

Polycopié de cours

**Méthodes d'Analyses
Spectroscopiques des
Molécules Organiques**

**République Algérienne Démocratique et
Populaire Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté SNV & STU
Département de biologie**

Document destiné aux étudiants en

**Master 1 :
Biochimie Appliquée, Biochimie**

**Licence 3^{ème} année :
Biochimie, Biologie Moléculaire et
Cellulaire**

Dr. BENARIBA Nabila

Maître de conférences classe B.
Université Abou Bekr Belkaid,
Faculté SNV & STU.
Département de Biologie

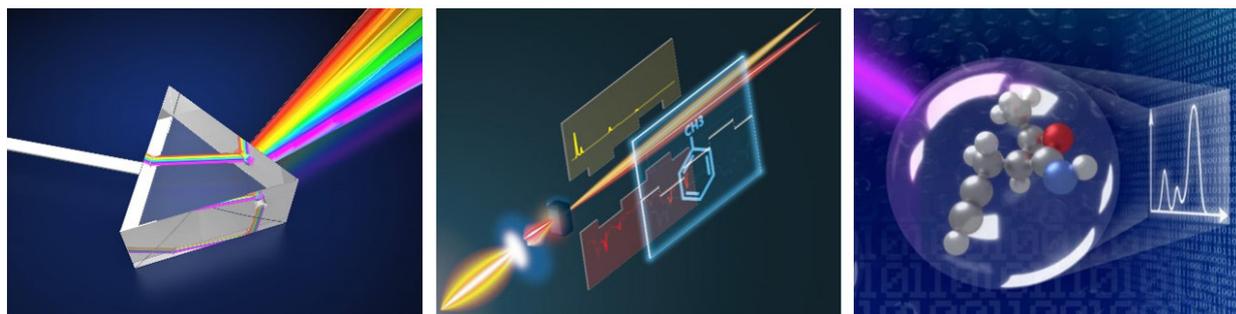
Année Universitaire : 2021/2022

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté SNV & STU Département de biologie
Département de Biologie

Polycopié de cours
Méthodes d'Analyses Spectroscopiques
des Molécules Organiques



Document destiné aux étudiants en.
Master 1 : Biochimie Appliquée, Biochimie
Licence 3^{ème} année : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Dr. BENARIBA Nabila

Maître de conférences classe B.
Université Abou Bekr Belkaid,
Faculté SNV & STU.
Département de Biologie

Année Universitaire : 2021/2022

Table des matières

Chapitre 1- Méthodes spectroscopiques

1- Les méthodes spectroscopiques.....	2
1-1 Définition.....	2
1-2 Types de méthodes spectroscopiques.....	3
1-3 Classification des méthodes spectroscopiques radiatives	3
1-4 Rayonnement électromagnétique.....	4
1-5 Spectre électromagnétique	5
1-6 Interaction rayonnement électromagnétique et matière : état de transition énergétique	9

Chapitre 2- La spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Visible

2-1 Principe de la spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Visible.....	12
2-2 La loi de Beer Lambert	13
2-3 Absorption de la lumière UV-Visible	13
2-3-1 Spectre d'absorption UV-Visible.....	15
2-3-2 Chromophores et absorption dans le spectre UV-Visible	15
2-4 Appareillage.....	17
2-5 Applications de la spectrométrie UV-Visible.....	20
2-5-1 Analyse qualitative.....	20
2-5-2 Analyse quantitative	20

Chapitre 3- La spectroscopie d'absorption moléculaire Infrarouge

3-1 Principe de la spectroscopie Infrarouge.....	23
3-2 Types de vibration dans l'infrarouge.....	24
3-2-1 Les vibrations d'élongation (Stretching)	24
3-2-2 Les vibrations de déformation (bending)	25
3-3 Appareillage de la spectroscopie infrarouge.....	27
3-3-1 Spectromètres dispersifs	28
3-3-2 Spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR)	28
3-4 Spectres IR et absorptions caractéristiques des liaisons.....	29
3-4-1 Analyse du spectre infrarouge.....	32

Chapitre 4- Spectroscopie par Résonance Magnétique (RMN)

4-1 Spin nucléaire.....	36
4-2 Transition de spin (Résonance magnétique)	36

4-3 Blindage ou effet d'écran.....	38
4-4 Principe général de la RMN.....	39
4-5 Spectre RMN : cas du ^1H	39
4-6 Analyse du spectre RMN ^1H	40
4-6-1 Déplacement chimique	40
4-6-2 Multiplicité du signal	41
4-6-3 La courbe d'intégration	43
4-7 Appareillage en RMN.....	43
4-8 La RMN bidimensionnelle (2D)	47
4-9 Applications de RMN.....	50

Chapitre 5- Spectroscopie de Masse

5-1 Principe.....	53
5-2 Les étapes de l'analyse par spectrométrie de masse.....	53
5-3 Spectromètre de masse	54
5-4 Sources d'ions	56
5-4-1 Ionisation par impact électronique	57
5-4-2 Ionisation chimique.....	57
5-5 Ionisation et fragmentation.....	57
5-6 Spectre de masse.....	59
5-7 Applications de la spectrométrie de masse.....	63

Chapitre 6 - Cristallographie : Diffraction des rayons X

6-1- Principe.....	66
6-2 Interaction RX-matière	67
6-3 Nature de l'échantillon utilisé en diffraction des rayons X.....	68
6-4 Principe de fonctionnement du diffractomètre.....	69
6-5 Spectre de diffraction ou diffractogramme.....	72
6-6 Applications de la technique de diffraction des rayons X.....	74

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 01 : Les types d'interaction entre rayonnement électromagnétique incident et la matière	2
Figure 02 : Classification des méthodes spectroscopiques	4
Figure 03 : Onde électromagnétique	4
Figure 04 : Les types des ondes électromagnétiques	5
Figure 05 : Le spectre des ondes électromagnétiques	6
Figure 06 : Etat de transition énergétique électronique	10
Figure 07 : Absorption (A) et transmission (T) de la lumière par une solution	12
Figure 08 : Le spectre de bandes d'absorption d'une solution colorée	14
Figure 09 : Cercle (étoile) chromatique et couleurs complémentaires	14
Figure 10 : La couleur complémentaire de la lumière visible absorbée par la solution	14
Figure 11 : Spectre d'absorbance UV-Visible	15
Figure 12 : Effet de l'environnement sur les variations de l'absorbance	17
Figure 13 : Schéma fonctionnel d'un spectrophotomètre UV-Visible	19
Figure 14 : Spectrophotomètre UV-Visible de paillasse	19
Figure 15 : Droite d'étalonnage	21
Figure 16 : Mouvements vibrationnels fondamentaux en IR	24
Figure 17 : Vibration d'élongation symétrique (a) et asymétrique (b)	25
Figure 18 : Aspect théorique des vibrations d'élongation (<i>Stretching</i>)	25
Figure 19 : Aspect théorique des vibrations de déformation angulaire (<i>Bending</i>)	26
Figure 20 : Modes des vibrations de déformation angulaire (<i>Bending</i>)	26
Figure 21 : Les modèles de spectromètre infrarouge IR	27
Figure 22 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR double faisceau de type dispersif	28
Figure 23 : Schéma de spectromètre à transformée de Fourier FT-IR	29
Figure 24 : Spectromètre Infrarouge au laboratoire	29
Figure 25 : Spectre infrarouge transmittance en fonction du nombre d'onde σ (cm^{-1})	30
Figure 26 : Bandes caractéristiques de certaines liaisons chimiques du spectre infrarouge	31
Figure 27 : Analyse du spectre infrarouge et identifications des liaisons et groupements chimiques.	32

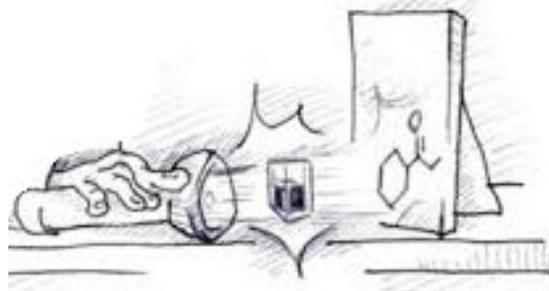
Figure 28 : Représentation schématique d'un spin nucléaire	36
Figure 29 : Orientation des moments magnétiques du spin nucléaire, aléatoire en absence du champ magnétique B_0	37
Figure 30 : Transition de spin (Résonance magnétique nucléaire)	37
Figure 31 : Transformé de fourrier et spectre RMN	38
Figure 32 : Spectre RMN	39
Figure 33 : Multiplicité du signal RMN	42
Figure 34 : la courbe d'intégration du spectre RMN	43
Figure 35 : Spectromètre RMN	44
Figure 36 : Schéma simplifié du spectromètre RMN	46
Figure 37 : représentation en 3D (a) et en contour (b) d'un spectre en RMN 2D	47
Figure 38 : RMN 2D COSY (a) , TOCSY (b) et NOESY (c) de 2 noyaux homonucléaires	49
Figure 39 : Corrélations hétéronucléaires HSQC (a) et HMBC (b)	49
Figure 40 : Schéma du principe de fonctionnement du spectromètre de masse	54
Figure 41 : Principe de fonctionnement du spectromètre de masse	55
Figure 42 : Source d'ions par impact électronique (bombardement électronique)	57
Figure 43 : Types d'ionisation	58
Figure 44 : Ionisation et fragmentation	58
Figure 45 : Ionisation et fragmentation moléculaire dépendante de l'énergie du flux électronique	59
Figure 46 : Spectre de masse	60
Figure 47 : Film (cliché) de radiographie (a) et de cristallographie ou diffractogramme (b)	65
Figure 48 : Schéma simplifié du principe de la diffraction des rayons X (a) , traitement des données pour détermination du model atomique (b, c)	66
Figure 49 : Formes des cristaux	67
Figure 50 : Diffraction des rayons X par les plans réticulaires du cristal (loi de Bragg)	68
Figure 51 : Film de diffraction d'un monocristal (a) et une poudre cristalline (b)	68
Figure 52 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre	70
Figure 53 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre à compteur	71
Figure 54 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre à quatre cercles	71
Figure 55 : Spectre de diffraction ou diffractogramme (a) ; Intensité intégrale d'un pic (Surface nette) pour analyse quantitative	72

Figure 56 : étapes des calculs pour obtentions de la carte de densité électronique	73
Figure 57 : Densité électronique de l'ubiquine C ₁₁ H ₁₄ O ₄	73

Liste des tableaux

Tableau 01 : Ondes électromagnétiques et états de transition énergétique électronique	10
Tableau 02 : Les groupements chromophores	16
Tableau 03 : Bandes caractéristiques de certains groupements chimique en spectroscopie IR	31
Tableau 04 : Table des nombres d'onde des vibrations d'élongation et de déformation en IR	33
Tableau 05 : Propriétés nucléaires des noyaux les plus étudiés en RMN	35
Tableau 06 : Quelques exemples de déplacements chimiques selon l'environnement proche du proton ¹ H et du ¹³ C	42
Tableau 07 : Fréquences des spectromètres RMN couramment utilisée en analyse	45

Chapitre 1- Méthodes spectroscopiques



1- Les méthodes spectroscopiques

1-1 Définition

Les méthodes spectroscopiques ou spectrométriques sont caractérisées par l'utilisation de la lumière pour effectuer des analyses qualitatives ou quantitatives des molécules dans différents milieux. Elles permettent l'analyse et parfois la séparation des molécules pour déterminer leurs caractéristiques : structure chimique, groupements fonctionnels, masse moléculaire, absorbance, concentration ... Ces méthodes physiques étudient la lumière ou les rayonnements (ondes) électromagnétiques absorbés, diffusés, transmis ou diffractés par la matière (**figure 01**). Elles trouvent leur application dans divers domaines : chimie, biologie, pharmacie, médecine, environnement, agroalimentaire, ...

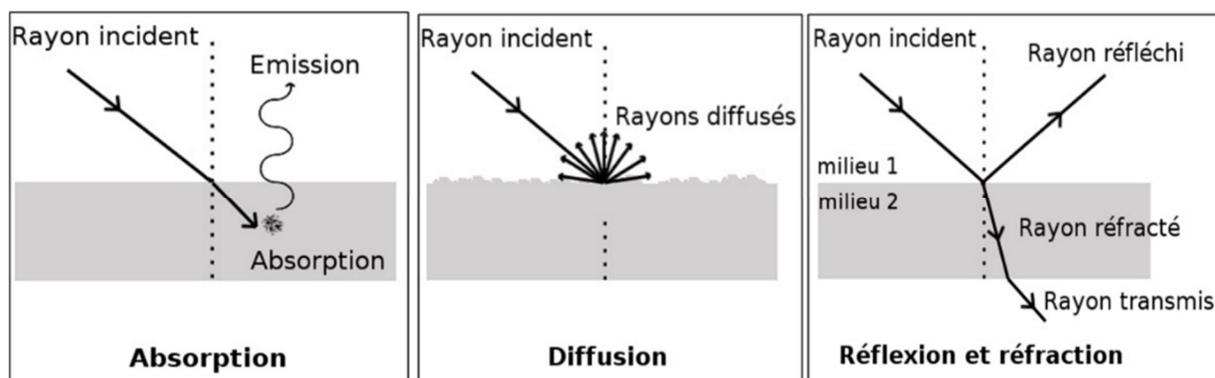


Figure 01 : Les types d'interaction entre rayonnement électromagnétique incident et la matière

Un rayonnement électromagnétique en contact de la matière peut être :

Absorbé : Une partie du rayonnement est absorbé par la matière qui s'échauffe, ce qui provoque une émission de la lumière.

Transmis : Une partie du rayonnement est transmise par la matière si elle n'est pas totalement opaque

Diffusé : Une partie du rayonnement est renvoyé dans toutes les directions si la matière n'est pas lisse

Diffracté : Une partie du rayonnement est réfléchis dans une seule direction si la matière est solide.

1-2 Types de méthodes spectroscopiques

Selon le rayonnement mis en contact avec la matière on distingue deux grands types de méthodes spectroscopiques :

- **La spectrométrie de masse** : c'est l'interaction électrons-matière, elle est basée sur le bombardement électronique de la matière.
- **La spectroscopie radiative** : c'est l'interaction rayonnement électromagnétique-matière, c'est le rayonnement électronique et magnétique qui sont en contact avec la matière.

1-3 Classification des méthodes spectroscopiques radiatives

Dans la spectroscopie radiative et selon la nature de la molécule à analyser (solide ou liquide) et l'interaction rayonnement électromagnétique/matière, on distingue deux types de spectroscopie radiative (**Figure 02**) ;

▪ La spectroscopie par diffraction de rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique incident est diffracté par la molécule cristallisée (solide), c'est le cas de la cristallographie par diffraction des rayons X.

▪ La spectroscopie par absorption de rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique incident est absorbé par la molécule en solution. Dans la spectroscopie par absorption de rayonnement électromagnétique et selon le spectre du rayonnement électromagnétique utilisé et l'absorption de ce rayonnement, on distingue ;

- **La spectroscopie d'absorption moléculaire** : tous les atomes de la molécule absorbent le rayonnement électromagnétique, en utilisant le spectre électromagnétique infrarouge, Visible et Ultra-violet. Cette absorption permet de déterminer les groupements fonctionnels de la molécule.
- **La spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire)** : Permet de localiser les hydrogènes et le carbone, c'est-à-dire la structure du squelette carboné.

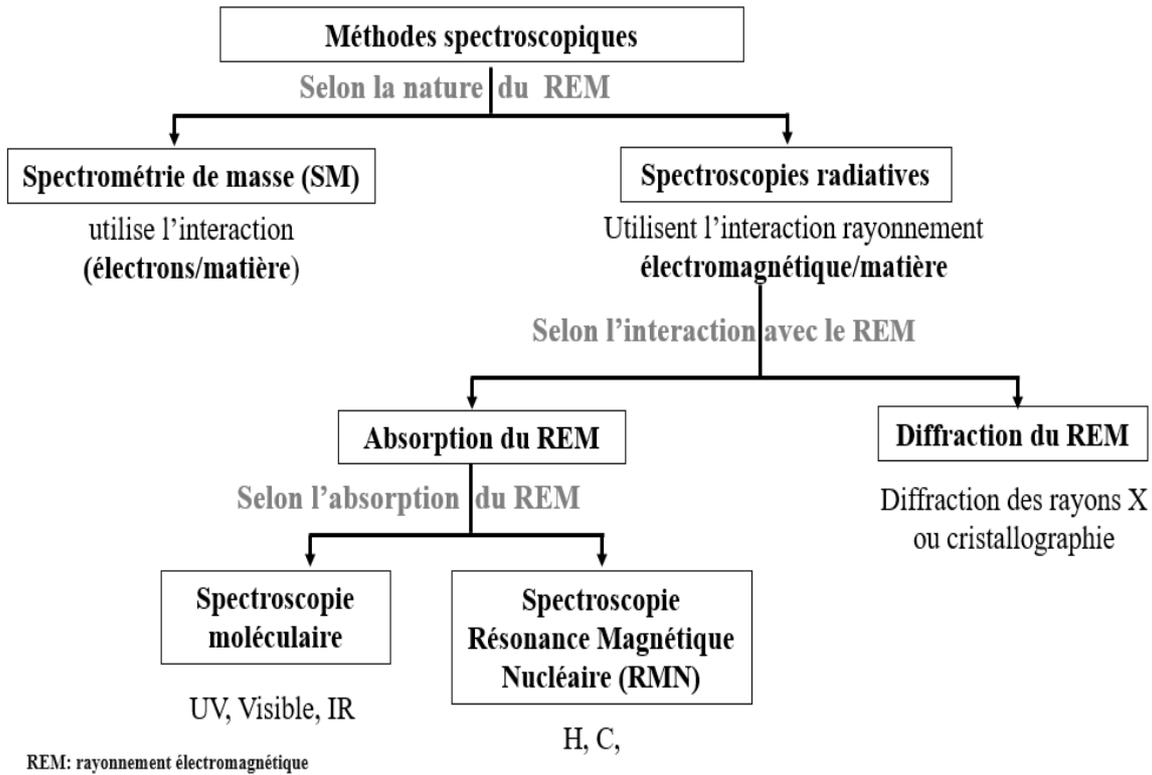


Figure 02 : Classification des méthodes spectroscopiques

1-4 Rayonnement électromagnétique

Un rayonnement est une catégorie d'ondes qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière, soit près de 300 000 kilomètres par seconde. Ces ondes correspondent aux oscillations couplées d'un champ électrique (**E**) et d'un champ magnétique (**B**) à la fois perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation (**Figure 04**), et elles transportent de l'énergie (photons).

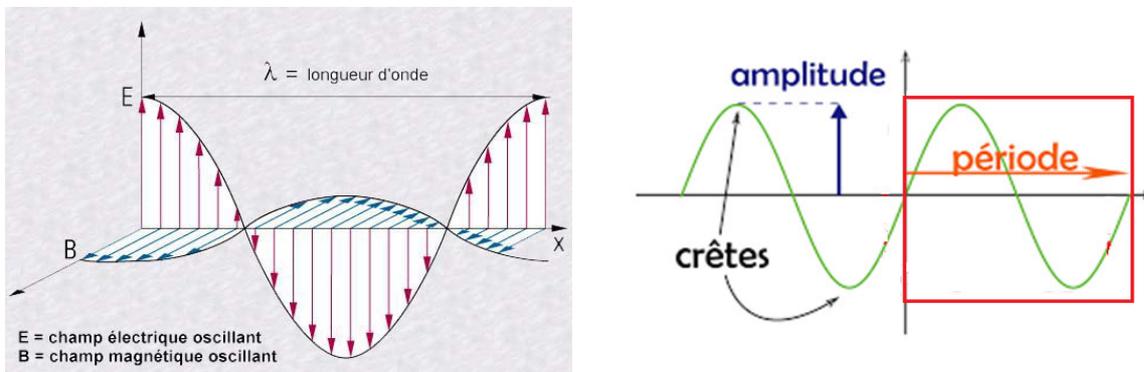


Figure 03 : Onde électromagnétique

Un rayonnement électromagnétique est caractérisé par sa fréquence (ν) exprimée en **Hertz**, correspond au nombre d'oscillations par seconde, et par sa longueur d'onde (λ) exprimée en **nm**, correspond à la distance qui sépare deux oscillations de l'onde. Elle est inversement proportionnelle à la fréquence. La lumière est une onde électromagnétique qui possède un caractère ondulatoire. Elle est caractérisée par sa fréquence (ν) et sa longueur d'onde (λ).

En fonction de la fréquence et de la longueur d'onde on distingue trois types des ondes électromagnétiques (**figure 04**).

- **Les ondes courtes** : caractérisées par une forte fréquence et une faible longueur d'onde λ
- **Les ondes moyennes** : caractérisées par des valeurs moyennes de la fréquence et de λ
- **Les ondes longues** : caractérisées par une forte longueur d'onde λ et une faible fréquence

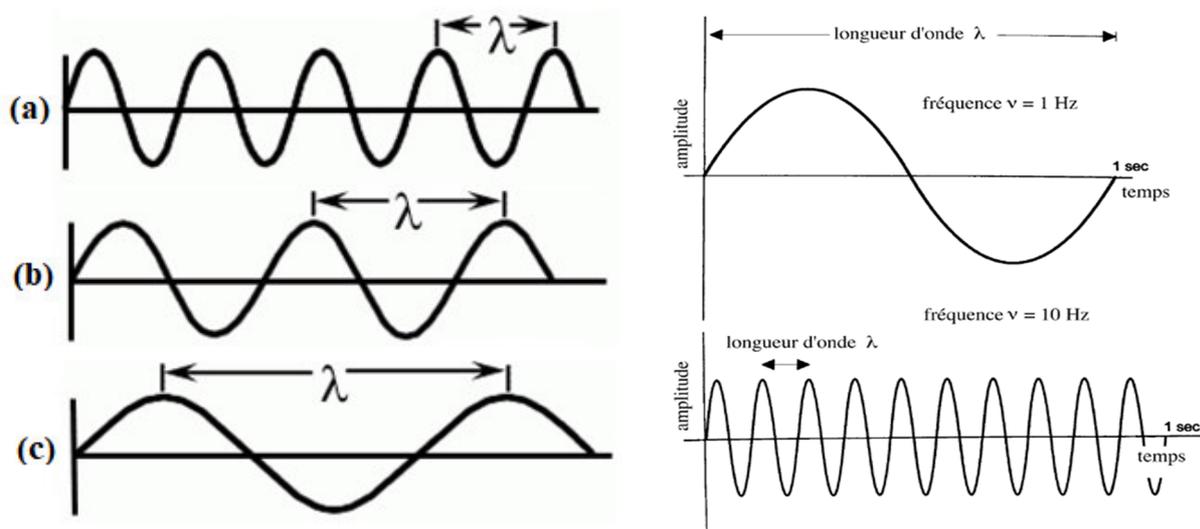


Figure 04 : Les types des ondes électromagnétiques
Onde courte (a), onde moyenne (b), onde longue (c)

1-5 Spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont classées et réparties en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence, ou bien de leur énergie. Cette répartition est appelée spectre électromagnétique (**Figure 05**). Les rayons gamma ont la plus haute fréquence, tandis que les ondes radio ont la plus basse. La lumière visible se situe approximativement au centre de ce spectre, et n'en représente qu'un spectre restreint.

Dans le spectre électromagnétique les ondes sont classées dans l'ordre des plus petites longueurs d'onde vers les plus grandes, on retrouve les ondes courtes qui sont ionisantes et

qui regroupent les rayons gamma (γ) et les rayons X, ensuite les rayons non ionisants et qui regroupent l'ultraviolet (UV), la lumière visible, l'infrarouge (IR), les microondes, et les ondes radio.

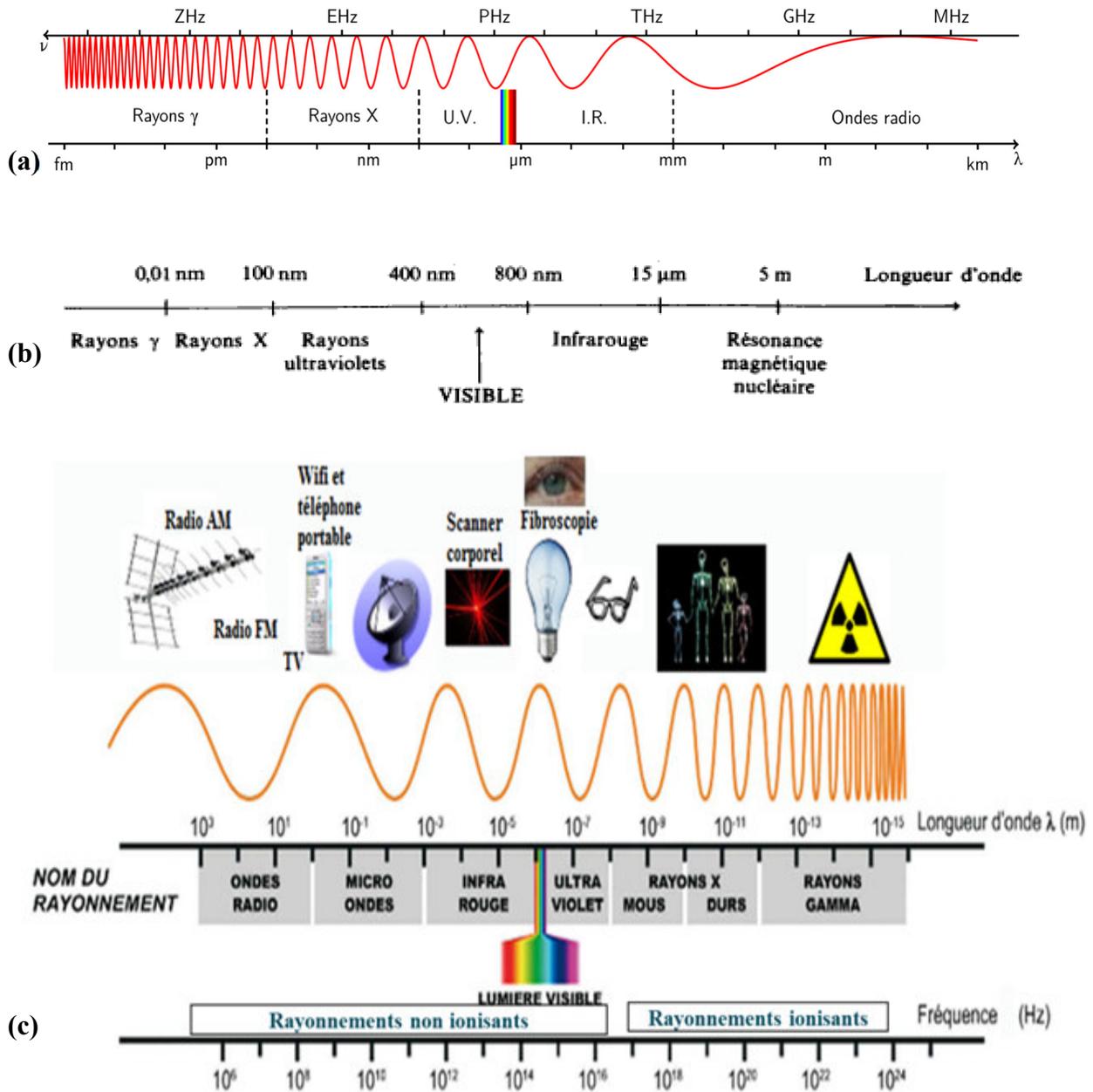


Figure 05 : Le spectre des ondes électromagnétiques

(a) : La fréquence et la longueur d'onde ; (b) : la longueur d'onde ;

(c) : Applications des ondes électromagnétiques

Les rayons gamma (γ)

Sont des rayonnements très énergétiques (radioactifs), qui traversent facilement la matière et sont très dangereux pour les cellules vivantes (carcinogènes). Ils sont caractérisés par une longueur d'onde inférieure à 0,01nm. Ces rayons sont utilisés dans le domaine médical comme la scintigraphie (médecine nucléaire) et la radiothérapie.

Les rayons X

Rayonnements très énergétiques, qui traversent plus ou moins facilement les corps matériels, et qui sont moins dangereux que les rayons gamma. Ces rayons à la longueur d'onde 0,01-100 nm, sont utilisés dans le domaine médicale dans la radiothérapie, la radiographie, les radio panoramiques, dans l'analyse structurale chimique comme la cristallographie et dans la technologie (contrôle des bagages dans les aéroports, contrôle des pièces de métallurgie...).

Les ultraviolets (UV)

Rayonnements ionisants et nocifs pour la peau, caractérisés par une longueur d'onde variable entre 10 et 100 nm pour les UV lointain, et entre 100 et 400 nm pour les UV proches. Ces derniers sont constitués de trois spectres ; **UVA** (100-280 nm), **UVB** (280-315 nm) et **UVC** (315-400nm). Les **UV extrêmes** (10-100 nm). Les UV sont utilisées divers appareils, de l'entretien dentaire (réparation des caries dentaires), les cabines de bronzage, les détecteurs de faux au niveau des banques, et certains dispositifs de séquençage de l'ADN. Les UVC sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes (stérilisation par rayonnement ultraviolet).

La lumière visible

Appelée également la lumière blanche, c'est la seule partie du spectre électromagnétique qui est visible pour l'œil humain. Elle fait partie de la lumière du soleil qui alimente les écosystèmes terrestres, via la photosynthèse. La lumière visible est caractérisée par un spectre très restreint qui se limite entre 400 et 750nm (ou 800nm).

L'arc-en-ciel est un exemple de réfraction de la lumière visible en sept couleurs monochromatiques : violet (400-420 nm) ; indigo (420-440 nm) ; bleu (440-480 nm) ; vert (480-560 nm) ; jaune (560-580 nm) ; orange (580-620 nm) et rouge (620-800 nm). La lumière blanche est l'addition des sept couleurs (rouge + orange + jaune + vert + bleu + indigo + violet = Blanc). Dans le domaine médical, la lumière visible est utilisée en fibroscopie et en

luminothérapie notamment la lumière bleue pour le traitement de la jaunisse néonatale et des maladies dermatologiques (des lésions cutanées et le cancer de la peau).

L'infrarouge (IR)

Un rayonnement électromagnétique caractérisé par une longueur d'onde trop grande pour être perceptible par l'œil humain, comprise entre 800 nm et 1 mm. IR est ressenti par le corps humain sous forme d'échauffement, avec élévation de la température des tissus exposés. Tous les corps chauds (corps humain ou animale) et les objets exposés à la température émettent des bandes spectrales du rayonnement IR, qui ne sont pas perçus par l'homme mais qui sont détectées par les caméras de vision nocturne. Trois spectres de rayonnement IR se distinguent par leur longueur d'onde ; **IR poche** 800 nm – 2500 nm (0,8-2,5 μm) ; **IR Moyen** 2500 nm- 25000 nm (2,5- 25 μm) ; **IR lointain** 2500- 1000000 nm (25-1000 μm).

IR est utilisée dans divers domaines, dans la vie quotidienne (les caméras à vision nocturne, la télécommande des télévisions, les thermomètres médicaux, lampes des couveuses d'élevage), dans la thermographie médicale, qui permet le diagnostic des tumeurs non profondes, qui apparaissent comme des régions chaudes, dans le domaine scientifique pour la détermination des groupements fonctionnels caractéristiques et des liaisons chimiques d'une molécule simple ou complexe, ainsi que dans le domaine industriel (séchage de la peinture des carrosseries automobiles, la soudure et le découpage de matériaux).

Les micro-ondes

Ces rayonnements électromagnétiques sont des ondes longues non ionisantes, caractérisés par une longueur d'onde qui varie entre 1mm (300 GHz) et 30 cm (1GHz). Ils se subdivisent en trois types suivant leur longueur d'onde ; UHF (1-3 GHz), SHF (3-30 GHz) ; EHF (30-300 GHz). Les micro-ondes sont utilisées dans les fours à micro-onde, le portable, la télévision, la radio, le radar, le satellite et internet.

Les ondes radio

Sont des ondes longues non ionisantes, caractérisées par une longueur d'onde qui varie entre 1m et 100 000 Km, ayant les plus basses fréquences 300GHz et 3Hz, respectivement. Elles sont utilisées dans la télécommunication. Les ondes radio renferment plusieurs catégories, allant des ondes à plus basse fréquence ELF (3-30 Hz) aux ondes de plus haute fréquence (300 MHz). Les plus connus sont les ondes de télévision et les ondes radio à fréquences AM et

FM. Les ondes radio sont très utilisées dans la vie quotidienne, dans la radio et la télévision ; dans les communications radio marines (communication entre les sous-marins, les bateaux...) ; dans la communication militaire, la communication des secours (police, ambulance, pompiers...) et dans les communications des trafics aériens. Dans le domaine médicale les ondes radios sont utilisées en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

1-6 Interaction rayonnement électromagnétique et matière : état de transition énergétique

Lorsqu'un rayonnement électromagnétique traverse un milieu (liquide, solide ou gaz), certaines longueurs d'ondes vont être absorbées de manière sélective par les particules présentes dans le milieu traversé.

Lorsqu'une molécule, un atome ou un ion absorbe un photon, son énergie augmente et il y a passage à un état excité. Le retour de l'état excité à l'état initial se fait le plus souvent par réémission sous forme de chaleur de l'énergie absorbée. Dans certains cas une partie de l'énergie est restituée sous forme de chaleur et sous forme d'un photon avec émission de la lumière (le cas de la fluorescence).

Les photons de la lumière qui se met en contact avec la matière mettent en jeu des énergies susceptibles de provoquer une perturbation du mouvement interne moléculaire, c'est une excitation des électrons qui se produisent lorsque les électrons sont excités à passer d'un faible niveau d'énergie (E_0) à niveau d'énergie supérieur (E_1).

L'écart d'énergie ($\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu$) associé avec cette transition fournit de l'information sur l'absorption, l'émission ou la diffusion du rayonnement électromagnétique (**Figure 06**).

La transition des électrons de valence ou des électrons internes est dépendante de l'énergie du rayonnement électromagnétique appliquée (**Tableau n°1**).

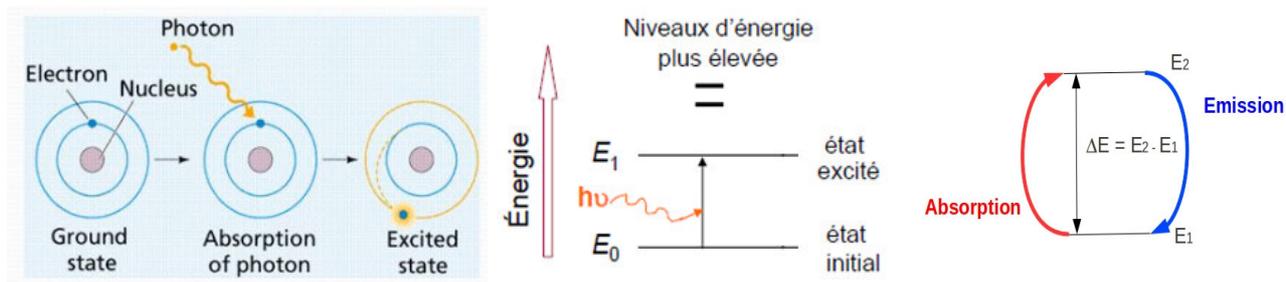
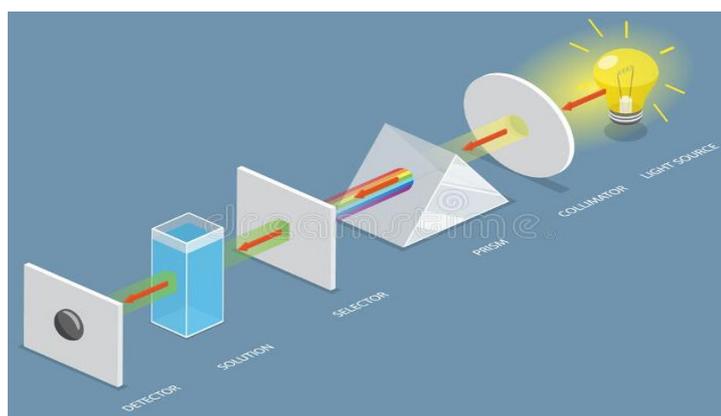


Figure 06 : Etat de transition énergétique électronique

Tableau 01 : Ondes électromagnétiques et états de transition énergétique électronique

Rayonnement électromagnétique	Transition énergétique	
Rayons γ , Rayons X	Transition des électrons des couches internes de l'atome	
UV-Visible	Transition des électrons des couches externes de l'atome	
Infrarouge	Excitation vibrationnelle des liaisons chimiques (rotation, élongation)	
Micro-ondes	Rotation autour des liaisons	
Ondes radio	Transitions des états de spin nucléaires	

Chapitre 2- La spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Visible



La spectroscopie UV-Visible est une méthode spectroscopique radiative d'absorption moléculaire du rayonnement électromagnétique dans le spectre de l'UV et du Visible, de 100 à 800 nm. C'est une méthode standard, utilisée quotidiennement dans de nombreux laboratoires de sciences de la vie comme méthode quantitative qui permet la détermination de la concentration de l'échantillon, et qualitatif quand elle détermine l'absorbance de l'échantillon pour définir sa pureté. C'est une technique rapide, non destructive ce qui permet de réutiliser l'échantillon pour un traitement ou une analyse ultérieure.

Les principaux domaines d'application de la spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Vis sont l'analyse biochimique, comme la détermination de la pureté et de la concentration en acides nucléiques ADN et ARN, la détermination de la concentration en protéines, étude des réactions enzymatiques et suivi des courbes de croissance des suspensions de cultures bactériennes, l'analyse toxicologique et pharmaceutique, le domaine agroalimentaire, le contrôle des eaux et les ions minéraux.

2-1 Principe de la spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Visible

La spectroscopie d'absorption moléculaire UV-Visible concerne l'absorption de la lumière visible et ultraviolet par des entités chimiques (molécules) en solution. Cette absorption (**A**) qui correspond à un état de transition énergétique des électrons (un état excité des électrons), traduit le rapport entre l'intensité de radiation incidente **I₀** et l'intensité de de la radiation transmise **I**. L'absorbance de la lumière (**A**) est liée au nombre de molécules présent dans la solution (concentration de la solution). La transmittance (**T%**) est la lumière transmise et non absorbée par les molécules de la solution (**Figure 07**).

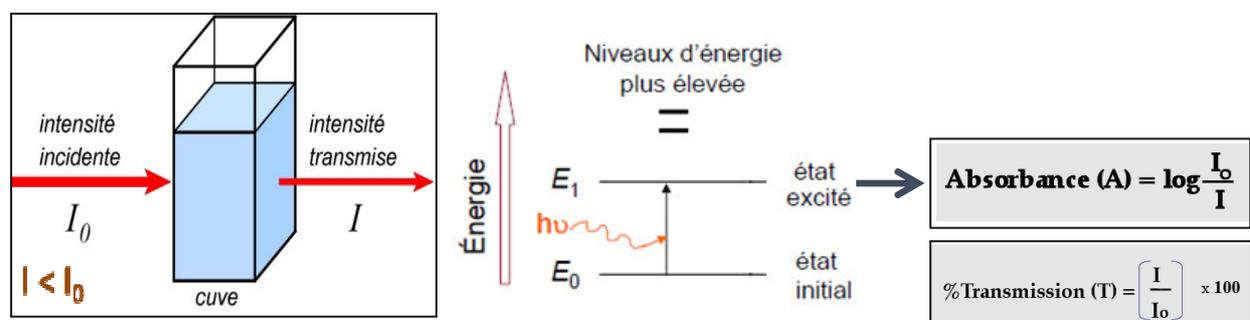


Figure 07 : Absorption (**A**) et transmission (**T**) de la lumière par une solution

2-2 La loi de Beer Lambert

L'absorbance et la transmittance sont en relation avec la loi de Beer Lambert qui établis une proportionnalité entre l'absorbance **A** et la concentration **C** de l'échantillon à une longueur d'onde $\lambda_{(\max)}$ selon la formule suivante ;

$$\mathbf{A(\lambda) = \epsilon(\lambda).L.C} \qquad \mathbf{C = A(\lambda) / [\epsilon(\lambda).L]}$$

A : Absorbance

ϵ : Coefficient d'extinction molaire (**$L.mol^{-1}.cm^{-1}$**), il est Caractéristique de la substance à une λ donnée) Les valeurs expérimentales de **ϵ** varient entre 0 à $10^6 L.mol^{-1}.cm^{-1}$

L : Trajet optique (**cm**), épaisseur de la cuve

λ : Longueur d'onde (**nm**)

La validité de la loi de Beer Lambert s'applique pour des radiations incidentes parfaitement monochromatiques qui traversent des solutions homogènes (limpides, translucides), colorées, et suffisamment diluées, en général pour des absorbances inférieures à 1, et ceci pour garder la proportionnalité entre la concentration de la solution et l'absorbance (**$A = f(C)$**).

La loi de Beer-Lambert n'est plus valable si on travaille avec une solution trop concentrée en espèce chimique colorante (trop foncée). Dans ce cas, il est nécessaire de diluer la solution avant de mesurer son absorbance en tenant compte du facteur de dilution pour déterminer la valeur réelle de la concertation dans la solution initiale.

2-3 Absorption de la lumière UV-Visible

Une solution incolore ou transparente (comme l'eau) est une solution qui laisse passer la lumière visible et n'absorbe aucune radiation de cette lumière. Par contre, lorsque de la lumière blanche traverse une solution colorée, certaines bandes de radiations sont absorbées par la solution et disparaissent du spectre de la lumière transmise, on parle de spectre de bande d'absorption (**Figure 08**). Plus la solution est colorée, plus la valeur de l'intensité lumineuse **I** diminue, plus l'absorbance (**A**) augmente.

La mesure de l'absorbance d'une espèce chimique doit être réaliser à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. Cette longueur d'onde peut être déterminée à partir de la couleur de la solution qui absorbe sa couleur complémentaire lorsqu'un faisceau lumineux le traverse. La couleur complémentaire correspond à la couleur de la longueur d'onde (lumière) diamétralement opposée à la couleur de la solution sur le cercle (ou étoile) chromatique (**Figure 09**).

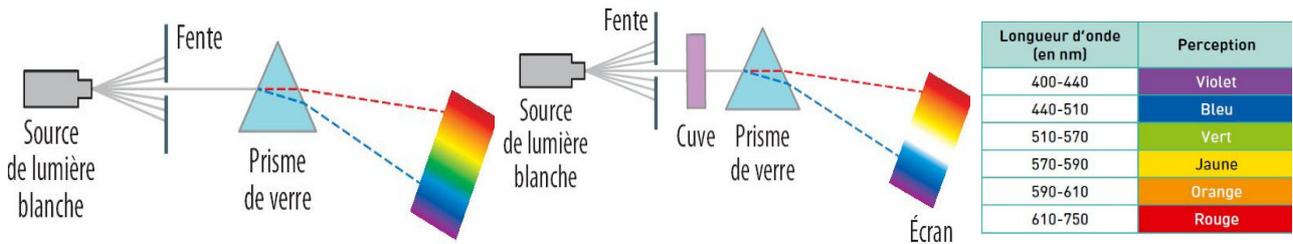


Figure 08 : Le spectre de bandes d'absorption d'une solution colorée

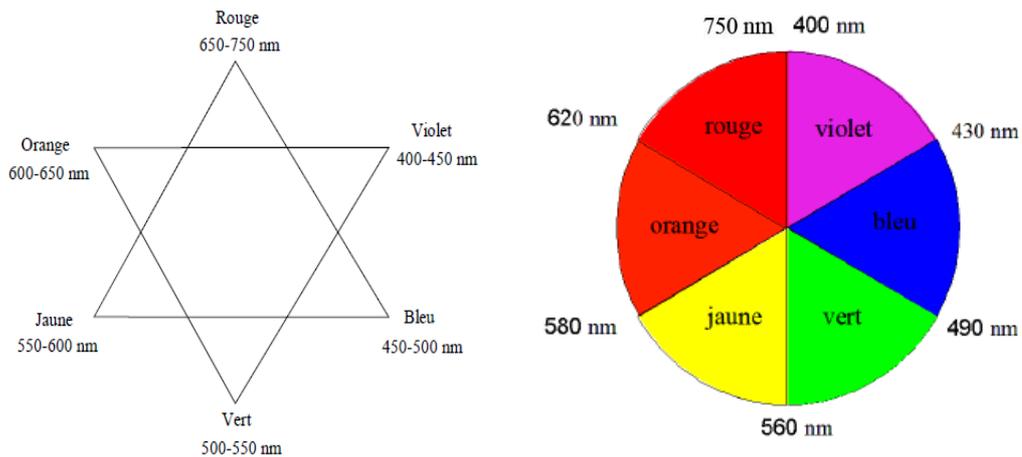
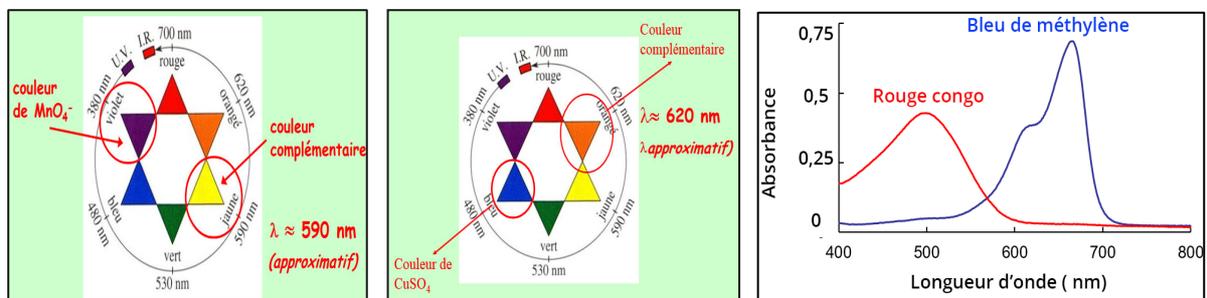


Figure 09 : Cercle (étoile) chromatique et couleurs complémentaires

Exemple : une solution de permanganate de potassium est de couleur violette, à l'aide du cercle chromatique on détermine la couleur de la lumière qu'elle absorbe majoritairement. Il s'agit de la couleur diamétralement opposée au magenta, c'est la couleur jaune de longueur d'onde λ_{\max} 590 nm. Un autre exemple, le rouge Congo possède un maximum d'absorption à 500 nm (dans le vert) la solution nous apparait de couleur rouge. Tandis que le bleu de méthylène absorbe entre 640 à 680 nm dans l'orange-rouge, la solution nous apparait de couleur bleu (Figure n°10).



λ (nm)	400	450	490	570	580	600	650
Couleur absorbée	Violet	Bleu	Bleu-vert	Jaune-vertâtre	Jaune	Orange	Rouge
Couleur observée	Jaune-vertâtre	Jaune	Rouge	Violet	Bleu profond	Bleu	Vert

Figure 10 : La couleur complémentaire de la lumière visible absorbée par la solution

2-3-1 Spectre d'absorption UV-Visible

Le spectre d'absorption d'une entité chimique est la courbe représentant les variations de l'absorbance ou de la transmittance en fonction de la longueur d'onde (**Figure 11**). Il est caractéristique de la substance et peut comporter plusieurs bandes d'absorption. C'est habituellement à une longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption que l'on mesure le coefficient d'absorption molaire (mol/L) de la substance étudiée. Les spectres des substances sont tracés dans l'UV et le visible. Il faut toujours définir le solvant, le Ph, et la température car l'emplacement de λ_{max} peut varier avec les trois paramètres (effet bathochrome et hypsochrome).

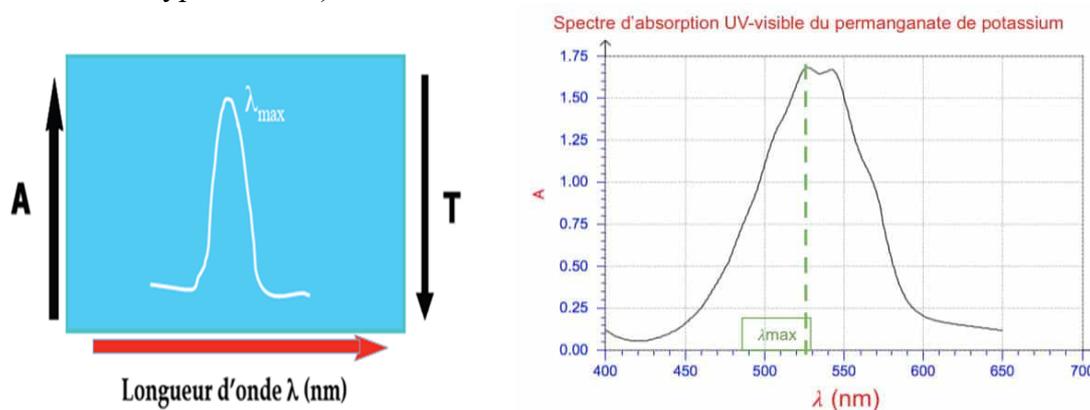


Figure 11 : Spectre d'absorbance UV-Visible

2-3-2 Chromophores et absorption dans le spectre UV-Visible

L'absorbance d'une solution dans la lumière UV-visible dépend du nombre de chromophores présents dans la molécule. Le chromophore est défini comme une substance qui possède des électrons capables d'absorber l'énergie et d'être excités, à différentes longueurs d'onde. Ainsi, Il peut également être définie comme la partie de la structure d'une molécule qui absorbe les photons de la lumière visible, ce qui donne une couleur visible à la molécule. Le chromophore est un groupe d'atomes comportant une ou plusieurs doubles liaisons qui modifient la fréquence de l'onde ainsi que l'intensité d'absorption (**Tableau 02**), dont quatre effets peuvent avoir lieu (**Figure 12**) ;

Effet bathochrome

ou déplacement bathochrome, également connu sous le nom de *red shift*, est le phénomène qui est vérifié lorsque la longueur d'onde d'absorption d'une substance se déplace vers des longueurs d'onde plus grandes ou une énergie plus faible en raison de l'effet du solvant ou en raison de la présence de différents substituants chimiques. Lorsque le nombre d'électrons

délocalisés augmente dans une molécule (le nombre de doubles liaisons conjuguées), les chromophores subissent un effet bathochrome (**Figure 12a**)

Effet hypsochrome

Ou déplacement hypsochrome, également connu sous le nom de décalage vers le bleu, se réfère au décalage dans l'absorption du spectre d'une substance dans la région à ondes plus courtes et à énergie plus élevée du spectre électromagnétique. Ce phénomène est responsable d'un déplacement vers les basses longueurs d'onde (**Figure 12b**).

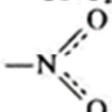
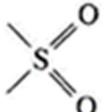
Effet hypochrome

Correspond à une diminution de l'intensité de l'absorption (diminution du pic d'absorption)

Effet hyperchrome

Correspond à une augmentation de l'intensité d'absorption (augmente du pic d'absorption)

Tableau 02 : Les groupements chromophores

Groupe chromophore	Système	Exemple	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}
Ethylénique	$RCH=CHR$	Ethylène	165 193	15000 10000
Acétylénique	$R-C\equiv C-R$	Acétylène	173	6000
Carbonyle	$RR_1C=O$	Acétone	188	900
Carbonyle	$RHC=O$	Acétaldéhyde	279	15
Carboxyle	$RCOOH$	Acide acétique	290	16
Amido	$RCONH_2$	Acétamide	204	60
Azométhyne	$>C=N-$	Acétoxime	< 208	
Nitrile	$-C\equiv N$	Acétonitrile	190	5000
Azo	$-N=N-$	Azométhane	< 160	
Nitroso	$-N=O$	Nitrosobutane	347	4,5
Nitrate	$-ONO_2$	Ethyle nitrate	300	100
Nitro		Nitrométhane	665	20
Nitrite	$-ONO$	Amyle nitrite	270	12
Sulfoxyde	$S=O$	Cyclohexyle méthyle sulfoxyde	218,5 346,5 ^a	1120
Sulfone		Diméthyle sulfone	210	1500
				< 180

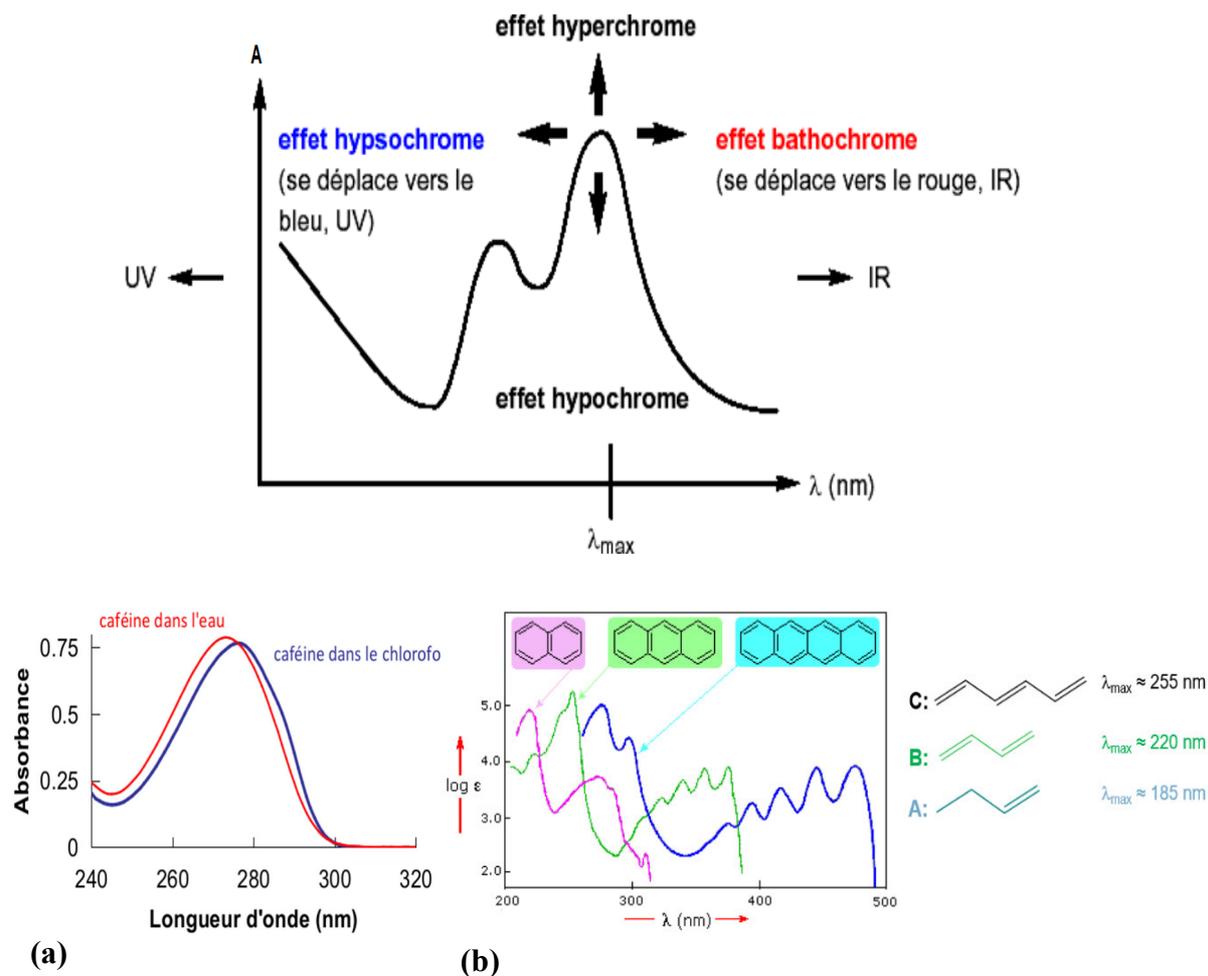


Figure 12 : Effet de l'environnement sur les variations de l'absorbance.

(a) Dans le chloroforme, le spectre de la caféine subit un effet bathochrome par rapport au spectre dans l'eau. (b) : Les molécules A, B et C possèdent le même chromophore C=C mais un nombre d'électrons délocalisables croissant, leur absorption subit donc un effet bathochrome.

2-4 Appareillage

Un spectrophotomètre est un appareil capable de mesurer l'absorbance (**A**) d'une molécule en solution colorée ou incolore à une longueur d'onde λ bien déterminée. Cet appareil (**Figure 13 ; 14**) est constitué de ;

Une source de la lumière

Dans l'UV (100 - 400 nm) la source est une lampe à décharge au deutérium. Une lampe à filament de tungstène est utilisée comme source de lumière visible (400-800 nm).

Une fente

Permet de focaliser la lumière polychromatique sur le système dispersif

Un système dispersif (réseau ou prisme)

Capable de fractionner la lumière blanche polychromatique en couleurs monochromatiques

Un monochromateur

Correspond à une fente capable de sélectionner une lumière monochromatique incidente sur la cuve qui porte l'échantillon

Un port échantillon

C'est une cuve (1cm de large) en verre, en quartz ou en polymère qui porte un volume bien déterminé de l'échantillon.

Un détecteur

Mesure l'intensité lumineuse après la traversée de la cuve

Un système optoélectronique

Permettant de traiter l'intensité lumineuse de la lumière transmise et calculer la valeur de l'absorbance

Un afficheur

Affiche le résultat de l'analyse soit sous forme d'une valeur de l'absorbance (**A**) ou sous forme d'un spectre de bandes d'absorption (**A=f(λ)**)

Le colorimètre est un outil de mesure colorimétrique trichromatique qui utilise des longueurs d'onde fixes uniquement dans la plage visible, il fournit une évaluation objective des caractéristiques de couleur à partir de la lumière traversant les filtres primaires du rouge, du vert et du bleu. Tandis que le spectrophotomètre qui peut offrir beaucoup plus de précision et de fonctions avancées, utilise des longueurs d'onde d'une plage plus large (UV-Visible). Il comprend deux parties principales : le spectromètre, qui produit la lumière avec une couleur sélectionnée, et le photomètre, qui mesure l'intensité de la lumière.

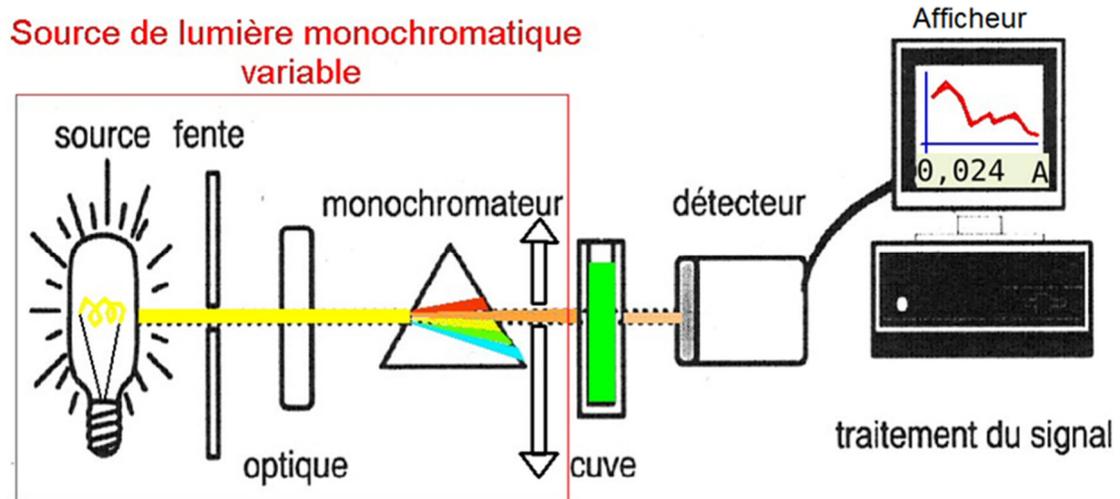


Figure 13 : Schéma fonctionnel d'un spectrophotomètre UV-Visible



Spectrophotomètre UV-Visible
lecteur de microplaque



Spectrophotomètre UV-Visible
lecteur de cuve



Cuves de lecture au
spectrophotomètre



Colorimètre lecteur de cuve
dans la lumière visible

Figure 14 : Spectrophotomètre UV-Visible de paillasse

2-5 Applications de la spectrométrie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon, mais également permet de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral.

2-5-1 Analyse qualitative

Elle consiste à tracer le spectre d'absorption de la substance par la mesure de la variation d'absorbance en fonction de la longueur d'onde dans l'UV et le visible. L'analyse des spectres mène à la détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption λ_{\max} sans fournir des renseignements sur la structure moléculaire des composés organique.

2-5-2 Analyse quantitative

Elle s'effectue en générale à la longueur d'onde du maximum d'absorption définie lors de l'analyse qualitatif. La relation donnée entre l'absorbance d'une molécule et sa concentration est définit par la loi de Beer Lambert. L'absorbance et de plus en plus utilisée car elle est directement proportionnelle à la concentration. La détermination de la concentration d'une solution est l'application la plus fréquente. En effet il très utile de pouvoir doser une substance dans un milieu simple ou complexe par une simple lecture photométrique. Deux cas peuvent se présenter ;

Milieu simple : quand ce milieu ne contient que la substance à doser, il suffit de connaître le coefficient ϵ de cette substance à une longueur d'onde donnée. On mesure l'absorbance du milieu, et l'application directe de la loi de Beer Lambert permet de déterminer la concentration C de la substance dans le milieu.

Milieu complexe : dans ce cas il est indispensable d'utiliser des réactions colorées en utilisant des étalons de concentrations connues, c'est le **dosage par étalonnage**. Pour ce dosage, le seul paramètre qui varie est la concentration molaire C de l'espèce chimique colorante (même ϵ , λ et même ℓ). Alors la relation de Beer-Lambert peut être simplifiée comme suit ;

$$A = k \times C$$

C : la concentration molaire en $mol. L^{-1}$

k : la constante de proportionnalité en $L. mol^{-1}$

A : l'absorbance

Le dosage par étalonnage consiste à utiliser une gamme de solution appelée solutions étalons qui contient la même espèce chimique colorée que la molécule à doser, et leurs concentrations est connues. Pour obtenir une valeur précise de la concentration en molécule à doser on doit réaliser une courbe d'étalonnage. Pour cela, on mesure l'absorbance de chaque concentration de solutions étalons, ainsi l'absorbance de la solution à doser ; puis tracer la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration des solutions étalons et on obtient la courbe étalon. En effet, on peut tracer une droite de régression qui passe au plus près des points obtenus, et on obtient une droite d'équation $A = a * C + b / A = a * C$. La concentration en molécule dans la solution à doser, dont on a mesuré son absorbance, est déterminée à partir de la droite d'équation (**Figure 15**). Théoriquement la droite d'étalonnage passe par le zéro, puisque $A=0$ quand $C=0$ (loi de Beer Lambert). Cependant, cela n'est pas toujours le cas.

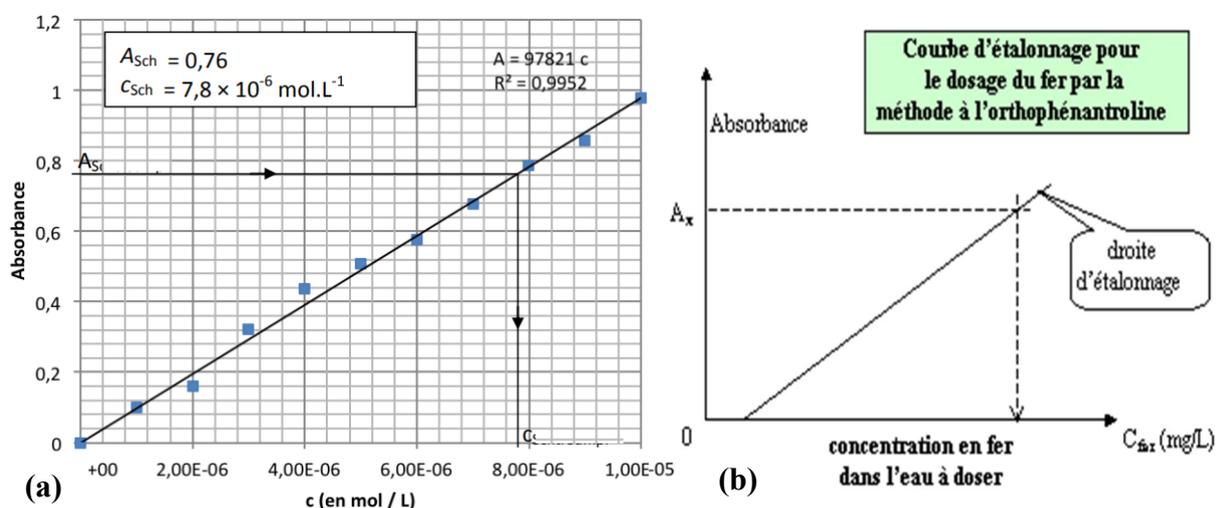
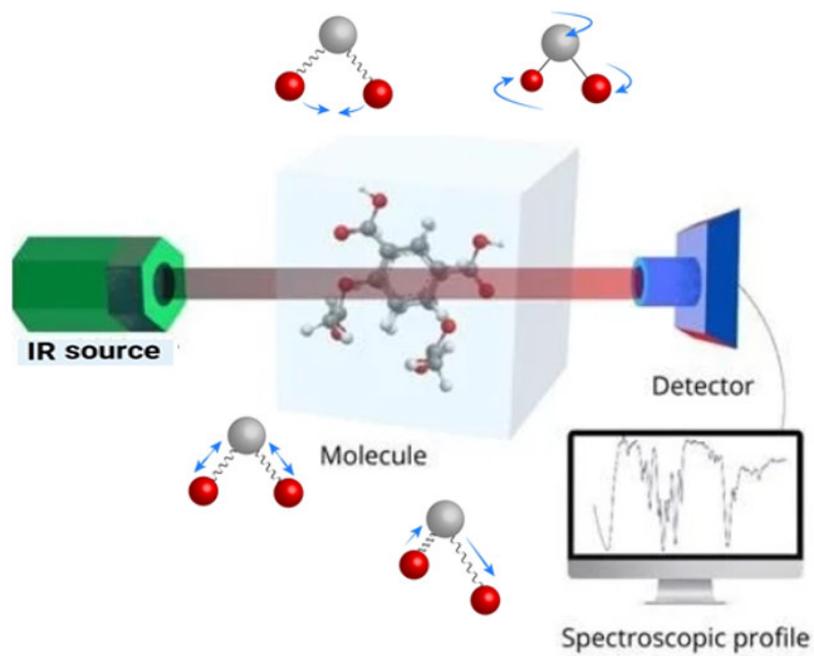


Figure 15 : Droite d'étalonnage, (a) : $A=f(c)$ de solutions de bleu patenté (E131 ; $\lambda_{max} = 640 \text{ nm}$) pour déterminer la concentration du colorant bleu dans des bonbons ; (b) : droite d'étalonnage du dosage du fer.

En biochimie clinique le dosage par étalonnage peut se faire par comparaison de l'absorbance de l'échantillon avec l'absorbance d'un étalon unique (un tube étalon, ou sérum étalon), d'où l'appellation de **la méthode du tube étalon**. Cette méthode consiste à manipuler dans les mêmes conditions opératoires une solution étalon à concentration connue (C_1) ayant une absorbance A_1 au λ_{max} et les solutions échantillons à concentration inconnues (C_x) ayant une absorbance A_2 à la **même longueur d'onde**. Exemple le dosage spectrophotométrique de la glycémie ou triglycéridémie dans le visible (500 -520 nm) en utilisant la méthode enzymatique (Kit enzymatique). La concentration de l'échantillon est déterminée par application de la formule

$$Cx = \frac{A2 * C1}{A1}$$

Chapitre 3- La spectroscopie d'absorption moléculaire Infrarouge



La spectroscopie d'absorption infrarouge est une méthode d'analyse structurale qui traite la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle est couramment utilisée en chimie analytique, dans l'analyse du contrôle de qualité (pureté des produits), dans l'industrie agroalimentaire, et l'industrie chimique pour identifier et caractériser une molécule inconnue, en identifiant ses liaisons et ses groupement fonctionnels.

La spectroscopie IR repose sur les interactions entre la matière et le rayonnement infrarouge. La longueur d'onde de ce rayonnement s'étend de 800 nm à 1000 μm , dont trois catégories IR caractérise ce rayonnement ;

- **Infrarouge proche**, caractérisé par une longueur d'onde λ qui varie entre 800 nm et 2500 nm (0,8-2,5 μm), et un nombre d'onde σ de 12500 à 4000 cm^{-1}
- **Infrarouge Moyen**, caractérisé par une longueur d'onde λ qui varie entre 2500 nm et 25000 nm (2,5- 25 μm), et un nombre d'onde σ de 4000 à 400 cm^{-1}
- **Infrarouge lointain**, caractérisé par une longueur d'onde λ qui varie entre 2500 et 1000000 nm (25-1000 μm), et un nombre d'onde σ de 400 à 10 cm^{-1}

3-1 Principe de la spectroscopie Infrarouge

Le rayonnement IR absorbé fournit à la matière une énergie autour de 30-40 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, cette énergie est insuffisante pour provoquer un état de transitions électronique comme la spectroscopie UV-Visible, mais elle est suffisante pour produire des changements dans l'énergie de vibration des molécules. Elle augmente l'amplitude des vibrations des liaisons chimiques de la molécule, c'est ce qu'on appelle absorption, le retour à l'état initial libère de la chaleur.

Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donnée, dont à chacun correspond une fréquence caractéristique. Les énergies mises en jeu provoquent deux modes fondamentaux de vibration des liaisons chimiques, d'où l'appellation de spectroscopie infrarouge (IR) vibrationnelle. On distingue alors la vibration d'élongation de déformation (**Figure 16**).

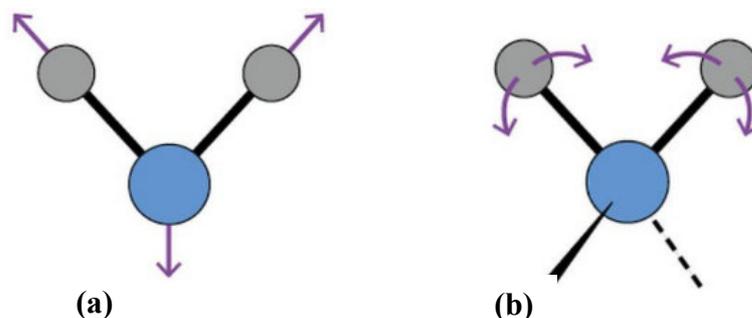


Figure 16 : Mouvements vibrationnels fondamentaux en IR.

(a) : vibration d'élongation ; (b) : vibration de déformation angulaire

3-2 Types de vibration dans l'infrarouge

L'énergie de vibration conduit à une modification de distances interatomiques et des angles des liaisons chimiques. Les liaisons des molécules possèdent deux modes de vibration. Deux atomes reliés par une liaison covalente peuvent effectuer une vibration d'élongation. Quand la molécule contient plus de deux atomes, ces derniers peuvent vibrer ensemble selon une variété d'élongation et de déformation.

D'un point de vue général, les différents modes vibrationnels sont classés en fonction de deux paramètres ;

- Un mode de vibration qui modifie les longueurs des liaisons est dite d'élongation, ou bien une vibration de déformation angulaire (dans le plan ou hors du plan),
- Un mode de vibration qui conserve la symétrie moléculaire est dit symétrique, il est asymétrique s'il conduit à la perte d'un ou plusieurs éléments de symétrie de la molécule.

3-2-1 Les vibrations d'élongation (*Stretching*)

Appelées également vibrations de valence, ce mode de vibration correspond à une variation de la longueur des liaisons chimiques. Il se produit lorsque deux atomes s'éloignent ou se rapprochent périodiquement le long de leur axe commun. On distingue le mode symétrique et le mode antisymétrique (**Figure 17**). Les vibrations d'élongation se produisent à des nombres d'onde élevés.

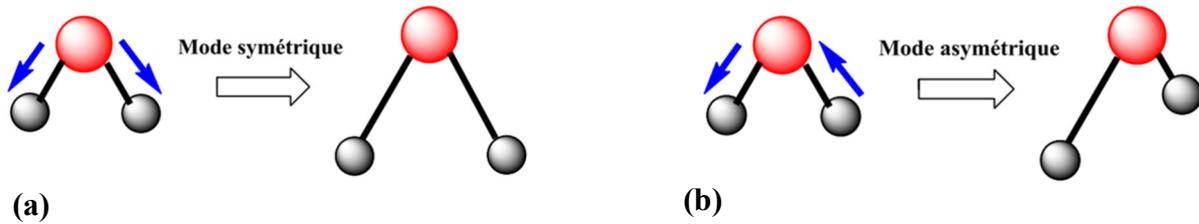


Figure 17 : Vibration d'élongation symétrique (a) et asymétrique (b)

Pour le mode de vibration par élongation, la liaison chimique entre deux atomes ressemble à un ressort qui relie deux masses m_A et m_B , de constante de force k , de longueur r et qui se tend et se détend à une certaine fréquence ν (Figure 18). Les atomes légers donnent des fréquences et des nombres d'onde élevés.

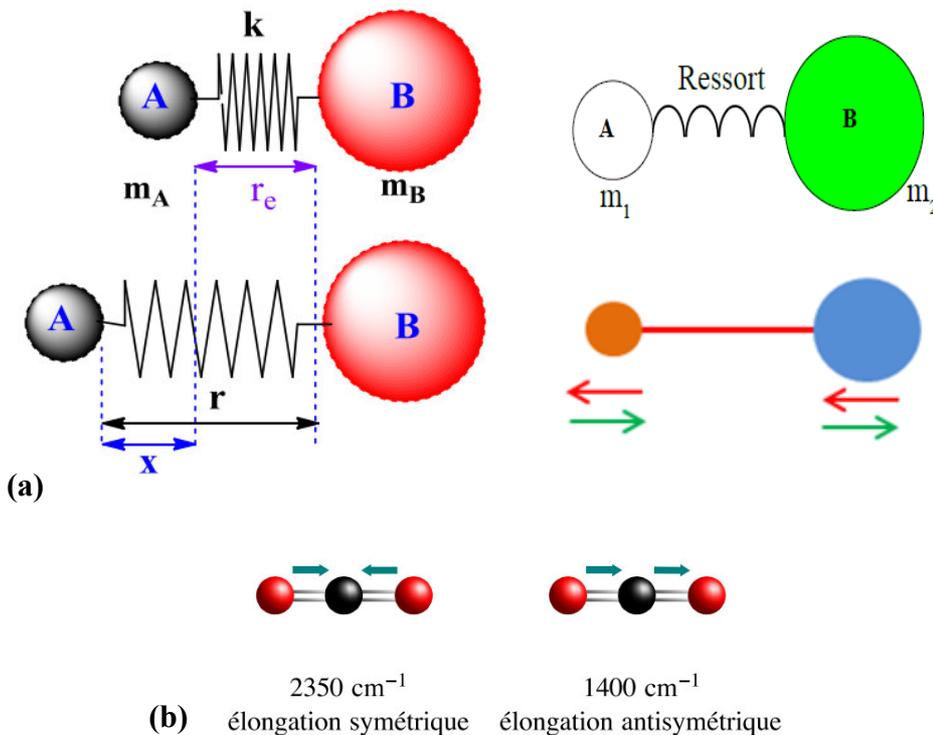


Figure 18 : Aspect théorique des vibrations d'élongation (*Stretching*) (a) ; Vibrations d'élongation de la molécule CO₂ (b)

3-2-2 Les vibrations de déformation (*bending*)

Ces vibrations correspondent à des modifications de l'angle de liaison chimique de la molécule suivant des mouvements de déformation dans le plan et des déformations hors du plan (Figure 19). Il y a quatre modes de vibration possible (Figure 20) : cisaillement et

balancement (basculement) dans le plan ; torsion et agitation hors du plan. Les vibrations de déformation sont observées vers les faibles nombres d'onde.

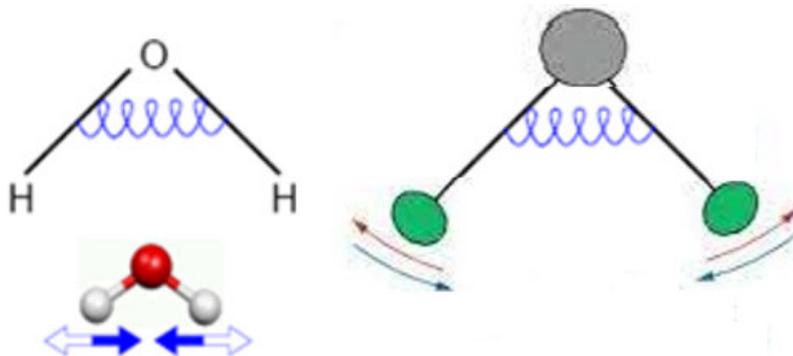


Figure 19 : Aspect théorique des vibrations de déformation angulaire (*Bending*)

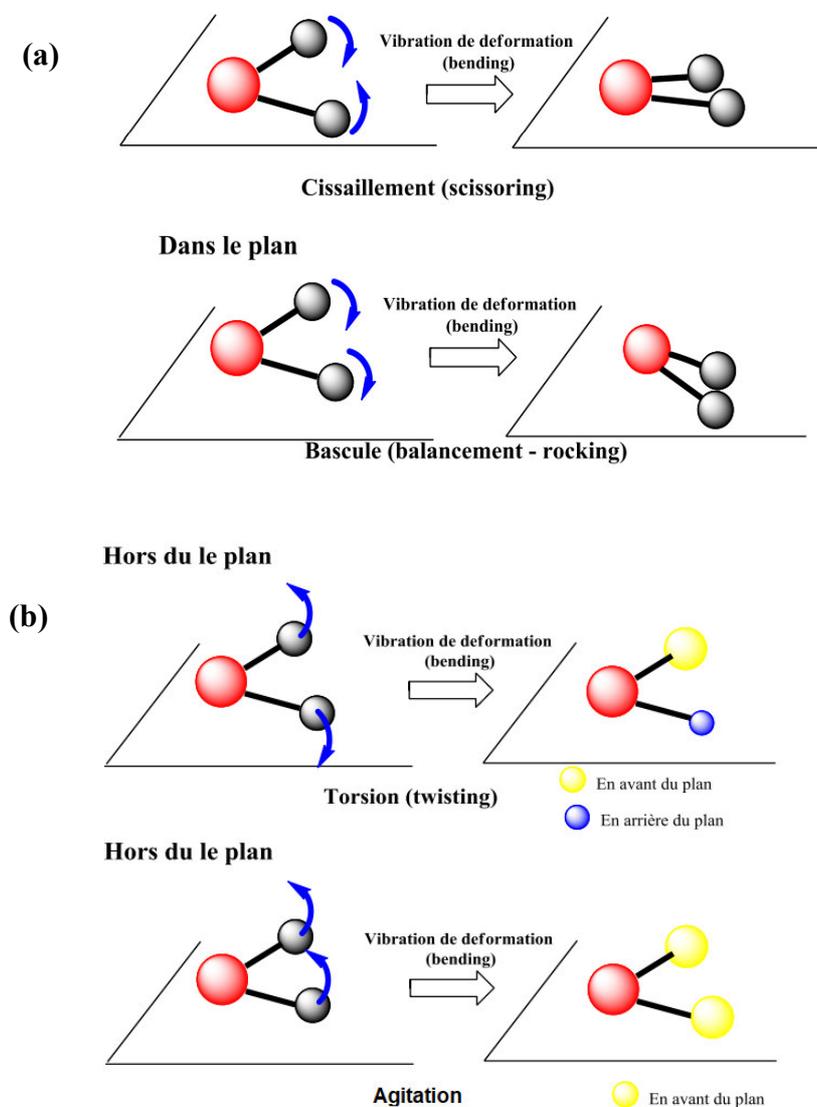


Figure 20 : Modes des vibrations de déformation angulaire (*Bending*) ;
 (a) : Cissaillement et basculement, des vibrations dans le plan ;
 (b) : Torsion et agitation, des vibrations hors du plan.

3-3 Appareillage de la spectroscopie infrarouge

L'analyse infrarouge est l'une des méthodes qui permet l'analyse de composés dans les trois états :

- **Etat gazeux** : l'échantillon ne demande pas de préparation spécifique.
- **Etat liquide** : quelques gouttes de la solution sont placées entre deux pastilles de sels (chlorure de sodium, bromure de potassium) qui n'absorbent pas les rayons infrarouges.
- **Etat solide** : La poudre à analyser est mélangée avec un sel (les mêmes que ceux cités précédemment) puis comprimée à l'aide d'une presse hydraulique. La pastille est ensuite placée dans l'appareil.

L'appareillage en spectrophotométrie infrarouge est relativement simple. D'une manière générale, il nécessite, une lampe émettant un faisceau de lumière infrarouge, une cellule réceptionnant l'échantillon, un interféromètre, permettant de s'affranchir d'un échantillon référence et un détecteur. L'ensemble est relié à un ordinateur permettant le stockage, la gestion et le traitement des signaux. Il existe deux grands types de spectromètre infrarouge. Le spectromètre dispersif et le spectromètre à transformée de Fourier (FT-IR) de Fourier. La différence entre les deux modèles réside essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'onde (**Figure 21**).

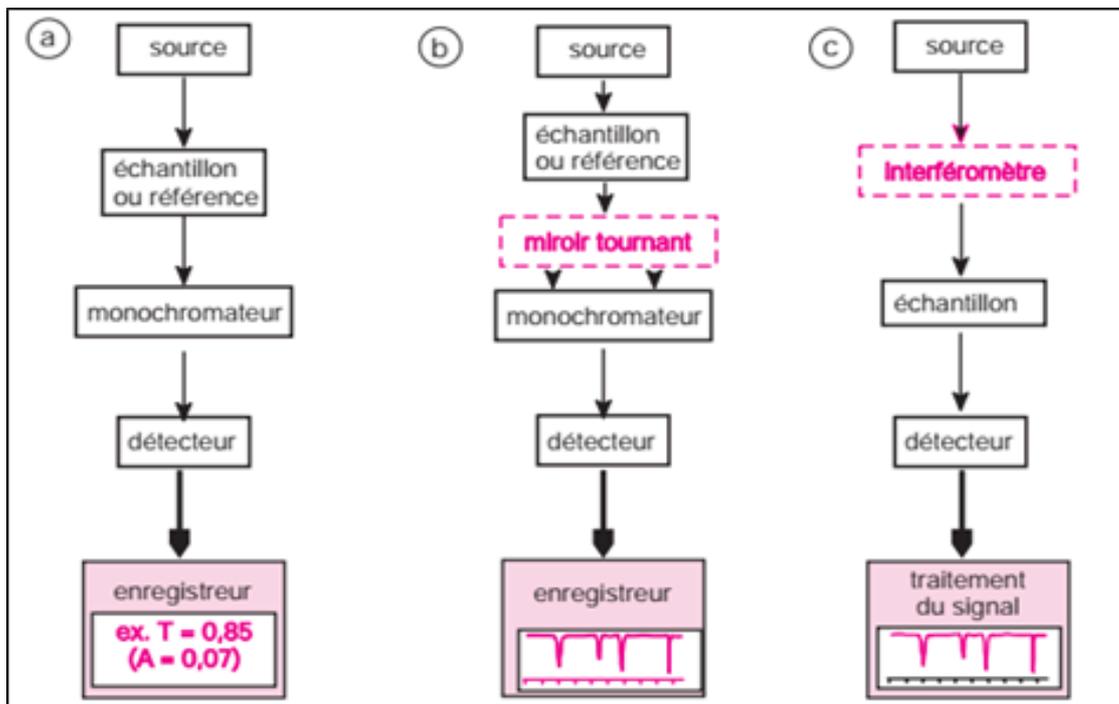


Figure 21 : Les modèles de spectromètre infrarouge IR ; **(a)** Analyseur simple faisceau ; **(b)** Spectromètre double faisceau de type dispersif ; **(c)** Modèle simple faisceau à transformée de Fourier (FTIR).

3-3-1 Spectromètres dispersifs

Sont les premiers spectromètres utilisés en spectroscopie infrarouges (ils sont classiques). Dans cet instrument, le rayon infrarouge est séparé en deux faisceaux. L'un passe au travers de l'échantillon, l'autre au travers d'une référence qui est parfois le composé dans lequel l'échantillon a été dissous. Les faisceaux sont ensuite réfléchis jusqu'à un détecteur, après être passés par un dispersif (séparateur) qui alterne rapidement les faisceaux entrant dans le détecteur. Les deux signaux sont comparés et le spectre ainsi obtenu est tracé (**Figure 22**).

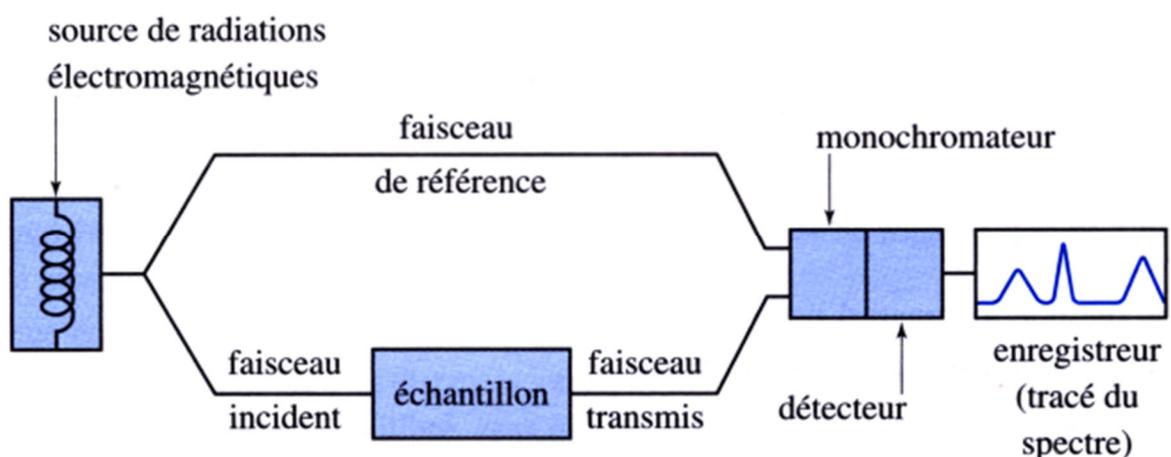


Figure 22 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR double faisceau de type dispersif

3-3-2 Spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR)

Les spectromètres FT-IR ont été développés pour apporter une réponse aux limitations des spectromètres dispersifs. Dans ces spectromètres une source continue génère de la lumière IR sur un large éventail de longueurs d'onde infrarouges. La lumière infrarouge passe ensuite par un interféromètre de Michelson et est ensuite dirigée vers l'échantillon. Contrairement aux mesures dispersives, nous obtenons d'abord un interférogramme, qui doit être converti en spectre IR. L'acquisition des spectres IRTF n'est pas seulement beaucoup plus rapide que celle obtenue avec des instruments dispersifs classiques mais les spectres montrent un rapport signal sur bruit significativement plus élevé et, les spectres obtenus ont une précision de longueur d'onde bien supérieure (**Figure 23**).

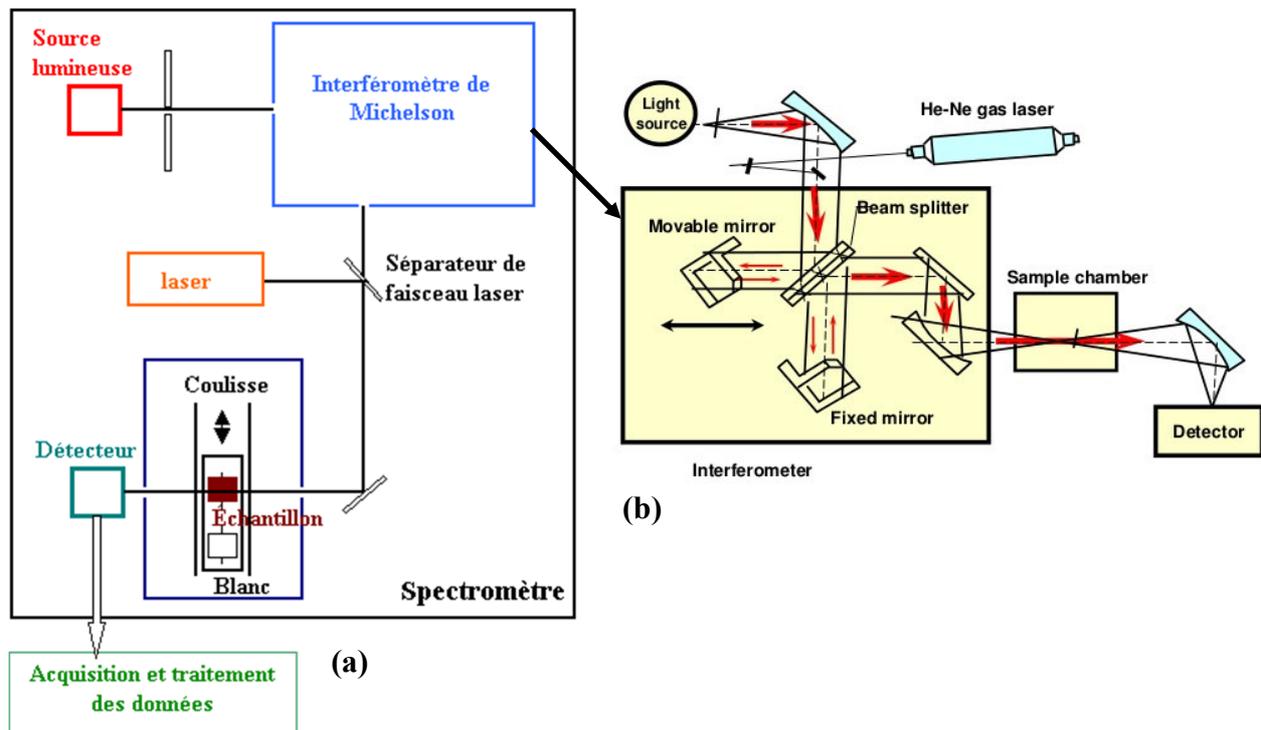


Figure 23 : Schéma de spectromètre à transformée de Fourier FT-IR(a) ; schéma de l'interféromètre de Michelson (b)



Figure 24 : Spectromètre Infrarouge au laboratoire

3-4 Spectres IR et absorptions caractéristiques des liaisons

Dans la spectroscopie IR, la lumière transmise détectée par le détecteur est analysée par l'ordinateur, ensuite, le résultat de l'analyse est obtenu sous forme d'un graphe appelé le spectre infrarouge. Il est souvent présenté en transmittance exprimée en pourcentage en fonction du nombre d'onde (l'inverse de la longueur d'onde) sur un axe des abscisses dirigé vers la gauche. Les bandes d'absorption sont orientées vers le bas, avec la distinction de deux zones sur le spectre ; une zone des bandes caractéristiques et une zone d'empreinte digitale. **(Figure 25)**. La zone des bandes caractéristiques correspond aux nombres d'onde compris entre 1500 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} , elle présente les bandes d'absorption caractéristiques de

certaines liaisons chimiques. La zone d'empreinte digitale correspond aux nombres d'onde compris entre 500 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} . Cette zone est complexe, elle n'est pas interprétée en détail, et elle est caractéristique du composé,

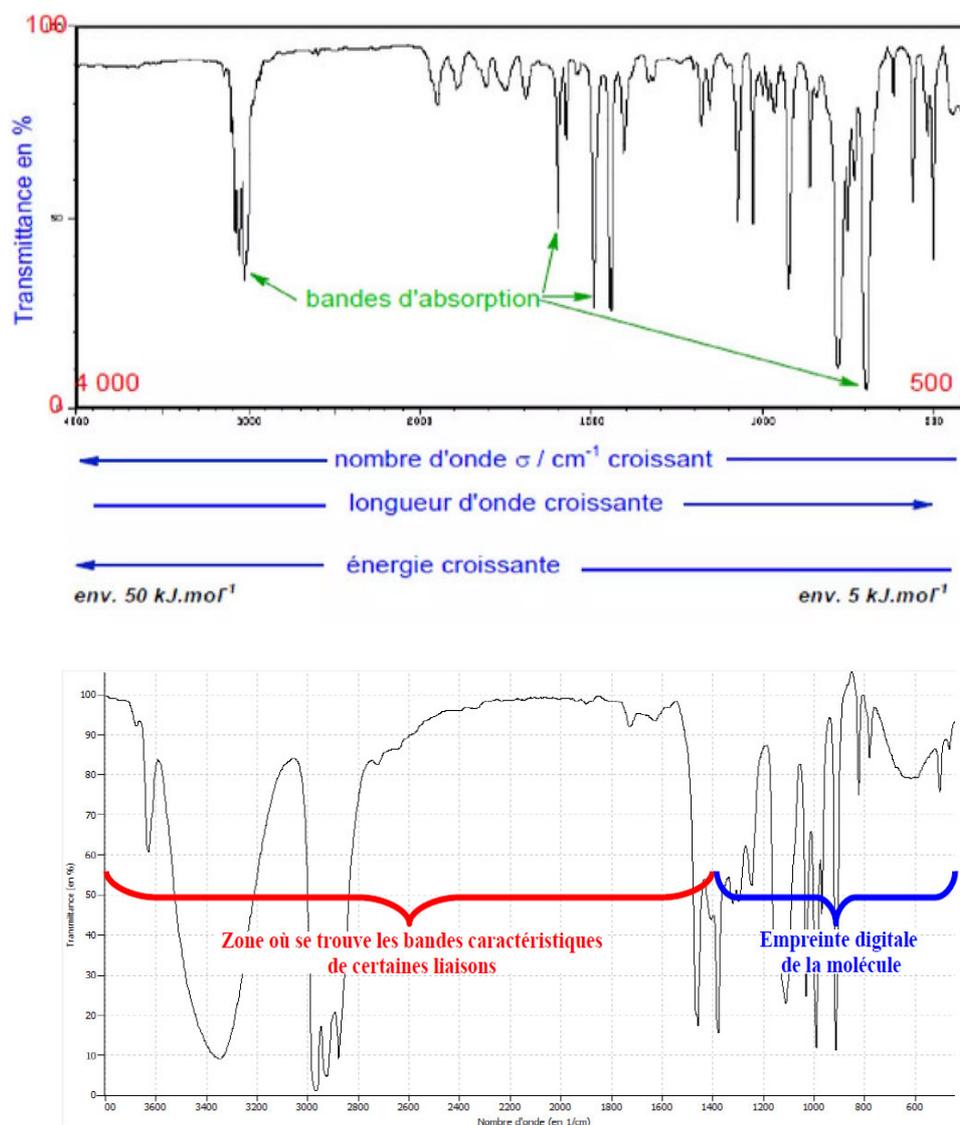


Figure 25 : Spectre infrarouge transmittance en fonction du nombre d'onde σ (cm^{-1})

L'interprétation du spectre consiste à faire correspondre les bandes d'absorption avec les liaisons chimiques correspondantes, et par extension les groupes caractéristiques de la molécule analysée. Pour cela des tables de données infrarouges sont toujours disponibles au laboratoire permettent au manipulateur d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Chaque bande est caractérisée par sa position dans le spectre (nombre d'onde), par sa taille (large ou fine), et par son intensité (faible, moyenne ou forte). Plusieurs bandes d'absorption caractéristiques sont repérées sur le spectre IR (**Figure 26 ; Tableau 03**) :

- 4 000 - 2 500 cm^{-1} : vibration d'élongation des liaisons C-H, N-H et O-H
- 2 500 - 2 000 cm^{-1} : vibration d'élongation des liaisons triples C≡C ou C≡N
- 2 000 - 1 500 cm^{-1} : vibration d'élongation des liaisons doubles C=C ou C=O
- En dessous de 1 500 cm^{-1} : régions des liaisons simples C-O, C-F, C-Cl...

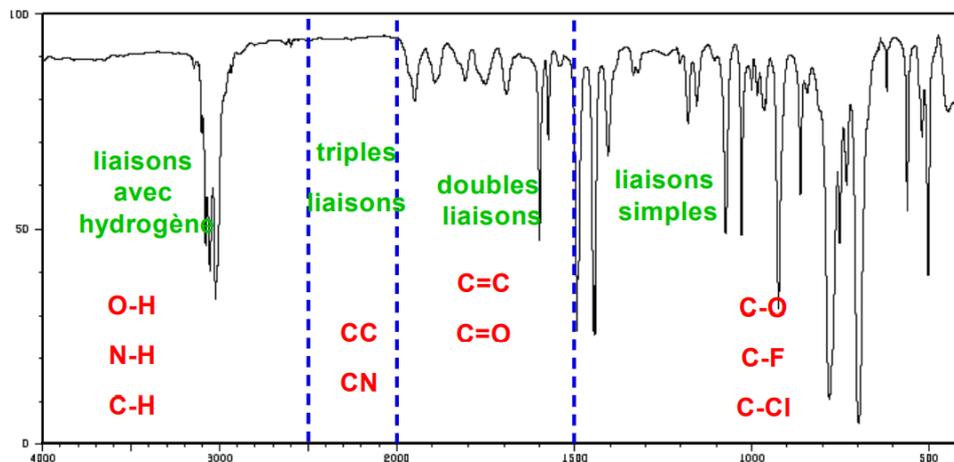


Figure 26 : Bandes caractéristiques de certaines liaisons chimiques du spectre infrarouge

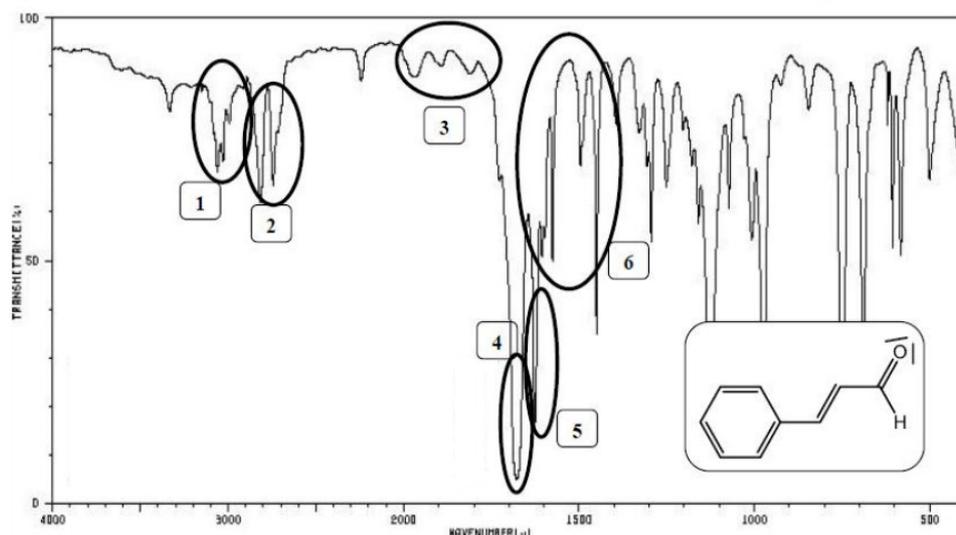
Tableau 03 : Bandes caractéristiques de certains groupements chimique en spectroscopie IR

Groupe caractéristique	Fonction associée	Formule	Nombre d'onde d'absorption des liaisons
Hydroxyle	Alcool		$\sigma_{\text{O-H}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1050 - 1250 \text{ cm}^{-1}$
Hydroxyle	Phénol		$\sigma_{\text{O-H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=C}} = 1450 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 3000 - 3100 \text{ cm}^{-1}$
Carbonyle	Aldéhyde	 (en fin de chaîne carbonée)	$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 2650 - 2800 \text{ cm}^{-1}$
Carbonyle	Cétone		$\sigma_{\text{C=O}} = 1680 - 1690 \text{ cm}^{-1}$
Carboxyle	Acide carboxylique		$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1725 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{O-H}} = 2500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1210 - 1320 \text{ cm}^{-1}$
Ester	Ester		$\sigma_{\text{C=O}} = 1720 - 1775 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1200 \text{ cm}^{-1}$
Amine	Amine (primaire)		$\sigma_{\text{N-H}} = 3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-N}} = 1250 - 1350 \text{ cm}^{-1}$
Amide	Amide		$\sigma_{\text{N-H}} = 3350 - 3370 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=O}} = 1630 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-N}} = 1040 - 1180 \text{ cm}^{-1}$

Au laboratoire d'analyse structurale, des tables de données infrarouges sont disponibles et permettent au manipulateur d'attribuer les absorptions aux différents groupements chimiques qui sont présents (**Tableau n° 04**).

3-4-1 Analyse du spectre infrarouge

L'interprétation d'un spectre IR n'est pas facile, en particulier pour des molécules complexes. Le manipulateur doit repérer les bandes caractéristiques sur son spectre ; ensuite il essaye de comparer le nombre d'onde de chaque bande repérée aux tables des nombres d'ondes disponibles dans la bibliographie (**Tableau n°4**) pour déterminer les types de liaisons et les groupements chimiques des molécules analysées (**c**).



	Nombre d'onde (en cm^{-1})	Liaison
1	3000 - 3200	C(tri) - H (aromatique et alcène)
2	2700 - 2800	C - H (aldéhyde)
3	1700 - 2000	Vibration du cycle aromatique
4	1677	C = O (carbonyle)
5	1627	C = C (alcène)
6	1400 - 1600	C = C (aromatique)

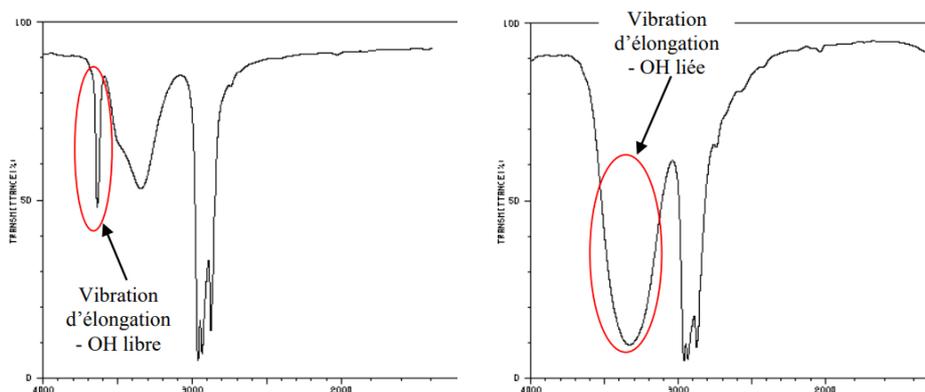
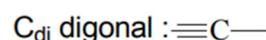
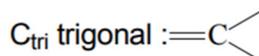
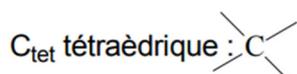


Figure 27 : Analyse du spectre infrarouge et identifications des liaisons et groupements chimiques.

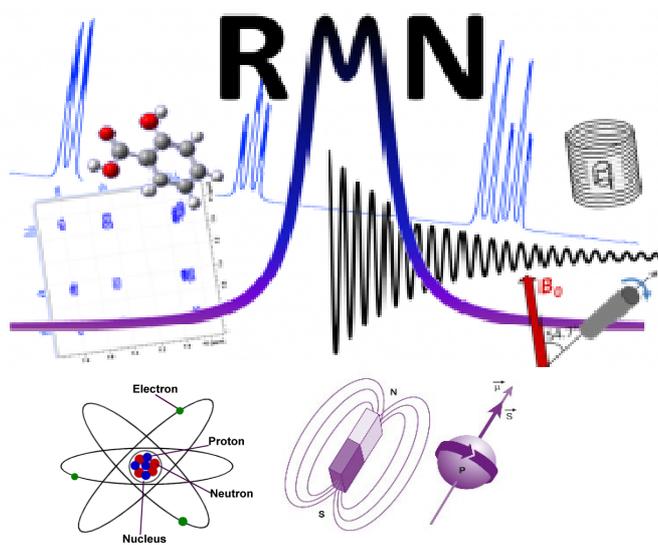
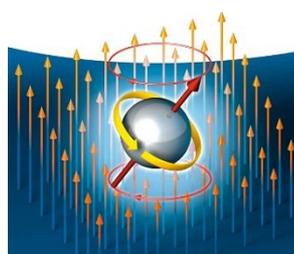
Tableau n°4 : Table des nombres d'onde des vibrations d'élongation et de déformation en IR

Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité
O-H alcool libre	Valence	3590-3650	F ; fine
O-H alcool lié	Valence	3200-3600	F ; large
N-H amine primaire : 2 bandes secondaire: 1 bande imine	Valence	3300-3500	m
N-H amide	Valence	3100-3500	F
C _{di} -H	Valence	≈ 3300	m ou f
C _{tri} -H	Valence	3030-3100	m
C _{tri} -H aromatique	Valence	3000-3100	m
C _{tet} -H	Valence	2850-2970	F
C _{tri} -H aldéhyde	Valence	2700-2900	m
O-H acide carboxylique	Valence	2500-3200	F à m ; large
C≡C	Valence	2100-2260	f
C≡N nitriles	Valence	2200-2260	F ou m
C=O anhydride	Valence	1800-1850 1740-1790	F ; 2 bandes
C=O chlorure d'acide	Valence	1790-1815	F
C=O ester	Valence	1735-1750	F
C=O aldéhyde et cétone	Valence	1700-1740	F
		abaissement de 20 à 30 cm ⁻¹ si conjugaison	
C=O acide carboxylique	Valence	1700-1725	F
C=O amide	Valence	1650-1700	F
C=C	Valence	1620-1690	m
C=C aromatique	Valence	1450-1600	Variable ; 3 ou 4 bandes
N=O (de -NO ₂) conjugué	Valence	1500-1550 1290-1360	F ; 2 bandes
N=N	Valence	1400-1500	f ; parfois invisible
C=N	Valence	1640-1690	F ou m
N-H amine ou amide	Déformation	1560-1640	F ou m
C _{tet} -H	Déformation	1430-1470	F
C _{tet} -H (CH ₃)	Déformation	1370-1390	F ; 2 bandes
O-H	Déformation	1260-1410	F
P=O	Valence	1250-1310	F
C _{tet} -O-C _{tet} (étheroxydes)	Valence	1070-1150	F
C _{tet} -OH (alcools)	Valence	1010-1200	
C _{tet} -O-C _{tri} (esters)	Valence	1050-1300	F ; 1 ou 2 bandes
C _{tri} -O-C _{tri} (anhydrides)			
C-N	Valence	1020-1220	m
C-C	Valence	1000-1250	F
C-F	Valence	1000-1040	F
C _{tri} -H de -HC=CH- (E) (Z)	Déformation Déformation	960-970 670-730	F m
C _{tri} -H aromatique monosubstitué	Déformation	730-770 et 680-720	F ; 2 bandes
C _{tri} -H aromatique o-disubstitué	Déformation	735-770	F
m-disubstitué	Déformation	750-800 et 680-720	F et m ; 2 bandes
p-disubstitué	Déformation	800-860	F
C _{tet} -Cl	Valence	600-800	F
C _{tet} -Br	Valence	500-750	F
C _{tet} -I	Valence	≈ 500	F

F:fort ; m:moyen ; f: faible



Chapitre 4- Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)



La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique extrêmement puissante qui permet d'obtenir des informations détaillées sur la structure et les propriétés physico-chimiques qui caractérisent un système. Cette technique analytique a été développée par les physiciens en 1938. Les premières mesures du magnétisme nucléaire ont été réalisées en 1946. A partir des années 70, le phénomène RMN est exploité en chimie organique, chimie inorganique, science des matériaux, puis en biochimie. C'est à partir des années 80 que les biologistes vont s'intéresser à cette technique analytique qui offre de large possibilités d'investigation des molécules de la matière vivante, il y aura la spectroscopie par RMN, puis l'imagerie par RMN (IRM).

La RMN représente un outil puissant, non destructif, principalement utilisé dans la détermination structurale d'un produit purifié, ou des mélanges de produits à l'état solide ou liquide. La RMN des liquides est un outil de base pour l'étude des petites molécules organiques en solution, substances naturelles ou synthétiques, et l'étude des macromolécules solubles (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, polymères synthétiques).

Les principaux noyaux d'intérêt biologique possédant des propriétés magnétiques sont les noyaux d'hydrogène (^1H), de l'isotope du carbone (^{13}C), du fluor (^{19}F), du phosphore (^{31}P) (spin 1/2). Seul le noyau d'hydrogène, formé d'un seul proton, joue un rôle important en imagerie aujourd'hui (on parle d'IRM « protonique »). Cela est lié au fait que l'hydrogène, qui représente 2/3 des atomes de l'organisme, possède un moment magnétique intrinsèque (protonique) élevé et donne lieu à un phénomène de résonance très net.

Tableau 05 : Propriétés nucléaires des noyaux les plus étudiés en RMN

Noyau	^1H	^{13}C	^{15}N	^{19}F	^{29}Si	^{31}P	^{57}Fe	^{109}Ag	^{113}Cd	^{119}Sn
I	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Abondance naturelle (%)	99,98	1,11	0,37	100	4,7	100	2,19	48,18	12,26	8,58

Deux types fréquents de spectroscopie RMN sont utilisés pour caractériser la structure organique, ^1H NMR et ^{13}C NMR, utilisées pour déterminer, respectivement, le type et le nombre d'atomes d'hydrogène, ainsi que le type d'atomes de carbone dans la molécule.

4-1 Spin nucléaire

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire dépend de l'existence d'une propriété quantique du noyau appelée le spin, celui-ci se définit comme la résultante des moments cinétiques des protons et neutrons (rotation sur eux-mêmes) d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique I et un moment magnétique μ . Dans le cas des noyaux de spin $\frac{1}{2}$, un moment magnétique assimilable à une aiguille aimanté microscopique est associé au moment cinétique. Le noyau se comporte comme un aimant (micro-aimant) tournant autour d'un axe, il peut se représenter comme une toupie en rotation, ce mouvement est appelé la précession (rotation) de Larmor (**Figure 28**).

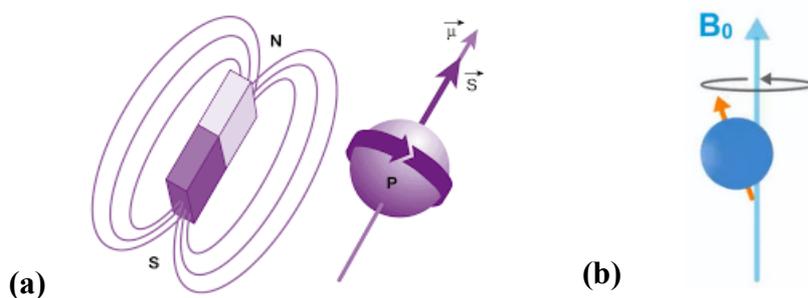


Figure 28 : Représentation schématique d'un spin nucléaire ; (a) le magnétisme nucléaire, (b) précession de Larmor.

4-2 Transition de spin (Résonance magnétique)

En solution, l'orientation des moments magnétiques des noyaux d'un échantillon est totalement aléatoire et dépend de l'agitation thermique. En absence de champs magnétique extérieur appelé généralement B_0 , les moments cinétiques de spin sont orientés aléatoirement dans la matière. En revanche, sous l'effet d'un champ magnétique intense B_0 (de plusieurs Teslas), les moments cinétiques de spin s'orientent selon deux directions. Parallèle (α) ou antiparallèle (β), par rapport au champs magnétique externe (**Figure 29**).

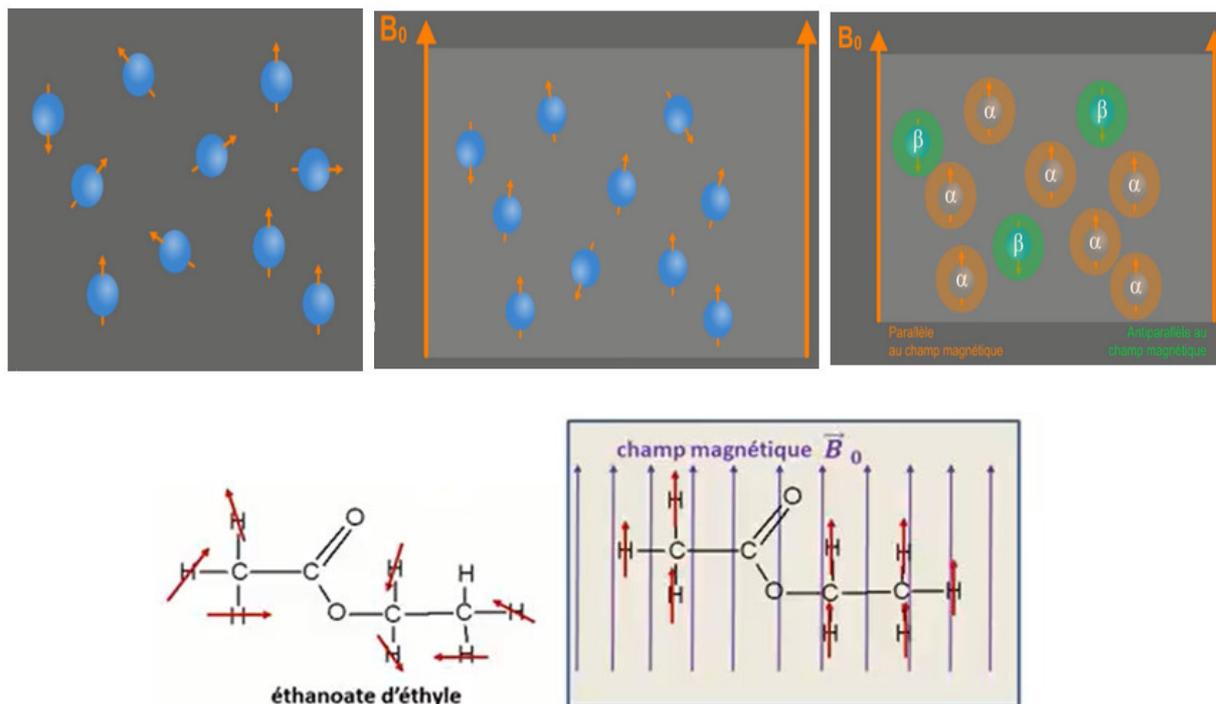


Figure 29 : Orientation des moments magnétiques du spin nucléaire, aléatoire en absence du champ magnétique B_0

L'application d'un champ magnétique B_1 perpendiculairement à B_0 , souvent appelé le champ radiofréquence, permet une transition du niveau α vers β . La transition du niveau bas au niveau haut peut avoir lieu par absorption d'une radiofréquence. Lorsque la transition a lieu, on dit qu'il y a résonance du noyau d'où on parle de la résonance magnétique nucléaire RMN (**Figure 30**). Après excitation, le champ B_1 cesse, l'aimantation qui a été basculée dans le plan transversal va évoluer pour revenir à son état d'équilibre, parallèle à B_0 . C'est le phénomène de relaxation.

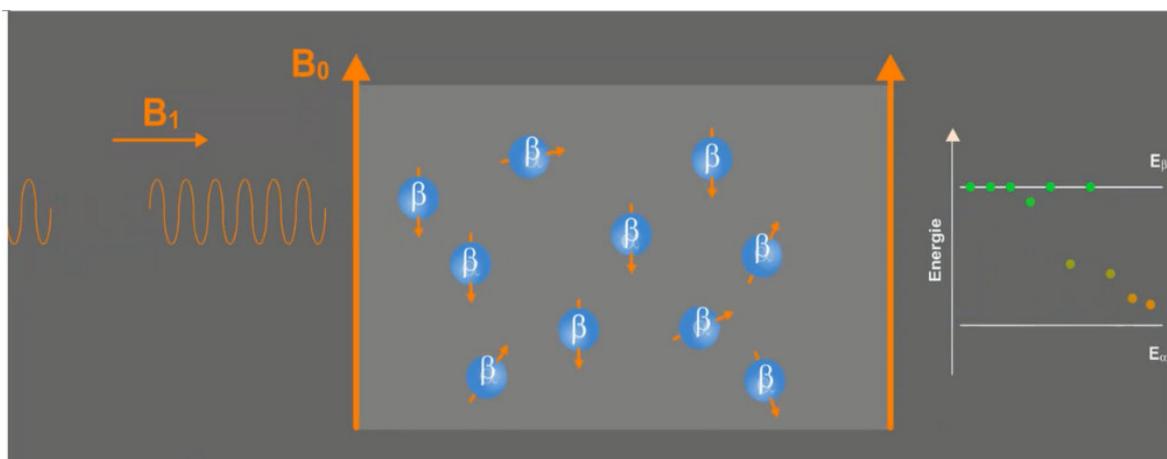


Figure 30 : Transition de spin (Résonance magnétique nucléaire)

Après l'arrêt de l'irradiation B_1 (arrêt de l'excitation), l'énergie libéré lors de la relaxation décroît en fonction du temps, le signal détecté est appelé le **FID** (Free Induction Decay). Ce dernier représente une opération mathématique qui permet de transformer un signal, qui évolue en fonction du temps (FID) en signal dépendant de la fréquence, ce qui permet ensuite d'obtenir le spectre de RMN (**Figure 31**).

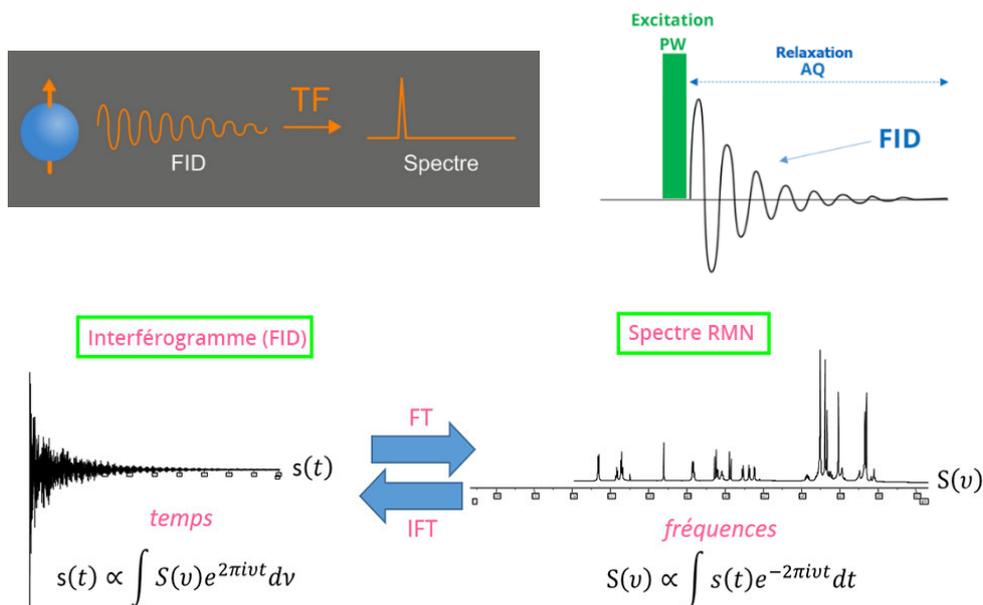
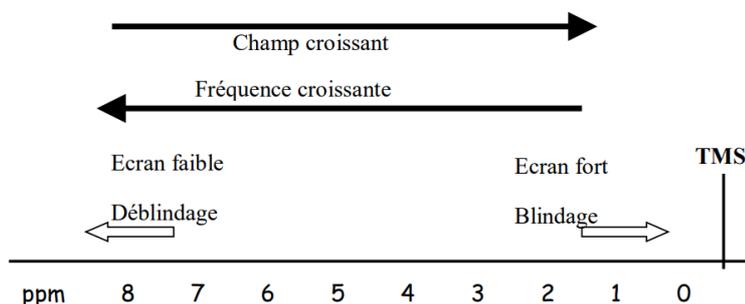


Figure 31 : Transformé de fourrier et spectre RMN

4-3 Blindage ou effet d'écran

Lorsqu'on soumet une molécule à un champ magnétique externe, ce champ agit non seulement sur les spins nucléaires, mais en même temps il induit ; dans un plan perpendiculaire à sa direction, une circulation des électrons autour du proton. D'où l'existence d'un champ magnétique interne. Ce champ peut s'additionner au champ extérieur, et dans ce cas on parle du phénomène de **déblindage**. Il peut s'opposer au champ extérieur, on parle alors du phénomène de **blindage** ou effet d'écran. 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.



4-4 Principe général de la RMN

Le principe de la RMN repose sur l'utilisation d'un champ magnétique B_0 pour orienter les spins nucléaires des atomes. L'excitation de ces atomes par une onde radio à la fréquence de résonance fait basculer les spins. Après excitation, les spins reviennent à leur état initial ; c'est l'état de relaxation. L'énergie libérée lors de la relaxation génère un petit courant détecté par un détecteur c'est le signal RMN, puis le traitement du signal par ordinateur permet l'obtention d'un spectre RMN. Le champ magnétique B_0 imposé doit être **intense**, il est environ 400 000 fois le champ magnétique terrestre.

4-5 Spectre RMN : cas du ^1H

Un spectre RMN du proton représente les pics de résonance des protons en fonction du déplacement chimique δ , l'origine (Référence) étant à droite du graphe et les valeurs croissantes sont orientées vers la gauche (**Figure 32**). Un pic (ou un groupement très rapproché de pics) est désigné sous le terme de signal en RMN. Chaque signal correspond à un atome ou un groupe d'atomes d'hydrogène, il est caractérisé par position, c'est-à-dire son déplacement chimique δ (ppm), sa forme (le nombre de pics), son intensité relative, et la distance entre les raies (couplage scalaire J). L'environnement de l'atome ou du groupe d'atomes d'hydrogène influe sur le déplacement chimique du signal et sur sa multiplicité (nombre de pics composant le signal).

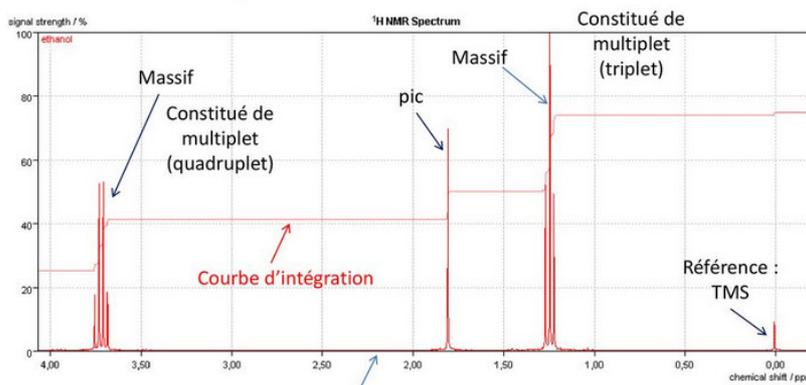
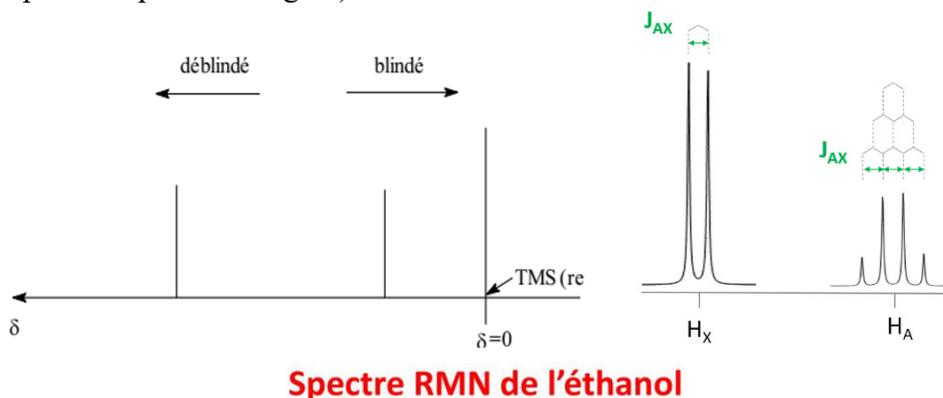


Figure 32 : Spectre RMN

Pour apprécier quantitativement le blindage que subit un proton on doit utiliser une référence. On utilise le signal que donnent les protons du **TMS** (TétraMéthylSilane) $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, introduit en petite quantité (1 à 2 %) dans l'échantillon, car son absorption est intense, et ne risque pas de réagir avec l'échantillon. Les 12 protons de cet étalon ont le même environnement chimique et fournissent un seul signal ayant un déplacement chimique $\delta = 0$ ppm.

4-6 Analyse du spectre RMN ^1H

En connaissant la formule brute de la molécule, la RMN permet de déterminer sa structure à partir des éléments suivants :

- La valeur des déplacements chimiques des différents signaux permet d'identifier certaines liaisons et groupements chimiques : des fourchettes de déplacements chimiques sont connues suivant le type de groupement ou liaison (en utilisant une table de données)
- La courbe d'intégration permet de déterminer le nombre de protons équivalents entre eux et les proportions entre les différents types de protons.
- La multiplicité des pics permet de connaître le nombre de protons portés par les carbones voisins.

4-6-1 Déplacement chimique

Les spectres ne sont pas gradués en fonction de la fréquence de résonance car la fréquence de résonance de chaque proton dépend du champ magnétique appliqué qui dépend de l'appareil utilisé. Pour avoir des spectres universels, il faut une grandeur qui ne dépend pas du champ magnétique. Cette grandeur est le déplacement chimique δ , définie par la formule suivante.

$$\delta = \frac{(\text{fréquence de résonance de l'atome} - \text{fréquence de résonance du TMS}) \times 10^6}{\text{fréquence du spectromètre}}$$

Exemple : le déplacement chimique de l'eau à 500 MHz:

$$\delta = \frac{((500.00212\text{MHz} - 500.00000\text{MHz})) \times 10^6}{500\text{MHz}} = 4,24 \text{ ppm}$$

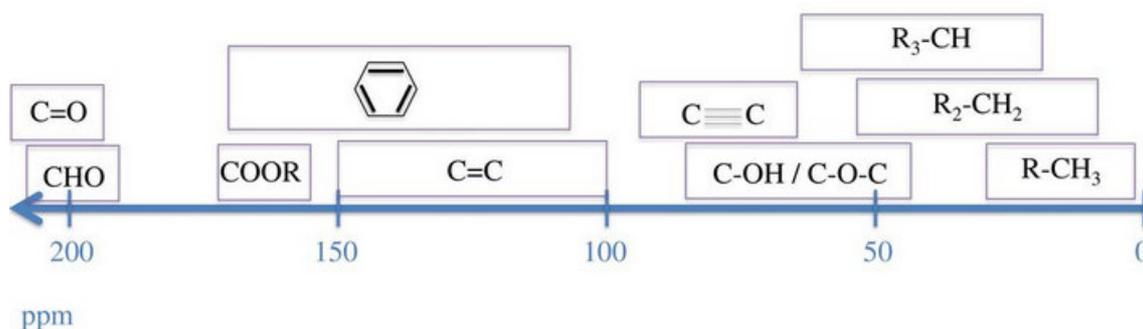
Le rapport $(\nu_i - \nu_{\text{réf}})/\nu_0$ est sans dimension et très faible. C'est pourquoi on multiplie le rapport par 10^6 et ainsi δ s'exprime en **ppm** (partie par million).

Sur le spectre RMN, le déplacement chimique est orienté de droite à gauche, sa valeur varie entre 0 et 15 ppm. Lorsqu'un proton est proche d'un atome très électronégatif, les électrons environnants sont plus proches de cet atome que de l'hydrogène : l'effet d'écran est amoindri,

le champ magnétique ressenti par le proton plus élevé, la fréquence de résonance du proton plus grande et le déplacement chimique plus important (**Tableau n°6**). Le déplacement chimique (^1H) dépend de nombreux facteurs, comme la concentration de la solution, le solvant, et l'existence de liaisons-H (intra ou intermoléculaire).

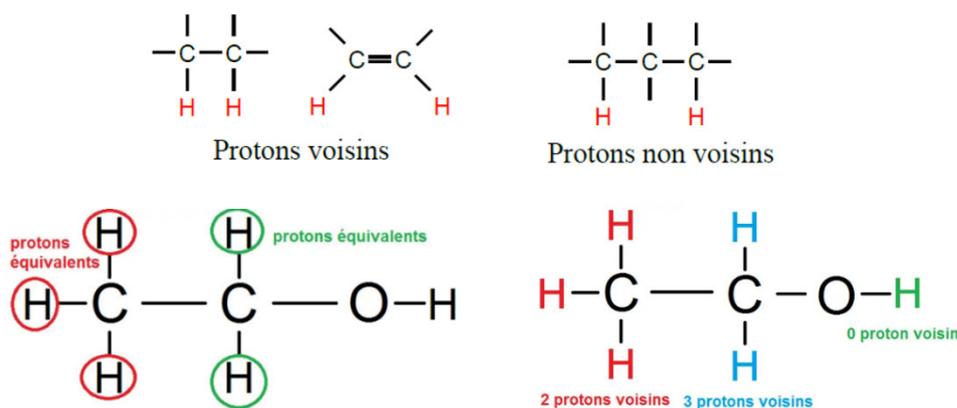
Tableau 06 : Quelques exemples de déplacements chimiques selon l'environnement proche du proton ^1H et du ^{13}C

Environnement proche du proton	$\begin{array}{c} \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H} \end{array}$ $\begin{array}{c} \\ \text{---C---} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{---C---O---} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{---C---X} \\ \\ \text{H} \end{array}$ dérivé halogéné	R-OH alcool	R-CHO aldéhyde	$\begin{array}{c} \\ \text{---C---C---} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	H-COO-R ester	R-COOH acide carboxylique
Déplacement chimique	0,8 à 2	3 à 4,1	2,5 à 4	1 à 6	9,5 à 9,9	2 à 2,7	8 à 8,5	10 à 13



4-6-2 Multiplicité du signal

Le signal correspond à un proton (ou groupe de protons) équivalent(s), il peut être multiple avec plusieurs pics, cette démultiplication des signaux est due aux interactions entre des protons voisins non équivalents. Deux protons sont dits voisins s'ils sont séparés par trois liaisons simples ou multiples, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas reliés au même atome de carbone mais à des atomes de carbone relié entre eux. Les protons équivalents sont des protons ayant le même environnement chimique, ils ont le même déplacement chimique et apparaissent sous le même pic, c'est-à-dire une molécule contient des protons identiques qui seront représentés par un seul pic, dont l'aire est proportionnel au nombre de protons présents.



Un proton ou un groupe de protons équivalents ayant n protons voisins donnera un signal constitué de $(n+1)$ pics, appelé **multiplet (Figure n°33)**. On parle de singulet (1 pic) ; doublet (2 pics); triplet (3 pics) ; quadruplet (4 pics) ; quintuplet (5 pics)... La multiplicité des pics ne dépend pas du nombre de protons qui résonnent, mais de ceux de leurs voisins

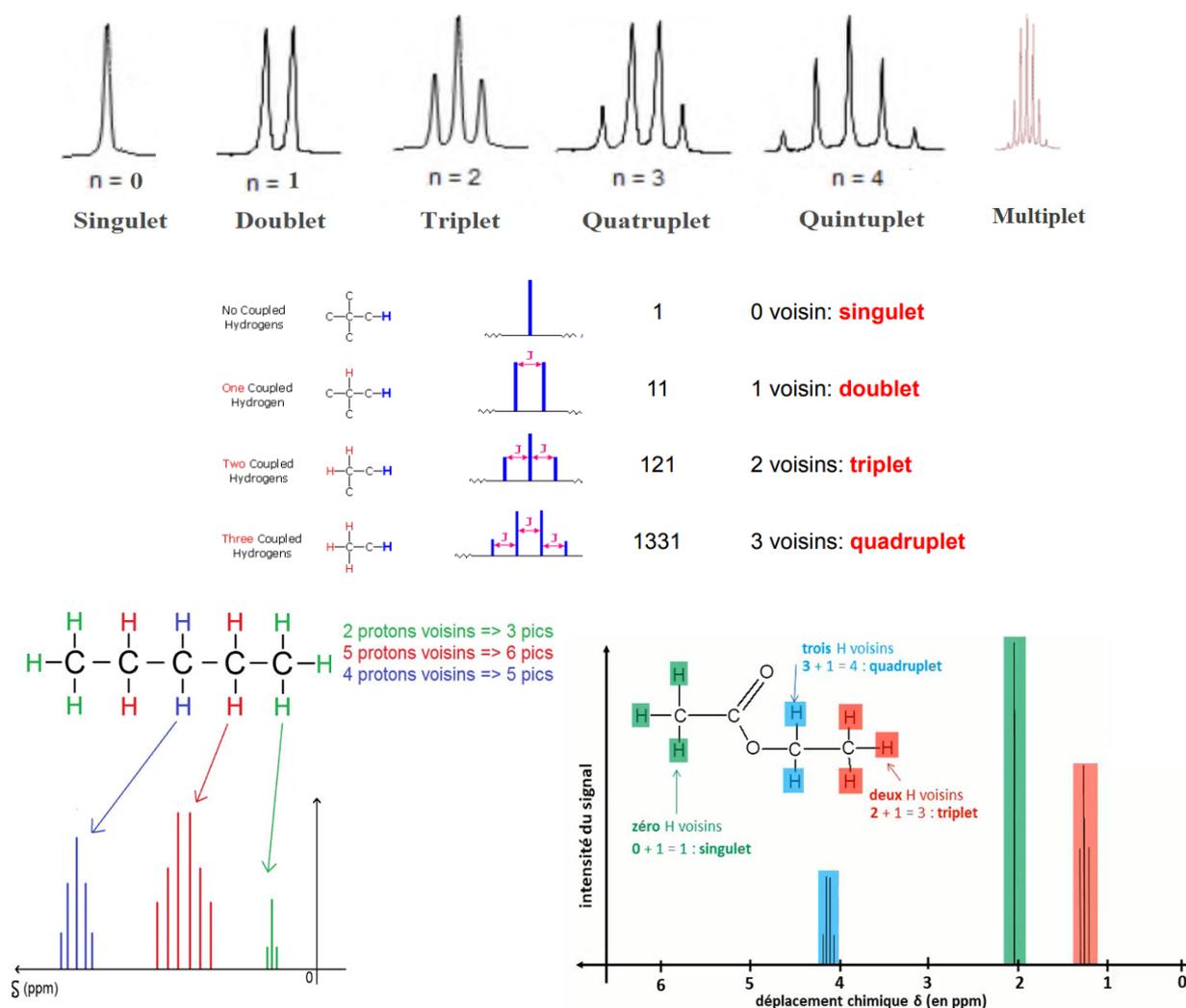


Figure 33 : Multiplicité du signal RMN

Lorsque les spectres RMN sont observés avec une résolution suffisante, on observe que certains signaux sont constitués de plusieurs pics. Ce phénomène de fragmentation du signal (en anglais : splitting) est dû aux interactions entre les noyaux. Soit dans l'espace, soit par l'intermédiaire des électrons de liaison. On donne le nom de couplage à ce type d'interaction. Dans le premier cas, on parle de couplage direct dans le second cas de couplage indirect. Le couplage scalaire peut être homo- ($J_{HH...}$) ou hétéronucléaire (J_{CH} , $J_{CF...}$).

4-6-3 La courbe d'intégration

Dans le spectre RMN, l'intensité des pics est proportionnelle au nombre de protons équivalents entrant en résonance. Ces pics pouvant être des singulets comme des multiplets, le spectromètre peut, déterminer une courbe appelée courbe d'intégration prenant une forme de paliers successifs. L'aire sous chaque palier (associé à un pic donné) est alors proportionnelle au nombre de protons équivalents entrant en résonance. Si on reprend l'exemple précédant, la molécule a trois groupes de protons équivalents. Le groupe bleu a 2 protons équivalents ; le groupe rouge a 4 protons équivalents (c'est-à-dire 2 fois plus que le groupe bleu), et le groupe vert a 6 protons équivalents (3 fois plus que le groupe bleu). Dans ce cas, la courbe d'intégration va monter à une certaine hauteur au niveau du signal bleu, elle va monter 2 fois plus au niveau du signal rouge, et 3 fois plus au niveau du signal vert.

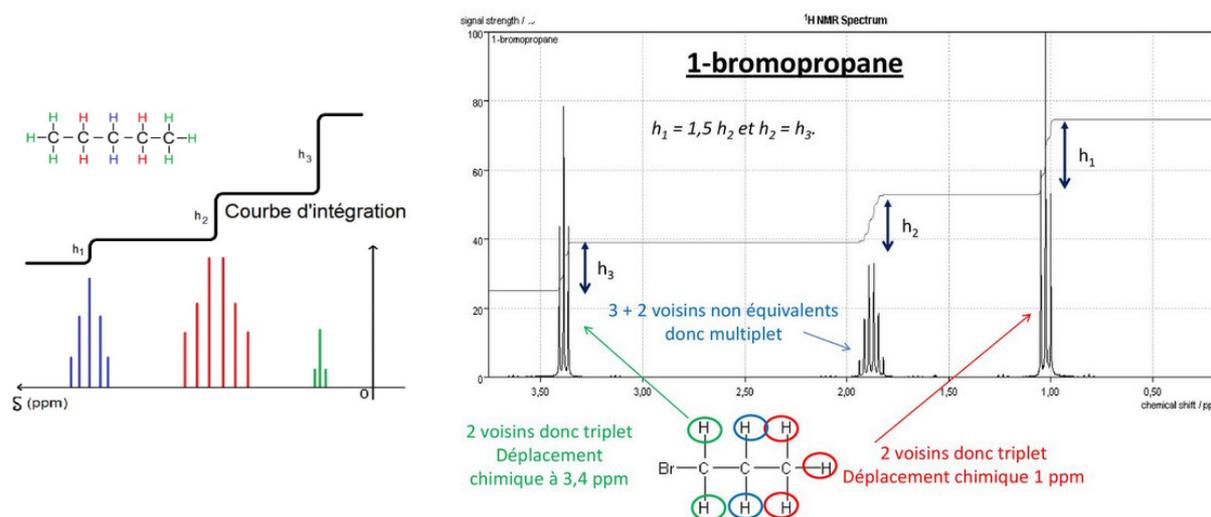
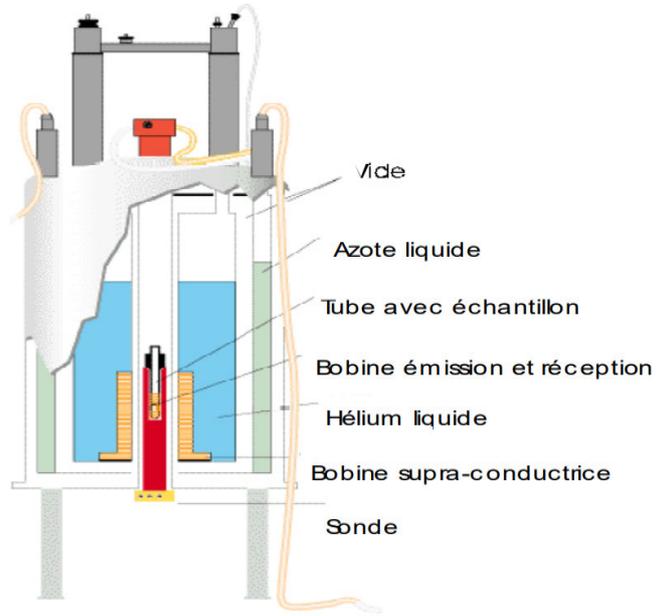


Figure 34 : la courbe d'intégration du spectre RMN

4-7 Appareillage en RMN

L'excitation des protons nécessite un champs magnétique intense. Les spectromètres RMN peuvent atteindre une intensité de 23,5 Tesla. Ce champ magnétique est créé par une bobine supraconductrice parcourue par un champ électrique. L'échantillon est placé au centre de la bobine. Afin de permettre à la bobine d'être supraconductrice, celle-ci est plongée dans un bain d'hélium. La bobine dégageant de la chaleur, l'hélium a tendance à s'évaporer. Pour ralentir l'évaporation et maintenir le système à une température constante, la RMN possède une double enveloppe (à la manière d'un thermos) dans lequel est injecté de l'azote liquide (environ -196°C) (Figure n°35).



Poste de pilotage

Console

Aimant Supraconducteur

Figure 35 : Spectromètre RMN

Plus l'intensité est importante plus les spectres obtenus sont détaillés et l'identification de composés en faibles quantités peut être réalisée. Les valeurs de ν et de B_0 qui sont les plus fréquemment utilisées pour la résonance du proton ^1H sont résumés le tableau ci-dessous.

Tableau 07 : Fréquences des spectromètres RMN couramment utilisée en analyse

B_0 / tesla	Fréquence ν / 10^6 Hz = MHz	Energie / $J.mol^{-1}$
1,4092	60	0,024
2,1138	90	0,036
7,0460	300	0,120
9,3960	400	0,159
23,49	1000	0,398

L'espèce chimique étudiée est introduite dans un tube de 18 cm de long et 5mm de diamètre contenant un solvant deutéré (hydrogènes remplacés par son isotope le deutérium), car le deutérium n'est pas excité par le champ magnétique ; par exemple, le solvant de choix pour l'étude des spectres protons est le chloroforme deutérie $CDCl_3$, ou le CCL_4 . Le tube est introduit au sein de l'appareil et l'analyse est lancée via l'ordinateur. 5 min plus tard le spectre apparaît à l'écran. L'analyse RMN se déroule en phase liquide. Cependant, elle est également possible en phase solide avec une adaptation de l'appareillage. Les fortes interactions des molécules entre elles en phase solide donne des signaux moins résolus (pics larges). Ces spectres sont donc moins facilement exploitables.



Le spectromètre de résonance magnétique nucléaire dispose de **(Figure n°36)** :

- Un aimant à l'origine du champ magnétique B_0 . Il s'agit d'un électro-aimant constitué d'un solénoïde alimenté par un courant continu stabilisé. Lors du passage du courant, l'élévation de température (par effet Joule) de l'aimant nécessite également la mise en place d'un circuit de refroidissement de l'aimant. Pour des champs importants (à partir de 2 Tesla), on a recours à des cryo-aimants utilisant des bobines supraconductrices refroidies à l'hélium liquide.

- Un émetteur-récepteur de radiofréquences RF. Cet émetteur est constitué d'une bobine alimentée par un courant alternatif (de fréquence égale à la fréquence de Larmor). Après l'impulsion, cette bobine est utilisée en récepteur pour capter le F.I.D.
- Une bobine de découplage. Cette bobine, analogue à celle constituant l'émetteur-récepteur RF permet de réaliser des expériences de double irradiation, servant entre autres à supprimer des couplages spin-spin.
- Un ordinateur couplé à l'émetteur-récepteur et aux différents éléments constitutifs de l'appareillage RMN. Il est à la fois chargé de piloter le spectromètre, de stocker les F.I.D., d'assurer les transformations de Fourier.

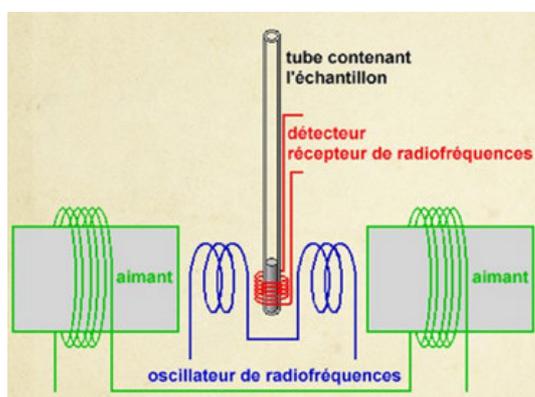
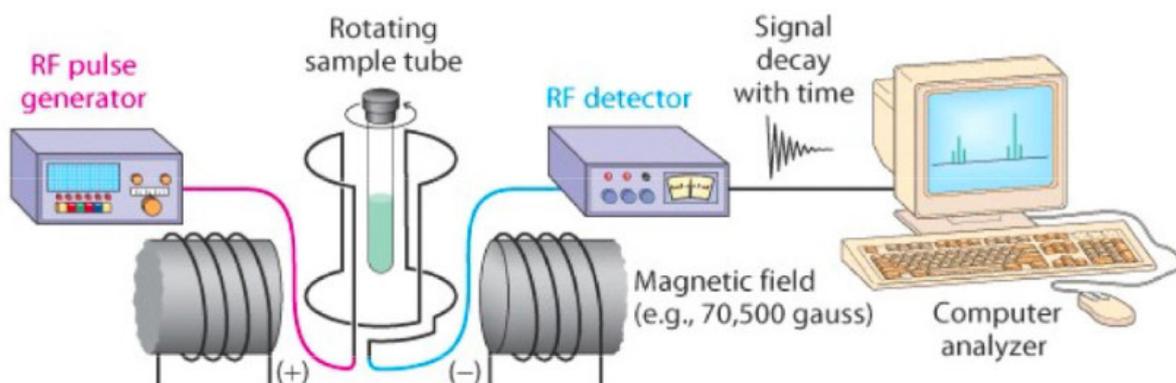
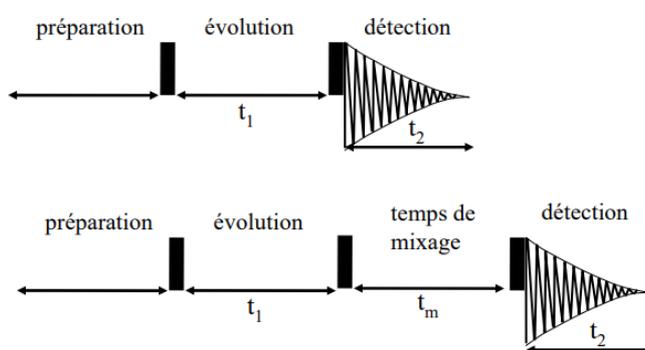


Figure 36 : Schéma simplifié du spectromètre RMN

4-8 La RMN bidimensionnelle (2D)

La RMN à deux dimensions (2D) est une technique plus efficace et précise que la RMN-1D, elle est très utilisée dans l'Analyse structurale des macromolécules, protéines, peptides, acides nucléiques. La RMN-2D appartient autant à la spectroscopie à transformée de Fourier qu'à celle à impulsion et repose sur une succession de trois intervalles de temps, préparation évolution et détection. Certain nombre d'expériences s'y ajoute encore une autre période avant la détection, le temps de mixage. Un spectre à deux dimensions (2D) est constitué de plusieurs spectres à une dimension (1D) acquis en variant un délai particulier (t_1) dans une séquence d'excitation comprenant au moins deux impulsions.



La RMN 1D révèle la position et l'intensité des pics de résonance et les couplages à courtes distances. Tandis que la RMN 2D permet de montrer les corrélations plus complexes existant entre les spins. Ces spectres sont donc particulièrement utiles dès que les molécules étudiées sont complexes (comportant beaucoup d'atomes couplés entre eux, couplage à longue portée entre spins ou à travers l'espace).

Le spectre RMN 2D peut être présentés sous deux formes, soit sous forme d'un spectre 3D avec deux axes correspondant aux fréquences f_1 et f_2 et le troisième représentant l'intensité des pics, soit un tracé en contour correspondant à la projection en 2D du spectre 3D (**Figure 37**).

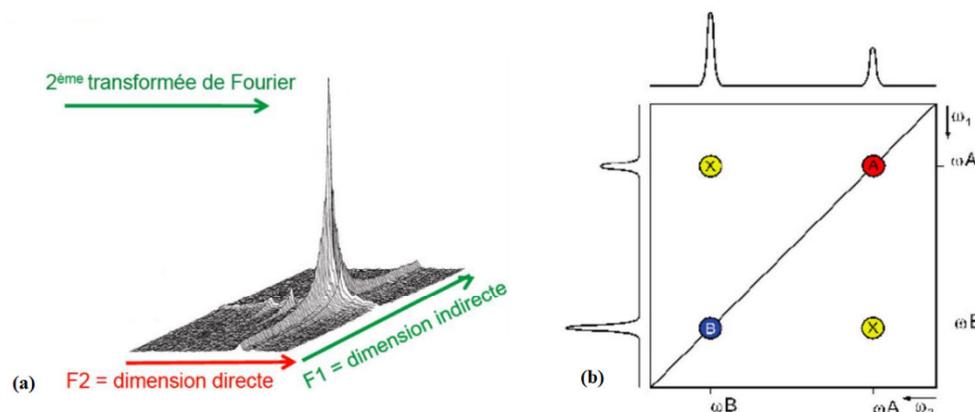


Figure 37 : représentation en 3D (a) et en contour (b) d'un spectre en RMN 2D

Les spectres RMN 2D de résolution permettent d'identifier les constantes de couplage entre deux spins. Ils comportent un axe correspondant au déplacement chimique d'un des deux spins (A par exemple) et un axe indiquant les fréquences de couplage. Les spectres RMN 2D de corrélation permettent de déterminer les corrélations entre les déplacements chimiques des différents spins qui sont couplés entre eux. On peut ainsi obtenir des spectres de corrélation homonucléaire (^1H - ^1H) ou hétéronucléaire (^1H - ^{13}C).

La corrélation des déplacements chimiques au travers des couplages scalaires homonucléaires peut être assurée par deux méthodes : **COSY** (Correlation Spectroscopy) permet de mettre en évidence les protons qui sont couplés de façon scalaire. On considère par exemple 2 protons A et X couplés en 3 J. Sur le spectre 2D, la diagonale correspond au spectre 1D et les tâches hors diagonale traduisent les corrélations ^1H - ^1H (**Figure 38**). **TOCSY** (Total Correlation Spectroscopy), appelé également **HOHAHA**, qui permet de mettre en évidence les systèmes de spins (ensemble de protons couplés de façon scalaire). La corrélation des déplacements chimiques au travers des couplages polaires homonucléaires couplage (^1H - ^1H) dans l'espace utilise la méthode **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) Transfert de l'aimantation d'un spin à un autre proche dans l'espace via le couplage dipolaire. Effet NOE existe que si $r < 5 \text{ \AA}$.

La corrélation des déplacements chimiques au travers des couplages scalaires hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) est assurée par les techniques : **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Correlation) met en évidence les couplages scalaires ^1JC -H ; **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) met en évidence les couplages scalaires ^2JC -H et ^3JC -H (**Figure 39**). **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) consiste à l'étude des couplages scalaires directs $^1\text{J}^1\text{H}$ - ^{13}C

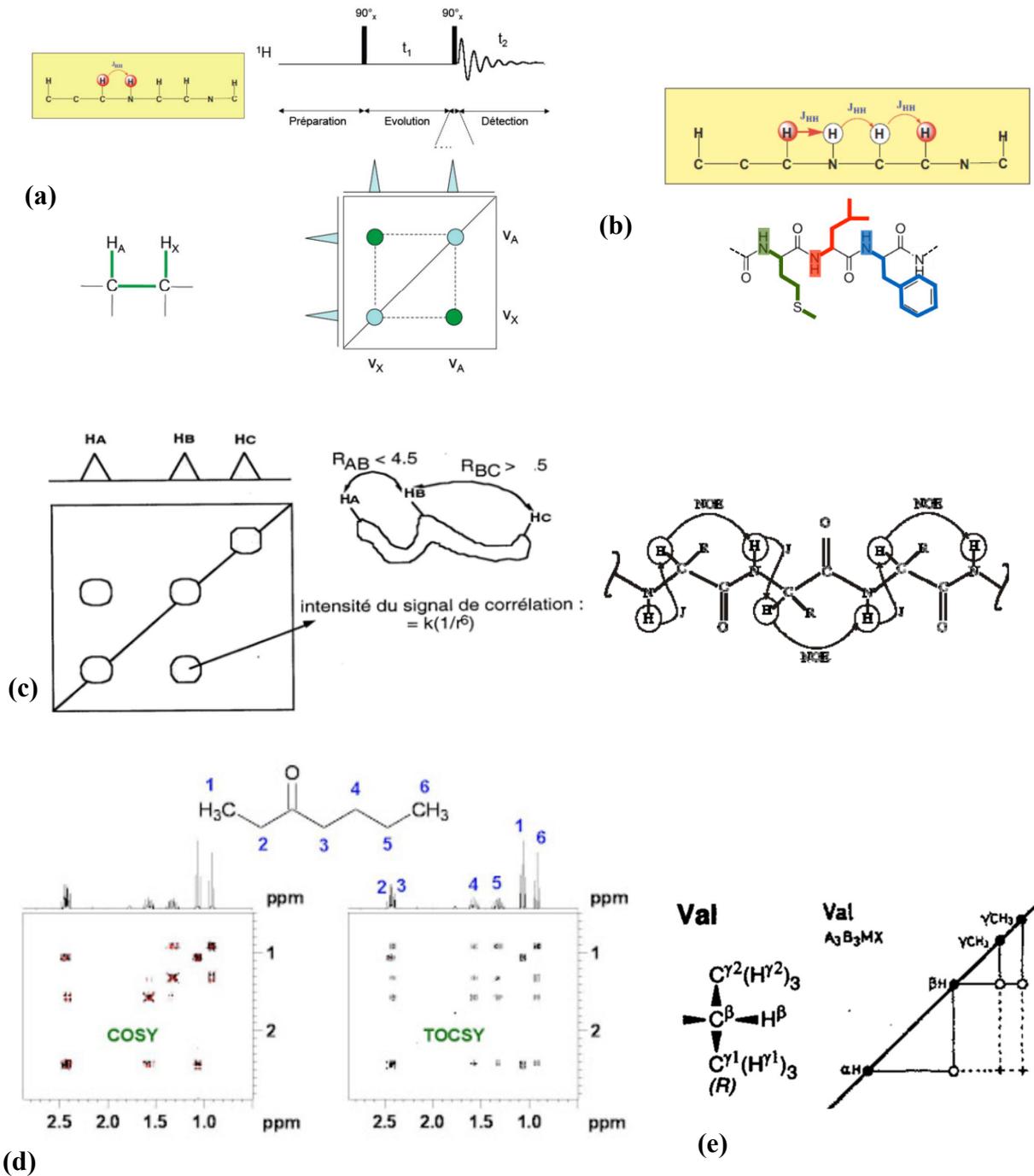


Figure 38 : RMN 2D COSY (a), TOCSY (b) et NOESY (c) de 2 noyaux homonucléaires ; RMN 2D COSY, TOCSY de 3-heptanone (d) RMN 2D COSY de la valine (e)

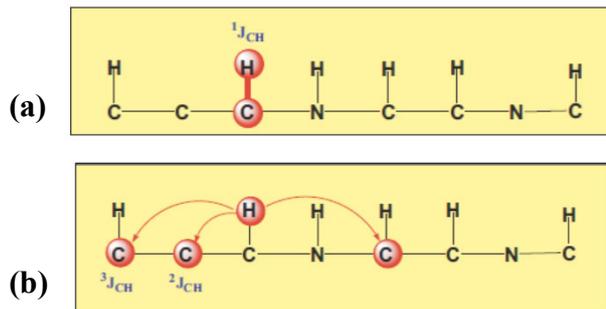


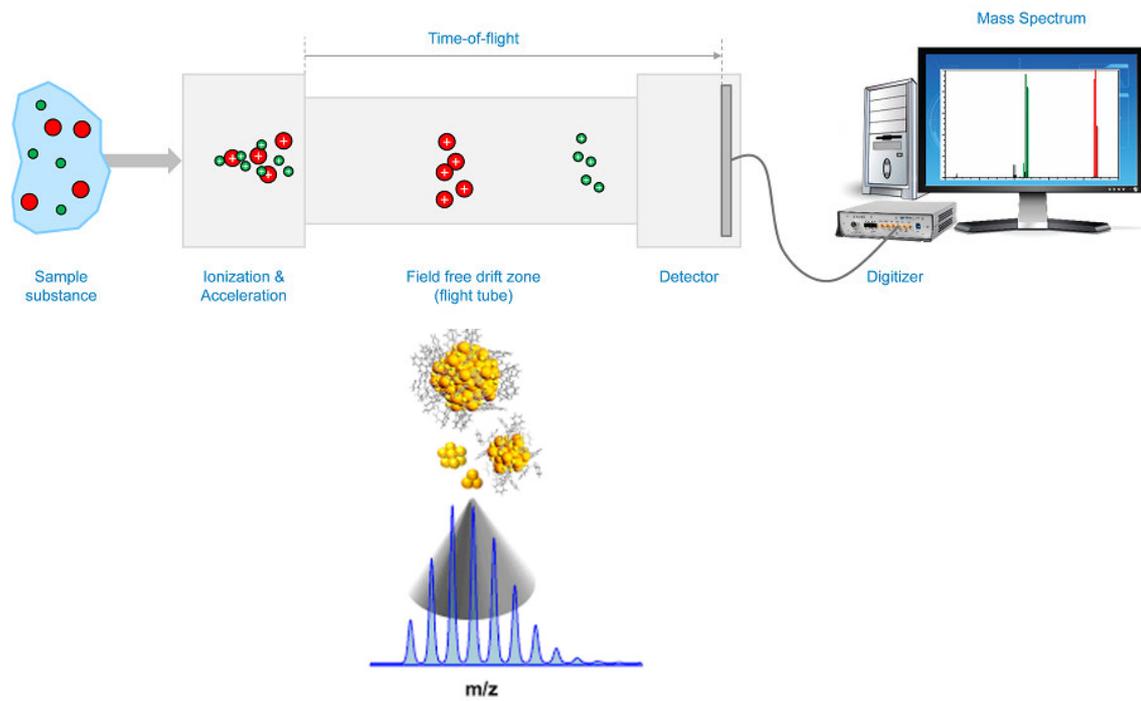
Figure 39 : Corrélations hétéronucléaires HSQC (a) et HMBC (b)

4-9 Applications de RMN

Les applications de la RMN sont diverses et incluent les domaines de recherche et industriels suivants :

- La biologie : cette technique est appliquée à l'étude des macromolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) pour comprendre les voies biochimiques impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et des glucides.
- La chimie : la RMN est largement utilisée pour des analyses qualitatives et quantitatives afin de suivre les réactions, d'identifier les structures et d'évaluer la pureté des échantillons.
- La médecine : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une application de la RMN permettant d'analyser les tissus mous afin d'identifier les tissus endommagés ou malades.
- L'industrie pharmaceutique : elle sert à déterminer la pureté et la quantité des principes actifs, des excipients et des impuretés dans les produits pharmaceutiques.
- L'industrie pétrolière : pour évaluer les hydrocarbures dans le pétrole brut et dans ses produits.

Chapitre 5- Spectroscopie de Masse



La spectrométrie de Masse (SM) est une technique physique très puissante d'analyse structurale permettant de détecter, d'identifier et de quantifier avec grande précision, la masse moléculaire de la molécule elle-même ou des fragments issus de la molécule. Cette technique complémentaire aux autres méthodes spectroscopiques (RMN, IR) permet également une analyse qualitative de mélanges complexes à l'aide du couplage avec les techniques de chromatographie gazeuse (GC-MS) ou liquide (LC-MS).

Contrairement à la spectroscopie RMN, IR et UV qui sont des spectroscopies d'absorption, la spectrométrie de masse n'est pas de la spectroscopie au sens strict du terme, puis qu'aucune radiation incidente n'est absorbée par la matière, il s'agit d'une interaction électron-matière. L'appareillage et les techniques physiques utilisées sont tout à fait différents de celles utilisées dans les trois autres types de spectroscopie cités précédemment.

Grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa rapidité d'analyse quantitatives, la spectrométrie de masse joue un rôle important dans les études de pollution de l'environnement, de dopage, dans le domaine de l'analyse des molécules biologiques (protéines, sucres...) et dans l'étude des polymères. L'avantage de la spectrométrie de masse réside dans l'utilisation de quantité infime d'échantillon (de l'ordre du nanogramme ou picogramme) sous différentes formes ; minéraux, organiques, bio-organiques, à l'état gazeux, liquide ou solide.

Actuellement, la spectrométrie de masse est utilisée dans divers domaines, comme l'industrie agroalimentaire, chimique, pétrochimique, dans l'environnement, sciences de la matière, dans la chimie, la chimie clinique, la médecine, la biologie, la microbiologie, la pharmacologie clinique et la toxicologie.

5-1 Principe

Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur une ionisation et une fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne en effet une accumulation d'énergie qui, en se dissipant peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à de nombreux fragments ionisés caractérisés par le rapport de leur masse à leur charge. Ces ions sont alors accélérés dans un champ électromagnétique et séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé le spectre de masse.

5-2 Les étapes de l'analyse par spectrométrie de masse

L'analyse des molécules par spectrométrie de masse est une succession des étapes auxquelles l'échantillon est soumis. Ces étapes se résument comme suit ;

- *Volatilisation* : l'état de matière condensée solide et liquide nécessite une volatilisation (passe à un état gazeux) par usage d'un système de pompage qui provoque l'écoulement de la vapeur
- *Ionisation et fragmentation* : l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est transformé en ions (exemple bombardement électronique). La fragmentation de l'ion aura lieu lorsque son énergie interne est supérieure à l'énergie d'activation.
- *Accélération* : les ions sont *focalisés* et *accélérés* par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
- *Séparation* : les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z) par l'*analyseur*
- *Détection* : après séparation, les ions sont captés par un détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.
- *Affichage du spectre de masse* issu du traitement du signal envoyé par le détecteur, et qui représente l'abondance des ions en fonction de leur rapport m/z .

5-3 Spectromètre de masse

La SM est une méthode instrumentale effectuée par un instrument sophistiqué le spectromètre de masse. Schématiquement ce dernier comprend différentes parties placées en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (analyseur) et enfin leur détection et traitement du signal (Figure 40, 41).

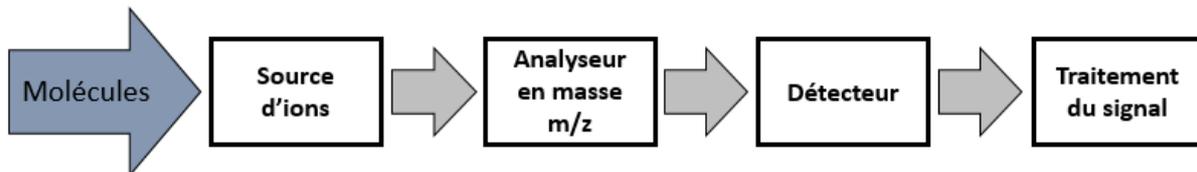
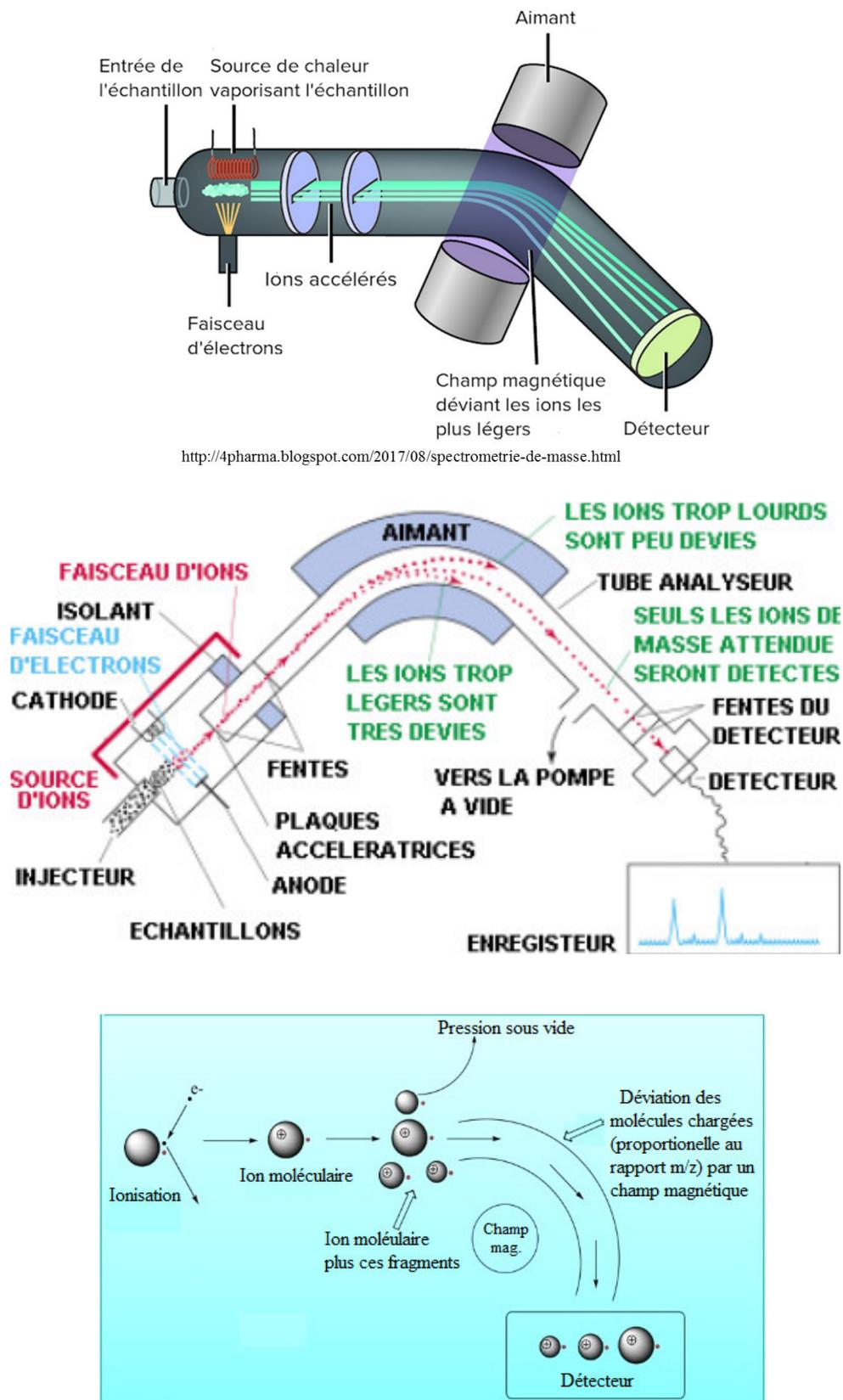


Figure 40 : Schéma du principe de fonctionnement du spectromètre de masse

- **Système d'introduction** : l'échantillon peut être introduit directement, sous forme gazeuse, liquide ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (CPG, LC, électrophorèse capillaire...).
- **Source d'ionisation** : Dans laquelle les molécules sont ionisées. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation. La plus importante est l'impact électronique
- **Analyseur** : permet la séparation des ions suivant leur rapport masse/charge en application d'un champ magnétique. Les plus grands seront le moins dévié. Plusieurs types d'analyseurs sont disponibles. Leur mode de fonctionnement repose sur l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques. L'analyseur à déviation magnétique, l'analyseur au filtre quadripolaire, l'analyseur un champ électrique constant à temps de vol (TOF : time of flight)
- **Décteur** : après séparation les ions sortant de l'analyseur sont captés par le détecteur qui les exprime en fonction de leur abondance relative
- **Système de traitement de donnée** : système informatique qui permet de transformer les données reçus par le détecteur en spectre de masse.



<http://4pharma.blogspot.com/2017/08/spectrometrie-de-masse.html>

Figure 41 : Principe de fonctionnement du spectromètre de masse

Les spectromètres de masse utilisés dans les laboratoires ont des combinaisons diverses entre un ionisateur et un analyseur de masse. Les plus connus sont les ESI-MS, ESI-MS/MS, MALDI-TOF/TOF, ESI-Q/Trap et Orbitrap. Ils sont choisis en fonction de leurs performances

et de leur coût d'installation. Pour améliorer les performances d'un MS ou MS/MS, le spectromètre de masse est souvent couplé avec une méthode de séparation telle que la chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC) pour une meilleure séparation des composés avant la MS.



5-4 Sources d'ions

Le fonctionnement d'un spectromètre de masse consiste à mettre en mouvement les analytes dans des compartiments qui sont placés sous un vide très poussé. Pour mettre en mouvement des analytes, il faut appliquer une force à la molécule en utilisant soit le champ électrique (E) soit le champ magnétique (B). Mais il y a une condition pour que l'analyte soit soumis à une force dans l'un ou l'autre de ces deux champs, il est impératif qu'il porte une charge électrique non nulle, c'est-à-dire qu'il faut qu'il soit ionisé.

Dans un spectromètre de masse, la source d'ions est la partie de l'instrument qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Il existe de nombreux types de sources d'ions et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent. Ionisation par impact Électronique (E.I.) ; Ionisation Chimique (C.I.) ; Bombardement atomique rapide (F.A.B.) ; Désorption par effet de champ (F.D.) ; Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) ; Electrospray (E.S.I.). Le premier type est le plus répandu et le plus utile pour l'étude structurale des composés.

5-4-1 Ionisation par impact électronique

L'ionisation par impact électronique est la plus ancienne et la mieux connue des méthodes d'ionisation (**figure 42**). Un flux d'électrons ayant une énergie de quelques eV à 100 eV, émis par un filament chauffé (rhénium ou tungstène), rencontre les molécules qui entrent dans la source, c'est le bombardement électronique. Si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule **M**, la transformant en un ion radical **M^{+•}**. Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'impact électronique conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

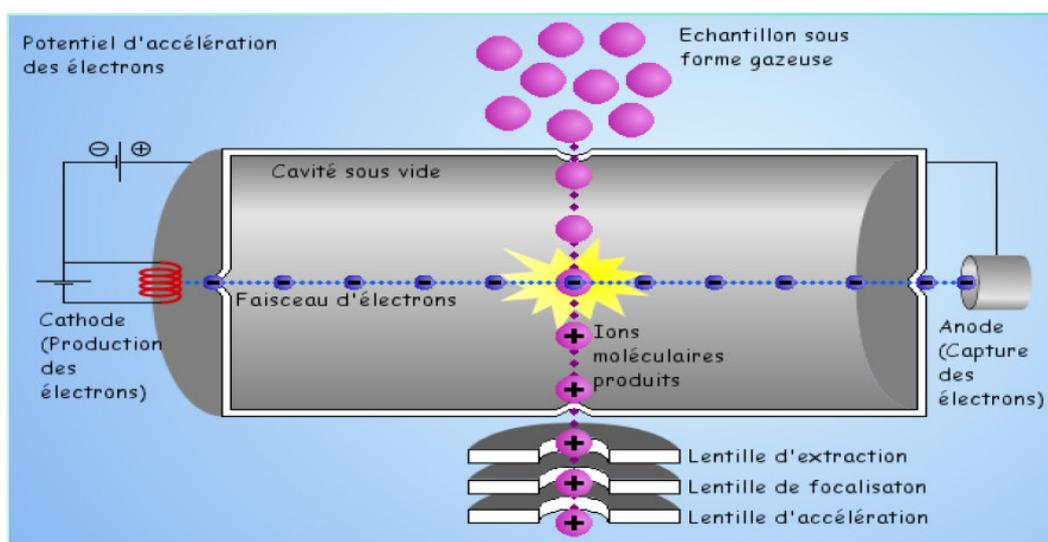


Figure 42 : Source d'ions par impact électronique (bombardement électronique)

5-4-2 Ionisation chimique

Les molécules gazeuses de l'échantillon à analyser sont introduites dans la chambre d'ionisation en même temps qu'un gaz réactif (CH_4 , isobutane, NH_3 ...). Ensuite un faisceau d'électrons bombarde les molécules et du fait des très faibles concentrations de l'échantillon, seules les molécules du gaz sont ionisées et fragmentées. Les fragments très réactifs ainsi formés réagissent à leur tour sur les molécules de l'échantillon et provoquent leur ionisation.

5-5 Ionisation et fragmentation

Le bombardement de l'échantillon gazeux sous vide provoque une augmentation de l'énergie des molécules suivie d'ionisations et fragmentations en ions (anions, cations) et molécules neutres. L'ionisation des molécules peut se faire de différentes manières ; par éjection ou capture d'un électron $\text{A-B}^{+\bullet}$, par protonation : A-BH^+ , par déprotonation : $\text{A-B}^{-\bullet}$, par cationisation : A-B-Na^+ (**Figure 43**).

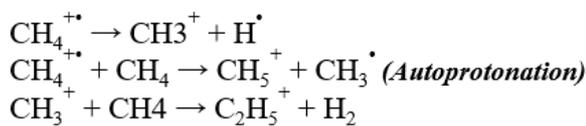
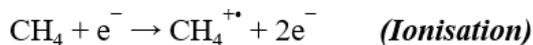
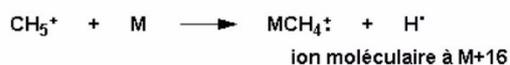
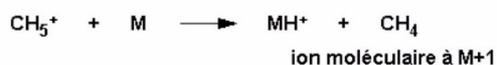
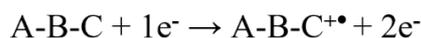
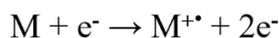


Figure 43 : Types d'ionisation

L'énergie nécessaire pour arracher un électron de la couche externe d'une molécule est appelée le potentiel d'ionisation (PI). La majorité des molécules ont des PI variables entre 8 et 15 eV. Toute fois le faisceau d'e⁻ ne produit des ions que si son énergie est de l'ordre de 70 eV. L'excès d'énergie est communiqué à l'ion moléculaire sous forme d'énergie interne. Cet ion moléculaire (ou ion parent) se fragmente en donnant des ions fils dont l'énergie interne est suffisamment élevée pour qu'ils puissent se fragmenter à leur tour et ainsi de suite (Figure 44).

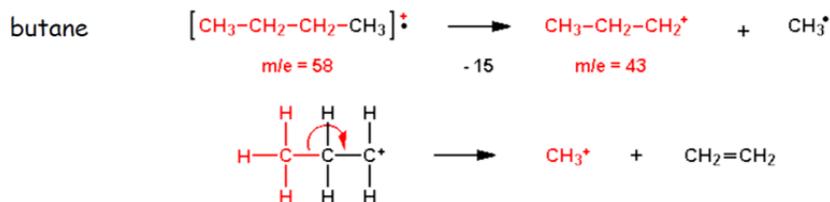
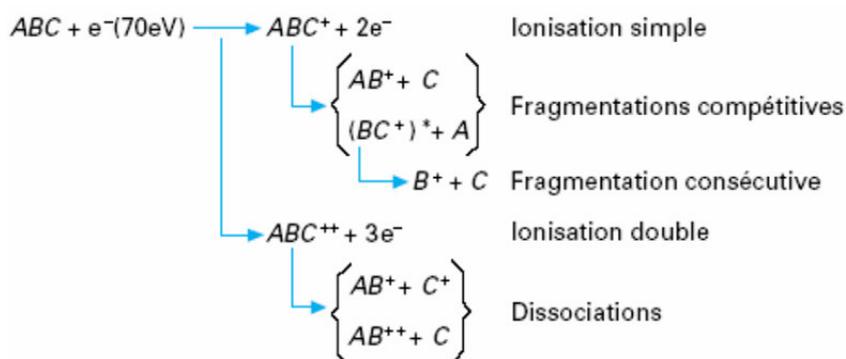
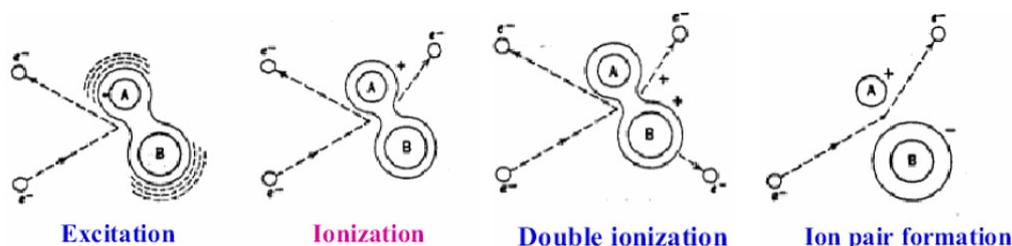


Figure 44 : Ionisation et fragmentation

Dans la chambre d'ionisation on obtient un mélange d'ions dont le plus léger est H^+ et le plus lourd est M^+ . Tous ces ions possèdent une durée de vie très brève de l'ordre de μ seconde. Il est donc nécessaire de les faire sortir de la source le plus rapidement possible afin de les analyser. La quantité de fragments produit dépend de l'énergie du flux électronique et de la « force » de l'ionisation (**figure 45**).

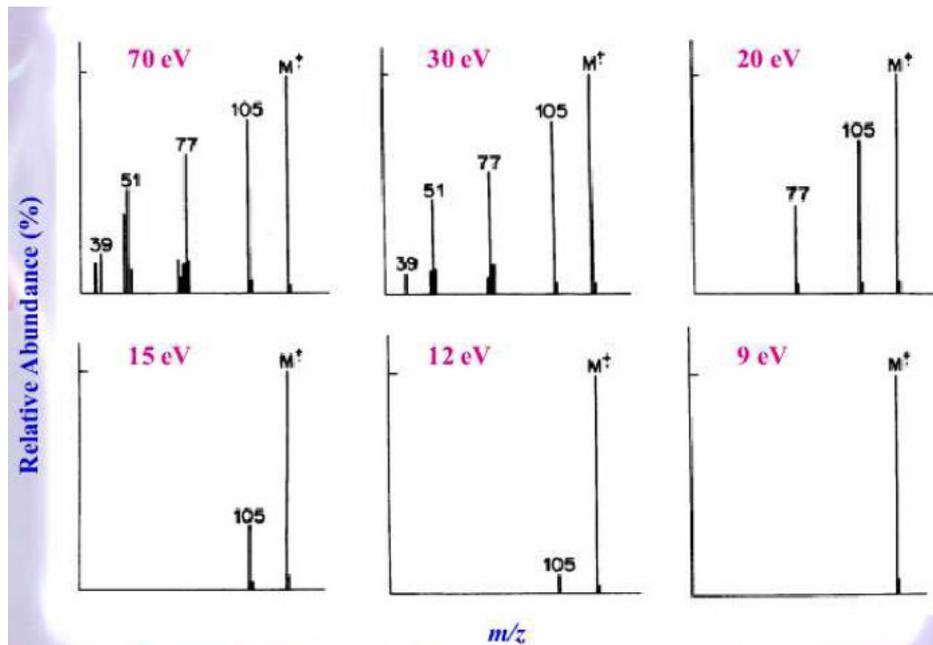
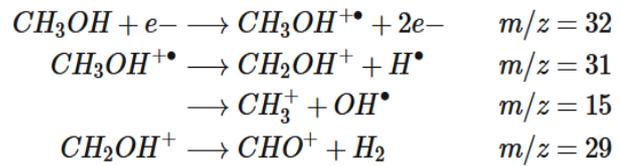
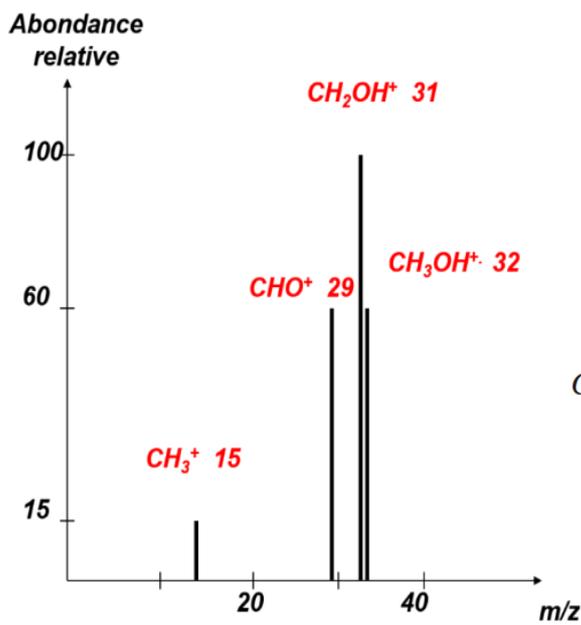
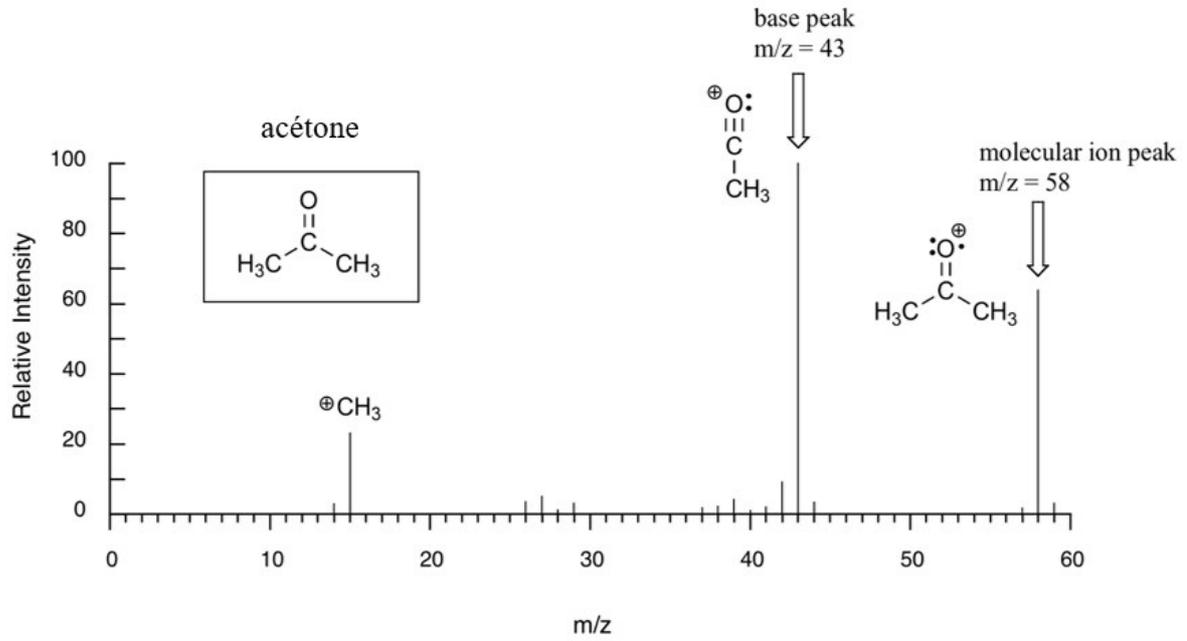
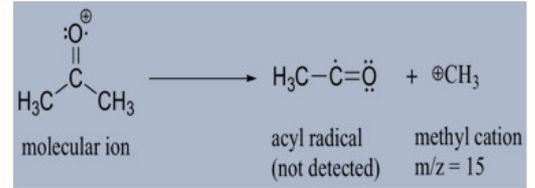
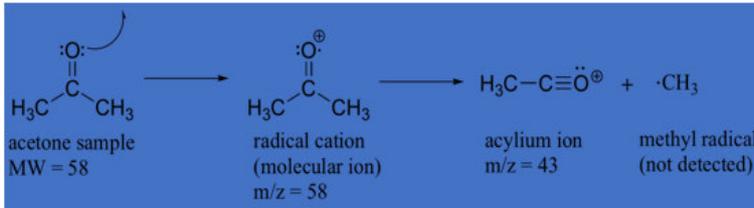


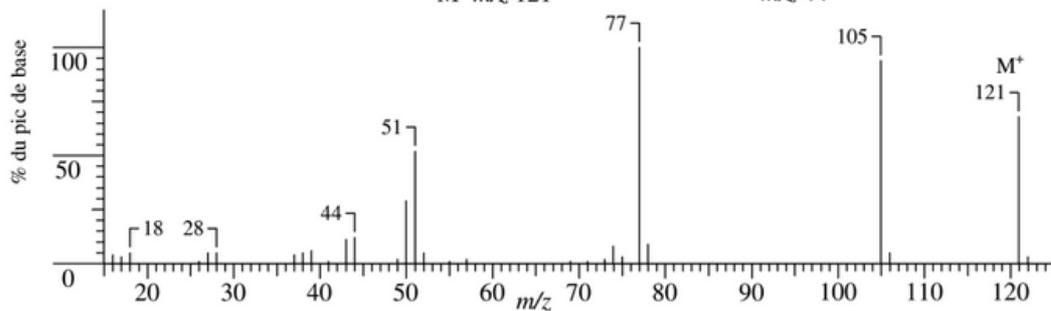
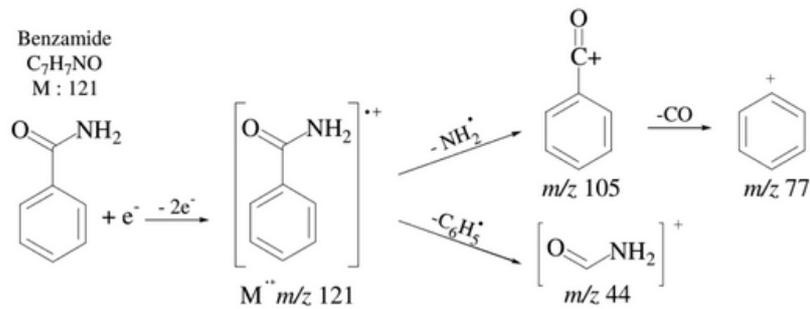
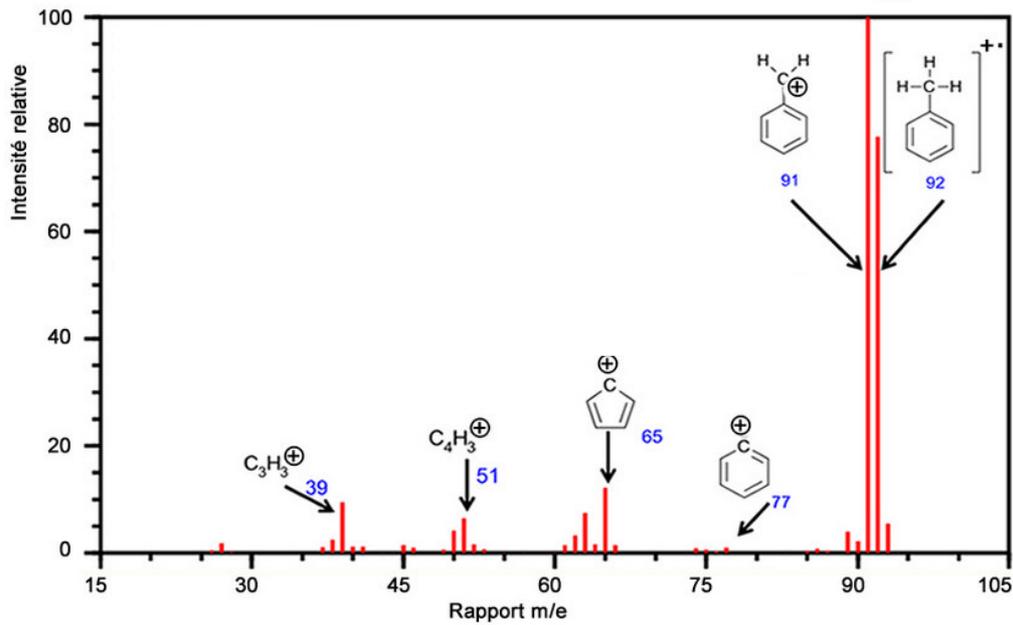
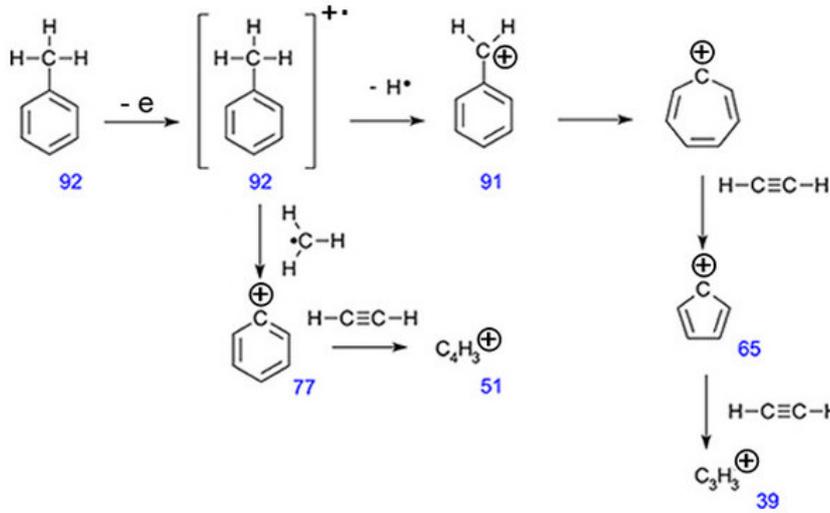
Figure 45 : Ionisation et fragmentation moléculaire dépendante de l'énergie du flux électronique

5-6 Spectre de masse

Le spectre de masse est un diagramme avec, en abscisse, le rapport m/z exprimé en Dalton, et en ordonnée, l'intensité correspondant à l'abondance relative des ions. Les différents types de pics observés dans un spectre de masse sont (**Figure 46**) ;

- **Le pic de base :** C'est le pic le plus intense du spectre. Il correspond à l'ion le plus abondant.
- **Le pic moléculaire ou pic parent :** Correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de molécule analysée (non fragmentée).
- **Les pics fragments :** il correspond aux différents ions fragments





5-7 Applications de la spectrométrie de masse

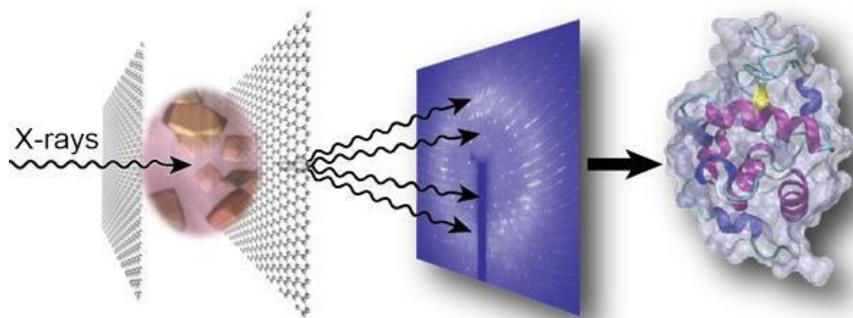
La spectrométrie de masse est largement utilisée pour mesurer de très faibles poids moléculaires à des concentrations extrêmement basses, en-dessous du ng/ml. La possibilité de coupler la spectrométrie de masse à d'autres techniques de séparation telles que l'électrophorèse capillaire, la GC ou la HPLC en fait un outil analytique polyvalent permettant de séparer et d'identifier simultanément les analytes. Les domaines d'application de la spectrométrie de masse sont multiples. Quelques domaines d'applications sont résumés comme suit ;

La recherche biomédicale : Analyse de séquences d'acides aminés de protéines et de peptides ; recherche de biomarqueurs et identification de protéines ; dépistage néonatal de maladies métaboliques ; détection de troubles héréditaires affectant la biosynthèse d'acides aminés, d'acides gras et de composés organiques

La pharmacologie et toxicologie : Dosage des drogues et alcool ; recherche des intoxications médicamenteuses, évaluation des impuretés au cours du développement de médicaments, évaluation de la pureté de principes actifs pharmaceutiques ; identification des drogues et des toxines.

Autres : éco-toxicologique, agroalimentaire, alimentation et cosmétique

Chapitre 6- Cristallographie : Diffraction des rayons X



La cristallographie est la science qui se consacre à l'étude des cristaux en partant de l'échelle atomique jusqu'à l'étude de la formation, la croissance, la forme extérieure, la structure interne et les propriétés physicochimiques de la matière cristallisée (ou en poudre).

La cristallographie aux rayons X, radiocristallographie ou diffraction de rayons X (DRX) est une technique puissante d'analyse des solides cristallisés, utilisée pour déterminer la structure atomique et moléculaire des matériaux et des molécules biologiques. Elle est basée sur la diffraction des rayons X par la matière.

Les rayons X sont des radiations électromagnétiques ayant une longueur d'onde, du même ordre de grandeur que la taille des atomes, de l'ordre de l'Ångström ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$). Ils sont à la base de différentes techniques d'analyse comme la radiographie et tomographie (imagerie médicale, science des matériaux), la cristallographie aux rayons X (diffraction de rayons X), et la spectroscopie de fluorescence X qui permet seulement de déterminer la nature chimique des atomes présents dans l'échantillon analysé (Fe, Al...) sans déterminer leur arrangement dans l'espace.

On distingue les rayons X durs, de plus grande énergie mais de plus faible longueur d'onde (0,1-0,2 nm), plus pénétrant, et qui sont utilisés en radiographie ; les rayons X mous qui sont facilement absorbés par une épaisseur millimétrique de matière solide, sont utilisés en cristallographie (**Figure 47**). Les rayons X sont produits soit par des tubes sous vide, dispositifs de petite taille accessibles en laboratoire, soit par un grand instrument, le synchrotron. Avec ce dernier, la gamme de longueurs d'onde disponibles est plus large et le rayonnement très intense

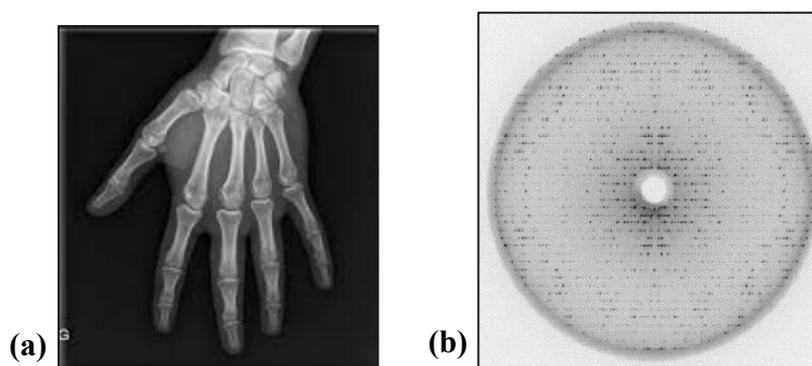


Figure 47 : Film (cliché) de radiographie (a) et de cristallographie ou diffractogramme (b)

La méthode analytique de diffraction des Rayons X est très utilisée dans divers domaines : la catalyse, la bio- cristallographie, la valorisation de ressources naturelles ou de substances naturelles pour la pharmacie ou l'industrie agro-alimentaire.

6-1- Principe

La diffraction des rayons X (DRX) est basée sur l'interaction d'un faisceau monochromatique de rayons X avec les atomes d'un matériau solide cristallisé. Les électrons entourant chaque atome ont la capacité, dans des conditions particulières, à « réfléchir » le rayonnement X. C'est le phénomène de diffraction. Un détecteur permet de mesurer l'intensité du faisceau diffracté par l'échantillon. La lumière diffractée apparaît sur un film photographique sous forme de taches (points) appelé film ou cliché de diffraction. Ensuite, chaque tache (point) sur le film de diffraction, qui représente l'intensité du rayonnement diffracté en fonction des angles de diffraction, sera analysé (calculs mathématiques, transformé de Fourier) par des logiciels sur ordinateur et déterminer un diffractogramme qui représente l'intensité du faisceau diffracté en fonction de l'angle du détecteur ; et une carte de densité électronique. L'analyse de la densité des électrons par les logiciels permet de reconstruire la position des atomes pour finalement donner un modèle atomique quasi exact de la structure de la molécule et obtenir une image 3D (Figure 48).

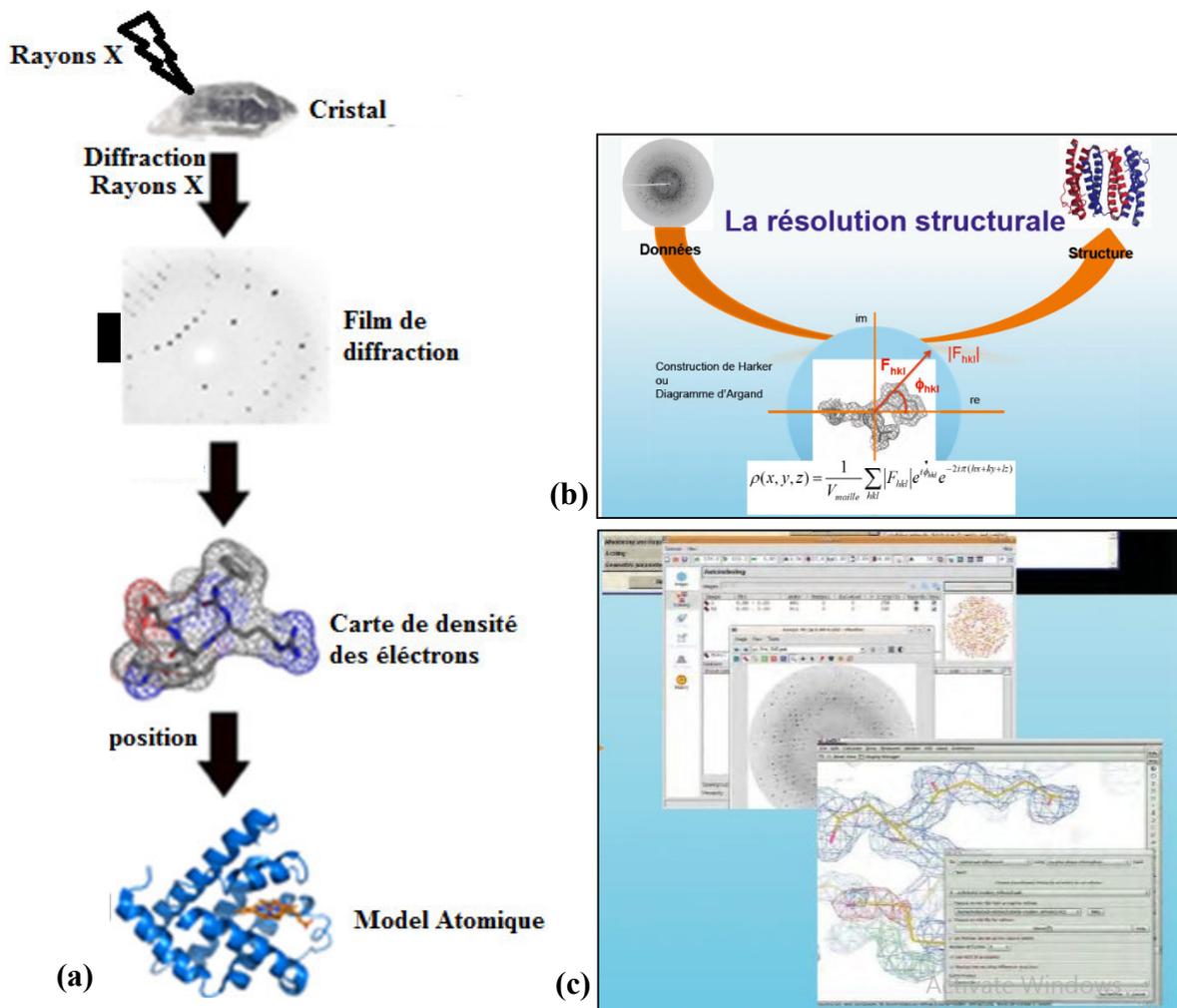


Figure 48 : Schéma simplifié du principe de la diffraction des rayons X (a), traitement des données pour détermination du model atomique (b, c)

6-2 Interaction RX-matière

Un cristal est un agencement d'atomes, d'ions ou de molécules, avec un motif se répétant périodiquement dans les trois dimensions. Les distances interatomiques sont de l'ordre de l'Ångström, du même ordre de grandeur que les longueurs d'onde des rayons X (**Figure 49**). un cristal constitue donc un réseau 3D qui peut diffracter les rayons X.

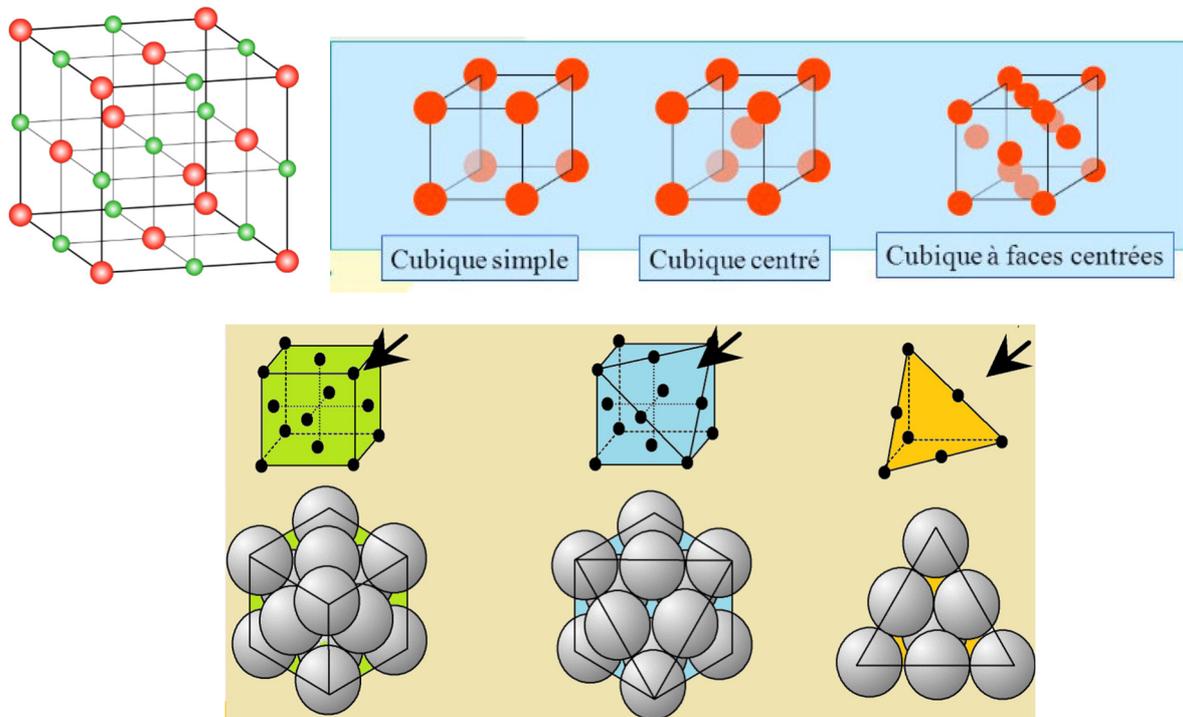


Figure 49 : Formes des cristaux

La matière cristallisée est constituée d'un empilement de familles de plans réticulaires parallèles et équidistants. Le faisceau de rayons X incident est réfléchi partiellement par le premier plan. Le faisceau non réfléchi "tombe" sur le deuxième plan pour être à nouveau partiellement réfléchi, et ainsi de suite (**Figure 50**). Chacun des atomes réfléchit une onde, qui se propage dans toutes les directions. Les ondes issues des atomes, apparaissent sur le film de diffraction. Les rayons X diffractés par le cristal sont renvoyés dans des directions spécifiques déterminées par la Loi de Bragg ($n\lambda=2d \sin \theta$), qui dépend de la longueur d'onde des rayons X et de la distance entre des plans d'atomes ordonnés sur le réseau cristallin (**Figure 49**). Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons diffractés, il est possible de d'obtenir une image tridimensionnelle de la densité électronique des atomes du cristal formant le motif cristallin ainsi que la nature de ces atomes, leurs liaisons chimiques, leur agitation thermique et d'autres informations structurales.

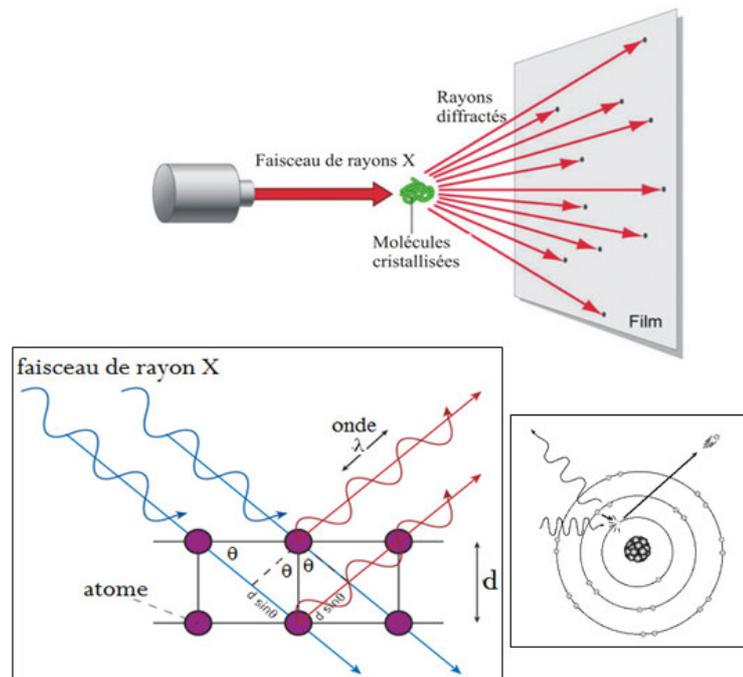


Figure 48 : Interaction rayon X- matière cristallisée

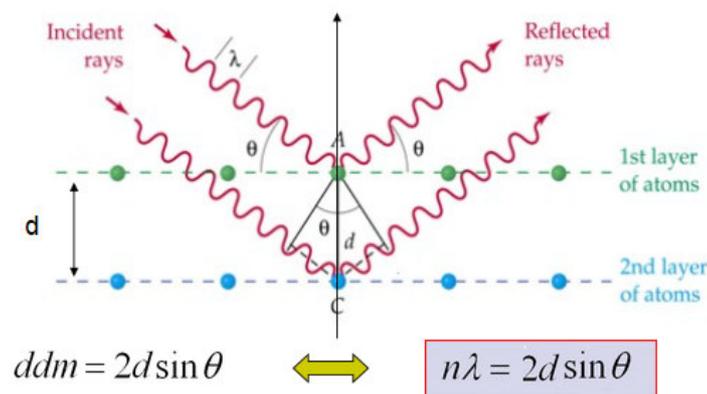


Figure 50 : Diffraction des rayons X par les plans réticulaires du cristal (**loi de Bragg**)

6-3 Nature de l'échantillon utilisé en diffraction des rayons X

L'exposition d'un monocristal (dimension de l'ordre de 0,1 mm) à un faisceau de rayons X produit une image constituée de taches de diffraction bien définies. Tandis que, une poudre cristalline, ensemble de cristaux microscopiques, produit un très grand nombre de taches groupées en cercles concentriques (**Figure 51**).

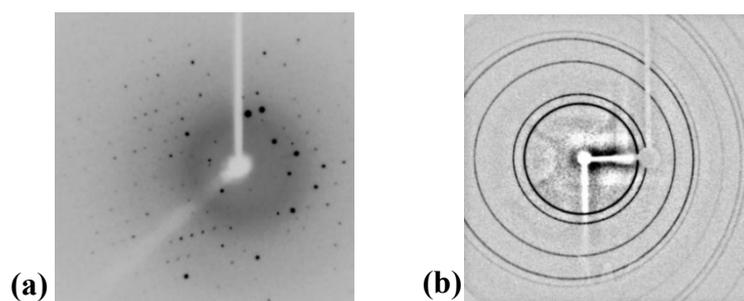


Figure 51 : Film de diffraction d'un monocristal **(a)** et une poudre cristalline **(b)**

6-4 Principe de fonctionnement du diffractomètre

L'appareil de mesure est appelé chambre de diffraction lorsqu'il est photographique et diffractomètre lorsqu'il comporte un système de comptage des photons. L'équipement utilisé dans la diffraction des rayons X est entièrement automatisé, il comprend un tube à rayons X, un porte-échantillon, un goniomètre, un détecteur de rayons X et un système électronique de traitement des données. Cet équipement permet l'enregistrement quantitatif des spectres de diffraction $I(\theta)$ des échantillons polycristallins. On peut utiliser un goniomètre (θ - 2θ). Le détecteur se déplace le long du cercle de focalisation tandis que l'échantillon tourne à vitesse angulaire moitié (**Figure 52**). Le cristal sélectionné est monté sur le diffractomètre, L'ensemble est fixé sur une tête goniométrique, ce qui va permettre de faire tourner le cristal dans les trois dimensions et ainsi de faire varier l'angle θ .

- **Génération de rayons X** : Les rayons X sont générés à l'aide d'un tube cathodique. Dans ce tube spécialement conçu, un filament est chauffé pour produire des électrons. Ces électrons sont accélérés par la tension d'accélération et frappent la cible.
- **Goniomètre** : Il s'agit d'un groupe de composants dotés de fentes d'entrée et de sortie appelées collimateurs. L'importance de ce système réside dans le maintien de l'angle des rayons X, de l'échantillon et du détecteur de manière à ce que la condition de Bragg soit respectée pendant le balayage. Le porte-échantillon et le détecteur sont tournés à l'aide d'un moteur pas à pas pour obtenir l'angle 2θ .
 - **Détecteur** : Il s'agit d'un compteur proportionnel qui compte le nombre de rayons X tombant sur sa surface. À l'endroit où la condition de Bragg est respectée, un maximum est observé.
 - **Unité de traitement électronique** : L'ordinateur contrôle toutes les parties mobiles et les fait fonctionner selon la programmation de l'utilisateur. Après avoir reçu les données du détecteur, les modèles sont traités électroniquement afin d'obtenir des paramètres importants tels que les distances interatomiques, structure cristalline, la déformation du réseau, la valeur de la cristallite, etc.

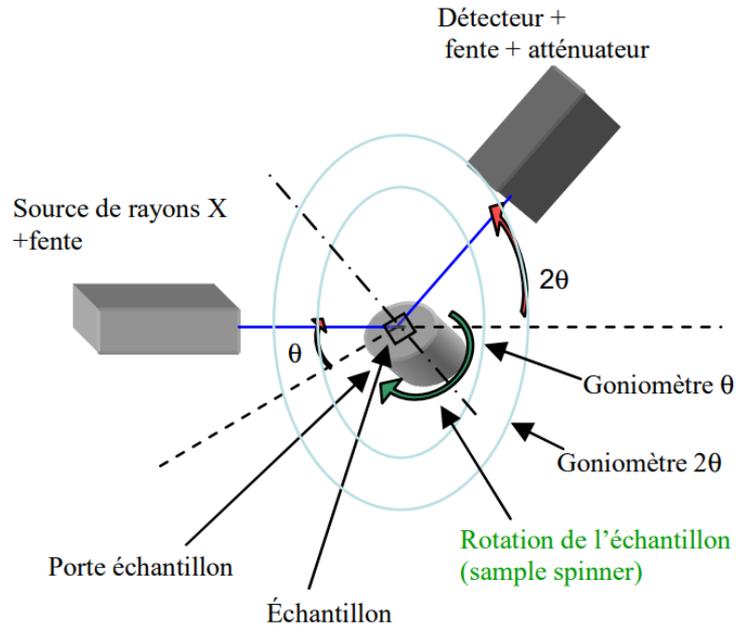


Figure 52 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre

Deux types de diffractomètre peuvent être utilisés ; Diffractomètre à compteur, et à quatre cercles. Le diffractomètre à compteur permet l'enregistrement quantitatif des spectres de diffraction $I(\theta)$ des échantillons polycristallins. Un goniomètre (θ - 2θ) peut être utilisé. Le détecteur se déplace le long du cercle de focalisation tandis que l'échantillon tourne à vitesse angulaire moitié (**Figure 53**). Le diffractomètre automatique à quatre cercles dont le terme quatre cercles attribue au nombre des mouvements rationnels disponibles du cristal pour un positionnement dans une direction quelconque de l'espace (**Figure 54**).

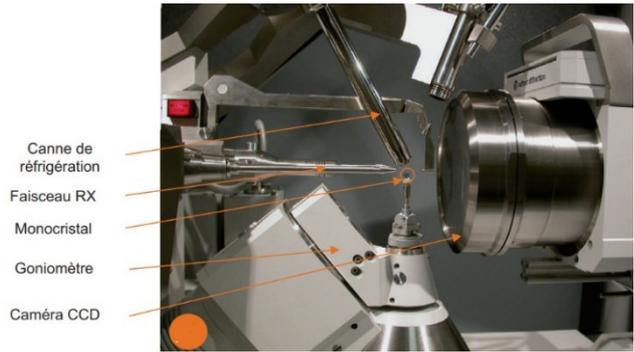
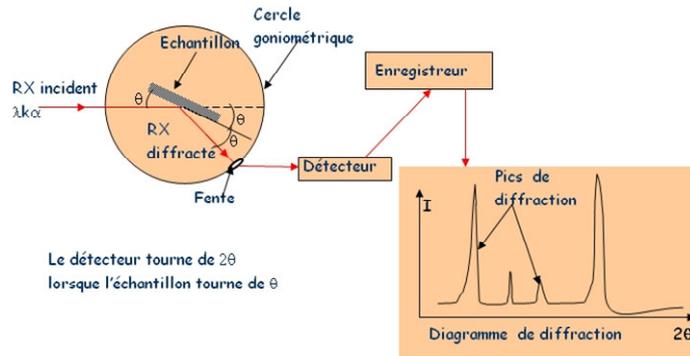


Figure 53 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre à compteur

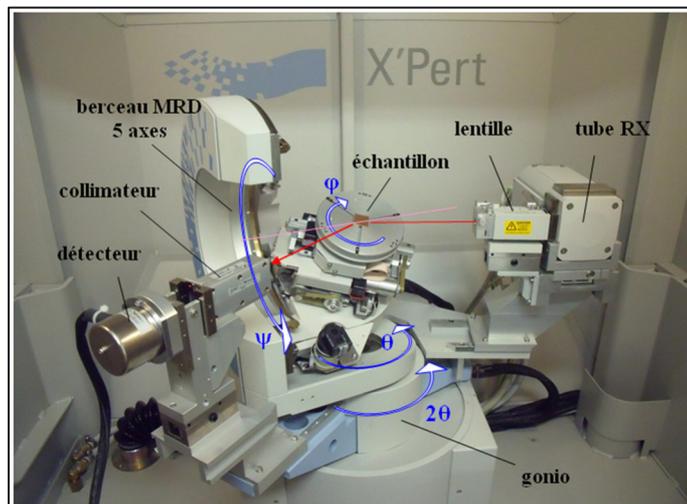
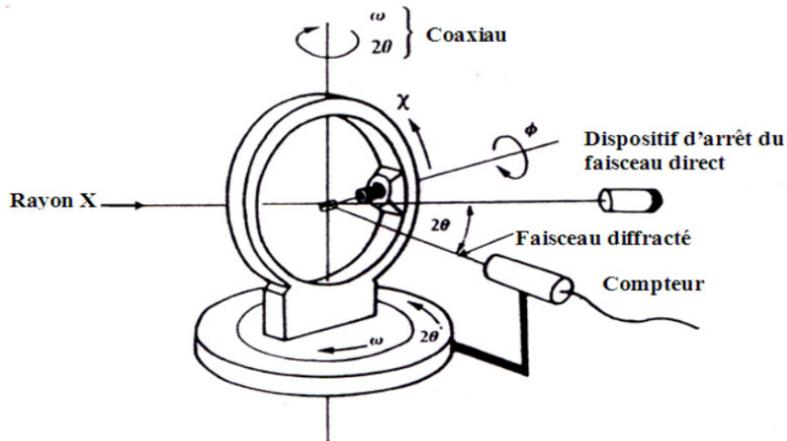


Figure 54 : Principe de fonctionnement d'un diffractomètre à quatre cercles

6-5 Spectre de diffraction ou diffractogramme

Le diffractogramme est un ensemble caractéristique de pics de diffraction qui correspondent à chaque phase cristalline de la matière analysée. Lorsque le faisceau de rayons X est diffracté, sa représentation, x, y où $x : \theta$ et $y : \text{Intensité}$, apparaît sous forme d'un pic. Un balayage en θ produit un diagramme de diffraction X ou un diffractogramme (**Figure 55**). Dans ce dernier, la position des raies dépend des dimensions de la maille élémentaire alors que l'intensité dépend de l'arrangement des atomes.

Pour l'analyse d'un échantillon inconnu il suffit de mesurer son diffractogramme, puis de le comparer au catalogue de fiches disponibles dans les laboratoires d'analyse. Le plus grand catalogue dispose de plus de 350 000 fiches, il faut donc des algorithmes informatiques puissants pour sélectionner les fiches les plus proches du diffractogramme.

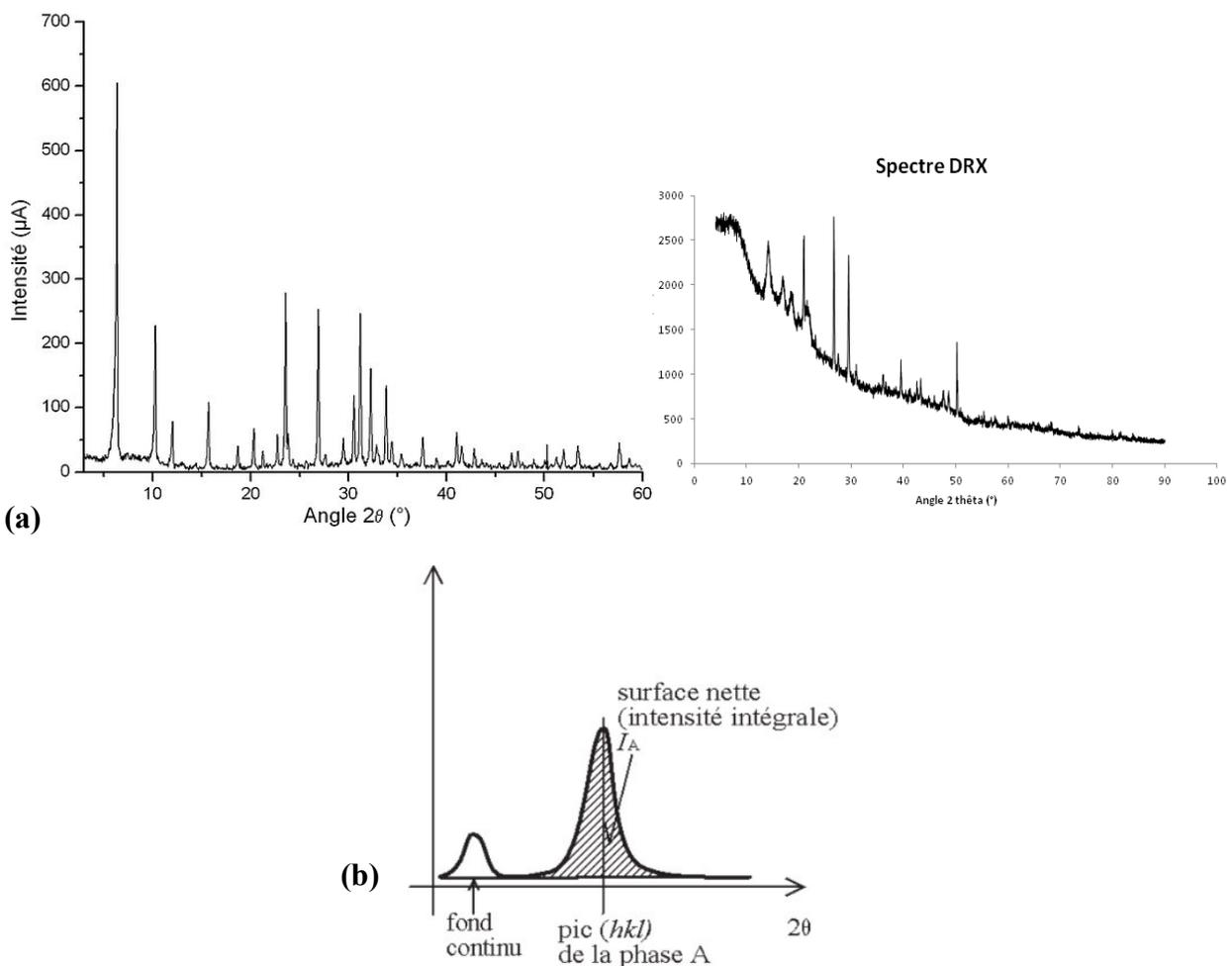


Figure 55 : Spectre de diffraction ou diffractogramme (a) ; Intensité intégrale d'un pic (Surface nette) pour analyse quantitative

Chaque tache sur le cliché à ces coordonnées (h,k,l). L'application d'une transformation mathématique : la transformée de Fourier détermine la carte de densité électronique ; cette dernière est le résultat du calcul de la densité sur une grille de points puis les points sont reliés entre eux par une ligne continue (**Figure 56, 57**).

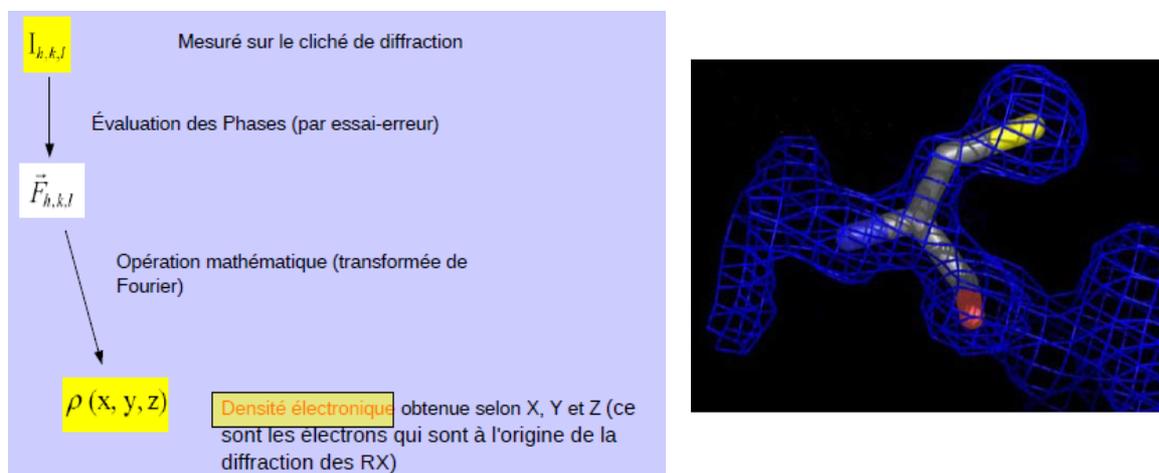
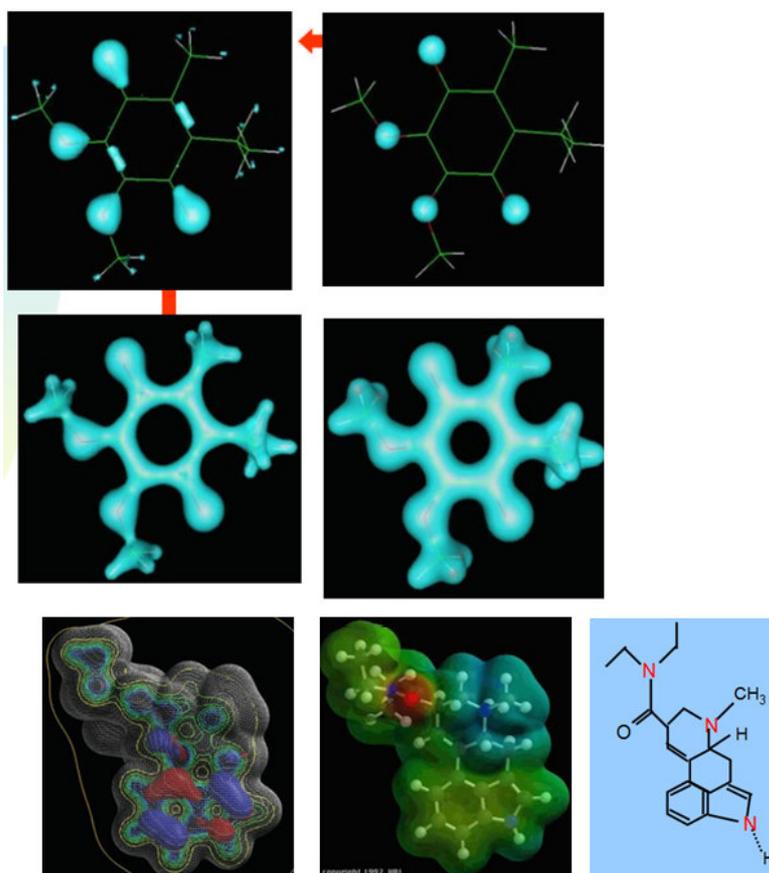


Figure 56 : étapes des calculs pour obtentions de la carte de densité électronique



<https://slideplayer.fr/slide/1156407/>

Figure 57 : Densité électronique de l'ubiquine $C_{11}H_{14}O_4$

6-6 Applications de la technique de diffraction des rayons X

La cristallographie par diffraction des rayons X est largement utilisée pour la caractérisation de matières cristallines dans divers domaines ;

- En géologie et géochimie pour identifier les composants d'une roche,
- En chimie pour la détermination de la taille des cristallites pour les matériaux polycristallins
- En biologie pour étudier la structure des protéines et des macromolécules
- Dans l'industrie pharmaceutique pour contrôler la qualité des produits pharmaceutiques
- Dans l'industrie nucléaire, elle sert à la détection de l'uranium, que ce soit pour l'extraction ou pour rechercher des impuretés dans le combustible.
- Dans le traitement des eaux usées pour identifier les matières à traiter.
- Dans l'industrie de cimenterie et la production des céramiques

Références bibliographiques

- 1) Biémont, E. (2008). *Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale*. De Boeck Supérieur.
- 2) Franca, A. S., & Nollet, L. M. (Eds.). (2017). *Spectroscopic methods in food analysis*. CRC press.
- 3) Gravereau, P. (2011). *Introduction à la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres* (Doctoral dissertation, Sciences Chimiques).
- 4) Grosu, I., Darabantu, M., & Mager, S. (1999). *Résonance magnétique nucléaire appliquée à l'analyse structurale de composés organiques*. Presses universitaires de Rouen et du Havre.
- 5) Hamon, M., Pellerin, F., & Guernet, M. (1980). *Abrégé de chimie analytique : Méthodes spectrales et analyse organique*. Masson.
- 6) Hollas, J. M. (1998). *Spectroscopie*. Dunod, Masson Editeur.
- 7) KAMOUN, P. (1991). *Appareils et méthodes en biochimie*. 3^{ème} éd. Paris : Flammarion.
- 8) Kamoun, Pierre, and Kamoun Pierre. (1997). *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion médecine-sciences.
- 9) Keeler, J. (2010). *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- 10) Kiemle, D. J., Silverstein, R. M., & Webster, F. X. (2016). *Identification spectrométrique de composés organiques-3ème édition*. De Boeck Supérieur.
- 11) Marion, D. (2013). An introduction to biological NMR spectroscopy. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(11), 3006-3025.
- 12) Péré, J. P. (1999). *Techniques spectroscopiques en biochimie analytique*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
- 13) Pomeranz, Y. (Ed.). (2013). *Food analysis: theory and practice*. Springer Science & Business Media.
- 14) Rabasso, N. (2020). *Chimie organique: Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques*. De Boeck Supérieur.
- 15) Rouessac, F., Rouessac, A., & Daniel Cruch. (2004). *Analyse chimique*. Dunod.
- 16) Serna, F., Lagneau, J., & Carpentier, J. M. (2014). *La diffraction des rayons X : une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques*. *Chim. Nouv*, 1-12.
- 17) Sharma, R. K. (2017). *Various spectroscopic techniques*. *Environmental Pollution: Monitoring Modelling and Control*; Studium Press, LLC: Houston, TX, USA, 181-206.
- 18) Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2003). *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck Supérieur.

- 19) Worsfold, P. J. (1993). UV-visible Spectroscopy and its Applications: Springer, Berlin, 1992 (ISBN 3-540-55421-1). ix+ 244 pp. Price DM 168.00.
- 20) Yano, J., & Yachandra, V. K. (2009). X-ray absorption spectroscopy. *Photosynthesis research*, 102, 241-254.
- 21) Bassez, M. Spectroscopie Ultraviolet-Visible.
- 22) http://acces.ens-lyon.fr/vie/2010Formavie/20100317_lyndon_emsley.pdf
- 23) <http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/Diffraction-rayons-X-techniques-determination-structure.xml>
- 24) <http://e-learning.univ-tebessa.dz/moodle/mod/resource/view.php?id=5351>
- 25) <http://thesis.univ-biskra.dz/2403/3/Chapitre-I-.pdf>
- 26) <http://www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie/benchidmi/RMN%20Master%202018-2019.pdf>
- 27) <http://www.mapageweb.umontreal.ca/winnikf/spectroscopie/notes%20de%20cours%20007/cours%20rmn%20um%2007%20noir%20blanc%20%233.pdf>
- 28) <http://www.pcet.master.univ-paris-diderot.fr/files/cours/Chapitre3%20-%20RMN%202D.pdf>
- 29) <http://www.univ-bejaia.dz/xmlui/bitstream/handle/123456789/14391/Etude%20de%20quelques%20cristaux%20par%20DRX.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 30) <https://chimieanalytique.com/spectrometrie-masse/>
- 31) <https://cours.espci.fr/site.php?id=41&fileid=1510>
- 32) <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-uv-visible>
- 33) <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/quest-ce-que-la-spectrometrie-de-masse>
- 34) <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-infrarouge-ir>
- 35) <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-resonance-magnetique-nucleaire-rmn>
- 36) https://decliksciences.be/analyses-instrumentales_spectrometrie/
- 37) <https://docplayer.fr/9115460-Diffraction-des-rayons-x.html>
- 38) <https://elearning.univ-bejaia.dz/mod/resource/view.php?id=123812>
- 39) <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/bapp/2019/CRISTALLOGRAPHIE%20ET%20DIFFRACTION%20DES%20RAYONS%20X-converti.pdf>

-
- 40) <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/bapp/2019/M%C3%A9thodes%20d'analyses%20spectroscopiques.pdf>
 - 41) https://fsciences.univ-setif.dz/uploads/production_pedagogique/attachment/1528/Techniques_D_analyse_Physico-chimiques_2.pdf
 - 42) <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/la-diffraction-des-rayons-x-principes-et-applications-dune-methode-de-caracterisation-des-arrangements-atomiques-dans-les-solides-cristallises-p24-n346/>
 - 43) <https://phychim.ac-versailles.fr/IMG/pdf/Documents-formation-spectroscopies.pdf>
 - 44) <https://slideplayer.fr/slide/1156407/>
 - 45) <https://slideplayer.fr/slide/1156657/>
 - 46) <https://talib24.com/wp-content/uploads/2019/07/Cours-de-Spectroscopie-moleculaire.pdf>
 - 47) <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:VQBNc2mvgO4J:https://spcl.acontpellier.fr/moodle/mod/resource/view.php%3Fid%3D5519&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=dz>
 - 48) https://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF_FR/FT-Spectrometrie_de_masse.pdf
 - 49) <https://www.electronique-mixte.fr/wp-content/uploads/2018/07/Formation-Traitement-du-signal-cours-1.pdf>
 - 50) <https://www.lcmcp.cnrs.fr/sites/thierry-azais/wp-content/uploads/2020/06/3-UV-visible-2019.pdf>
 - 51) <https://www.sigmaaldrich.com/DZ/fr/applications/analytical-chemistry/mass-spectrometry>
 - 52) https://www.sulm.ch/pipette_magazin/files/pipette/2015-03/pipette_3_2015-006_PABinz_Applications-et-futur-de-la-spectrometrie-de-masse.pdf