

TECHNIQUES D'ANALYSE BIOLOGIQUE I

TROISIEME PARTIE

TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

1. Généralités

La spectroscopie se base sur l'interaction entre la lumière et la matière. La lumière est l'onde qui peut transporter l'énergie à distance sans que ceci ne soit accompagné d'un transfert de la matière. La lumière n'est qu'une radiation électromagnétique (REM), caractérisée par une dualité ondulatoire et quantique.

En physique classique, il existe une nette distinction entre l'onde et le corpuscule ou la particule. Le corpuscule se situe en un endroit donné de l'espace, il a une masse (**m**) et il peut se déplacer avec une vitesse (**V**) et son énergie cinétique (**Ec**) est fonction de sa masse et de sa vitesse. $E_c = \frac{1}{2} m v^2$

L'onde électromagnétique occupe une région étendue de l'espace et sa vitesse est constante (**C**= $3 \cdot 10^8$ m/s), elle se caractérise par une fréquence **v** et une longueur d'onde **λ**.

$$\lambda = C/v$$

Selon la physique classique, l'électron est une particule et la lumière est une onde électromagnétique.

La mécanique quantique fait disparaître cette distinction entre onde et particule et affirme que toute entité comme la lumière ou les électrons possède à la fois la nature ondulatoire et la nature corpusculaire, c.a.d que les deux natures coexistent, c'est la dualité onde-corpuscule.

Pour Einstein, la lumière est un courant de photons (corpuscule d'énergie) qui se déplacent à la vitesse de la lumière et son énergie est $E = h\nu$ avec **h** = constante de Planck $h = 6.63 \cdot 10^{-34}$ J.S ($4.14 \cdot 10^{-15}$ eV).

2. Caractéristiques de la radiation électromagnétique

*On se basant sur l'aspect ondulatoire, une REM est caractérisée par:

2.1. Période (T): c'est le temps entre 2 maxima ou 2 minima. Ou bien c'est le temps mis par l'onde pour effectuer une oscillation, il est exprimé en **secondes**.

2.2. Longueur d'onde (λ): c'est la distance entre deux crêtes successives. Ou bien c'est la distance parcourus par l'onde en une période. Elle est exprimée en mètre et dérivées (**m, nm**), $\lambda = C T$ soit $\lambda = C/v$ ($C = 310^8$ m/s)

2.3. Fréquence (ν): c'est le nombre de vibrations par seconde $\nu = 1/T$, l'unité de mesure est **S⁻¹** appelée Hertz (Hz).

2.4. Nombre d'ondes ($\ddot{\nu}$): c'est le nombre d'ondes par centimètre $\ddot{\nu} = 1/\lambda$, son unité de mesure est le **cm⁻¹** appelé Kayser

*On se basant sur l'aspect corpusculaire, une REM est caractérisée par:

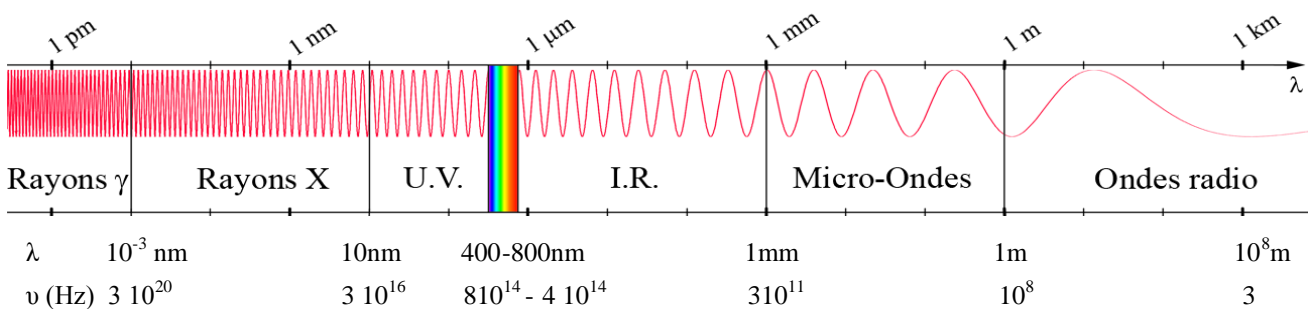
2.5. Energie du photon: $E = h\nu$, unité = eV ou J

2.6. Intensité: $I = n h \nu$ (n = nombre de photons)

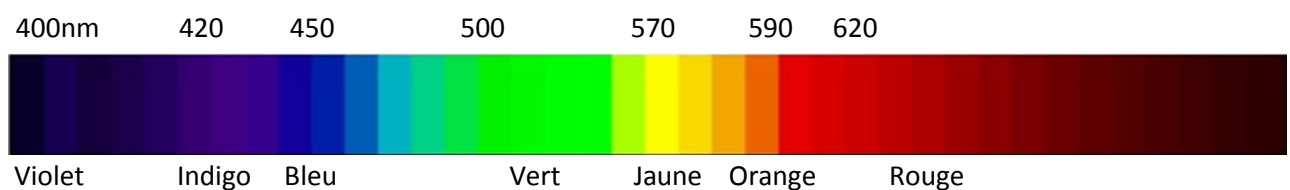
NB : Si ν augmente **E** augmente mais λ diminue et inversement.

3. Spectre électromagnétique

Les limites des différentes zones ne sont pas très précises et non soumises à une détermination expérimentale.



Domaine visible (400nm-800nm)



4. Types de spectres

Les spectres sont classés en spectres d'absorption et spectres d'émission. Chacun est divisé en spectre continu et spectre discontinu. Le discontinu peut être un spectre de raies ou de bandes. Donc on a un spectre continu et un spectre de raies et spectre de bandes dans la classe de l'absorption et la même chose de la classe d'émission.

* Spectre d'émission

Le spectre d'émission est le spectre émis par un corps (particules) quelconque, lorsqu'il est excité par un moyen quelconque. En effet, lorsqu'un corps est excité, il passe d'un état énergétique à un état plus élevé (excité) instable, il tend toujours à revenir à son état de base plus stable (désexcité). Au cours de cette transition, il libère l'énergie reçue sous forme de radiations qui constituent le spectre d'émission du corps excité (**Fig.7**).

* Spectre d'absorption

Un corps est capable d'absorber le spectre qu'il est capable d'émettre. Les radiations dont les fréquences correspondent aux transitions possibles, seront absorbées par la substance émettrice elle-même (**Fig.7**).

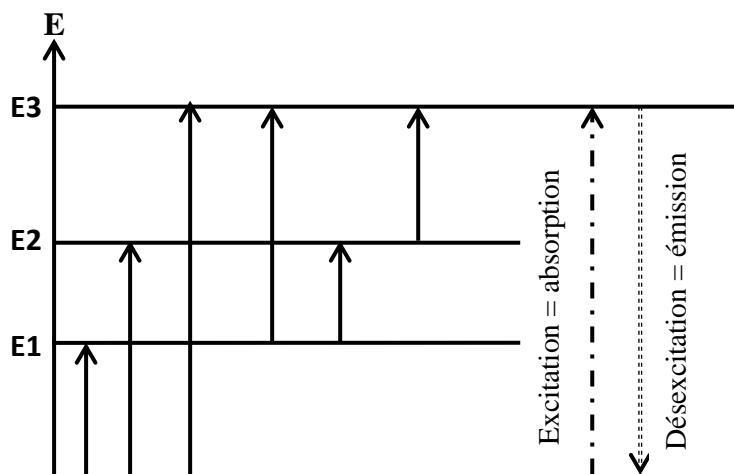


Fig.7: Diagramme énergétique d'une molécule

Selon le phénomène considéré, on parle de spectroscopie d'émission ou de spectroscopie d'absorption

5. Absorption de l'énergie rayonnante

5.1. Terminologie

- *Suffixe -ion- désigne le phénomène (absorption, transmission)
- *Suffixe -ance- signifie la mesure du phénomène (Absorbance, Transmittance)
- *Puissance: c'est l'énergie rayonnante qui atteint une surface donnée en une seconde.
- *Intensité: c'est l'énergie rayonnante /cm²/s

5.2. Principes de l'absorption des radiations

L'énergie d'une molécule ne varie pas d'une manière continue, mais plutôt d'une manière discontinue. Chaque molécule est caractérisée par une série de niveaux énergétiques quantifiés qui constituent le diagramme énergétique spécifique de la molécule. L'énergie totale d'une molécule est égale à :

$$E_{\text{molécule}} = E_{\text{électrique}} + E_{\text{vibration}} + E_{\text{rotation}}$$

- * Le passage d'une molécule d'un niveau énergétique à un autre niveau, conduit automatiquement à l'absorption ou à l'émission d'une quantité d'énergie égale à la différence entre les deux niveaux.
- * Un photon est absorbé par une molécule quand l'énergie qu'il transporte permet à la molécule de passer d'un niveau énergétique à un niveau supérieur.

5.3. Lois de l'absorption

Lorsqu'un flux lumineux traverse une substance, trois cas peuvent se produire :

- * Si $I = I_0$: le flux n'est pas modifié, le milieu est dit transparent
- * Si $I_0 = 0$: le faisceau est complètement absorbé, le milieu est dit opaque
- * Si $I < I_0$: le flux est partiellement affaibli, le milieu est dit absorbant

C'est sur cette absorption partielle que reposent toutes les techniques de la spectroscopie d'absorption.

5.4. Loi de Beer-Lambert

5.4.1. Exposé de la loi

Considérons un flux lumineux monochromatique d'intensité I_0 traversant une substance en solution (concentration molaire C), dans un solvant non absorbant, sur une épaisseur dl . On aura la relation

$$dI = -K.C.dl.I \quad \text{ou bien} \quad dI/I = -K.C.dl$$

Cette équation concerne une petite épaisseur (dl), il faut intégrer sur toute la longueur traversée L .

$$\int dI/I = -KC \int dl \quad \text{soit} \quad \ln I - \ln I_0 = -KCL \quad \text{donc} \quad \ln I/I_0 = -KCL \quad \text{donc} \quad I/I_0 = e^{-KCL}$$

K est le coefficient molaire ou d'extinction ou d'absorption.

K dépend principalement de la substance absorbante, et d'une manière secondaire de la longueur d'onde incidente et de la température.

L'absorption est exprimée de 2 manières:

$$\text{*Transmittance (T): } T (\%) = I/I_0 \cdot 100$$

Si $T = 1$, le milieu est transparent

Si $T = 0$, le milieu est opaque.

$$\text{*Absorbance (A): } A(\text{DO}) = \text{Log } 1/T = \text{Log } I_0/I = 1/2,3 \ln I_0/I = K/2,3 CL = \epsilon LC$$

$$A = \epsilon LC \quad \text{donc} \quad \epsilon = A/LC$$

A est un nombre sans unité, L en cm et C en moles/litre.

ϵ est le coefficient d'absorption molaire dans le cas où C est exprimée en mole/litre. Il est appelé coefficient d'absorption ou d'extinction moléculaire ou massique lorsque C est massique (g/l).

Attention ϵ est fonction de λ .

5.4.2. Additivité des absorbances

Si un faisceau traverse plusieurs solutions différentes ($\epsilon_1 C_1$ et $\epsilon_2 C_2$ et $\epsilon_3 C_3 \dots$ etc.)

la loi de Beer s'écrit $A_t = A_1 + A_2 + A_3 \dots$ etc.

D'où la possibilité d'additionner et de soustraire les absorbances (cas du blanc).

5.4.3. Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-lambert n'est valable que si les conditions suivantes sont remplies

*Monochromatisme

*Solutions très diluées ($C < C_{\text{max}}$)

*pH et température constantes

*Pas de milieux troubles

*pas de milieux fluorescents

a/ Monochromatisme

La loi de Beer-Lambert n'est valable que dans le cas d'un monochromatisme rigoureux. Pratiquement, le monochromateur assure cette fonction, mais il isole une bande passante la plus étroite possible selon la qualité du monochromateur utilisé. Pour être le plus juste possible, il faut travailler au voisinage du maximum d'absorption, où l'absorbance ne varie pas de façon significative avec la longueur d'onde.

b/ Concentration des solutions

Le coefficient ϵ est fonction de l'indice de réfraction, or cet indice croît avec la concentration et ϵ ne devient constant que si les concentrations sont très faibles. Pratiquement, on doit connaître le domaine de linéarité de la fonction $A=f(C)$.

c/ Influence de la température

Pratiquement, il faut toujours travailler à des températures plus ou moins constantes. Car l'absorbance varie avec les fortes variations de températures.

d/ Turbidité et fluorescence des milieux

*Dans un milieu trouble, une partie de l'énergie est absorbée, mais pas par la molécule analysée et une autre partie diffuse et par conséquent, elle échappe à la mesure.

*La fluorescence qui réémis des REM perturbe énormément les mesures et par conséquent, les milieux troubles et les milieux fluorescents doivent être écartés.

Une spectroscopie spéciale aux milieux troubles est disponible (turbidimétrie) et une autre pour les milieux fluorescents (fluorimétrie).

e/ Influence du pH

Le pH est une expression de l'état électronique du milieu. Donc, en pratique, il faut travailler à pH plus ou moins constant et éviter les changements importants du pH.

6. SPECTROSCOPIE UV/VIS

6.1. Introduction

L'énergie totale d'une molécule est : $E_m = E_{Elec} + E_{Vib} + E_{Rot}$

Le principe de la spectroscopie IR repose sur la variation de l'énergie vibrationnelle et/ou rotationnelle. Cependant, la spectroscopie UV/Vis repose sur la variation de l'énergie électrique.

* Si l'énergie ($h\nu$) apportée est grande, elle provoque une transition électronique, toujours accompagnée d'un changement au niveau vibrationnel et rotationnel. Cette énergie correspond au domaine UV/Vis.

* Si l'énergie est beaucoup plus faible, c.a.d incapable de produire des transitions électroniques, l'absorption ne met en jeu que l'énergie de vibration et de rotation, cette énergie correspond au domaine IR proche et moyen.

* Si l'énergie est encore beaucoup plus faible, c.a.d incapable de provoquer des transitions électroniques et vibrationnelles, elle donne un spectre de rotation pure, cette énergie correspond au domaine IR lointain.

6.2. Rappel

L'absorption dans le domaine UV/Vis correspond aux transitions électroniques. Il est donc important de se rappeler des différents types d'électrons et des différents types de liaisons chimiques.

6.2.1. Différents types de liaisons chimiques

1. Liaison covalente

Elle se forme entre deux atomes par mise en commun d'un doublet d'électrons.

Liaison σ : (orbitale σ électron σ), s'établit par fusion frontale de 2 orbitales à symétrie axiale (tête à tête). C'est une liaison très stable.

Liaison π : (orbitale π , électron π), elle est issue de la fusion latérale de deux orbitales parallèles. Elle donne une orbitale π qui présente deux zones de haute probabilité de présence des deux électrons π , symétriques par rapport au plan de la molécule, au-dessous et au-dessus de la liaison σ .

*Elle est moins stable que σ .

*Elle assure les liaisons multiples

*Elle est en dehors de l'axe des noyaux, donc, elle assure un recouvrement latéral

*Elle empêche la libre rotation autour de l'axe des deux noyaux

*Elle cause une diminution de la longueur de la liaison et une augmentation de l'énergie de liaison (C-C=0.154nm avec 83kCal/mole, C=C=0.134nm avec 146 kCal/mole et C≡C= 0.121nm avec 200 kCal/mole)

2. Liaison ionique

Elle s'établit entre deux atomes présentant une grande différence d'électronégativité. Dans cette liaison il n'y'a pas de recouvrement des orbitales atomiques, il n'y'a pas de mise en commun d'un doublet électronique, mais il y'a un transfert d'un électron vers l'atome le plus électronégatif, c'est la limite de la liaison covalente.

3. Energie d'ionisation

C'est l'énergie nécessaire pour arracher un électron à un atome neutre. Plus le nombre d'électrons déjà arrachés est grand, plus l'énergie à fournir pour en extraire un autre est plus grande.

4. Moment dipolaire

Quand les deux atomes liés sont électriquement différents, le plus électronégatif attire vers lui le doublet électronique, ce qui fait apparaître des charges partielles δ sur les deux atomes avec $|\delta| < e$. Ainsi la liaison AB est polarisée et caractérisée par un moment dipolaire μ dont la valeur et le sens dépendent des atomes considérés.

5. Orbitales moléculaires

L'orbitale moléculaire est caractérisée par un niveau énergétique inférieur à celui de l'orbitale atomique, ceci signifie que 2 atomes liés sont plus stables que ces même atomes libres, la différence d'énergie correspond à l'énergie de liaison. Le doublet d'électrons mis en commun est appelé doublet liant, il a un niveau énergétique plus faible que celui du doublet non liant.

Il est clair donc que lorsqu'une molécule absorbe de la lumière, un électron est excité de son forte orbital moléculaire occupé (Highest Occupied Molecular Orbital)

HOMO, vers sa plus faible orbitale moléculaire inoccupée (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) LUMO.

Généralement, l'état HOMO correspond à l'orbitale liante σ et π et l'état LUMO correspond à l'orbitale anti-liante σ^* et π^* .

Etant donné que l'absorption UV/Vis met en jeu les 3 électrons de valence σ , π et n, donc selon l'énergie fournie on peut distinguer 4 types de transitions ($\sigma\sigma^*$, $\pi\pi^*$, $n\sigma^*$ et $n\pi^*$), n correspond aux électrons libres des hétéroatomes.

NB1: Ils existent 4 types de bandes caractéristiques correspondant aux différentes transitions électroniques observées dans l'UV.

NB2: Les radiations UV/Vis assurent l'excitation sans provoquer la rupture des liaisons.

6.3. Terminologie

6.3.1. Groupement chromophore

Groupement covalent, insaturé et responsable de l'absorption (noyaux aromatiques, hétérocycles, groupements C=O des cétones et des aldéhydes, N=O, N=N, C=C ...etc.).

6.3.2. Groupement auxochrome

Groupement saturé qui lorsqu'il se lie à un groupement chromophore modifie sa longueur d'onde maximale (λ_{\max}), comme le OH et NH₂.

6.3.3. Effet bathochrome

C'est le déplacement de λ_{\max} par la présence d'un groupement fonctionnel vers des longueurs d'ondes plus grandes (ex groupement cétone).

6.3.4. Effet hypsochrome

C'est le déplacement de λ_{\max} par la présence d'un groupement fonctionnel vers des longueurs d'ondes plus petites.

6.3.5. Effet hyperchrome

C'est l'augmentation de l'intensité d'absorption par la présence d'un groupement fonctionnel actif.

6.4. Etude pratique

L'analyse dans le domaine visible ne peut se faire qu'à l'état liquide. Cependant dans le domaine UV, l'analyse des formes gazeuses est possible avec l'utilisation de cellules spéciales, par contre l'analyse de la forme solide est très limitée car le problème de supports transparents aux UV se pose fortement.

La forme liquide est la plus utilisée dans les analyses qualitatives et quantitatives. Les solvants les plus utilisés (transparents) sont: eau, éthanol, hexane, cyclohexane...etc.

Appareillage

Le spectromètre d'absorption moléculaire comporte les éléments essentiels suivants : source de radiations, monochromateur, chambre d'analyse, détecteur, amplificateur, enregistreur et les accessoires (**Fig.8**).

1- Source de radiations

Dans le domaine visible, les lampes à filament de tungstène sont les plus utilisées. Cependant, dans le domaine UV les lampes à deutérium sont les plus utilisées.

2- Monochromateur

Toutes les sources utilisées sont polychromatiques, on se trouve dans l'obligation d'utiliser un monochromateur (prisme, filtres interférentiels...) qui permet de séparer les différentes longueurs d'ondes d'un faisceau polychromatique, et c'est ainsi que λ_{\max} est sélectionnée.

3- Compartiment d'analyse

Lieu d'emplacement des cuvettes qui portent les échantillons. Certaines cuvettes ont un côté transparent qui doit être placé en face du faisceau et un côté opaque qui sera utilisé pour prendre et manipuler la cuvette.

Certains supports de cuvettes sont thermo-régulés.

*Dans le visibles les cuvettes en plastiques à usage unique sont très recommandées, à défaut des cuvettes en verre sont utilisées.

*Dans le domaine UV seules les cuvettes en quartz sont utilisées (attention, le prix des cuvettes en quartz est trop élevé, elles doivent être manipulées avec beaucoup de soin).

4- Détecteur

Il permet d'obtenir un signal électrique proportionnel au flux énergétique transmis à chaque fréquence et ainsi de repérer les zones d'absorption. Dans le cas des photocellules (système photosensible), les photons reçus sur la surface photosensible seront transformés en un courant électrique, dont l'intensité est proportionnelle à l'intensité du faisceau lumineux.

5- Amplificateur

Le détecteur émet des signaux de très faibles amplitudes, il est donc indispensable de les amplifier pour pouvoir les lire et les exploiter.

6- Enregistreur

Il permet de transformer les signaux émis en données graphiques (spectre). L'enregistreur est indispensable dans les cas des IR et de l'analyse qualitative par UV, tandis que dans les autres cas, l'enregistrement des absorbances est suffisant.

* Un logiciel de pilotage permet de remplacer l'enregistreur. Dans ce cas, une unité informatique intégrée ou branchée au spectromètre assure cette fonction.

7- Accessoires

Pour faciliter, accélérer, sécuriser le matériel utilisé, plusieurs accessoires se trouvent sur le marché comme le passeur automatique, le laveur automatique. Le couplage à un système informatisé d'enregistrement, de traitement et d'exploitation et de calcul est nécessaire.

Types d'appareil

Deux principaux types de spectromètres sont disponibles sur le marché: le simple faisceau (mono-faisceau) et le double faisceau.

Avec le mono-faisceau, les mesures sont effectuées individuellement, le réglage du zéro se fait avec le solvant (blanc). Par contre, le double faisceau permet une compensation directe de l'absorption éventuelle du solvant et des variations de l'intensité du faisceau émis par la source.

Pratiquement, le faisceau est dédoublé à la sortie du monochromateur dans le double faisceau, un de ces faisceaux traverse la cuve du solvant et le second faisceau traverse la cuve de l'échantillon. Le récepteur reçoit alternativement chacun des deux faisceaux et la différence est annulée grâce à un atténuateur.

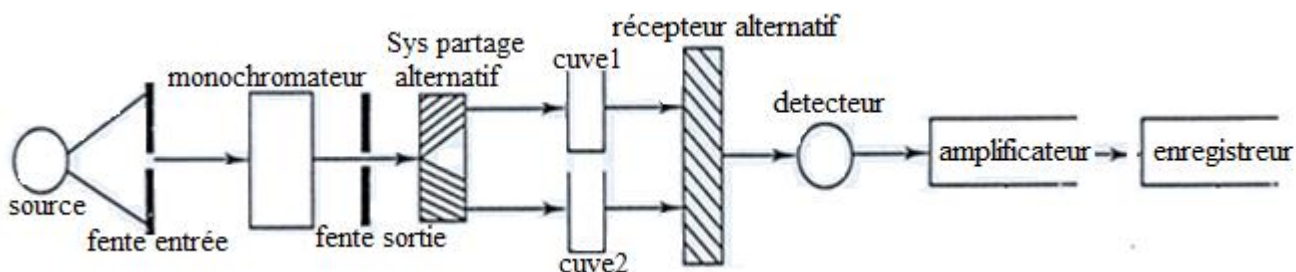


Fig. 8: Schéma représentatif d'un spectrophotomètre double faisceau

Applications

La spectroscopie UV/Vis permet d'effectuer une analyse quantitative et qualitative. L'analyse quantitative est bien assurée dans les deux domaines UV et visible. Ce type d'analyse est actuellement une routine dans tous les laboratoires d'analyse médicales, biologiques, alimentaires, chimiques, d'hygiène et dans les laboratoires de recherche. Le dosage quantitatif dans UV/Vis se fait par le biais d'une gamme d'étalonnage bien préparée. Si ϵ est connu, l'absorbance mesurée, permet de déterminer directement la concentration selon la formule $A = \epsilon LC$.

Quant à l'aspect qualitatif, il ne peut être réalisé que par la spectrométrie UV. Pratiquement, la caractérisation d'un composé par son spectre UV nécessite la connaissance des λ_{\max} des principales bandes d'absorption spécifiques d'une part et des ϵ de ces bandes.

Le spectre UV possède des bandes larges et peu nettes, donc il n'apporte pas un grand élément à l'analyse qualitative, mais il complète d'autres techniques d'analyse, surtout que des spectres de références sont disponibles.