

Chapitre 5 : Spectrophotométrie

1. Définition

La spectrophotométrie est une méthode quantitative basée sur les propriétés de réflexion ou de transmission d'une substance. Elle est utilisée pour mesurer la quantité de lumière absorbée par une substance chimique en mesurant l'intensité de la lumière lorsqu'un faisceau lumineux traverse une solution échantillon. Elle peut également être utilisée pour déterminer la concentration d'un soluté connu.

2. Spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique est composé d'un continuum d'ondes de propriétés différentes. La figure 1 montre plusieurs régions de ce spectre, notamment les rayons X, l'ultraviolet (UV), le visible (VIS), et l'infrarouge (IR), qui sont classées selon la fréquence et la longueur d'onde.

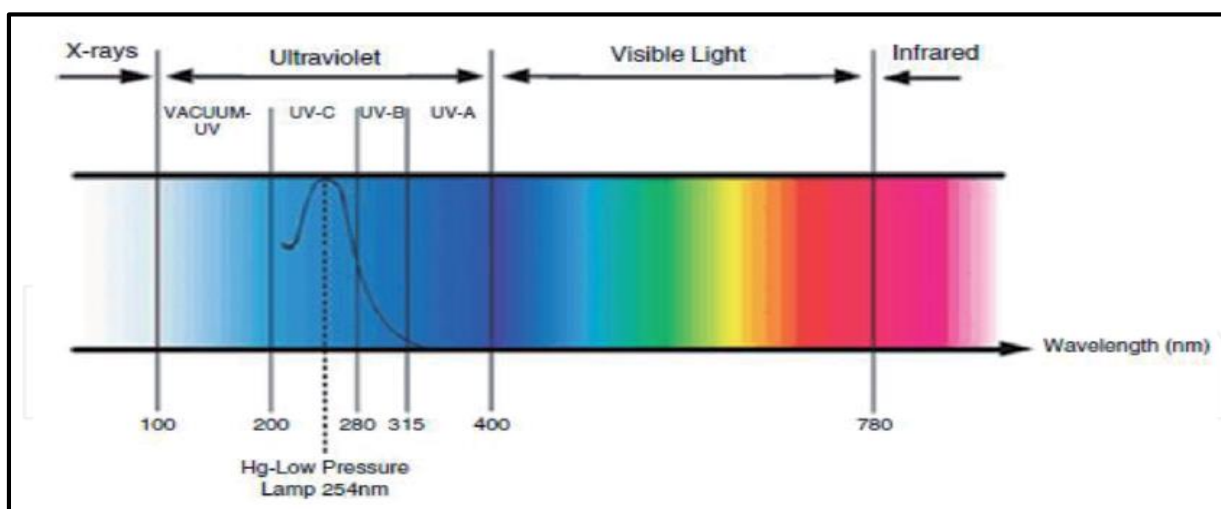


Figure 1: Spectre électromagnétique.

3. Transmission et absorbance

Un spectromètre produit une variété de longueurs d'onde, car différents composés absorbent mieux à différentes longueurs d'onde. Une fois que l'intensité de la lumière est connue après son passage dans la cuvette, elle peut être liée à la transmittance (T). La transmittance est la fraction de lumière qui traverse l'échantillon. Elle peut être calculée à l'aide de l'équation suivant :

$$\text{Transmittance, } T = I_t/I_0$$

I_t est l'intensité lumineuse après que le faisceau lumineux a traversé la cuvette et I_0 est l'intensité lumineuse avant que le faisceau lumineux ne traverse la cuvette.

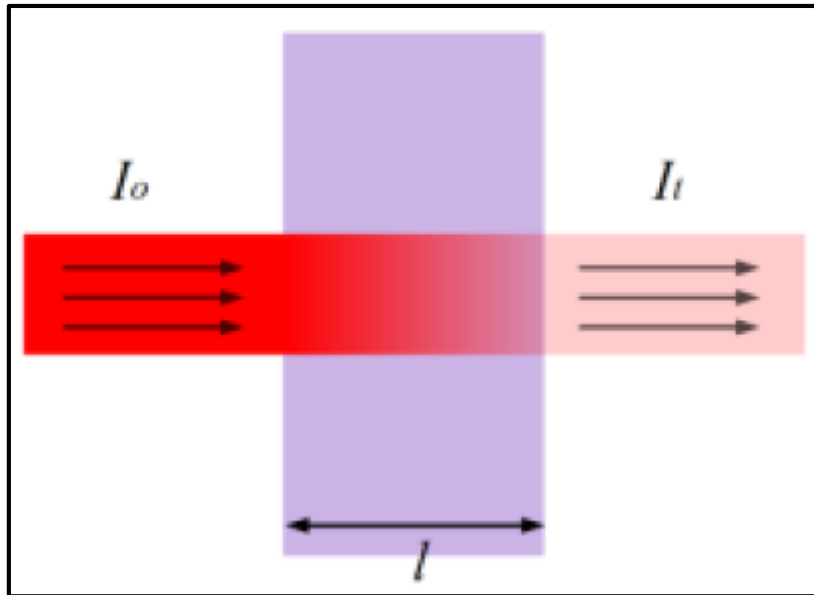


Figure 2: Transmittance.

Lorsque la lumière traverse un échantillon ou est réfléchi par celui-ci, la quantité de lumière absorbée est la différence entre le rayonnement incident (I_0) et le rayonnement transmis (I). La quantité de lumière absorbée est exprimée en absorbance (A).

Absorbance, $A = -\log(T)$

4. Loi de Beer-Lambert

Les mesures quantitatives en spectrophotométrie sont basées sur la loi de Beer-Lambert sur l'absorption de la lumière par les solutions.

À partir du degré d'absorption, la concentration du composant absorbant peut être déduite en utilisant l'équation suivante. Si l'intensité de la lumière, I_0 , diminue à I_t après avoir parcouru un trajet de longueur L dans un milieu, alors, selon la loi de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A : l'absorbance

ϵ : en ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution.

c : (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) la concentration de l'espèce absorbante.

l : (en cm) la longueur du trajet optique.

5. Présentation d'un spectrophotomètre

Un spectrophotomètre permet de réaliser des mesures des propriétés optiques spectrales de matériaux. Les éléments principaux constituant un spectrophotomètre sont :

- un générateur de faisceaux de lumière monochromatique comprenant une ou deux sources de rayonnement couplées à un monochromateur à réseau simple ou double ;

- un système optique mettant en forme le faisceau et permettant le fonctionnement en mode « simple faisceau » ou « double faisceau » ;
- un dispositif de positionnement de l'objet à mesurer ;
- un système de détection constitué de un ou plusieurs détecteurs.

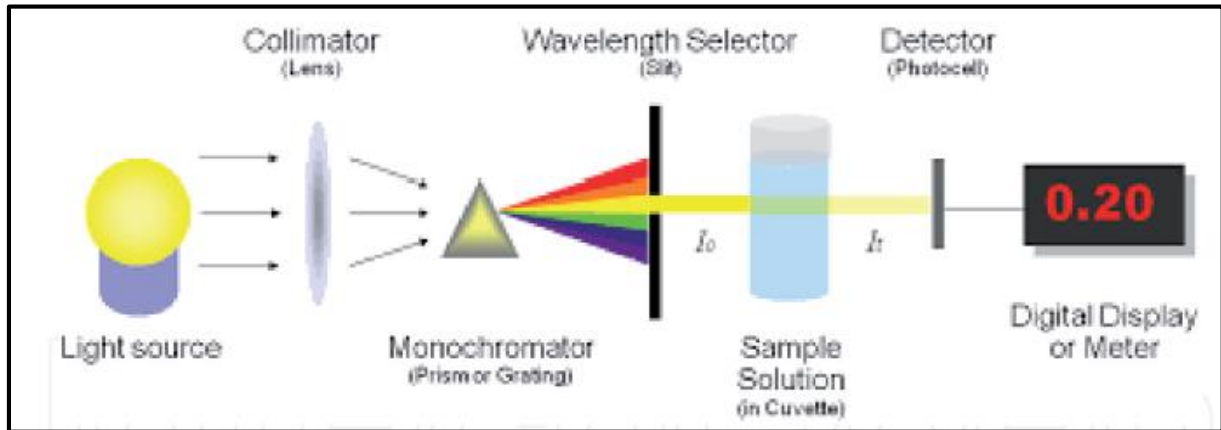


Figure 3 : Instrumentation de base du spectrophotomètre.

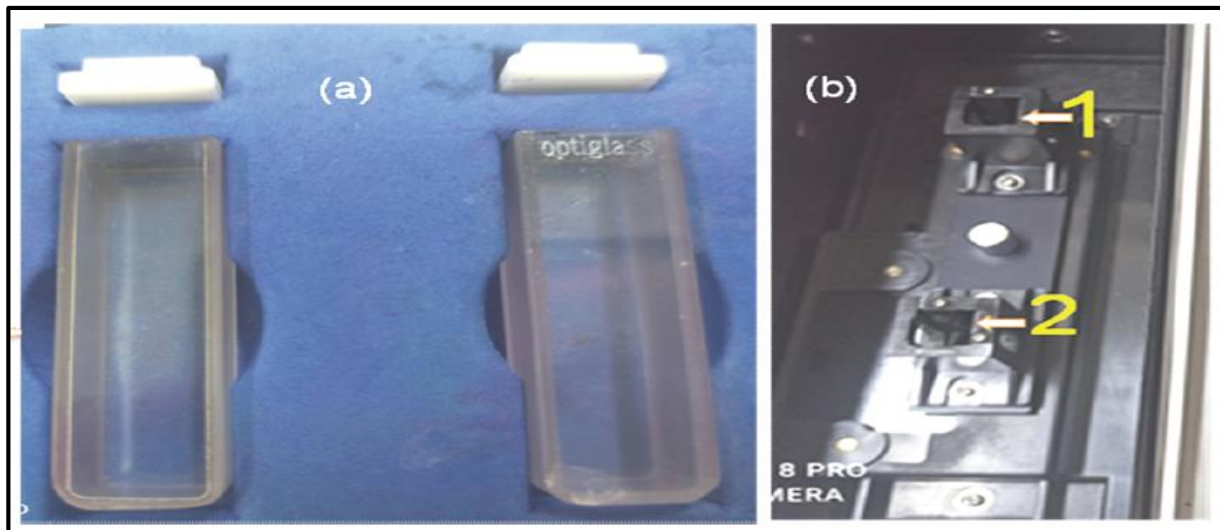


Figure 4 : (a) Cuvettes en verre (b) Support de cuvettes 1 pour la cuvette de référence et 2 pour la cuvette d'échantillon dans le spectrophotomètre.

6. Types de spectrophotométrie

6.1. Spectrophotométrie UV-visible

➤ Principe

La loi d'absorbance est le principe de base de la spectrophotométrie UV-visible. Cette loi traite de la relation entre l'épaisseur du matériau absorbant et la concentration de l'échantillon, (loi de Beer-Lambert).

➤ Instrumentation

Le spectrophotomètre UV-visible se compose d'une source lumineuse, de porte-échantillons, d'un monochromateur et d'un détecteur.

Source lumineuse : Les lampes à hydrogène et les lampes au deutérium sont utilisées comme source de lumière UV, tandis que pour la source visible, la lampe à filament de tungstène est la plus utilisée.

Porte-échantillons : Dans les gammes UV et visible, des cuvettes sont utilisées comme porte-échantillons, qui sont en quartz ou en verre ordinaire. Généralement, dans la région UV, des cellules en quartz ou en silice sont utilisées, tandis que dans la région visible, des cellules en verre sont utilisées et ces cuvettes ont une longueur de trajet standard de 1 cm.

Monochromateurs : Un monochromateur convertit le rayonnement polychromatique en rayonnements monochromatiques par lesquels les longueurs d'onde de ces rayonnements se traduisent en bandes très étroites.

Détecteurs : Les cellules photovoltaïques, les phototubes et les photomultiplicateurs sont des détecteurs couramment utilisés dans la gamme UV et visible. Le schéma fonctionnel suivant montre les principales parties du spectrophotomètre UV-visible.

➤ **Applications**

- Analyse pharmaceutique : La spectrophotométrie UV-visible est une technique largement utilisée dans la détermination de la concentration de médicaments dans l'analyse pharmaceutique.

- Études de vaporisation de composés peu volatils : Le spectrophotomètre UV-visible est impliqué dans la détermination de la vaporisation de composés peu volatils dans la phase vapeur située au-dessus de l'échantillon à l'état condensé.

- La spectroscopie UV-visible est également utilisée pour l'identification d'analytes purs qui ne sont pas soumis à la décomposition, notamment pour l'identification des acides nucléiques. Cette étude présente l'avantage d'identifier les nouveaux matériels génétiques découverts dans divers microbes et autres espèces.

- La spectrophotométrie UV-visible est une technique largement utilisée en biochimie pour la détermination des concentrations micromolaires de substances dans le sang, l'urine et d'autres liquides corporels. Elle est également utilisée à la fois pour la détermination des espèces et pour l'étude des processus biochimiques.

-La quantification et l'identification des composés organiques ont été réalisées grâce à la technique de spectroscopie UV-visible. Cette technique est très utile pour l'analyse des nouveaux médicaments développés dans l'industrie pharmaceutique.

6.2. Spectrophotométrie infrarouge

➤ Principe

Lorsqu'une molécule absorbe la lumière d'une longueur d'onde supérieure à celle des UV et du visible, il existe alors une possibilité de transitions vibrationnelles dans les molécules. Ces transitions vibrationnelles des molécules conduisent à la formation d'un spectre IR. Ces transitions vibrationnelles sont dues à l'apparition de transitions électroniques lorsqu'une substance donnée absorbe de l'énergie lumineuse.

➤ Instrumentation

Comme le spectrophotomètre UV-visible, le spectromètre IR se compose également d'une source lumineuse, d'un porte-échantillon, d'un monochromateur et d'un détecteur.

Source lumineuse : les lampes au xénon et au tungstène sont généralement utilisées comme sources lumineuses dans la région proche de l'infrarouge.

Porte-échantillons : dans la région infrarouge, des cuvettes en quartz sont généralement utilisées comme porte-échantillons.

Monochromateur : les réseaux sont utilisés comme monochromateurs dans la région infrarouge.

Détecteurs : les détecteurs couramment utilisés dans la spectrophotométrie IR sont des matériaux semi-conducteurs à base d'arséniure d'indium et de gallium (InGaAs).

➤ Applications

-Identification des composés : la spectroscopie IR permet de découvrir divers composés chimiques et groupes fonctionnels dans les molécules organiques, tels que les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques, saturés et insaturés, les acides aminés, les groupes éther et hydroxyle, les halogènes, l'azote, le phosphore, le silicium, les composés oxysulfurés, etc.

- La spectroscopie IR est impliquée avec succès dans la caractérisation des nanoparticules, en particulier dans l'étude des caractéristiques physico-chimiques des nanotransporteurs de médicaments et dans l'identification de groupes fonctionnels à la surface des nanoparticules développées qui sont impliquées dans le système de ciblage des médicaments.

-La spectroscopie IR joue un rôle important dans la recherche en biologie de surface pour étudier l'interaction de surface des médicaments, des anticorps avec les protéines de surface cellulaire et d'autres molécules biologiques, ce qui aide à comprendre comment optimiser la sensibilité entre les molécules en interaction.

-Vitesse des réactions : les spectres infrarouges donnent une excellente indication pour de nombreux groupes fonctionnels. Ainsi, les réactions enzymatiques impliquant ces groupes fonctionnels - soit ces groupes sont consommés, soit générés dans la réaction enzymatique - peuvent être analysées à l'aide de la spectroscopie infrarouge. Par exemple, l'activité

enzymatique de la pyruvate kinase a été étudiée avec son substrat phosphoénolpyruvate, qui a donné un spectre caractéristique pour comprendre comment le substrat est consommé et le produit formé.

-Interaction entre molécules : les chaînes polypeptidiques forment des liaisons hydrogène interchaînes. Il en va de même pour les deux brins d'ADN. Les liaisons hydrogène ont été étudiées de manière très profitable à l'aide de la spectroscopie infrarouge.

-La spectroscopie infrarouge est un outil important dans la détermination structurale des minéraux.

6.3. Spectro-fluorométrie

➤ Principe

Le phénomène par lequel une molécule après avoir absorbé des radiations émet une radiation d'une longueur d'onde plus grande est connu sous le nom de fluorescence. Lorsqu'un composé absorbe une radiation, il passe au niveau de sortie et revient ensuite au niveau de base soit en une seule étape en émettant une radiation de la même longueur d'onde qu'il a absorbée, soit de manière progressive en émettant des quanta de radiation correspondant à chaque étape d'énergie avec une longueur d'onde plus grande. Ce phénomène conduit à la formation de spectres de fluorescence. La fluorescence est un phénomène de durée extrêmement courte (10^{-7} s ou moins) et peut donc fournir des informations sur des événements qui prennent moins de 10^{-7} s.

La fluorométrie suit également la loi de Beer-Lambert dans son principe de fonctionnement.

➤ Instrumentation

L'instrumentation d'un spectrofluoromètre diffère de celle du spectrophotomètre sur deux aspects importants en plus d'autres variations mineures.

- a. Il y a deux monochromateurs au lieu d'un comme dans un spectrophotomètre ; un monochromateur est placé avant le porte-échantillon et un après celui-ci, et
- b. Comme la fluorescence est maximale entre 25 et 30°C, le porte-échantillon est doté d'un dispositif pour maintenir la température.

➤ Applications

-Identification de la structure tridimensionnelle des protéines : les protéines sont constituées d'un groupe combiné de 20 acides aminés. Pour la découverte informatique de médicaments, il est très important de connaître la corrélation entre la structure tridimensionnelle et ses fonctions. Ces données peuvent ne pas être fournies avec succès par la cristallographie aux rayons X et la microscopie électronique. Par conséquent, pour résoudre ce problème, la spectrophotométrie

de fluorescence fournit des informations fiables sur la structure tridimensionnelle des protéines en préservant la structure native de la protéine.

- Dans les aliments : la spectroscopie de fluorescence joue un rôle important dans la détermination de nombreux composants alimentaires, adultérants, additifs et contaminants.

- Contrôle de la qualité dans la transformation des aliments : la spectroscopie de fluorescence est une méthode d'analyse rapide et sensible pour caractériser les produits alimentaires. Par exemple, récemment, certains auteurs ont étudié l'impact du traitement thermique sur la vitamine A dans un échantillon de lait en utilisant des spectres de fluorescence. Les spectres de fluorescence montrent que le traitement thermique induit une diminution de l'intensité de fluorescence à la fois à 320 et 290 nm puisque les échantillons de lait sont chauffés à 75°C pendant 10 min. Comparé à des échantillons de lait chauffés à 55°C pendant la même période.

- Les applications les plus courantes du spectrofluorimètre comprennent l'analyse qualitative, l'analyse quantitative (les applications comprennent le dosage de la riboflavine, de la thiamine, des hormones telles que le cortisol, les œstrogènes, la sérotonine et la dopamine, les pesticides organophosphorés, les carcinogènes de la fumée de tabac, les médicaments tels que l'acide lysergique et les barbituriques, les porphyrines, le cholestérol et même certains ions métalliques) ; et les études sur la structure des protéines (protéines contenant du FAD).

6.4. Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA)

➤ Principe

Lorsque les molécules de l'échantillon sont soumises à la volatilisation, les atomes produits absorbent une certaine longueur d'onde de lumière provenant d'une source qui produit un spectre atomique caractéristique de la molécule.

➤ Instrumentation pour la SAA

Les composants de base d'un spectrophotomètre d'absorption atomique sont :

a. Atomiseurs : les atomiseurs les plus utilisés en SAA sont les atomiseurs électrothermiques (ETA).

Ils sont impliqués dans la conversion des molécules de l'échantillon en un atome gazeux individuel qui peut absorber la lumière de la source.

b. Source lumineuse : généralement, une lampe à cathode creuse utilisée comme source lumineuse en SAA pour produire une certaine longueur d'onde de lumière qui est idéalement absorbée par les atomes gazeux. De nos jours, des instruments avec optique à faisceau simple et double sont disponibles.

c. L'isolement et la quantification des longueurs d'onde d'intérêt peuvent être effectués par des détecteurs et pour contrôler le fonctionnement de l'instrument et collecter et traiter les données, le système informatique aide.

➤ **Applications**

- L'AAS est une technique spectrométrique sensible et hautement sélective pour la détermination de nombreux éléments à l'état de traces et d'ultra-traces, à savoir Cd, Cr, Zn, Cu, Ag, Mn, Mg, Hg, As, Sc, etc., à l'échelle du picogramme dans le sol, les sédiments et les échantillons végétaux. Par exemple, cette technique est très utile pour les scientifiques qui travaillent à la découverte des impacts des activités minières et industrielles.

- La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) peut être utilisée pour l'estimation des métaux dans les fluides corporels comme le sérum, le sang total, en dehors de l'urine et dans les tissus pour des recherches toxicologiques dans les études cliniques.

- L'AAS s'est avérée être un très bon outil, en particulier pour la détermination de la qualité des aliments. Dans ce contexte, elle est impliquée dans la détermination des métaux alcalins et alcalino-terreux car ces éléments agissent comme un micro-composant dans les échantillons alimentaires.

- Pour vérifier la qualité de l'eau, l'AAS est l'une des techniques les plus utiles.

2.5. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

➤ **Principe**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'une des techniques les plus utiles et les plus puissantes pour déterminer la structure moléculaire. Le principe de la RMN est que lorsqu'un champ magnétique puissant et un émetteur radiofréquence sont appliqués sur des molécules d'échantillon, les noyaux atomiques de ces molécules sont excités et forment des lignes spectrales dans le spectre.

➤ **Instrumentation**

Les composants du spectromètre RMN sont :

a. Source de rayonnement : un émetteur radiofréquence (RF), qui génère le courant radiofréquence. Ce courant est délivré à la bobine émettrice qui crée un signal utilisé pour exciter les protons dans le champ magnétique.

b. Un aimant supraconducteur, qui produit un champ magnétique dans le volume central de l'aimant. Le champ magnétique produit varie de 1 à 10 T.

Les spectromètres RMN avancés sont constitués de solénoïdes supraconducteurs qui génèrent un champ magnétique supérieur à 3,5 T. L'aimant est doté d'un alésage pour maintenir la sonde

d'échantillon et d'un ensemble de bobines de calage à température ambiante (RTS) pour réduire l'inhomogénéité du champ magnétique sur le volume d'échantillon actif.

c. Un récepteur reçoit le signal absorbé sous forme numérisée généralement appelée décroissance d'induction libre (FID).

d. Un ordinateur, un amplificateur et un convertisseur analogique-numérique (ADC).

➤ Applications

- Biochimie : La RMN est une technique puissante dans la recherche métabolique. Elle est devenue une méthode de choix pour découvrir la dynamique et la compartimentation des voies et réseaux métaboliques [41]. En dehors de cela, la RMN est également utile dans l'étude d'échantillons biologiques intacts tels que le cœur, les reins et les muscles squelettiques avec l'isotope ^{31}P .

- Pharmacie : La spectroscopie RMN permet de visualiser des atomes et des molécules simples dans divers liquides ainsi qu'à l'état solide [42]. Elle est non destructive et donne une idée de la structure moléculaire qui permet l'élucidation et la quantification de la structure de diverses molécules organiques et fournit des informations sur la structure chimique et la dynamique des molécules organiques dans les systèmes biologiques. Ces études structurales fournissent des informations liées aux fonctions des molécules organiques telles que les acides aminés, les protéines, les glucides et les antibiotiques tels que la ciprofloxacine, l'azithromycine et la valinomycine.

- Chimie : La spectroscopie RMN est utilisée sans ambiguïté pour identifier de nouveaux composés et, à ce titre, elle est généralement requise par les revues scientifiques pour confirmer l'identité de nouveaux composés synthétisés.

- La RMN a été utilisée pour étudier le système de transport membranaire in vivo ou synthétique. Par exemple, elle a été utilisée pour étudier le transport des ions Na^+ dans les globules rouges humains.

- La RMN a été utilisée pour la détermination quantitative de la concentration de métabolites. L'utilisation de la RMN pour déterminer la concentration de phosphocréatine dans le muscle humain.