

III. Méthodes Spectrales.

1. Introduction :

Spectrophotométrie= spectro+photo+métrie

Spectro=rayon électromagnétique photo=lumière métrie=mesurer

Qui dit spectrophotométrie dit spectre électromagnétique. Le spectre électromagnétique est constitué d'ondes de différentes longueurs, des plus petites aux plus grandes et qui sont les rayons gamma, rayon x, ultraviolet, visible, infrarouge microonde, les ondes radio.

La lumière visible ne représente qu'une minuscule partie du spectre électromagnétisme; mais étant détectable par l'œil humain, elle fut donc un des premiers moyens de caractérisation des composés chimiques.

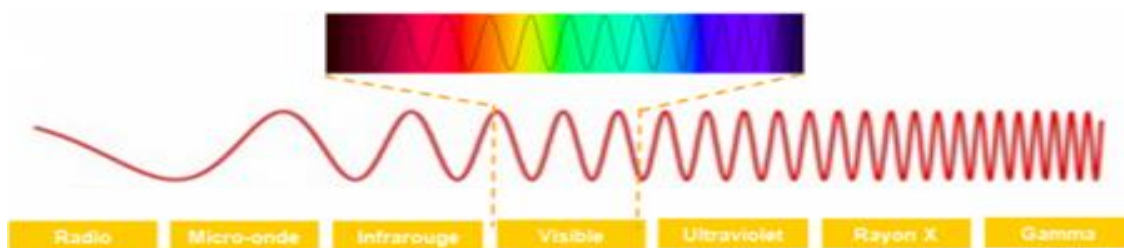


Figure1 : Le spectre électromagnétique

Historique :

C'est **Issac Newton** (1642-1726) qui a été le fondateur de la spectroscopie, il a été le premier à comprendre que l'étalement des couleurs par le prisme est lié à la nature intrinsèque de la lumière, non pas au prisme lui-même.

2. Définition de la spectrophotométrie :

La spectrophotométrie est l'étude quantitative des interactions entre la lumière et la matière. Lorsque la lumière traverse une substance, elle est en partie transmise et en partie absorbée.

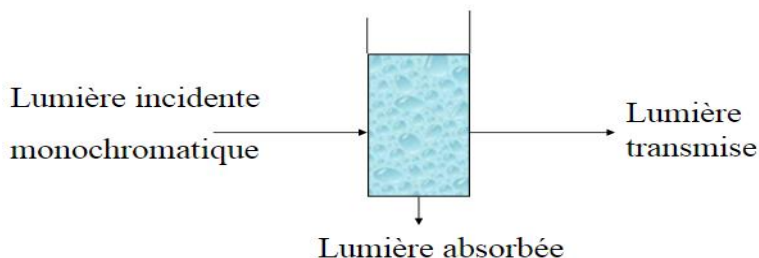


Figure 2 : interaction de la substance avec la lumière

3. Différents types de spectrométrie et leurs applications.

Il existe trois grandes familles de spectroscopie :

- a. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.
- b. Spectrophotométrie atomique qui peut être : à absorption atomique ou à émission atomique

- c. Spectrophotométrie de résonance magnétique nucléaire.

3.1. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire.

a. définition :

Technique de laboratoire permettant de doser une substance chimique en solution (hémoglobine, calcium sanguin) en faisant traverser à cette solution étudiée (provenant d'un prélèvement effectué sur un malade, par exemple) un rayon d'une lumière artificielle (rayonnement électromagnétique). On **mesure** par la suite l'intensité du rayonnement électromagnétique qu'elle **absorbe** à des longueurs d'onde différentes, allant de **l'ultraviolet** jusqu'aux **ondes radio**. Ce rayonnement qu'elle absorbe est appelé le **spectre d'absorption**.

b. Principe :

La **spectrophotométrie d'absorption** : mesure que l'**absorbance** ou la densité optique de la substance chimique (généralement en solution).

En effet, selon la **loi de Beer-Lambert**, l'intensité de la lumière transmise après passage de la solution à doser est fonction de la concentration de cette substance. Plus la concentration **C** augmente, plus la solution est sombre, plus elle absorbe la lumière et donc plus l'absorbance **A** est élevée : (**$A = kCL$**).

$C = c$ est la concentration des espèces absorbantes.

k = constante caractéristique de l'échantillon.

A = absorbance de la lumière.

L = longueur de la cuve que traverse la lumière = 1 cm

c. Le spectre d'absorption : c'est la quantité de lumière absorbée par un composé, en fonction de la longueur d'onde

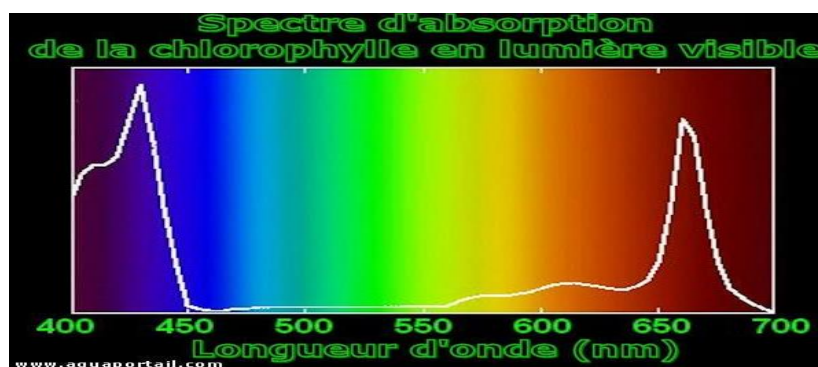


Figure 3 : le spectre d'absorption

Exemple : Le spectre d'absorption de la chlorophylle en lumière visible dispose de deux pics, un dans le bleu et un second dans le rouge le vert n'est pas absorbé, il est transmis, ce qui nous permet de le voir en vert (diapo).

d. Types d'appareillages.

C'est le **spectrophotomètre** qui mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée.

-Un **monochromateur** est un dispositif utilisé en **optique** pour sélectionner une gamme la plus étroite possible de **longueurs d'onde** à partir d'un **faisceau lumineux** de gamme de **longueurs d'onde** plus large

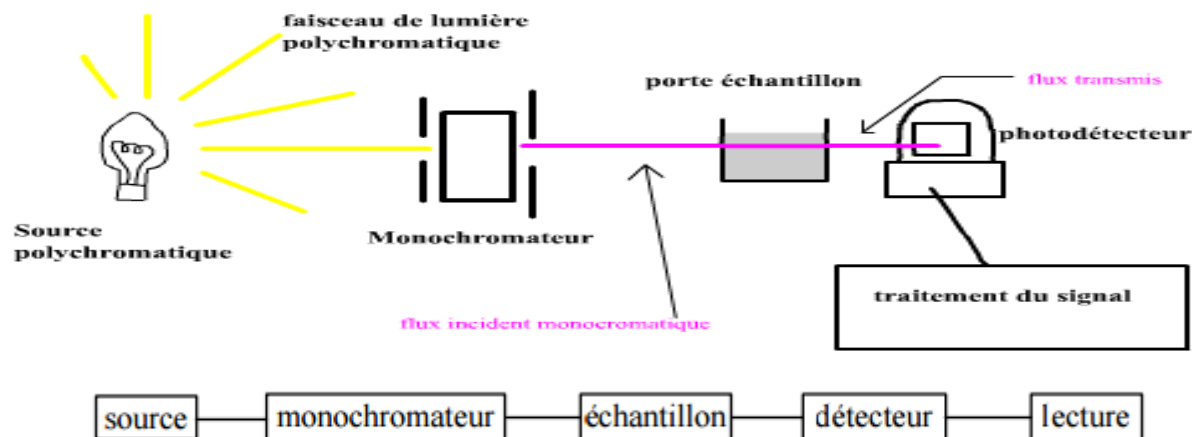


Figure 4 : Fonctionnement du spectrophotomètre

- La **lumière** monochromatique, traverse une **cuve** contenant la solution étudiée, et l'appareil **photodétecteur** mesure l'intensité de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.
- Il existe plusieurs spectromètres parmi eux, le spectromètre Raman ou infrarouge, le spectromètre micro-onde ou à hyperfréquence et enfin le plus utilisé, le spectromètre UV/Visible ; c'est une technique de spectroscopie qui met en jeu les **ondes** dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm -1 400 nm). L'échantillon sera soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde.



Figure 4 : Spectromètre UV/Visible

f. Application :

Utilisé dans les analyses **chimiques** et pour déterminer le pourcentage d'oxygénation du sang (**oxymétrie**).

3.2 Spectrophotométrie atomique

Les sources de rayonnement UV/Visible, utilisées en spectrométrie moléculaires ne conviennent pas pour la spectrométrie atomique, il a fallu mettre au point des sources spécifiques dont les plus utilisées sont **la lampe à cathode creuse et la torche plasma**.

C'est une méthode donc qui analyse **quantitativement** ou **qualitativement** environ **70** éléments à l'état de traces (métaux, métalloïdes et non-métaux).

3.2.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique(SAA).

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres de l'échantillon peuvent **absorber** les rayonnements d'une certaine **longueur d'ondes** de la **lampe à cathode creuse**.

a. Principe et appareillage.

La lumière est remplacée par une source atomique qui provient de la lampe à cathode creuse.

Le rayonnement traverse la flamme du four graphique (atomisation), le monochromateur et il est ensuite en partie absorbé par l'échantillon.

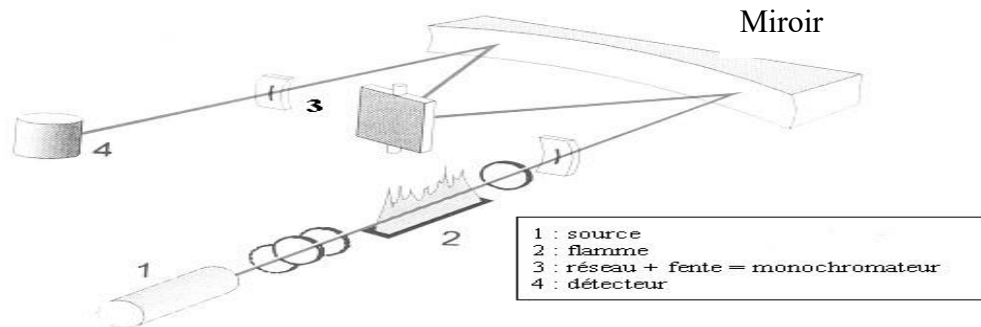


Figure 5 : Principe de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).



Figure 6 : Spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA).

b.Application :

La SAA est une méthode basée sur l'analyse des **métaux** d'échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques et atmosphériques par exemple.

3.2.2. Spectrophotométrie d'émission atomique (SEA)

La spectroscopie d'émission atomique (SEA) mesure l'**émission** optique provenant des molécules de l'échantillon, atomisées et stimulées par une flamme à haute température (source d'énergie) de torche plasma, pour déterminer sa concentration.

Les atomes ou **molécules** de l'échantillon qui sont atomisés et stimulés par la source d'énergie à haute température peuvent se désintégrer en émettant des radiations appelées **émissions atomiques** (spectroscopie d'émission atomique).

a. Principe et appareillage :

La solution est pulvérisée dans une flamme où elle est transformée en vapeurs atomiques.

On envoie sur ces vapeurs une source d'énergie à haute température caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde) produite par la source qui est généralement la torche plasma, qui va les atomiser et stimuler en émettant des radiations appelées **émissions atomiques**. La radiation est absorbée par un capteur optoélectronique (photodiode).

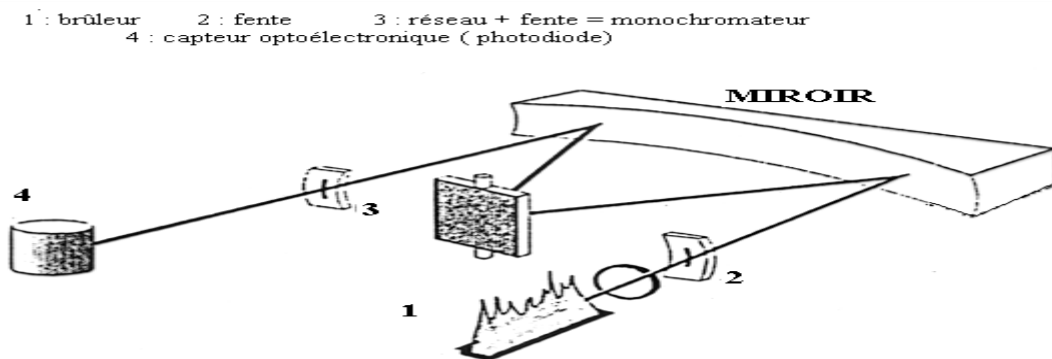


Figure 7 : Principe de la spectrophotométrie d'émission atomique (SEA).



Figure 7 : Spectromètre par torche à plasma à couplage inductif (ICP)

b. Application :

Ses usages les plus importants portent sur la détermination du **sodium**, du **potassium**, du **lithium** et du **calcium** dans les fluides et tissus biologiques.

3.3. Résonance magnétique nucléaire.

Méthode spectrométrique récente (1950-1960) dont le développement et les performances s'accroît de façon spectaculaire.

a. Définition :

Cette technique permet de connaître la structure des molécules, en mesurant l'**absorption** d'une radiation par le noyau atomique possédant un **spin** nucléaire, de la substance ou matière analysée, placés dans un champ magnétique fort, tel que le domaine des **fréquences radio** appelées **fréquences de résonances**.

b. Principe :

Le **noyau atomique** désigne la région située au centre d'un **atome** constituée de **protons** (charge positive) et de **neutrons** (charge neutre) formant ensemble les **nucléons**.

Le **spin** correspond à la masse ou à la charge du noyau.

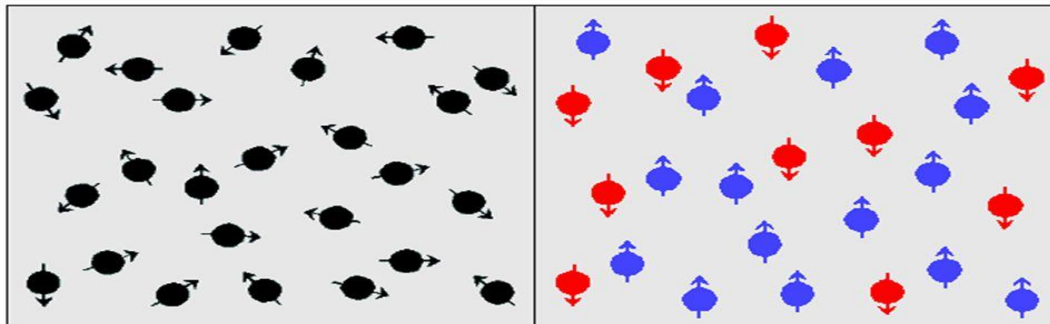
-Les noyaux peuvent être divisés en **deux catégories** : d'une part ceux qui possèdent un **spin** et d'autre part ceux qui n'en possèdent pas.

Pour les noyaux qui possèdent un spin :

-En l'absence du champ magnétique, les protons du noyau sont orientés au hasard

-Et en présence du champ magnétique, en fréquence radio, les protons qui possèdent un moment angulaire de **spin**, optent pour 2 orientations, une orientée parallèlement au sens du champ magnétique et l'autre antiparallèlement au sens du champ magnétique, le noyau est dit en **résonance**.

Principe de la RMN



À gauche, orientation des protons en l'absence de champ.
 À droite, en présence d'un champ magnétique. En bleu, les protons orientés dans le sens du champ et en rouge, les protons orientés dans le sens contraire au champ.

c.Appareillage :

L'espèce à étudier est introduite dans un tube contenant un solvant bien choisie, en faisant varier les **fréquences des ondes radio** traversant la solution, on peut enregistrer les **fréquences de résonance** de l'ensemble des protons de la molécule étudiée.

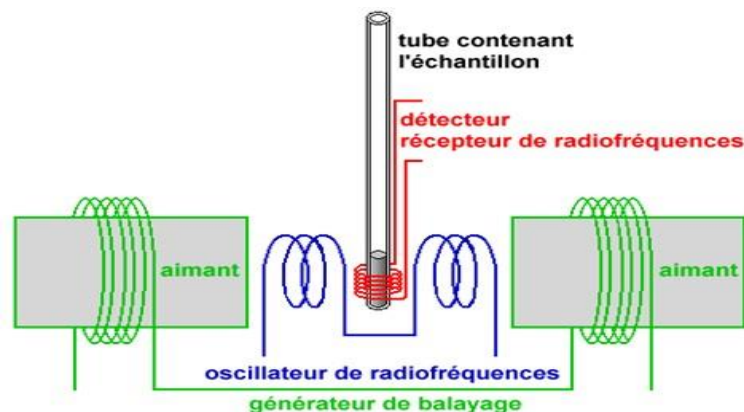


Figure 8 : Principe du fonctionnement du spectromètre à résonance magnétique nucléaire.

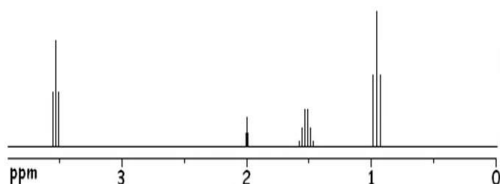


Figure 9 : fréquence de résonance.



Figure 10 : spectromètre à résonance magnétique nucléaire.

d.Application :

Dans l'industrie : recherche les défauts de fabrication.

En biologie : analyse de la structure des macromolécules (protéines, acides nucléides polysaccharides...).

En pharmaceutique : vérifie la pureté des médicaments.

En médecine : diagnostic facilité grâce à l'imagerie par RMN, appelée l'IRM, technique d'imagerie médicale permet d'obtenir des Images en 2D ou 3D de l'intérieur du corps.