

Introduction à la spectroscopie

1. Introduction

La spectroscopie est une technique d'analyse qu'il possède : la lumière- la matière.

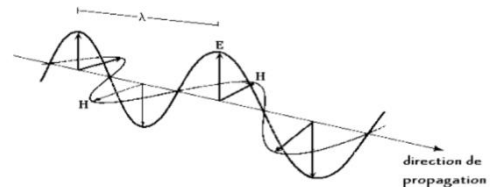
L'interaction de la lumière et la matière nous donne trois cas:

- Adsorption.
- Emission.
- Diffusion.

La matière : est un ensemble des molécules.

La lumière : est une dualité onde-corpuscule.

Le rayonnement: Un rayonnement électromagnétique (ou radiation électromagnétique) est une onde constituée par deux champs oscillants: un champ électrique E et un champ magnétique H à la fois perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation.

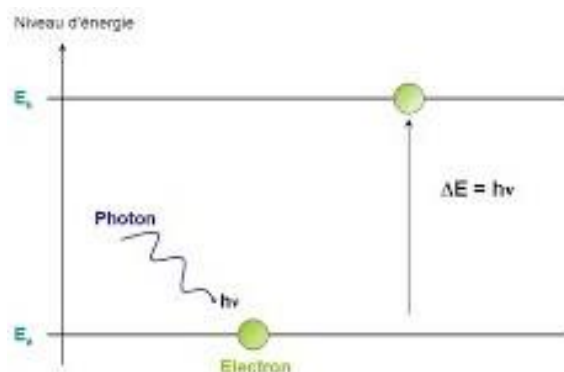


On caractérise un rayonnement électromagnétique par sa fréquence, sa longueur d'onde ou son nombre d'onde.

Onde : $v = c/\lambda$ d'où (c: vitesse de la lumière= 3.10^8 m/s).

Corpuscule (le photon) : $E = h.v = h.c/\lambda$ d'où (h: constante de planck= $6,63.10^{-34}$ J/s).

Adsorption : Gain d'énergie de quanta.



Le spectre vient de l'absorption de la lumière par la matière.

2. Les mouvements possibles d'une molécule

Translation : énergie de translation continue, elle nous donne un spectre continu, qu'il ne

donne aucune information.

Rotation : énergie de rotation.

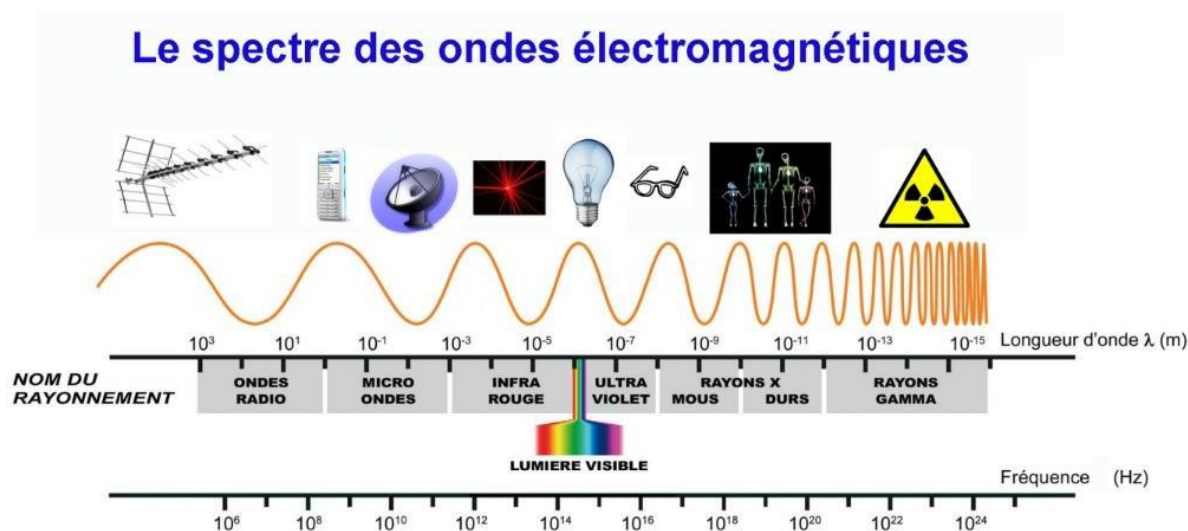
Vibration : énergie de vibration.

Electronique (réarrangement des électrons) : énergie électronique.

Energies quantifiées nous donne un spectre discontinue donc les informations sont données.

Ces trois cas de l'énergie change lorsque les molécules absorbent la lumière (champ électromagnétique).

3. Les domaines de la lumière électromagnétique



Selon la technique de spectroscopie, on pourra déduire des spectres obtenus des informations à caractère structural.

Quelques exemples de techniques spectroscopiques

- Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-visible) ;
- Spectrophotométrie d'émission et d'absorption ;
- Spectroscopie infra-rouge (IR) ;
- Spectroscopie Raman ;
- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ;
- Spectroscopie de résonance magnétique paraélectronique (RPE) ;
- Spectrométrie de masse (SM) ;
- Spectroscopie photo-électronique.

Spectrophotométrie UV-Visible

1. Introduction

La spectrophotométrie UV-Visible englobe les radiations visibles pour l'œil humain et apporte peu d'informations structurales. En revanche beaucoup d'applications en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert.

La spectrophotométrie est fondée sur l'étude de changement d'adsorption de la lumière par un milieu en fonction de la concentration.

Chaque transition électronique est accompagnée de changement de l'énergie de vibration.

2. Domaine énergétique

Le domaine du spectre ultraviolet utilisable en analyse s'étend environ de 190 à 400 nm.

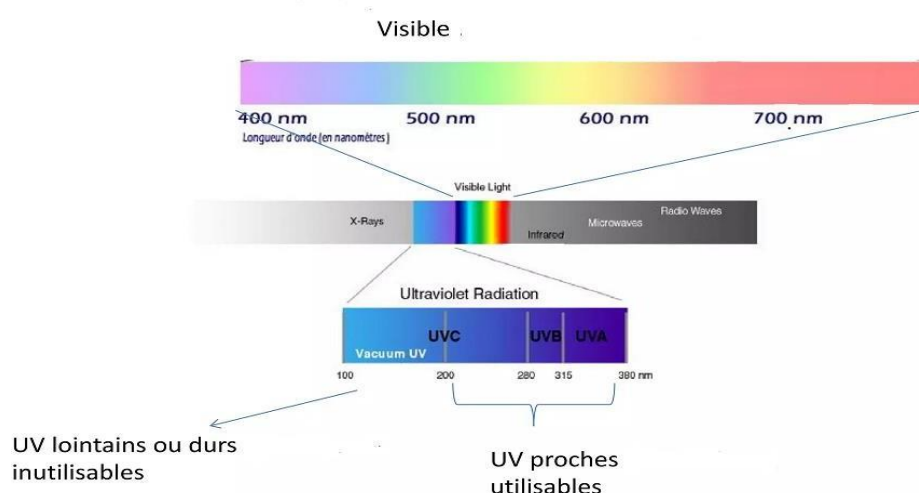


Figure 1: Domaine spectrale UV-Vis (100-800 nm)

UV-Visible: 800-100 nm (Figure 1).

Visible: 400-800 nm.

UV proche: 200-400 nm.

UV lointain: 100-200 nm.

Les appareils courants fonctionnent à partir de 200 nm. Donc l'UV lointain n'est pas accessible aux mesures dans ces conditions.

Le spectre de la lumière UV se divise en trois parties qui induisent des effets différents :

200-280 nm: Destruction des bactéries (désinfection).

280-315 nm: Favorise la formation de la vitamine D anti-rachitique.

315-400nm: Favorise la pigmentation de la peau.

3. Transition électroniques en UV-Visible

Diagramme simplifié d'une molécule:

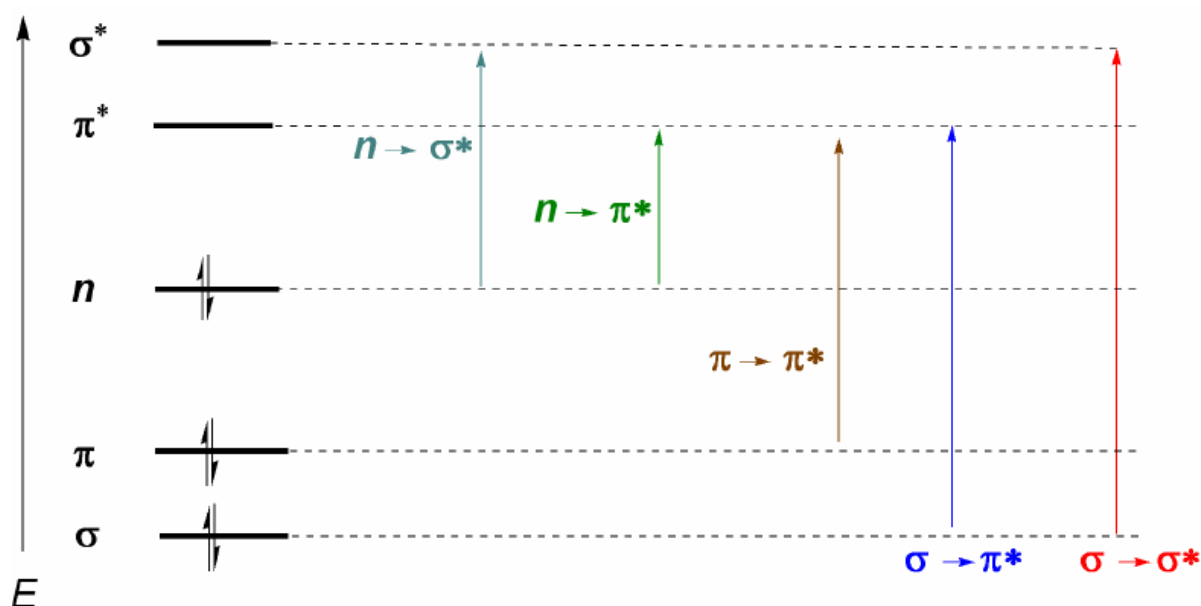


Figure 2: Diagramme énergétique d'une molécule (Représentation schématique des transitions électroniques)

4. Type d'électrons rencontrés

Les caractéristiques de ces électrons :

Electrons (σ): caractérisent les liaisons saturées (fortement liées).

Electrons (π): caractérisent les liaisons insaturées (faiblement liées).

Electrons (n): les doublets non liants.

4.1. Les différents types de transitions:

Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$: elle apparait dans l'UV lointain, car la saut d'un électron d'une orbitale moléculaire OM liante (σ) dans une OM anti-liante (σ^*) demande beaucoup d'énergie. C'est le cas des hydrocarbures saturés (ex : hexane C_6H_6 ...) qui ne présentent que des liaisons de ce type; (transparents dans le proche UV).

(Cette transition est non exploitable par les appareils usuels car $\lambda < 200$ nm).

Transition $n \rightarrow \sigma^*$: le saut d'un électron d'un doublet n des atomes O, Cl, N, S....dans une orbitale OM^* (σ^*) conduit à une transition d'intensité moyenne. (ex : Alcools, éthers, amines...).

(Cette transition est exploitable par les appareils usuels si $\lambda \geq 200$ nm).

Transition $n \rightarrow \pi^*$: Cette transition peu intense résulte d'un passage d'un électron d'un doublet à une orbitale anti-liante (π^*). On l'a rencontré pour les molécules comportant un hétéro atome porteur de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé. La plus

connue est celle qui correspond à la bande carbonyle (C=O) facilement observable entre (270 nm-295 nm). Ces transitions sont exploitables par les appareils courants et ont leur origine dans les groupements tel que : C=O, N=O, N=N,.....

Ces transitions présentent un faible coefficient d'absorption molaire ϵ ($\epsilon < 100$).

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'adsorption vers 170 nm, dont la position dépend de la présence de substituants hétéro atomiques. Ces transitions lorsqu'elles apparaissent dans les molécules conjuguées.

4.2. Analyse quantitative : loi de l'absorption moléculaire (Beer-Lambert)

L'UV-Visible est largement exploité en analyse quantitative. Les mesures reposent sur la loi de Beer-Lambert qui relie dans certaines conditions l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution (Figure 3):

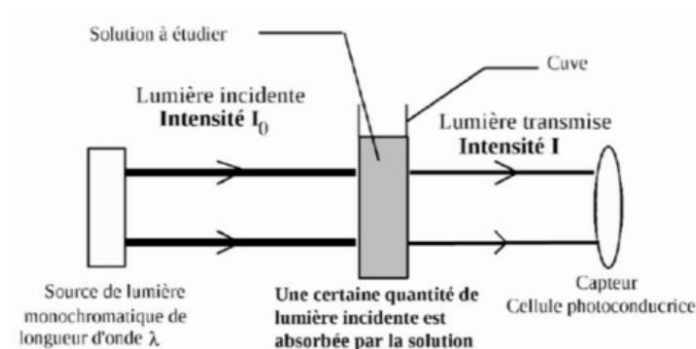


Figure 3: Principe de spectroscopie

On a $\log I_0/I_t = \epsilon.C.l$

ϵ : Coefficient d'absorption molaire ($l.mol^{-1}.cm^{-1}$); C: concentration du composé ($mol.l^{-1}$); l: largeur de la cellule d'analyse. Le terme $\log I_0/I_t = A$ = densité optique (DO).

4.2.1. Conditions d'utilisation de la loi de Beer-Lambert:

- La lumière doit être monochromatique.
- Les solutions utilisées ne doivent pas être colloïdales, ce qui éviterait les pertes des rayonnements par réflexion ou diffusion.
- Les solutions doivent être diluées ($10^{-2} mol.l^{-1}$).

- La nature de la substance à analyser ne doit pas varier avec la concentration (dissolution, polymérisation,...).

4.2.2. Additivité de la loi de Beer-Lambert:

Si l'on a un mélange de substances C_1, C_2, \dots, C_n et que celui est traversé par un rayonnement monochromatique, alors la densité optique totale de ce mélange est égale à la somme des densités optiques (ou absorbance) partielles dues à chaque substance.

$$DO_T = DO_1 + DO_2 + DO_3 + \dots + DO_n$$

5. Techniques d'utilisation

5.1. Spectre :

En UV-Visible, on peut représenter $I/I_0 = f(\lambda)$ ou $\epsilon = f(\lambda)$. On obtient un spectre de bande (propre aux molécules). Pour un atome (on parle de spectre de raies).

Ce spectre (Figure 4) contient une bande caractérisé par (λ_{max}).

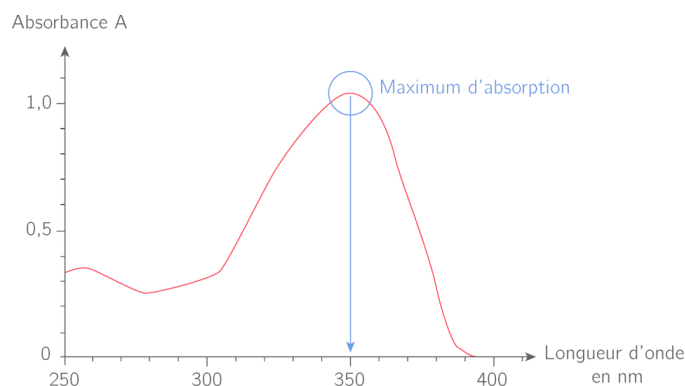


Figure 4: Absorbance maximale à une longueur d'onde λ_{max}

λ_{max} : La longueur d'onde ou le composé absorbe fortement.

5.2. Solvant:

Le choix du solvant est important dans cette technique, il doit être :

- Inerte vis-à-vis du soluté (composé à analyser) ;
- Transparent à la longueur d'onde utilisée ;
- Il doit être débarrassé de toutes ses impuretés avant d'être utilisé.

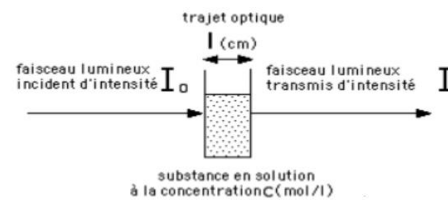
Exemple : l'eau distillée transparente au-delà de 200 nm.

5.3.Dosage:

Dans tous ces cas, la loi utilisée est celle de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot C \cdot l$. Le dosage se fait par:

Dosage direct:

La solution doit absorber l'UV ou le visible, en mesure l'absorbance à λ_{max} et on obtient la concentration on utilisant la loi de Beer-Lambert.



Comparaison à un étalon:

Un étalon (est une substance dont la concentration est connue).

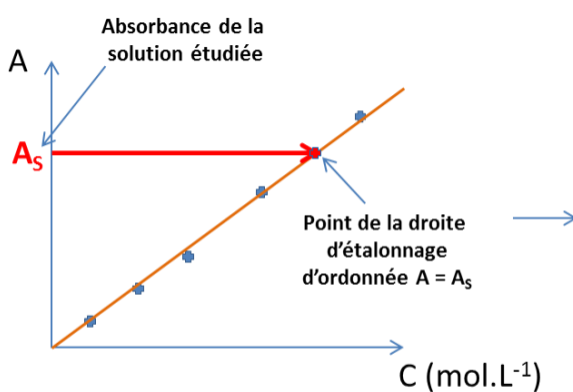
X (est un étalon avec une concentration inconnue).

$$\frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{(\epsilon \cdot C \cdot l)_X}{(\epsilon \cdot C \cdot l)_{\text{étal}}} \Rightarrow \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{C_X}{C_{\text{étal}}} \Rightarrow C_X = \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} \times C_{\text{étal}}$$

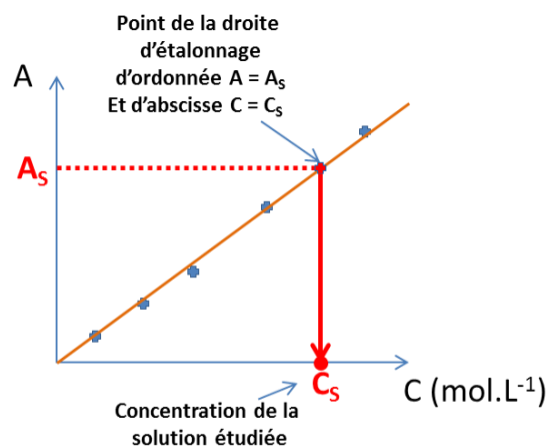
Par comparaison à plusieurs étalons:

Il suffit de mesurer l'absorbance A de plusieurs étalons et tracer la courbe : $A = DO = f(C)$

Dans ce travail, on doit choisir (λ_{max}) qui correspond à la plus forte absorption.



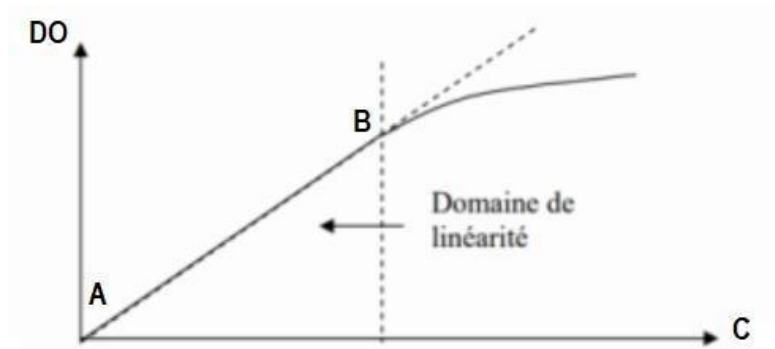
Étape 1



Étape 2

Remarque :

Si l'allure du graphe $A = DO = f(C)$ est de la forme suivante :



Ne prendre que la partie linéaire A-B, car $A = f(C)$ est toujours linéaire.

6. Appareillages:

On distingue le mono faisceau et le double faisceau.

6.1. Mono faisceau:

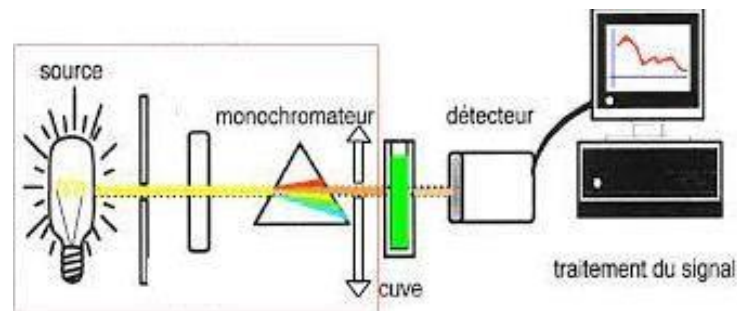


Figure 5: Les composants d'un spectrophotomètre

Un spectrophotomètre comprend les parties essentielles suivantes (Figure 5):

a- Source lumineuse: Elle est constituée par :

Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine UV de 190 à 400 nm.

Une lampe à filament de tungstène pour la région allant de 350 à 800 nm.

Une lampe à décharge au xénon (utilisée dans le domaine UV et visible) (Figure 6).



Figure 6: Lampe à arc au deutérium –a-, et à filament de tungstène –b- et lampe à décharge au xénon –c-

b- Monochromateur:

L'élément de base est un prisme, un réseau ou un filtre coloré. Le rôle du monochromateur est d'isoler le rayonnement sur lequel on fait la mesure. Il est composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie.

c- Cellule d'analyse:

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La longueur de la cuve est définie (1, 2, 4 ou 5 cm de trajet optique). Elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV, les cuves sont en quartz, elles ne peuvent être ni en verre ni en plastique. Dans le domaine du visible, les cellules peuvent être en quartz ou en verre (Figure 7).

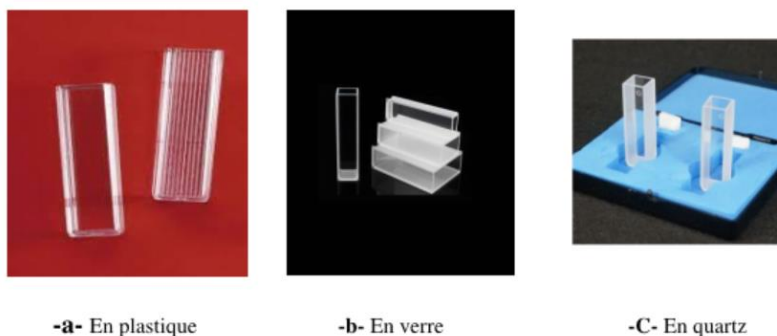


Figure 7: Modèles des cuves utilisées en spectrophotomètre

d- Détecteur:

Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Sa sensibilité dépend de la longueur d'onde. On utilise soit un photomultiplicateur soit un semi-conducteur.

e- Enregistrement des mesures.

6.2. Double faisceau:

Ces spectrophotomètres à double faisceau, l'un traverse l'échantillon et l'autre la référence. Deux miroirs tournant en forme de secteurs, permettent au détecteur de comparer exactement pour la même longueur d'onde les intensités transmises par l'une ou l'autre des deux voies.

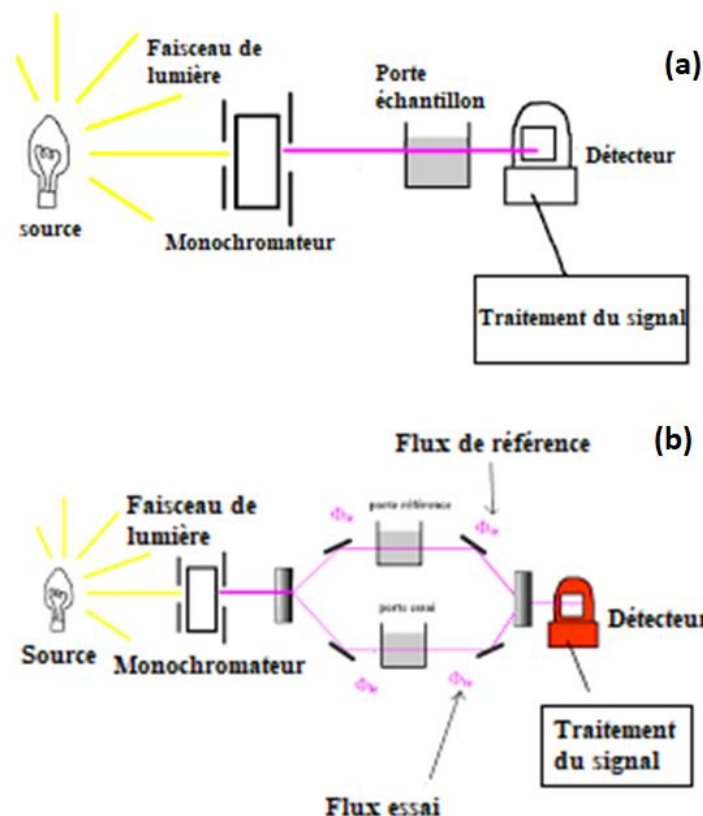


Figure 8: Spectrophotomètre (a) mono et (b) double faisceau

7. Application

Cette technique représente un vaste domaine d'application, elle concerne:

- i. Le dosage d'impuretés dont l'intensité est connu.
- ii. Le dosage d'un principe actif d'un médicament.
- iii. Des métaux de transitions par complexométrie.
- iv. Contrôle de pureté.
- v. Suivi cinétique.
- vi. Titrage.
- vii. Analyse qualitative et quantitative....

Voici quelques applications détaillées de la spectroscopie UV-Visible dans différents domaines:

En biochimie clinique:

Cette méthode permet en biochimie clinique de doser de nombreux paramètres essentiellement sérique ou plasmique (sérum ou plasma) les principaux sont le glucose, cholestérol, triglycérides, protéines (hémoglobine, albumine, ...), urée, créatinine et calcium, bilirubine conjuguée et non conjuguée,

Dans le domaine végétal:

- Dosage des polyphénols (méthode de Folin Ciocalteu).
- Dosage des flavonoïdes (méthode d' $AlCl_3$).

- Dosage des tannins (méthode de la catéchine).
- Dosage des caroténoïdes, de la vitamine C, des alcaloïdes,

En biologie moléculaire:

Il est utilisé lors de l'extraction d'ADN, pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui sont la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques.

Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

En microbiologie:

La densité d'une culture bactérienne est estimée par sa turbidimétrie mesurée par l'absorbance d'un échantillon à 600 nm.

En enzymologie:

Les activités enzymatiques:

Transaminase

(ALAT: Alanine Amino-transférase et ASAT: Aspartate Aminotransférase), amylase, phosphatase alcaline, LDH (lactate déshydrogénase) ...

