> -H	valence	2 800 – 3 000	F
C <sub>tri</sub> -H aldéhyde	valence	2 750 – 2 900	m
O-H acide carboxylique	valence	2 500 – 3 200	F à m ; large
C≡C	valence	2 100 – 2 250	f
C≡N	valence	2 120 – 2 260	F ou m
C=O anhydride	valence	1 700 – 1 840	F ; 2 bandes
C=O chlorure d'acyle	valence	1 770 – 1 820	F
C=O ester	valence	1 700 – 1 740	F
C=O aldéhyde et cétone	valence	1 650 – 1 730	F
		abaissement de 20 à 30 cm <sup>-1</sup> si conjugaison	

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

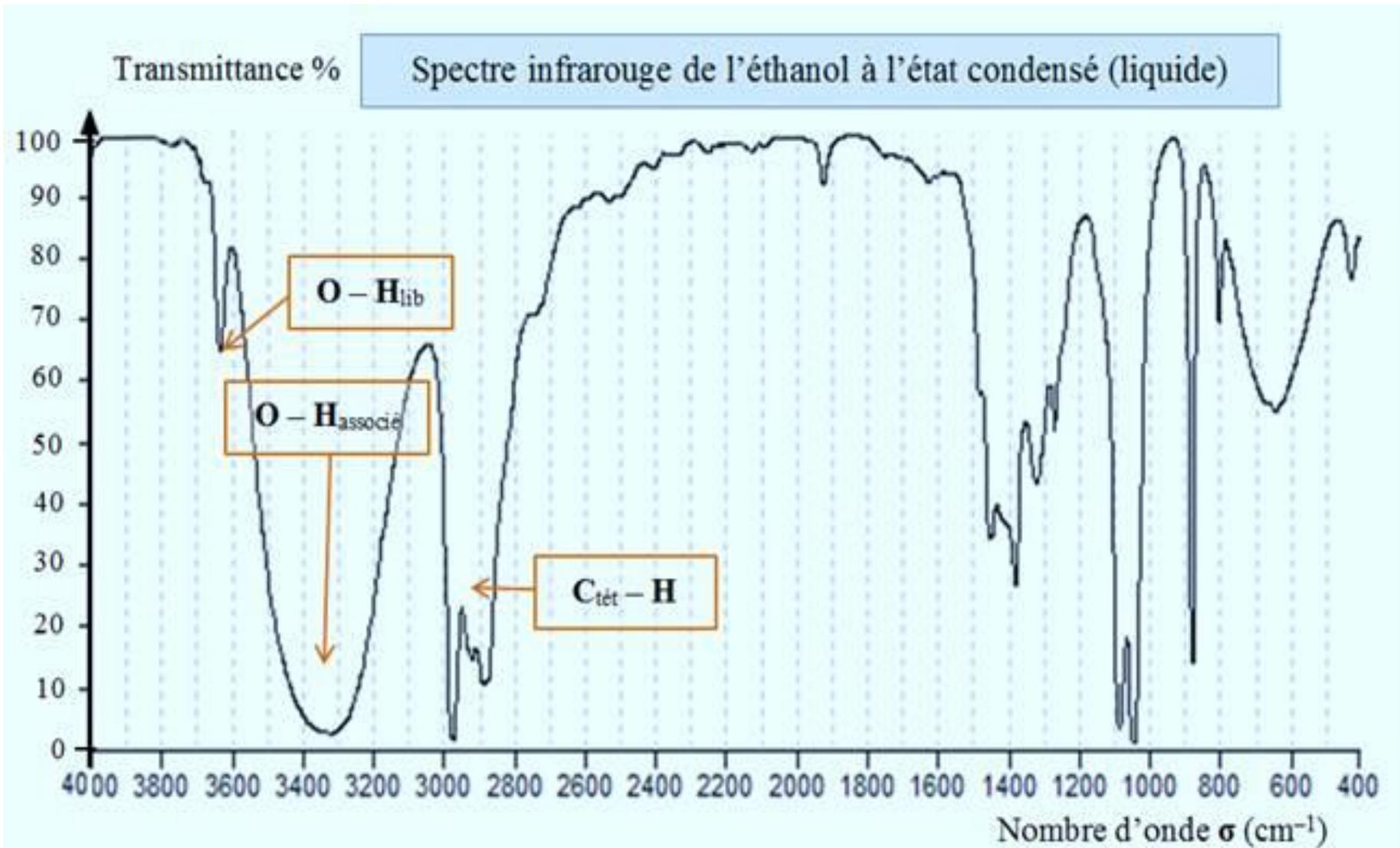
## Tables correspondant aux nombres d'ondes correspondant au maximum d'absorption des liaisons chimiques

C=O acide	valence	1 680 – 1 710	F
C=C	valence	1 625 – 1 685	m
C=C aromatique	valence	1 450 – 1 600	variable ; 3 ou 4 bandes
N=O	valence	1 510 – 1 580	F ; 2 bandes
C=N	valence	1 325 – 1 365	F
N-H amine ou amide	déformation	1 600 – 1 680	F ou m
C <sub>tét</sub> -H	déformation	1 560 – 1 640	F
C <sub>tét</sub> -H (CH <sub>3</sub> )	déformation	1 415 – 1 470	F ; 2 bandes
C-O	valence	1 365 – 1 385	F
C-C	valence	1 050 – 1 450	F
C-F	valence	1 000 – 1 250	F
C <sub>tri</sub> -H aromatique monosubstitué	déformation	1 000 – 1 040	F ; 2 bandes
C <sub>tri</sub> -H aromatique <i>o</i> -disubstitué	déformation	730 – 770	F
<i>m</i> -disubstitué	déformation	690 – 770	F et m ; 2 bandes
<i>p</i> -disubstitué	déformation	735 – 770	F
C <sub>tri</sub> -H aromatique trisubstitué	déformation	750 – 810	F et m ; 2 bandes
1,2,3	déformation	680 – 725	F
1,2,4	déformation	800 – 860	F et m ; 2 bandes
1,3,5	déformation	770 – 800	F ; 2 bandes
C-Cl	valence	685 – 720	F
C-Br	valence	860 – 900	F
C-I	valence	800 – 860	F
		675 – 730	
		700 – 800	
		600 – 750	
		500 – 600	

F : fort ; m : moyen ; f : faible

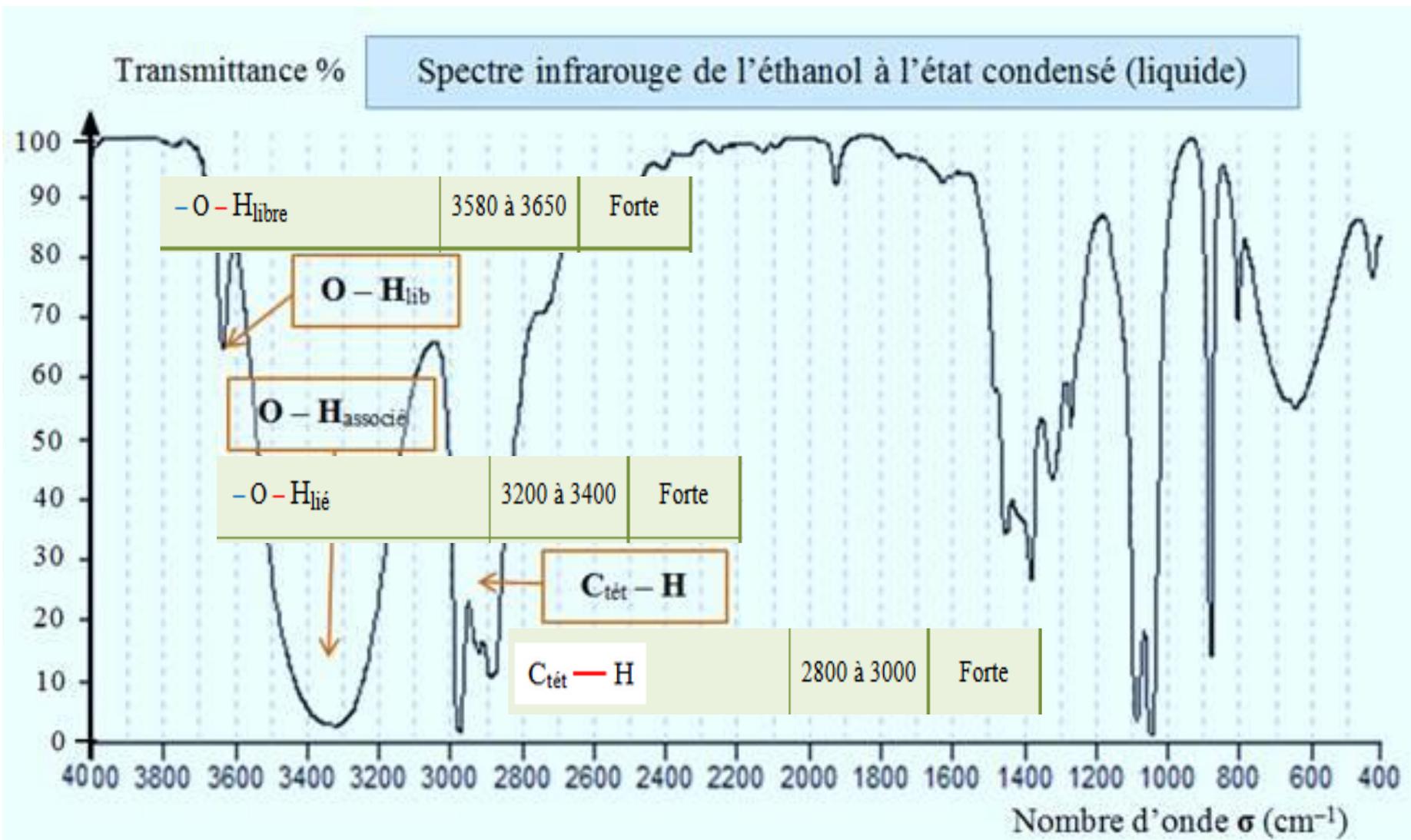
# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Zone de bandes caractéristiques du spectre infrarouge



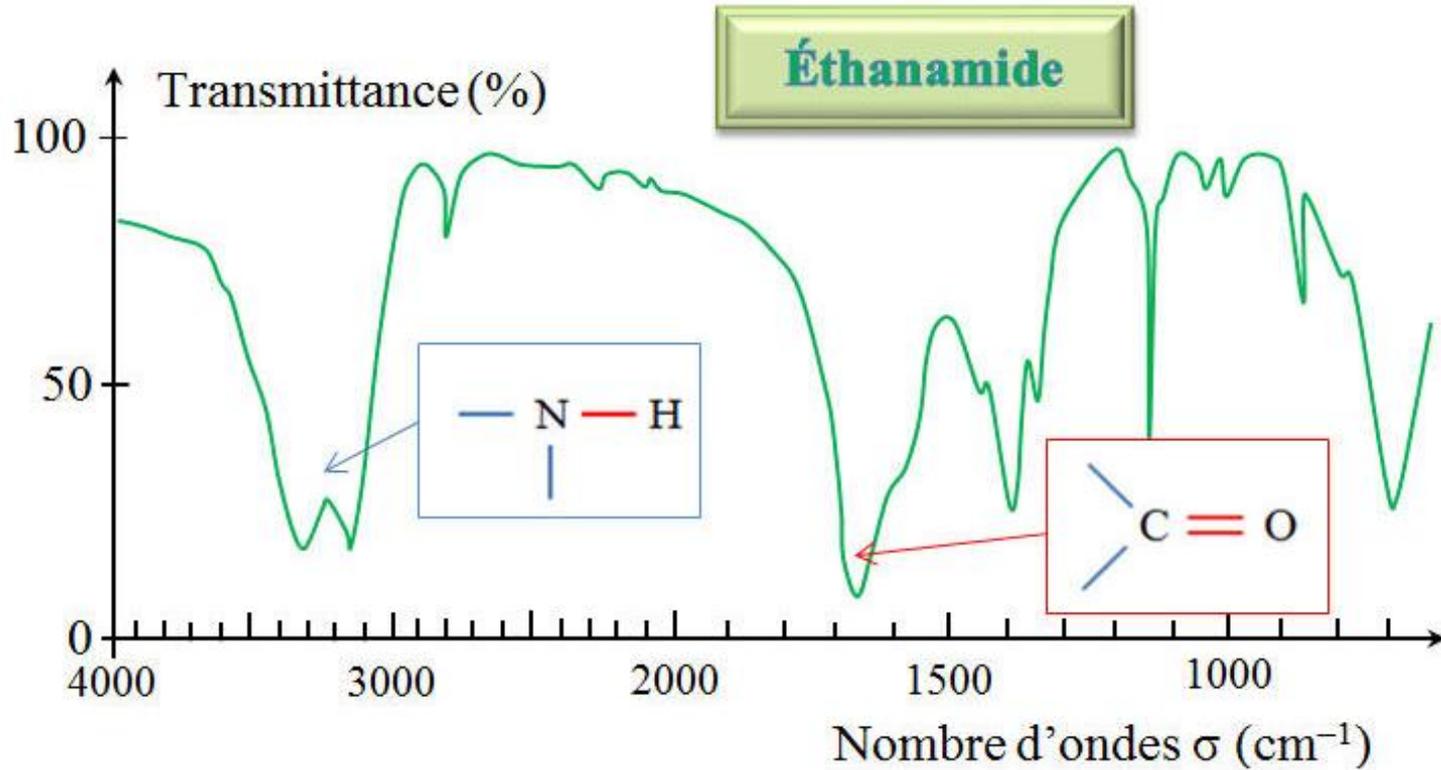
# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Zone de bandes caractéristiques du spectre infrarouge



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Zone de bandes caractéristiques du spectre infrarouge



	1650 à 1730	Forte
--	-------------	-------

	3100 à 3500	Moyenne
--	-------------	---------

## La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

### Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre infrarouge

Le principe du spectrophotomètre IR est le même que celui utilisé en UV-visible: l'appareil envoie des radiations de fréquences bien déterminées (**800nm à 1mm**).

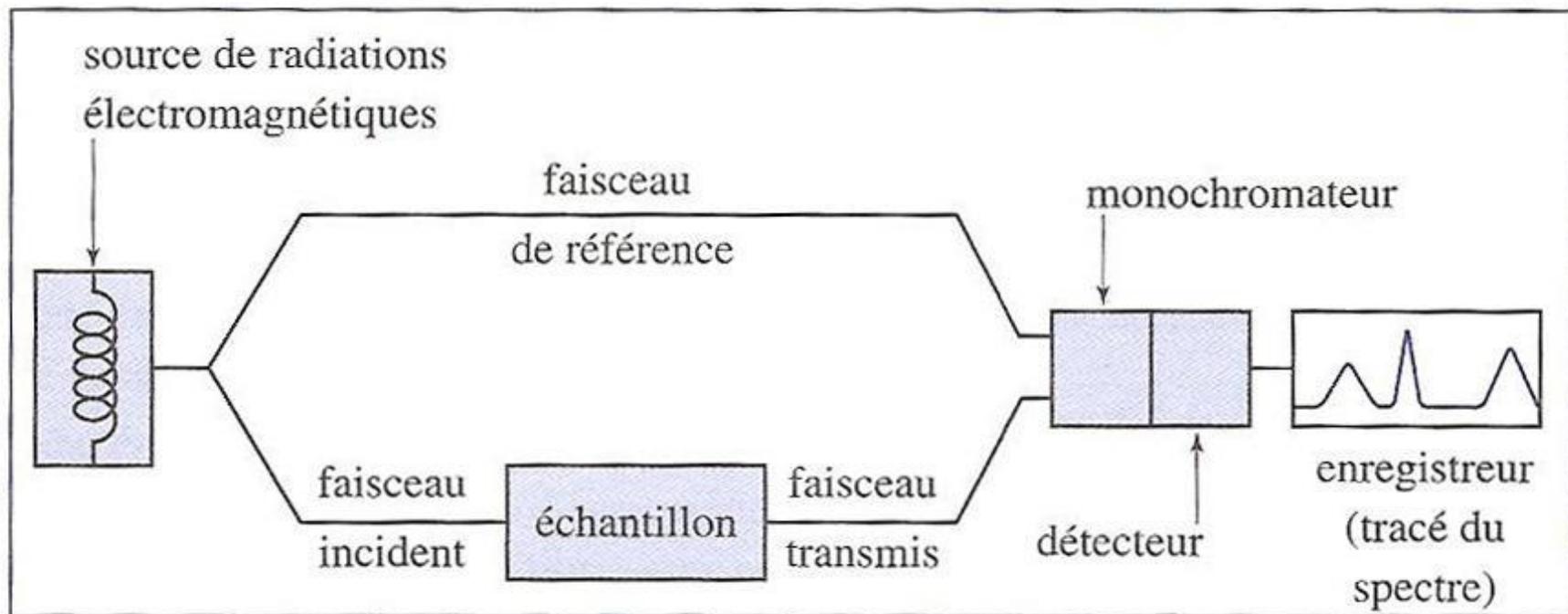
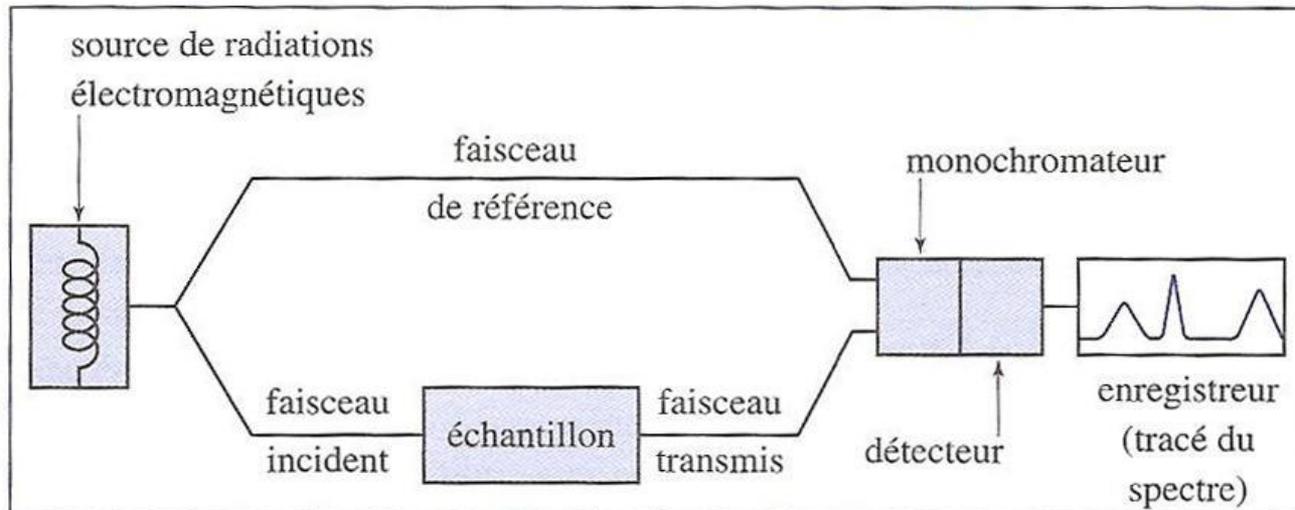


Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR

# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Le spectrophotomètre IR comporte;

- une source de rayons IR émettant un rayonnement polychromatique de  $7800\text{cm}^{-1}$  à  $350\text{cm}^{-1}$ )
- un dispositif optique qui décompose le spectre du rayonnement incident
- un porte-échantillon qui reçoit l'ensemble des de rayons IR simultanément mais ne les transmet pas de la même façon.
- un capteur qui enregistre les signaux (correspondant aux différentes fréquences)
- un détecteur des signaux collectés, qui sont ensuite convertis (logiciel) en spectre d'absorption qui apparaissent sur l'écran de l'ordinateur.



# La Spectroscopie moléculaire Infrarouge

## Le spectrophotomètre IR

