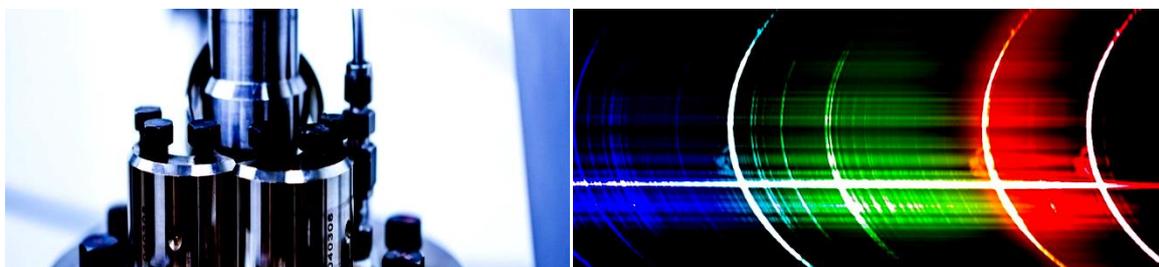


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre universitaire Belhadj Bouchaïb – Ain Témouchent Institut des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie



Cours de Méthodes Physico-Chimiques d'Analyse :
Méthodes spectrales

Polycopié destiné aux étudiants de Master 1 Biochimie (LMD)



Présenté par Dr. BENTABET Nesrine épouse LASGAA

Préface

Le présent polycopié est destiné aux étudiants de Master Biochimie. Il peut également servir aux étudiants de licence en biologie.

Son programme regroupe les méthodes spectroscopiques d'analyse les plus utilisées pour caractériser les produits de synthèse organiques ou les produits naturels.

Ce polycopié est le résultat des enseignements que j'ai effectué dans le module de méthodes spectrales appartenant à l'unité de Méthodes Physico-Chimiques d'Analyse pour le niveau M1 Biochimie.

Les cours sont présentés de façon simplifiée, plusieurs exemples de spectres sont donnés pour faciliter la compréhension de ce module.

Le polycopié est composé de sept chapitres :

Chapitre I : Spectrométrie UV-Visible.

Chapitre II : Spectrométrie à fluorescence

Chapitre III: Spectrométrie d'absorption atomique

Chapitre IV : Spectrométrie d'émission atomique

Chapitre V : Spectrométrie de masse.

Chapitre VI : Résonance magnétique nucléaire.

Chapitre VII : Spectrométrie d'infrarouge

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE I : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV- VISIBLE..... | 1 |
| 1. Introduction | 2 |
| 2. Domaine spectral | 2 |
| 3. Principe | 2 |
| 4. Loi d'absorption de la lumière - Loi de Beer-Lambert | 3 |
| 5. Allure d'un spectre d'absorption | 4 |
| 6. Règles de sélection | 4 |
| 7. Types de transitions électroniques | 6 |
| 8. Effet de l'environnement sur les transitions | 6 |
| 8.1. Terminologie | 7 |
| 8.2. Effet de la substitution | 7 |
| 8.3. Effet de la conjugaison | 8 |
| 8.4. Effet de solvant | 9 |
| 9. Principaux chromophores | 9 |
| 9.1. Chromophore éthylénique | 11 |
| 9.2. Chromophore carbonyle | 12 |
| 9.3. Composés benzéniques | 13 |
| 10. Techniques expérimentales | 13 |
| 10.1. Appareillage | 14 |
| 10.2. Echantillonnage | 15 |
| CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE A FLUORESCENCE | 16 |
| 1. Introduction | 16 |
| 2. Fluorescence et phosphorescence | 17 |
| 3. Origine de la fluorescence | 19 |
| 4. Relation entre fluorescence et concentration | 20 |
| 5. Diffusion Rayleigh et diffusion Raman | 20 |
| 5.1. Diffusion Rayleigh | 20 |
| 5.2. Diffusion Raman | 21 |
| 6. Instrumentation | 22 |
| 6.1. Fluorimètres à rapport de fluorescence (méthode ratiométrique) | 23 |
| 6.2. Spectrofluorimètres | 24 |
| 7. Quelques applications de la fluorescence..... | 26 |
| CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE A ABSORPTION ATOMIQUE | 27 |
| 1. Introduction | 27 |
| 2. Illustration et interprétation des phénomènes concernés : Expérience de Kirchhoff ... | 28 |
| 3. Domaines d'application | 28 |
| 3.1. La spectroscopie d'absorption | 29 |
| 3.2. La spectroscopie d'émission | 29 |
| 4. Principe de fonctionnement de la spectroscopie d'absorption | 29 |
| 4.1. Fondements des méthodes de mesure par absorption atomique | 29 |
| 4.1.1. Règle de Bohr | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2. Remarque sur la validité de la loi de Bohr | 30 |
| 4.1.3. Largeur des raies spectrales et des profils d'absorption | 30 |
| 4.2. Remarques sur les largeurs | 31 |
| 5. Mise en œuvre de la technique | 31 |
| 5.1. Sources | 33 |
| 5.1.1. La lampe à cathode creuse | 34 |
| 5.1.2. La lampe LED | 34 |
| 5.1.3. Autres types de lampes : Lampes a haute brillance - lampes a décharge sans électrode..... | 34 |
| 5.2. Atomisation | 35 |
| 5.2.1. Atomisation par flamme | 39 |
| 5.2.2. Atomisation électrothermique | 40 |
| 6. Mesures : LOI DE BEER-LAMBERT | 41 |
| 6.1. Expressions de la loi | 42 |
| 6.2. Réception et séparation des rayonnements | 42 |
| 6.3. La détection du rayonnement et le traitement du signal | 44 |
| 7. Paramètres influençant la mesure | 45 |
| CHAPITRE IV : SPECTROSCOPIE A EMISSION ATOMIQUE | 46 |
| 1. Présentation du phénomène physique d'émission atomique | 46 |
| 1.1. Définition | 46 |
| 1.2. L'atomisation puis l'excitation d'atomes d'un échantillon à doser par transfert à très haute température | 47 |
| 2. Instrumentation | 47 |
| 2.1. Schéma de principe d'un photomètre de flamme..... | 48 |
| 2.2. Présentation d'un spectromètre d'émission atomique à plasma par couplage inductif (<i>ICP-AES ; ou ICP-OES</i>)..... | 48 |
| 3. Justification de l'aspect quantitatif de l'émission atomique | 50 |
| 4. Bilan concernant les fonctions de la flamme ou du plasma, applications | 50 |
| 5. Réalisation des mesures | 50 |
| 5.1. Généralités concernant l'exécution des mesures | 51 |
| 5.2. Exécution des mesures en <i>FEP</i> | 52 |
| 5.3. Exécution des mesures en <i>ICP-OES</i> | 53 |
| CHAPITRE V : SPECTROSCOPIE DE MASSE | 54 |
| 1. Introduction | 54 |
| 2. Principe de base | 54 |
| 2.1. Ionisation | 54 |
| 2.2. Accélération | 54 |
| 2.3. Séparation | 54 |
| 2.4. Détection | 54 |
| 3. Les spectromètres de type EB | 56 |
| 4. Les analyseurs à temps de vol | 56 |
| 5. Les analyseurs à filtre quadripolaire par transmission | 56 |
| 6. Les analyseurs à piégeage d'ions par quadripôle | 58 |

| | | |
|--|--|----|
| 7. | Les grandeurs importantes | 59 |
| 8. | Les procédés d'ionisation | 59 |
| | 8.1. Ionisation chimique positive (CI) | 60 |
| | 8.2. Bombardement par atomes rapides (FAB) | 60 |
| | 8.3. Ionisation laser assistée par matrice (MALDI) | 60 |
| | 8.4. Ionisation par plasma d'argon | 60 |
| | 8.5. Ionisation par l'intermédiaire d'un spray | 60 |
| 9. | Les détecteurs d'ions | 61 |
| 10. | Quelques applications | 61 |
| | 10.1. Identification au moyen d'une spectrothèque | 61 |
| | 10.2. Analyse de la composition élémentaire des ions (recherche de la masse) | 61 |
| | 10.3. Avec les abondances isotopiques | 61 |
| 11. | Fragmentation des molécules organiques | 63 |
| CHAPITRE VI : SPECTROSCOPIE A RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE | | 64 |
| 1. | Définition de la RMN | 64 |
| 2. | <i>Quels sont les noyaux capables de fournir une résonance ?</i> | 64 |
| 3. | Condition de résonance | 65 |
| 4. | Déplacements chimiques caractéristiques du proton : δ | 65 |
| | 4.1. Effets d'écran | 66 |
| | 4.2. <i>Molécule de référence</i> | 66 |
| | 4.3. <i>Déplacement chimique</i> | 66 |
| 5. | <i>Courbe d'absorption</i> | 67 |
| 6. | Facteurs influençant le déplacement chimique | 69 |
| 7. | Courbe d'intégration | 69 |
| 8. | Le couplage spin/spin de premier ordre | 71 |
| 9. | Appareillage | 73 |
| CHAPITRE VII : SPECTROSCOPIE A INFRAROUGE | | 74 |
| 1. | Le rayonnement infrarouge | 75 |
| 2. | Sources lumineuses de radiations IR | 75 |
| | 2.1. Sources thermiques | 76 |
| | 2.2. Diodes émettrices de lumière | 77 |
| 3. | Types de spectromètres | 77 |
| | 3.1. Spectromètres dispersifs | 78 |
| | 3.2. Spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR) (non dispersifs) | 78 |
| | 3.2.1. <i>Fonctionnement du spectromètre FT-IR</i> | 80 |
| | 3.2.2. <i>Génération du spectre FT-IR</i> | 80 |
| | 3.2.3. <i>Résolution spectrale</i> | 81 |
| 4. | Microspectroscopie FT-IR | 81 |
| 5. | Spectroscopie photoacoustique (PAS) | 83 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | | 84 |

CHAPITRE I :

SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV- VISIBLE

1- Introduction

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

2- Domaine spectral

Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

- visible : 800 nm (rouge) - 400 nm (indigo)
- proche-UV : 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm.

3 - Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

4 – Loi d'absorption de la lumière - Loi de Beer-Lambert

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l (**Fig 01**).

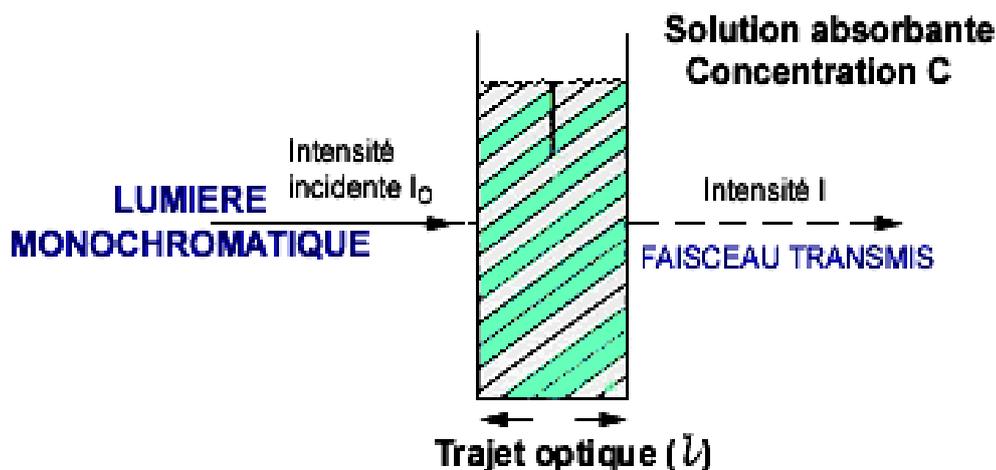


FIGURE N°01 : Principe de la loi de Beer-Lambert.

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-kIC}$$

- * I_0 est l'intensité de la lumière incidente
- * I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- * l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)
- * C est la concentration des espèces absorbantes
- * k est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = kIC/2.3 = \epsilon l C$.

- * $\log(I_0/I)$ est appelé **absorbance (A)**
- * $I/I_0 = T$ est la **transmission**
- * **% T** est la **transmittance**
- * ϵ est le **coefficient d'extinction molaire** ; c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de **loi de Beer-Lambert** :

$$A = -\log T = \epsilon l C$$

Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation ...).

5 - Allure d'un spectre d'absorption

L'ordonnée peut être A , T , ϵ ou $\log \epsilon$. L'abscisse est la longueur d'onde ou moins souvent le nombre d'onde. Le spectre présente très peu de bandes comparativement au spectre IR mais leur allure est beaucoup plus large (Fig 02).

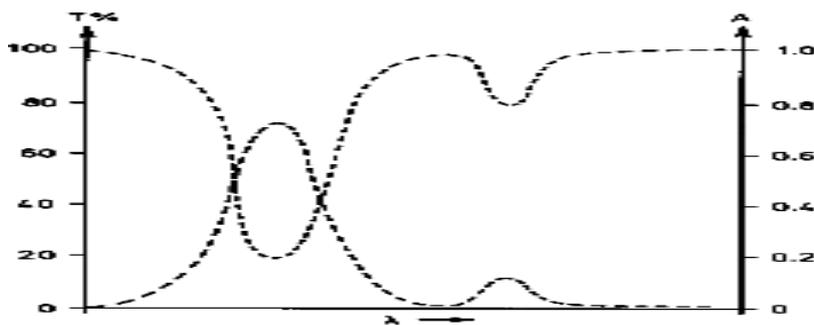


FIGURE N°02 : Allure d'un spectre d'adsorption

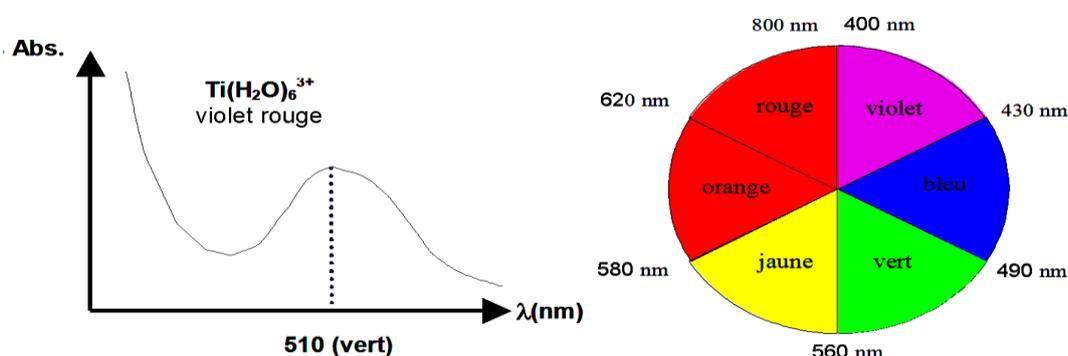
La bande d'absorption, observée dans le domaine de l'UV-visible, est caractérisée par sa position en longueur d'onde λ_{max} , nm (ou en nombre d'onde, cm^{-1}) et par son intensité liée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{max} .

La position du maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique. Quant à l'intensité, on peut montrer qu'elle est liée au moment dipolaire. Sa valeur permet de savoir si la transition est permise ou interdite.

Remarque : Absorption et couleur

La couleur d'un composé est le complémentaire de ce qu'il absorbe (violet/jaune, bleu/orange, vert/rouge).

Exemple : Le complexe $\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ est rouge-violet et absorbe dans le vert.



6 - Règles de sélection

Une transition électronique est analysée comme un changement de population entre une orbitale moléculaire fondamentale occupée et une orbitale moléculaire excitée vacante. Lorsqu'elle a lieu, la matière absorbe un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises.

Les règles de sélection déterminent si une transition est **permise (active)** ou **interdite (inactive)**. Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. De plus, une transition permise a lieu si les orbitales impliquées au cours de ce processus sont telles que $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta S = 0$. *En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron.*

7 - Types de transitions électroniques

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Le diagramme suivant illustre ceci pour des orbitales de type σ , π et n (**Fig 03**) :

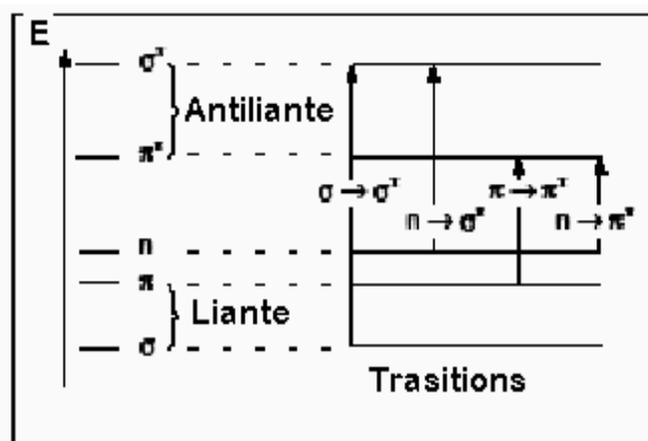


FIGURE N°03 : Les types de transitions électroniques

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores (C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N...).

La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu.

a. - Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une OM liante σ vers une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV-lointain, vers 130 nm.

b. - Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Ce type de transition a lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé.

La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle située entre 270 et 280 nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible.

c. - Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl...) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe à l'extrême limite du proche-UV.

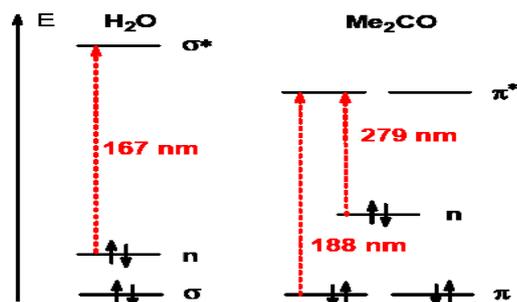
d. - Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm.

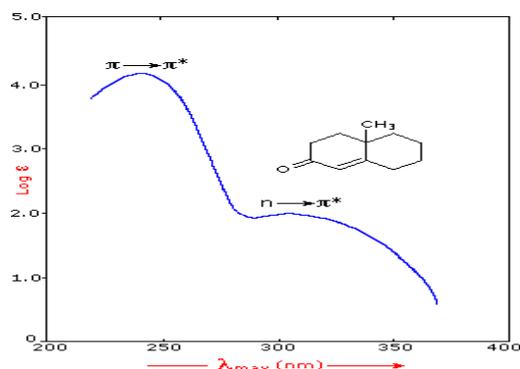
Sur le diagramme énergétique suivant sont situées ces transitions les unes par rapport aux autres dans le cas général.

Exemples :

| Exemple | Transition | λ_{\max} , nm | ϵ |
|----------|-------------------------|-----------------------|------------|
| Ethylène | $\pi \rightarrow \pi^*$ | 165 | 15000 |
| 1-hexyne | $\pi \rightarrow \pi^*$ | 180 | 10000 |
| Ethanal | $n \rightarrow \pi^*$ | 293 | 12 |



| | | | |
|--------------------|--------------------------|-----|------|
| Nitrométhane | $n \rightarrow \pi^*$ | 275 | 17 |
| | $\pi \rightarrow \pi^*$ | 200 | 5000 |
| Bromure de méthyle | $n \rightarrow \sigma^*$ | 205 | 200 |

**e. - Transition d - d**

Dans les complexes des métaux de transition, on assiste sous l'effet du champ cristallin à une levée de dégénérescence des orbitales d.

En général, ces complexes sont colorés. Par exemple, les solutions des complexes de cuivre(II) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ sont bleues. Les absorptions dans le visible sont le plus souvent dues à une transition d'un électron d'une orbitale d peuplée à une orbitale d vide (Ex. un électron passe du niveau t_{2g} au niveau e_g pour une géométrie octaédrique). On parle de transition **d-d**. Les coefficients d'extinction molaire sont souvent très faibles, de 1 à $100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

8 - Effet de l'environnement sur les transitions**8-1 -Terminologie**

➤ **Groupe chromophore** : groupement insaturé covalent responsable de l'absorption.

Exemples : $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$...

➤ **Effet bathochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

➤ **Effet hypsochrome** : déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.

➤ **Effet hyperchrome** : augmentation de l'intensité d'absorption.

➤ **Effet hypochrome** : diminution de l'intensité d'absorption.

Ces effets sont illustrés sur la figure suivante (Fig 04) :

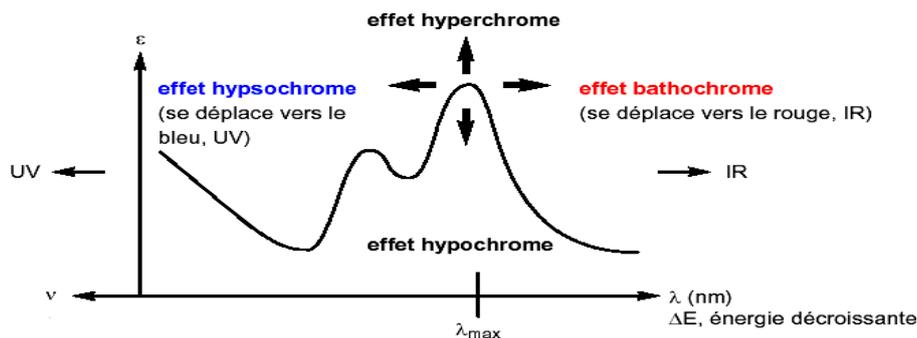


FIGURE N°04 : Effet de l'environnement sur les transitions

8-2- Effet de la substitution

La position de la bande d'absorption dépend de la présence ou non de substituants sur le groupement chromophore. Par exemple, plus le groupe éthylénique est substitué, plus la bande d'absorption due à la transition, c'est déplacée vers le visible : effet bathochrome (Fig 05).

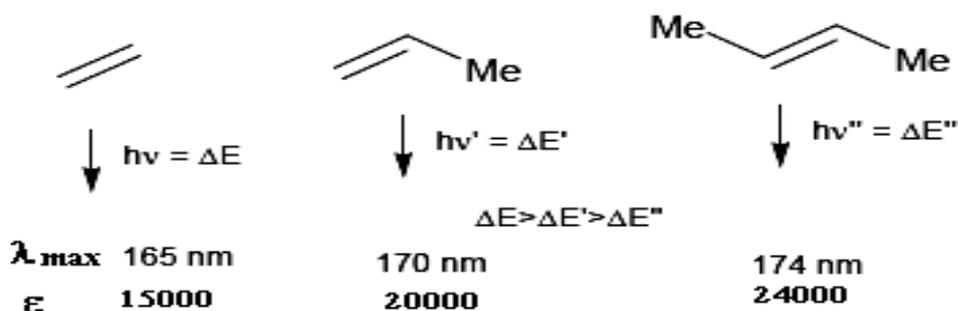


FIGURE N°05 : Effet de la substitution sur l'absorption

Pour les substituants à effet mésomère (auxochromes) portés par un chromophore C=C ou C=O, les paires d'électrons non-appariées peuvent participer à la résonance, augmentant la conjugaison d'une molécule : -OH, -OR, -X, -NH₂, ... d'où des effets bathochrome et hyperchrome.

8-3- Effet de la conjugaison

L'enchaînement d'insaturations entraîne la délocalisation des électrons π . Cette délocalisation qui traduit la facilité des électrons à se mouvoir le long de la molécule est accompagnée d'un rapprochement des niveaux d'énergies.

Il en découle un effet bathochrome et un effet hyperchrome sur la bande d'absorption correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

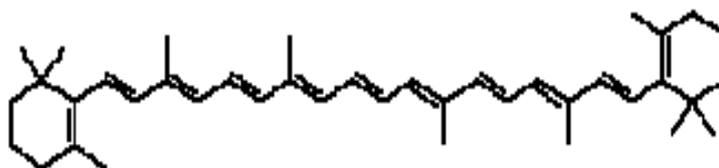
| Composé | λ_{\max} | ϵ_{\max} |
|-----------------|------------------|-------------------|
| Ethylène | 165 | 15000 |
| Buta-1, 3-diène | 217 | 20900 |

Le même effet est observé sur la transition $n \rightarrow \pi^*$.

| Composés | transition $\pi \rightarrow \pi^*$ | transition $n \rightarrow \pi^*$ |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Propanone | 188 nm | 279 nm |
| Méthyl isobutylcétone | 236 nm | 315 nm |

Remarque : Le déplacement bathochrome est à l'origine de la couleur de nombreux composés naturels dont les formules semi-développées présentent des chromophores conjugués étendus.

Ainsi la couleur orangée du β -carotène (formule ci-dessous), provient de la réunion de onze doubles liaisons conjuguées: $\lambda_{\max} = 497$ et 466 nm (dans le chloroforme).

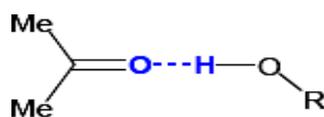


Pour les aromatiques polynucléaires, plus le nombre de cycles condensés augmente, plus l'absorption se déplace vers de plus grandes longueurs d'onde jusqu'à ce qu'elle atteigne la région du visible.

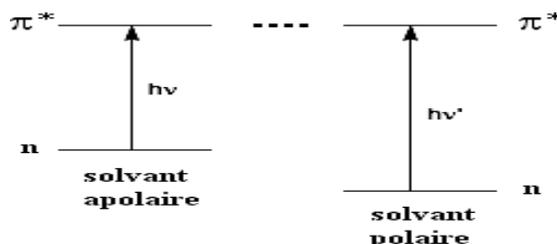
8-4- Effet de solvant

La position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

Cas de la transition $n \rightarrow \pi^*$: Ex. du groupement carbonyle des fonctions cétones.



stabilisation de $n(\text{CO})$ par pont-H
(en stabilisant l'état fondamental on rend la transition électronique plus difficile, d'énergie plus élevée)



Avant l'absorption, la liaison $\delta^+C=O^{\delta-}$ est stabilisée par un solvant polaire. Il faut plus d'énergie pour provoquer la transition \Rightarrow **diminue par augmentation de la polarité du solvant.**

Cas de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$: Si l'état excité est plus polaire que l'état fondamental, c'est la forme excitée qui est stabilisée par un solvant polaire. ΔE diminue \Rightarrow **λ augmente par augmentation de la polarité du solvant.**

En résumé, l'étude du déplacement des bandes d'absorption par effet de la polarité des solvants peut aider à reconnaître la nature électronique des transitions observées.

Par augmentation de la polarité du solvant :

Transition $n \rightarrow \pi^*$: effet hypsochrome

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: effet bathochrome

Remarque : Une structure fine peut être observée dans les solvants non polaires comme dans le cas de la bande vers 256 nm ($\epsilon = 200$) du benzène et des aromatiques polynucléaires (Fig 06).

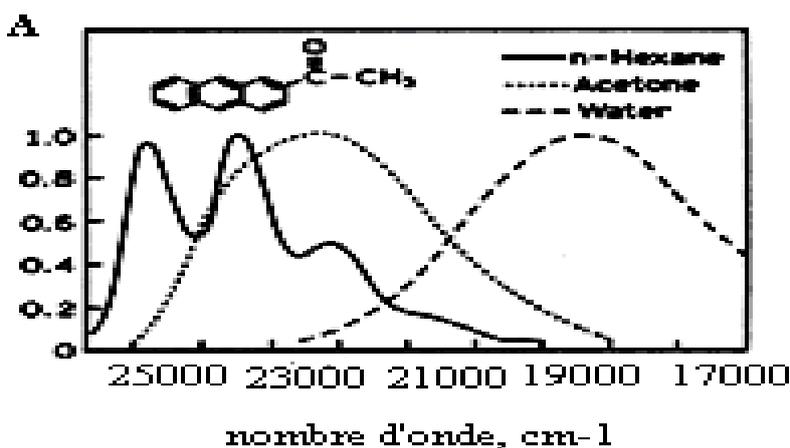


FIGURE N°06 : spectre présenté dans le n-hexane.

9 - Principaux chromophores

Le spectre UV ou visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient.

9 -1- Chromophore éthylénique

- Chromophore isolé

Ethylène : Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} = 165$, $\epsilon = 15000$

- Diènes et polyènes

On note un effet bathohyperchrome très remarquable par rapport au chromophore isolé. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques, dues à Woodward, Fieser et Scott, qui concernent les diènes et composés carbonylés insaturés. A partir de tableaux qui rassemblent, sous forme d'incrément, les divers facteurs de structure à considérer, on peut prévoir la position de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de ces systèmes conjugués. La concordance est bonne entre les valeurs calculées et les positions expérimentales.

Exemple 1:

| | | |
|---|-------|---|
|  | | |
| Diène parent linéaire | | |
| Valeur de base | | 217 nm |
| 3 alkyles | 3 x 5 | <u>15 nm</u> |
| Calculée | | $\lambda_{\text{max}} = 232 \text{ nm}$ |
| Observée | | $\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$ |

Exemple 2:

| | | |
|---|-------|---|
|  | | |
| Diène parent homoannulaire | | |
| Valeur de base | | 253 nm |
| 2 restes de cycles | 2 x 5 | <u>10 nm</u> |
| Calculée | | $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$ |
| Observée | | $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$ |

9-2- Chromophore carbonyle

- Chromophore isolé

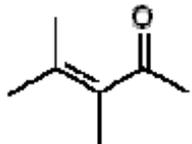
On a deux types de transitions : $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$.

Acétone : $n \rightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$, $\epsilon = 16$; $\pi \rightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} = 186 \text{ nm}$, $\epsilon = 1000$.

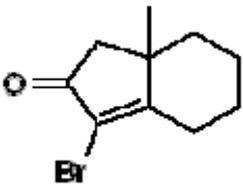
- Chromophore conjugué

Les règles de calcul établies par Woodward, Fieser et Scott permettent de prévoir la position de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de groupements carbonyles α, β -insaturés.

Exemple 1 :

| | | | | |
|---|------|--|--|--|
|  | | | Cétone acyclique α, β - insaturée | |
| Valeur de base | | | 215 nm | |
| Alkyle en α | | | 10 nm | |
| 2 alkyles en β | 2x12 | | 24 | |
| Calculée | | | $\lambda_{\max} = 249 \text{ nm}$ | |
| observée | | | $\lambda_{\max} = 249 \text{ nm}$ | |

Exemple 2 :

| | | | | |
|---|------|--|--|--|
|  | | | Cétone cyclique à 5 chaînons α, β - insaturée | |
| Valeur de base | | | 202 nm | |
| Brome en α | | | 25 nm | |
| 2 restes de cycle en β | 2x12 | | 24 nm | |
| Double liaison exocyclique | | | 5 nm | |
| Calculée | | | $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$ | |
| Observée | | | $\lambda_{\max} = 251 \text{ nm}$ | |

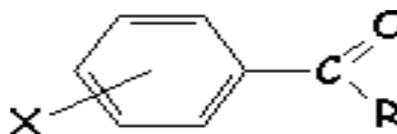
9-3- Composés benzéniques

L'absorption des composés aromatiques est beaucoup plus complexe que celle des éthyléniques. Plusieurs transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ sont observées.

Le spectre UV du benzène présente trois bandes d'absorption dues à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$.

- $\lambda_{\max} = 184 \text{ nm}$, $\epsilon = 60000$
- $\lambda_{\max} = 203 \text{ nm}$, $\epsilon = 7900$
- $\lambda_{\max} = 256 \text{ nm}$, $\epsilon = 200$

L'effet des substituants perturbe les OM. Les règles de Scott permettent de prévoir approximativement λ_{\max} dans l'éthanol de la bande vers 256 nm des composés carbonylés aromatiques substitués de formule générale :



Exemple 1 :

| | | |
|-------------------------|--|--|
| | | Cétone aromatique, R = reste de cycle |
| Valeur de base | | 246 nm |
| Reste de cycle en ortho | | 3 nm |
| Brome en méta | | 2 nm |
| Calculée | | $\lambda_{\max} = 251 \text{ nm}$ |
| Observée | | $\lambda_{\max} = 253 \text{ nm}$ |

Exemple 2:

| | | |
|----------------|-----|-----------------------------------|
| | | C=O aromatique, R = OH |
| Valeur de base | | 230 nm |
| 2 OH en méta | 2x7 | 14 nm |
| OH en para | | 25 nm |
| Calculée | | $\lambda_{\max} = 269 \text{ nm}$ |
| Observée | | $\lambda_{\max} = 270 \text{ nm}$ |

10- Techniques expérimentales

10-1- Appareillage

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. La figure 7 suivante représente le schéma de principe d'un *spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau*.

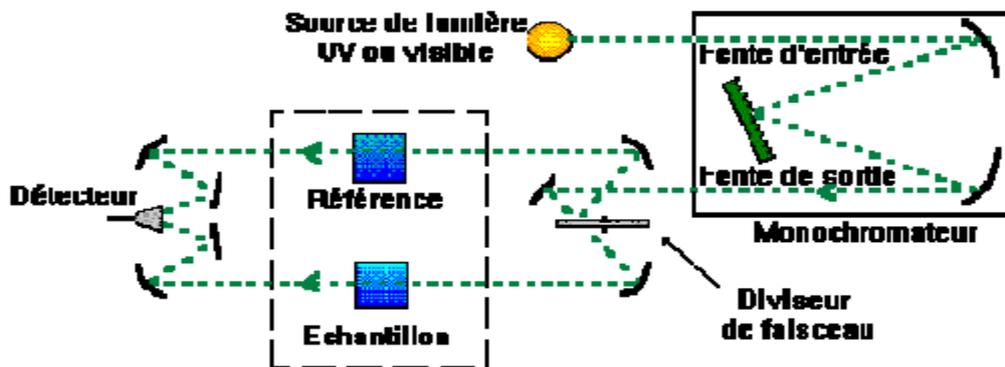


FIGURE 07 : Schéma de principe d'un *spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau*.

Il est constitué des éléments suivants :

- Source

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse.

Dans la région de l'UV (190 à 400 nm), la source est une lampe à décharge au deutérium. Une lampe à filament de tungstène est utilisée pour la région allant de 350 à 800 nm.

- Monochromateur

Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement polychromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques.

Les monochromateurs les plus utilisés sont composés en général d'une fente d'entrée, d'un dispositif de dispersion comme un prisme ou un réseau et d'une fente de sortie.

L'échantillon et le détecteur, placés juste derrière le monochromateur, ne seront donc traversés que par un domaine étroit de longueurs d'onde.

- Diviseur de faisceau ou photomètre

La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.

- Détecteur

Le détecteur est un tube photomultiplicateur qui convertit la lumière reçue en courant. Ce type de détecteurs est de plus en plus remplacé par des photodiodes (semi-conducteurs) plus sensibles.

Le détecteur est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.

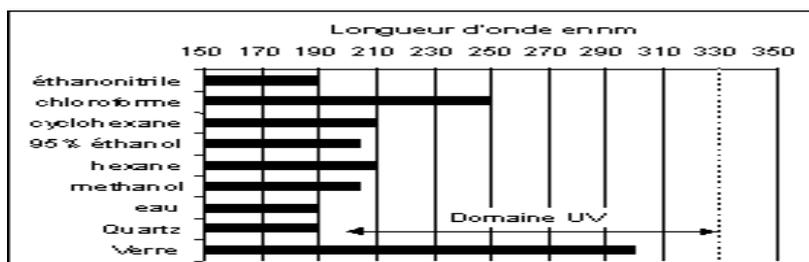
Remarque : En UV-visible, le porte-échantillon est placé à la sortie du monochromateur, et non après la source, afin d'éviter de détériorer l'échantillon avec le rayonnement UV provenant de la source.

10-2- Echantillonnage

Les composés peuvent être étudiés dans divers états physiques (gazeux, liquide, solide ...). La plupart du temps, l'étude se fait en solution.

- Solvants

Pour l'étude en solution, le composé doit être dissous dans un solvant convenablement choisi : il doit dissoudre le produit et être transparent (n'absorbe pas) dans la région examinée. Le tableau suivant donne la zone d'absorption de certains solvants et matériaux.



Exemple : L'hexane peut être utilisé comme solvant pour des échantillons qui absorbent à des longueurs d'onde supérieures à 210 nm.

- Cellules

La solution à étudier doit être placée dans une cellule ou cuve. Les cellules de mesure sont généralement des tubes parallèles pipédiques de 1x1 cm de côté et de 4 à 5 cm de hauteur. Elles sont en quartz pour le domaine UV-visible. Le verre est réservé aux mesures dans le domaine visible uniquement.

11- Applications de la spectroscopie UV-Visible

11-1- Analyse qualitative

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

11- 2 - Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- Dosage du benzène dans le cyclohexane

11- 3 - Autres applications

D'autres applications sont connues pour le contrôle qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation ou pour la détermination des masses molaires.

CHAPITRE II :

SPECTROSCOPIE A FLUORESCENCE

1- Introduction :

Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides (cristaux moléculaires ou ioniques), qu'ils soient purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Parmi les applications en analyse de ce phénomène, baptisé photoluminescence, se trouve **la fluorimétrie**, une méthode à la fois sélective et très sensible permettant de très nombreux dosages. L'intensité de fluorescence étant en rapport avec la concentration de l'analyte, les dosages sont faits à l'aide de fluorimètres ou de spectrofluorimètres. L'extinction extrêmement rapide de l'intensité lumineuse lorsque l'excitation cesse, fait également l'objet de mesures à des fins analytiques. Par opposition, **la phosphorescence** se caractérise par une décroissance dans le temps beaucoup plus lente. La fluorescence est également mise à profit dans la conception de détecteurs utilisés en chromatographie liquide. Bien que l'origine en soit différente, la **chimiluminescence**, qui consiste en émission de lumière au cours de certaines réactions chimiques, a reçu quelques applications en chimie analytique.

2- Fluorescence et phosphorescence

Beaucoup de composés, lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse du domaine du visible ou du proche ultraviolet, absorbent de l'énergie pour la restituer par la suite sous forme d'un rayonnement. Certains présentent la faculté plus ou moins prononcée de réémettre quasi-instantanément à une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'origine. Ils sont dits *fluorescents* (**Fig 01 et 02**). Lorsqu'on éteint la source, l'intensité lumineuse diminue extrêmement rapidement en suivant une loi exponentielle.

L'expression 1 relie l'intensité de fluorescence $I_{f(t)}$ et le temps écoulé t après l'excitation :

$$I_{f(t)} = I_{f(0)} \cdot \exp [-kt] \quad (1)$$

Cette loi de décroissance s'applique aussi à la *phosphorescence*. La différence tient à la valeur de la constante k qui est beaucoup plus grande pour la *fluorescence* que pour la *phosphorescence* car celle-ci décroît beaucoup plus lentement. La *durée de vie* de fluorescence τ_0 est définie à partir de k par $\tau_0 = 1/k$. À l'instant τ_0 , l'intensité $I_{f(t)}$ vaut, d'après l'équation 1, 36,8 % de l'intensité de départ $I_{f(0)}$. Autrement dit, un composé fluorescent correspond à l'échelle microscopique à une population d'espèces individuelles dont 63,2 % sont revenues à un état non émissif après ce temps. τ_0 est de l'ordre de quelques nanosecondes. Pour faciliter les mesures de fluorescence, les instruments courants opèrent en régime stationnaire, c'est-à-dire en maintenant la source d'excitation allumée, avec, en contrepartie l'obligation évidente de différencier la lumière de la source et celle de fluorescence.

La figure 1 illustre par un exemple l'apparente symétrie en miroir des spectres d'absorbance et de fluorescence de nombreux composés. Pour obtenir cette représentation on réunit sur le même graphe avec une double échelle, le spectre en absorbance et celui en émittance.

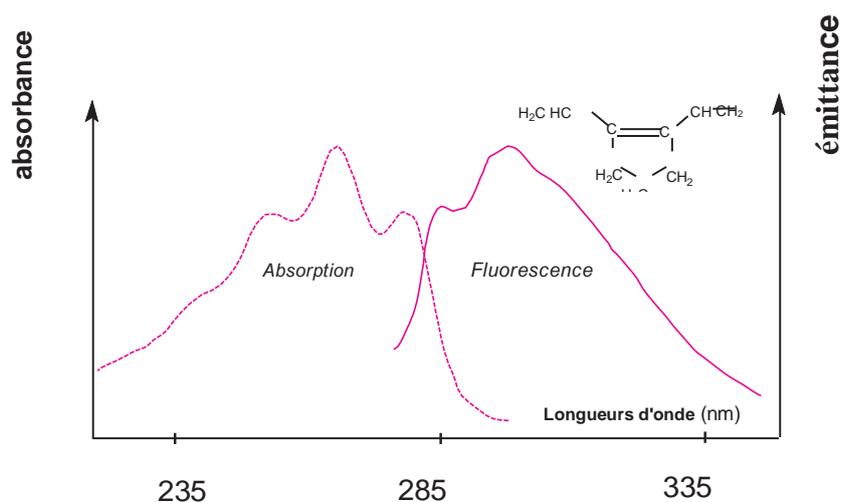


FIGURE 1 : Représentation sur un même graphe des spectres d'absorption et de fluorescence d'un composé éthylénique.

Le spectre de fluorescence qui ressemble à l'image dans un miroir du spectre d'absorption, ainsi que le « Stokes shift » peuvent s'interpréter en considérant les diagrammes énergétiques (fig. 1).

- **Fluorescence résolue dans le temps.** L'avènement de sources lumineuses à impulsions ultra-brèves (lasers picoseconde et diodes laser) permet d'accéder aux courbes de décroissance de la fluorescence en fonction du temps. De nouvelles applications basées sur la connaissance des durées de vie en découlent, mais elles sont encore peu nombreuses en analyse chimique.

3- Origine de la fluorescence

Soumise à l'excitation lumineuse, la molécule du composé (le soluté, dans l'état électronique fondamental S_0), est portée dans son premier état électronique excité S_1 . Ses électrons et ceux des molécules environnantes de solvant se rééquilibrent quasiment instantanément ; mais les positions des noyaux des atomes en revanche restent identiques à ce qu'elles sont dans l'état fondamental (c'est le principe de Franck-Condon). Le système soluté/cage de solvant étant ainsi hors-équilibre, il va évoluer vers une conformation plus stable de l'état électronique excité S_1 (Fig. 2). Très rapidement, (10^{-12} s), par des processus dits de *conversion interne*, les molécules rejoignent, sans émettre de photons, l'état V_0 du niveau S_1 . Si ce niveau est compatible avec le niveau fondamental le système peut y redescendre par une étape de fluorescence (10^{-11} à 10^{-8} s) au cours de laquelle les molécules retournent dans un des états vibrationnels de l'état S_0 initial en émettant des photons. Au cours de la fluorescence qui accompagne le retour à l'état initial, la molécule peut conserver une partie de l'énergie reçue sous forme d'énergie vibrationnelle. Cet excès d'énergie de vibration est dissipé par collisions ou autres processus non radiatifs baptisés mécanismes de *relaxation vibrationnelle*. Il peut se produire également une émission de photons beaucoup moins énergétiques, à l'origine d'une fluorescence située dans le moyen infrarouge.

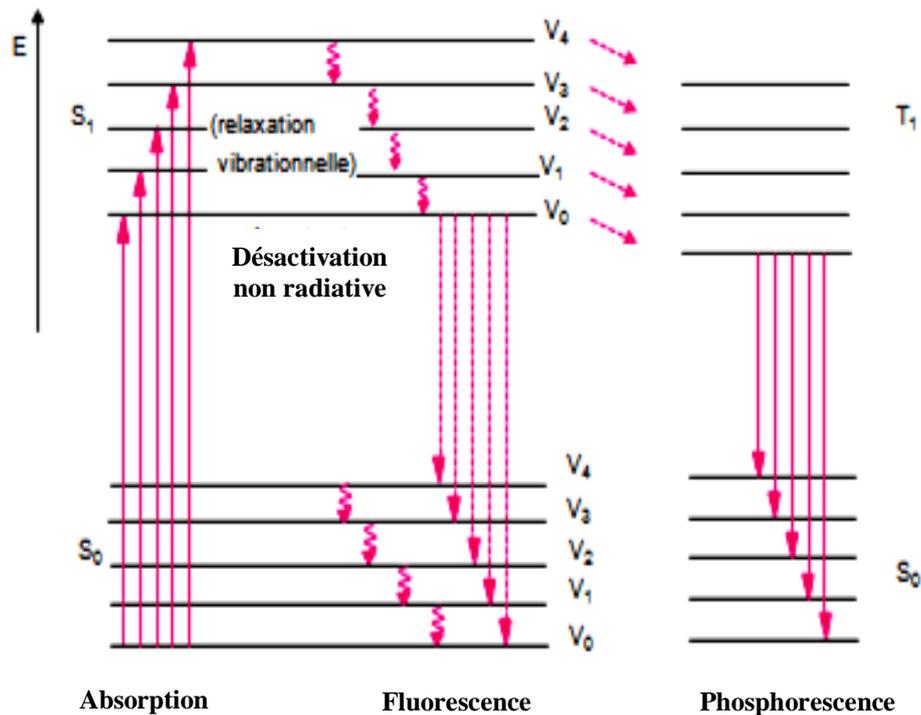


FIGURE 2 : Diagramme énergétique comparatif de la fluorescence et de la phosphorescence.

Les flèches courtes correspondent à des mécanismes de conversion interne sans émission de photons. La fluorescence résulte de transferts entre états de même multiplicité (même état de spin), et la phosphorescence entre états de multiplicités différentes.

L'état T_1 produit un retard dans le retour à l'état fondamental pouvant atteindre plusieurs heures. Le « *stokes shift* » correspond à l'énergie dissipée sous forme de chaleur (relaxation vibrationnelle) pendant la durée de vie de l'état excité, donc avant que les photons soient émis. La situation réelle est plus complexe que ce diagramme un peu trop simplifié, dit de **Jablonski**, peut le laisser supposer. À notre échelle, un composé peut être à la fois fluorescent et phosphorescent car à l'échelle moléculaire les espèces individuelles qui le composent n'ont pas le même comportement.

- **La phosphorescence** correspond à un mode de désexcitation plus complexe. Après la phase d'absorption correspondant au transfert d'un électron dans un niveau S_1 (état singulet), on assiste, si la relaxation vibrationnelle est assez lente, au retournement de spin de l'électron pour conduire à un état T_1 un peu plus stable (état triplet). De ce fait, le retour ultérieur au niveau fondamental est ralenti puisqu'il implique un nouveau retournement du spin de cet électron. Les durées de vies peuvent dépasser plusieurs minutes (**Fig.2**).
- La sensibilité en fluorimétrie est souvent 1 000 fois supérieure à celle que l'on connaît en absorption UV/visible. Cependant l'usage correct de ces techniques exige une bonne connaissance du phénomène afin d'éviter de nombreuses sources d'erreurs.

- **La fluorescence** est souvent le privilège des molécules cycliques, rigides et possédant des liaisons p. Elle est augmentée par la présence de groupes électro-donneurs et diminuée avec les groupes électro-attracteurs (**Fig. 3**). Elle dépend également du pH et du solvant. Les molécules non rigides par contre, perdent facilement la totalité de l'énergie absorbée par dégradation et relaxation vibrationnelle. Par analogie, on peut comparer ce phénomène à l'effet que produit un coup de marteau soit sur un bloc mou, caoutchouc par exemple, soit sur quelque chose de dur, comme une enclume. Sur le caoutchouc, l'énergie se disperse dans la masse (échauffement) et aucun bruit n'est émis, en revanche, sur l'enclume, une partie de l'énergie mécanique est retransmise vers l'extérieur (rayonnement sonore), phénomène comparable à la fluorescence.

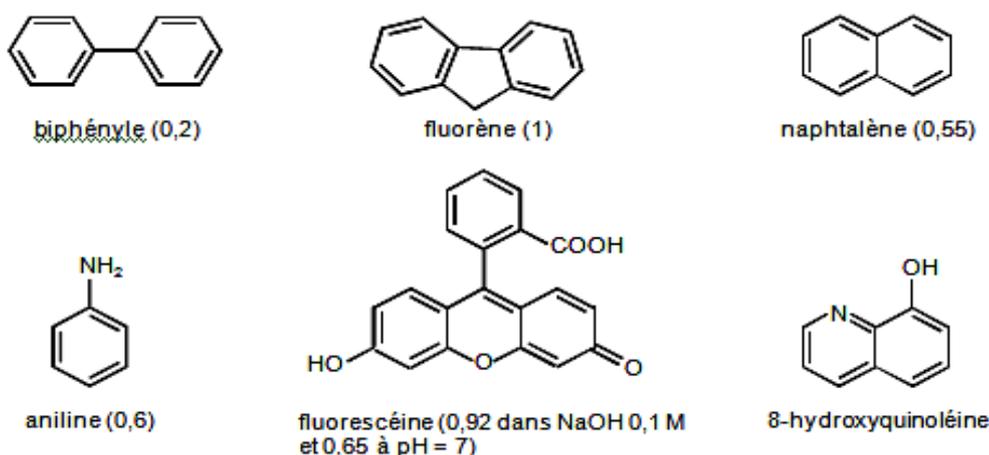


FIGURE 3 : Composés fluorescents aromatiques.

Le nom est suivi du rendement de fluorescence F_f (voir Fig .3) dont la valeur est obtenue de proche en proche par comparaison avec des composés de fluorescence connue. Les mesures sont faites à 77 K. La 8-hydroxyquinoléine est représentative de diverses molécules formant des complexes de chélation fluorescents avec certains ions métalliques.

4- Relation entre fluorescence et concentration

En chaque point de la solution l'intensité de fluorescence est différente parce qu'une partie de l'intensité de la radiation excitatrice est absorbée avant d'atteindre le point considéré et parce qu'une partie de la lumière de fluorescence se trouve piégée avant de sortir de la cellule. Globalement la fluorescence reçue par le capteur du détecteur correspond donc à la résultante des fluorescences de chacun des petits volumes individuels constituant l'espace délimité par les fenêtres d'entrée et de sortie. C'est pourquoi le calcul *a priori* de l'intensité de fluorescence (émittance I_f) de l'échantillon est difficile. Le phénomène d'affaiblissement lumineux appelé « filtre interne », dû au recouvrement partiel des spectres d'absorption et d'émission (*quenching couleur*) est augmenté des transferts d'énergie d'espèces excitées avec d'autres molécules ou ions étrangers par collisions ou formation de complexes (*quenching chimique*). Ainsi l'oxygène entraîne une sous-estimation de la fluorescence.

Pour les solutions, on définit le rendement quantique de fluorescence Φ_f (compris entre 0 et 1) par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés, ce dernier étant équivalent au rapport de l'intensité de fluorescence I_f sur l'intensité absorbée I_a (**relation 2**).

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a} \quad (2)$$

5- Diffusion Rayleigh et diffusion Raman

Si les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont voisines, il peut y avoir risque de confusion entre la fluorescence de l'échantillon et deux émissions parasites dues au solvant :

5-1- Diffusion Rayleigh

La diffusion Rayleigh est la réémission, à la même longueur d'onde, d'une petite fraction de la lumière excitatrice dans toutes les directions par le solvant dans lequel se trouve le composé (**Fig .4**). Son intensité dépend de la polarisabilité des molécules de ce solvant.

5-2- Diffusion Raman

La diffusion Raman, de 100 à 1 000 fois plus faible que la diffusion Rayleigh, provient du transfert d'une partie de l'énergie de la lumière excitatrice aux molécules de solvant sous forme d'énergie de vibration. Les molécules de solvant réémettent donc des photons de moindre énergie que ceux ayant servi à les exciter. Par rapport à la diffusion Rayleigh, le pic de diffusion Raman est déplacé vers les grandes longueurs d'onde. Pour chaque solvant la différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons réémis est constante, si bien qu'en modifiant la longueur d'onde d'excitation, on déplace la position du pic Raman (**Tab. 1 et Fig. 4**).

Tableau 1 : Positions des pics Raman, calculées pour quatre solvants usuels et cinq longueurs d'onde excitatrices d'une lampe à mercure

| Excitation (nm) | 254 | 313 | 365 | 405 | 436 | écart (cm ⁻¹) |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------|
| eau | 278 | 350 | 416 | 469 | 511 | 3 380 |
| ethanol | 274 | 344 | 405 | 459 | 500 | 2 920 |
| cyclohexane | 274 | 344 | 408 | 458 | 499 | 2 880 |
| chloroforme | 275 | 346 | 410 | 461 | 502 | 3 020 |

- La diffusion Raman de l'eau sert de test de sensibilité des fluorimètres. Celui-ci consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic Raman avec une cellule remplie d'eau, par exemple à 397 nm ($25\,191\text{ cm}^{-1}$) si l'excitation est réglée à 350 nm ($28\,571\text{ cm}^{-1}$), par suite du décalage de 3380 cm^{-1} propre à ce solvant.

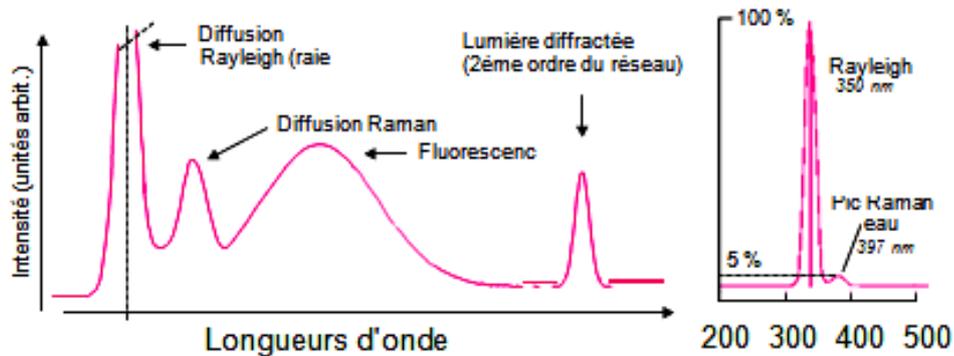


FIGURE 4 : Les diverses composantes d'un spectre de fluorescence.

La position de la raie Raman dépend de la longueur d'onde de la raie excitatrice et du solvant. À droite, test de sensibilité d'un fluorimètre.

- La fluorescence n'est pas seulement mise à profit à des fins d'analyse. C'est ainsi qu'on ajoute aux poudres à laver le linge un additif fluorescent destiné à s'accrocher aux fibres textiles. Ce composé absorbe les radiations solaires invisibles pour l'œil et restitue l'énergie captée sous forme de radiations de plus grande longueur d'onde, dans la partie bleue du spectre visible.

6- Instrumentation

Le composé fluorescent qui fait l'objet du dosage se comporte comme une source qui irradie dans toutes les directions. Par construction, l'appareil recueille en général la lumière émise suivant un axe qui est perpendiculaire au faisceau de la lumière en provenance de la source excitatrice. Pour les solutions fortement absorbantes, l'observation peut se faire dans le prolongement du faisceau incident et pour les échantillons opaques ou semi-opaques dans une direction frontale sous un angle variable (Fig. 5). La source excitatrice est souvent constituée par une lampe à arc xénon de 150 à 800 watts. La mesure de l'intensité lumineuse est faite par un photomultiplicateur ou une photodiode.

Le solvant, la température, le pH et la concentration sont autant de paramètres qui interviennent sur les intensités de fluorescence.

Certains gaz à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre sont quantifiés à partir de leur fluorescence rétrodiffusée, induite par excitation d'une très courte impulsion (1 ms) d'un puissant laser monochromatique qu'il est possible d'accorder sur une longueur d'onde spécifique du composé recherché (dispositif appelé lidar).

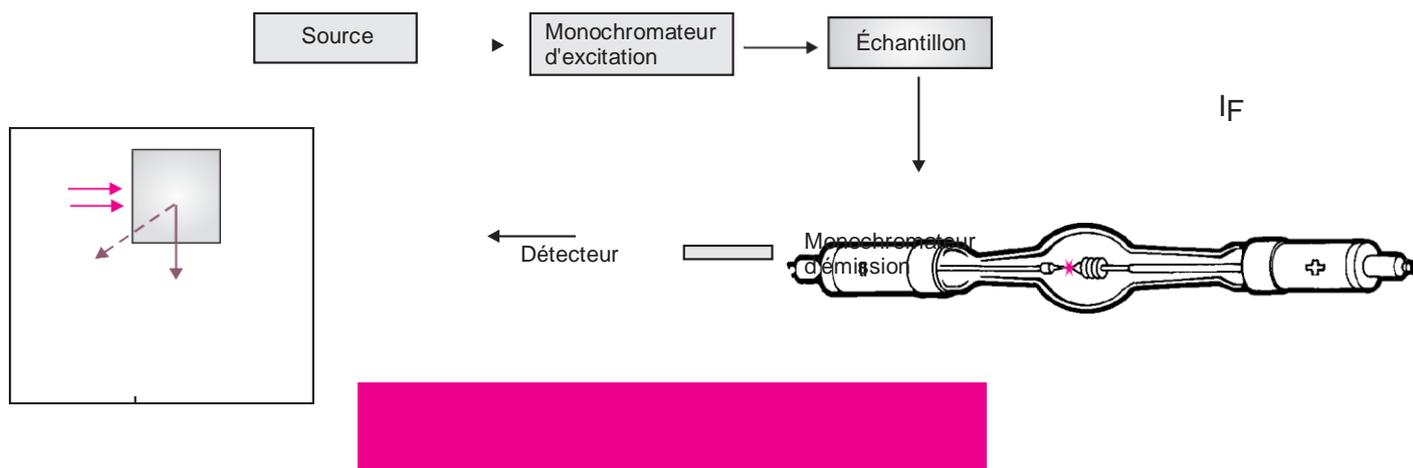


FIGURE 5 : Agencement des différentes composantes d'un spectrofluorimètre et lampe à arc xénon.

La fluorescence est mesurée en régime permanent « steady state », en maintenant l'excitation, à la différence de l'étude de la fluorescence dynamique. Deux géométries, angle droit et angle aigu, sont utilisées pour l'examen de la lumière émise. Modèle de lampe à arc xénon. La pression de xénon dans la lampe est d'environ 1 MPa. Ces lampes à arc sans filament, à enveloppe en verre de silice, sont des sources de « lumière blanche ». La cathode correspond à l'électrode la plus fine.

Deux grandes catégories d'appareils sont proposées par les constructeurs :

- les fluorimètres à rapport de fluorescence,
- les spectrofluorimètres.

6-1- Fluorimètres à rapport de fluorescence (méthode ratiométrique)

La lumière émise par la source traverse d'abord le monochromateur d'excitation qui permet de sélectionner la bande étroite de longueurs d'onde (15 nm) qui va servir à exciter l'échantillon. Une partie de la fluorescence émise par le composé est captée dans une direction perpendiculaire ou parallèle (selon les modèles) au faisceau incident. Cette lumière traverse le monochromateur d'émission qui sélectionne la longueur d'onde de mesure avant d'atteindre le détecteur. De nombreux constructeurs commercialisent des modèles avec filtres (**Fig. 6**). Ces appareils sont de type monofaisceau. Ils comportent un compartiment à tourelle dans laquelle sont placées à la fois les cuves contenant les solutions étalons, l'échantillon ainsi qu'une cuve remplie d'un composé à usage de standard fluorescent. En alternant sur le trajet optique les solutions étalons et échantillon et le standard fluorescent on mesure le rapport de fluorescence qui sert à la fois à construire la courbe d'étalonnage et, pour l'échantillon, de paramètre de mesure. On élimine ainsi les fluctuations possibles de la source et bon nombre de paramètres de réglage de l'appareil. Les standards courants utilisés dans cette méthode ratiométrique sont généralement des solutions de sulfate de quinine, de rhodamine B ou de 2-aminopyridine.

L'emploi d'une lampe flash xénon comme source permet d'étudier la fluorescence après extinction de la source. Cette méthode est connue en immunologie où les complexes fluorescents obtenus avec les sels de lanthane ont une durée de vie de fluorescence d'environ 1 ms, suffisante pour être à l'origine de dosages très sensibles (de l'ordre de la picomole).

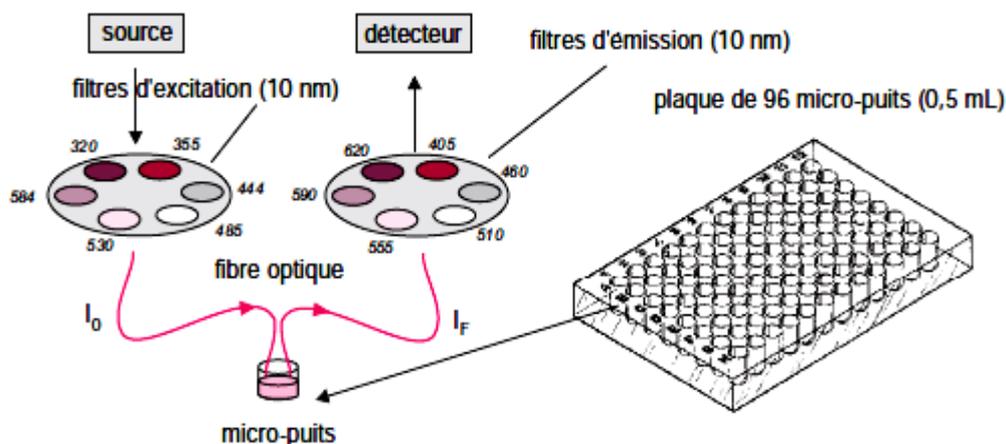


FIGURE 6: Schéma optique simplifié d'un fluorimètre à lecteur de micro-puits.

Une fibre optique amène la lumière excitatrice au niveau du puits choisi et une seconde fibre récupère la fluorescence, ici sous une géométrie frontale. Pour le contrôle des résultats en chimie combinatoire et autres méthodes de screening en immunologie/enzymologie, ces fluorimètres peuvent recevoir des microplaques comportant de 6 à 384 puits.

6- 2- Spectrofluorimètres

Les spectrofluorimètres sont dotés de fonctions qui leur permettent l'étude plus complète des composés fluorescents, notamment par l'enregistrement de leurs spectres d'émission et d'excitation (Fig. 7). Ils disposent de deux monochromateurs motorisés pouvant balayer chacun une bande spectrale. On obtient le spectre d'émission en maintenant la longueur d'onde d'excitation fixe, et le spectre d'excitation en maintenant la longueur d'onde d'émission fixe.

Les spectrofluorimètres disposent de logiciels qui peuvent déterminer automatiquement le meilleur couple de longueurs d'onde excitation/émission.

Manuellement le processus peut se faire par la méthode dite « un seul facteur à la fois » :

- on enregistre le spectre UV du composé avec un spectrophotomètre UV/VIS ;
- on règle le monochromateur d'excitation à la valeur correspondant au maximum du spectre d'absorption ;
- on enregistre le spectre de fluorescence ;
- on règle le monochromateur d'émission à la longueur d'onde du maximum de fluorescence et on fait varier la longueur d'onde d'excitation. On obtient le spectre d'excitation qui permet un meilleur choix final de la radiation excitatrice (qui peut être distincte de celle correspondant au maximum d'absorption du spectre UV).

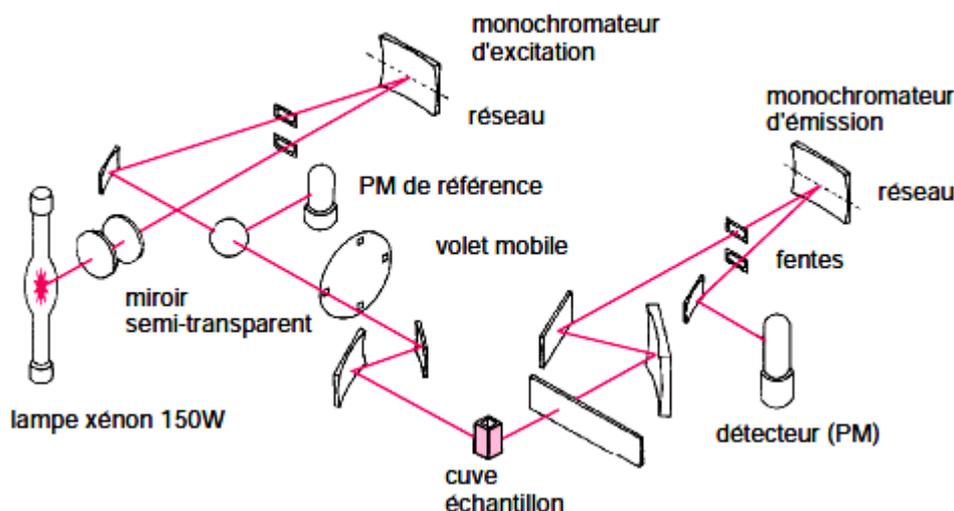


FIGURE 7 : Schéma du spectrofluorimètre Shimadzu F-4500.

Une fraction du faisceau incident, réfléchi par un miroir semi-transparent, arrive sur une photodiode de référence. La comparaison des signaux des deux détecteurs permet d'éliminer la dérive de la source. Ce procédé à un seul faisceau permet d'obtenir la stabilité propre aux appareils à double faisceau. Les spectres présentent souvent des petites différences lorsqu'ils proviennent d'appareils différents (reproduit avec l'autorisation de la société Shimadzu).

Certains instruments permettent la mesure des durées de vie de fluorescence, bien que celles-ci soient très courtes. Il existe plusieurs méthodes basées soit sur l'enregistrement de la courbe de décroissance de la lumière émise lorsque l'excitation a cessé, soit sur la comparaison de la modulation de la fluorescence en fonction d'une modulation rapide de l'excitation. La première méthode impose d'utiliser une source pulsée (laser) et la seconde une source modulée de fréquence élevée. En analysant le signal obtenu (modulation et phase) en fonction de la fréquence de la source excitatrice, il est ainsi possible de calculer la durée de vie de fluorescence.

7 - Quelques applications de la fluorescence

En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle (moins de 10 % de l'ensemble des composés), beaucoup peuvent le devenir par le biais d'une modification ou d'une association avec une autre molécule fluorescente. On peut greffer par exemple sur l'analyte un réactif fluorophore par réaction chimique (les 7-hydroxycoumarines peuvent être utilisées à cet effet). C'est la *dérivation de fluorescence*, qui rappelle le procédé employé en colorimétrie.

Pour doser les métaux sous forme de cations, on forme des complexes de chélation avec l'oxine (8-hydroxyquinoléine), l'alizarine ou la benzoïne, extractibles par les solvants organiques.

En biochimie, la fluorescence trouve de nombreuses applications pour quantifier les protéines ou les acides nucléiques au moyen de réactifs qui se fixent spécifiquement sur ces composés. Cette approche, quelquefois très élaborée, en association avec l'électrophorèse, constitue une alternative plus sensible et moins contraignante que la révélation au moyen de substrats radioactifs.

- **La chimifluorescence** (à ne pas confondre avec la chimiluminescence) est également un moyen particulièrement sensible de détection de protéines spécifiques. On doit disposer pour cela d'un anticorps spécifique porteur d'un conjugué enzymatique, tel une phosphatase (**Fig. 8**). Mis en présence d'un substrat tel un dérivé phosphaté de la fluorescéine, il y a libération de cette dernière facile à mettre en évidence par sa fluorescence déclenchée par une source excitatrice.

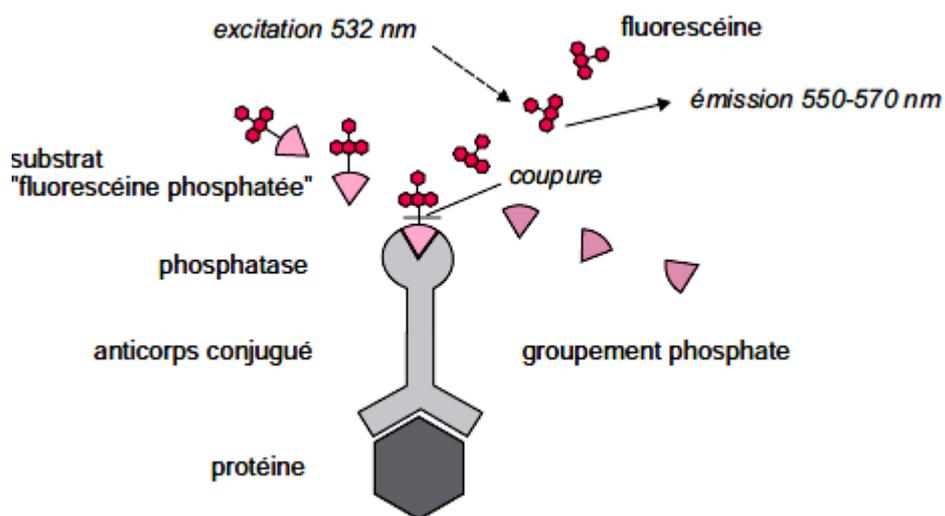


FIGURE 8: Processus d'un dosage de protéine par chimifluorescence en biochimie.

En analyse par CLHP, on peut ainsi marquer les amines (avec d'autres coumarines), ce qui permet des seuils de détection extrêmement bas, de l'ordre de l'attomole (10^{-18} M). Parmi les applications classiques actuelles de la fluorescence, figurent les dosages des hydrocarbures polycycliques aromatiques (« HPA ») dans les eaux de consommation, par CLHP. Dans ce cas, le détecteur est muni d'une cellule de fluorescence à circulation, installée en aval de la colonne du chromatographe. Ce mode de détection est particulièrement bien adapté pour atteindre les seuils très bas imposés par la législation. Ce même procédé permet de doser également les aflatoxines, ainsi que de nombreux autres composés organiques.

CHAPITRE III :

SPECTROSCOPIE A ABSORPTION ATOMIQUE

1. Introduction

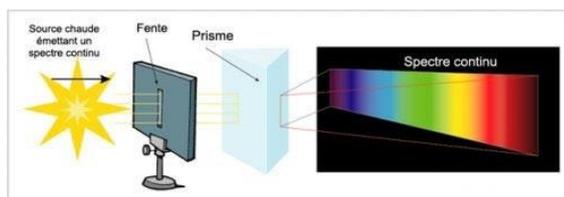
La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et l'émission de flamme (EF), encore appelée photométrie de flamme, permettent de doser dans pratiquement toute sorte d'échantillon, un ou plusieurs éléments prédéfinis choisis dans une liste en contenant environ 70 (métaux et non métaux). Les appareils correspondants fonctionnent pour la plupart suivant l'une ou l'autre de ces méthodes, bien que le principe des mesures soit différent. Les applications sont très nombreuses étant donné qu'on atteint pour certains éléments des concentrations inférieures au $\mu\text{g/L}$.

2. Illustration et interprétation des phénomènes concernés : Expérience de Kirchhoff

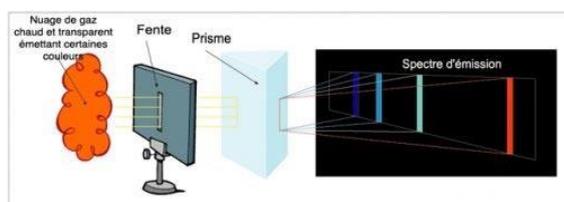
Vieilles de plus d'un siècle les expériences de Kirchhoff, à qui l'on doit également l'invention du spectroscope, permettent d'illustrer les principes de l'absorption et de l'émission atomique (**Fig 1**).

Lorsqu'on disperse la lumière émise par une source polychromatique (lampe à incandescence ou arc électrique) avec un prisme, on obtient un spectre continu. Si on substitue à la source précédente un bec Bunsen dans lequel on projette un peu de chlorure de sodium, on obtient le spectre de raies d'émission de cet élément, qui montre le doublet jaune bien connu situé vers 589 nm. Cette partie de l'expérience illustre l'émission de flamme (émission atomique).

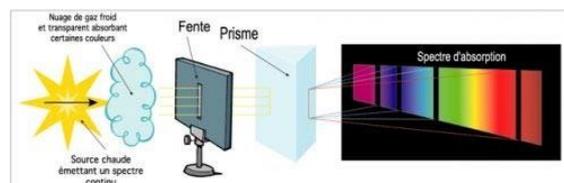
Enfin si on associe les deux sources précédentes en plaçant sur le trajet optique de la flamme du bec Bunsen, en aval de la source polychromatique, on obtient sur l'écran un spectre comparable à celui présenté ci-dessous, si ce n'est qu'il apparaît des raies sombres à l'endroit des raies d'émission de l'élément. Ce « renversement des raies » résulte de la présence, dans la flamme, d'une large proportion d'atomes restés à l'état fondamental, donc absorbant la lumière à 589 nm. C'est une manifestation de l'absorption atomique.



Spectre continu



Na est présent sous une forme qui émet la lumière



Na est présent sous une forme qui absorbe la lumière

FIGURE 1 : Illustration de l'expérience de Kirchhoff

Cette expérience traduit l'existence d'états d'énergie potentielle parfaitement définis pour chaque atome et qui dépendent de sa configuration électronique. Lorsqu'un atome à l'état libre est porté à une température élevée, ou irradié avec une source lumineuse du domaine du proche UV/Visible, on favorise le passage d'un de ces électrons externes, de l'état fondamental où il se trouve, à un état excité. Ce transfert correspond à une absorption d'énergie. Inversement, lorsque l'atome revient spontanément à son état fondamental, il peut réémettre cet excédent d'énergie sous forme d'un ou plusieurs photons. Dans les expériences précédentes, la flamme provoque les transitions les plus probables de l'atome de sodium.

3. Domaines d'application

3.1. La spectroscopie d'absorption

La spectrométrie par absorption atomique permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques à l'état de traces (quelques mg/litre). L'analyse se base sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental, et on utilise à cet effet en général des solutions sauf dans le cas des hydrures. Une préparation est donc souvent nécessaire : dissolution d'un alliage par exemple.

La méthode est :

- Quantitative
- Relative : il faut donc faire une courbe d'étalonnage Cette méthode présente de nombreux avantages :
 - Elle est très sélective, il n'y pas d'interférences spectrales ou alors elles sont connues ;
 - La technique est simple si on sait préparer les solutions initiales ;
 - Elle est très documentée : tous les pièges sont connus et répertoriés dans le manuel livré avec l'appareil!

Cependant, on peut noter un certain nombre de limites :

- Pour des raisons technologiques et non de principes, certains éléments, comme les gaz rares, les halogènes... ne peuvent être analysés par spectrométrie, leur énergie d'absorption n'étant pas comprise entre 180 et 1000 nm).
- Les concentrations doivent être à l'échelle de traces afin de rester dans le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert, car sa dynamique est limitée. L'existence d'interférences chimiques sévères complique parfois (*exemple*: calcium/phosphore).
- L'aspect non qualitatif de la technique impose la connaissance des éléments à doser afin de choisir la source adaptée
- Les réglages préliminaires se basent sur des paramètres qui ne sont pas toujours indépendants.

3.2. La spectroscopie d'émission

La plupart des éléments ($\gg 60$) du tableau périodique peuvent être analysés par absorption atomique. *Pourquoi alors recourir à des méthodes telles que l'émission atomique?* Or les techniques d'émission atomique en flamme et en plasma sont largement utilisées, ce qui ne serait pas le cas si les chimistes analytiques n'y voyaient pas des avantages par rapport à la spectroscopie d'absorption.

Les techniques d'émission atomique présentent deux avantages majeurs :

- Certains éléments peuvent être analysés avec une plus grande sensibilité et moins d'interférences ;
- L'émission atomique permet d'effectuer des analyses qualitatives, ce qui n'est pas le cas en absorption. En effet, c'est l'échantillon lui-même qui est la source de lumière dans une spectroscopie d'émission. Cela signifie que plusieurs éléments peuvent être analysés simultanément, ce qui représente un gain de temps appréciable, et donc un gain d'argent, même si un spectromètre d'analyse multi-éléments en émission coûte beaucoup plus cher qu'un spectromètre d'absorption atomique.

4. Principe de fonctionnement de la spectroscopie d'absorption

4.1. Fondements des méthodes de mesure par absorption atomique

4.1.1. Règle de Bohr

Dans le cas particulier de l'absorption atomique, on travaille sur des atomes libres à l'état fondamental ($W_i = 0$). Ces atomes peuvent absorber des photons et passer ainsi à leurs différents états excités peu nombreux à cause des règles de sélection qui interdisent le nombre total de combinaisons que l'on pourrait réaliser entre les états excités et l'état fondamental (**Fig .2**). Pour un atome, on peut donc faire de l'absorption sur les raies qui correspondent au passage état fondamental - états excités, mais avec une sensibilité différente liée aux coefficients d'Einstein différents pour chaque niveau excité. Ces raies sont appelées raies de résonance bien que l'on réserve quelquefois cette appellation à la plus sensible d'entre elles.

On peut schématiser cette interaction matière-rayonnement par la figure suivante (**Fig 2**) :

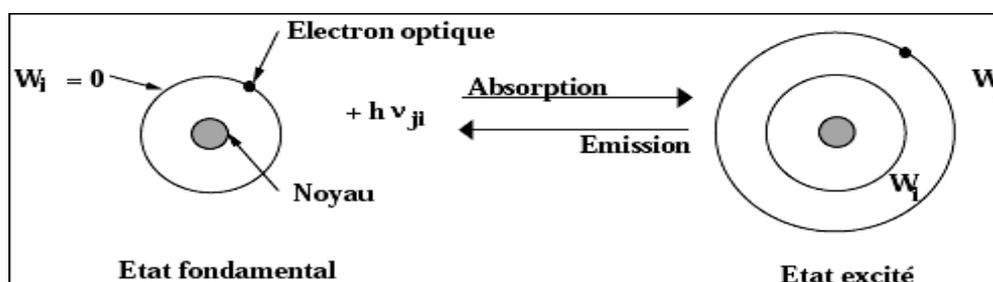


FIGURE 2 : Interaction rayonnement - matière

Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments que l'on a décidé de doser.

4.1.2. Remarque sur la validité de la loi de Bohr

Cette représentation et l'application de la règle de Bohr sont insuffisantes pour rendre compte des observations. En effet, d'après ce qui précède, on n'explique pas la "largeur" des raies d'émission et d'absorption. Or celle-ci est déterminante dans le choix de la technique utilisée, notamment au niveau du choix de la source lumineuse.

Voyons d'abord l'origine de ces largeurs de raies, puis la façon dont on s'accommode techniquement de ce phénomène.

D'après la loi de Bohr, les niveaux d'énergie et les spectres devraient présenter l'allure suivante (Fig 3):

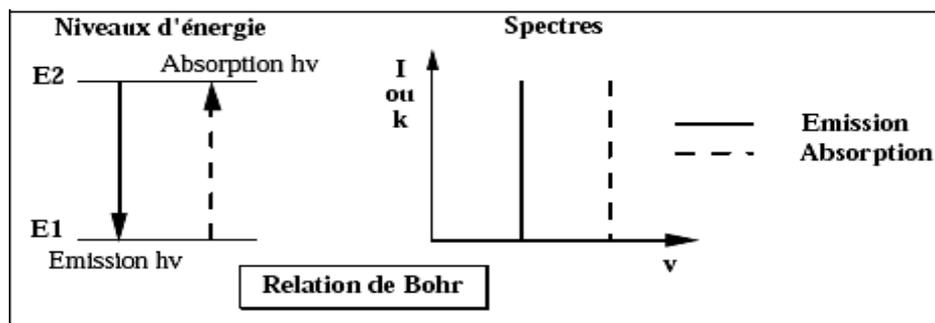


FIGURE 3 : Spectres d'après la loi de Bohr

4.1.3. Largeur des raies spectrales et des profils d'absorption

Si l'on examine les deux raies monochromatiques (jaunes) du sodium émises par une lampe à décharge avec un appareil suffisamment résolvant, on constate que les photons émis occupent un domaine étroit mais non nul, donc les raies ont une certaine "largeur". Pour les spectroscopistes, il existe trois causes principales de l'existence de cette largeur :

- Le principe d'incertitude, à l'origine de la largeur "naturelle"
- L'effet Doppler, responsable de la largeur Doppler
- Les collisions entre émetteurs ou absorbeurs, conduisent à la largeur "Lorentz"

La largeur de la raie est mesurée à mi-hauteur de la raie (valeur de l'intensité égale à la moitié de l'intensité I_{\max} au centre de la raie).

4.2. Remarques sur les largeurs

On peut provoquer un "élargissement" des raies d'émission et des profils d'absorption en appliquant des champs magnétiques (effet **Zeeman**) ou électriques (effet **Stark**) aux atomes. Il s'agit plutôt d'une "multiplication" des raies plutôt que d'un élargissement, les composantes du multiplet pouvant avoir la même largeur que la raie ou le profil sans champ, la séparation des composantes étant liée à l'intensité du champ, ou pourrait croire à un simple élargissement pour les champs faibles.

Les effets liés à la pression sont complexes et peuvent provoquer des déplacements des maxima des raies et des profils d'absorption.

5. Mise en œuvre de la technique

L'appareil est schématisé ci-dessous (Fig 4)

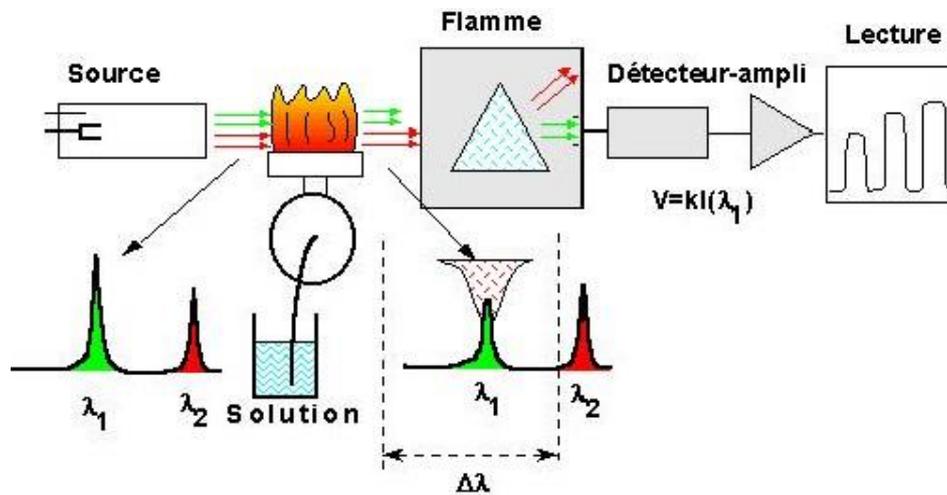


FIGURE 4 : Schéma de principe du spectrophotomètre d'absorption atomique

a. Sources

Comme on l'a vu au paragraphe précédent, les raies d'émission, mais aussi les profils d'absorption ne sont pas discrets. Ils ont une certaine largeur. L'idéal serait d'utiliser une raie monochromatique de la longueur d'onde correspondant au maximum du profil d'absorption. Mais pour obtenir une telle raie, il faudrait des monochromateurs de très haute qualité, ce qui rend l'appareil très cher. Les monochromateurs qu'on utilise habituellement ont une bande passante beaucoup plus large que la bande dans laquelle un atome absorbe. Avec une telle source de lumière "continue", une mesure est possible mais la sensibilité est très basse car seule une très faible partie de l'intensité est absorbée par les atomes (Fig. 5). Voyons cela sur la figure suivante:

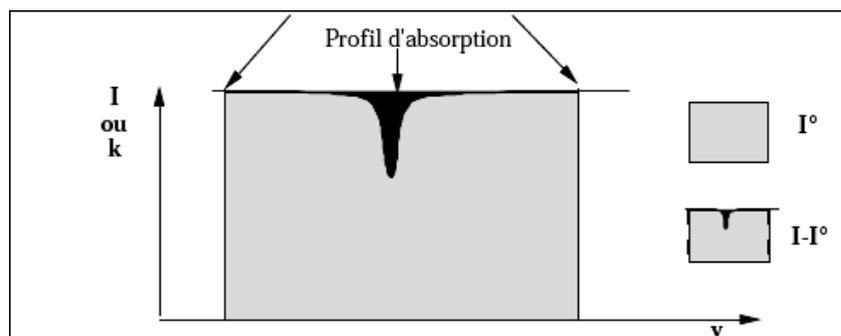


FIGURE 5 : Cas d'une trop grande bande passante du monochromateur d'où une sensibilité faible

Pour éviter ce problème lié à une trop grande largeur de la bande passante du monochromateur, on utilise des lampes à cathode creuse.

Le problème créé par l'étalement des pics d'absorption a été résolu au milieu des années 1950, en utilisant une source qui émet une raie de même longueur d'onde que celle qui a été sélectionnée pour les mesures d'absorption, mais plus étroite. Par exemple, on choisira une lampe à vapeur de mercure comme source de rayonnement externe pour le dosage du mercure. Les atomes de mercure gazeux excités électriquement dans cette lampe reviennent à l'état fondamental en émettant un rayonnement aux longueurs d'onde exactes où les atomes de mercure de l'analyte dans la flamme sont susceptibles d'absorber.

La température de la lampe est inférieure à celle de la flamme. Il s'ensuit que l'élargissement des raies d'émission du mercure de la lampe dû à l'effet Doppler et à la pression est inférieur à celui des raies d'absorption de l'analyte dans la flamme. En d'autres termes, la bande passante des raies émises par la lampe est plus étroite que celle des pics d'absorption de l'analyte dans la flamme.

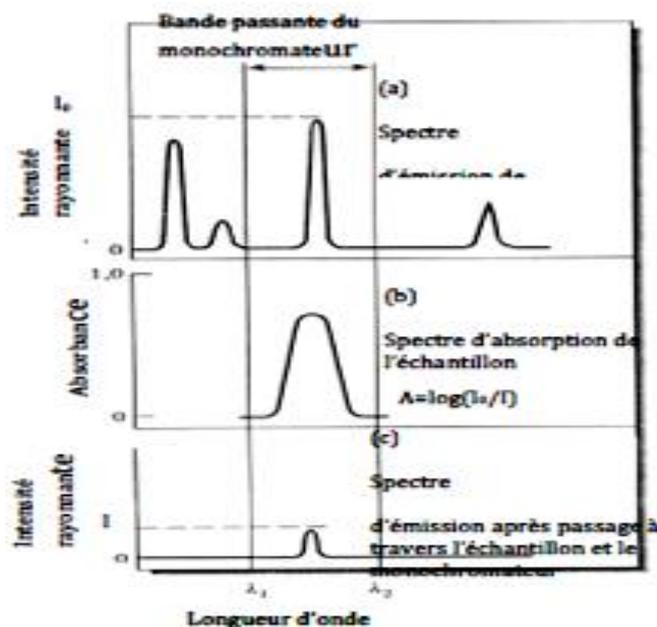


FIGURE 6 : Mesure des absorbances dans les méthodes d'absorption atomique

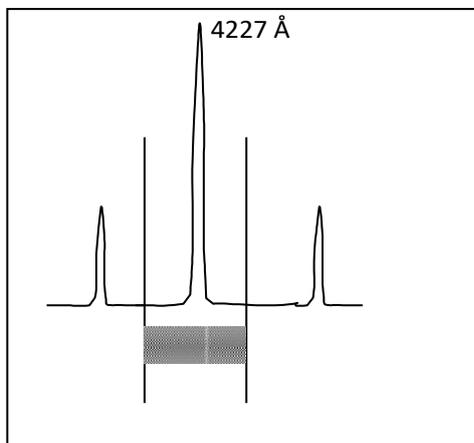
La figure ci-dessus illustre la stratégie à laquelle on recourt pour mesurer les absorbances dans les méthodes d'absorption atomique. La figure 6 (a) présente l'émission de quatre raies étroites à partir d'une lampe de spectroscopie atomique et la sélection d'une seule de ces raies par un filtre ou un monochromateur. La figure 6 (b) représente le spectre d'absorption de flamme de l'analyte entre les longueurs d'onde λ_1 et λ_2 ; notez que le pic d'absorption dans la flamme est nettement plus étalé que la raie d'émission de la source. Comme le montre la figure (c), l'intensité du faisceau incident I_0 se réduit à I après passage à travers l'échantillon. Puisque la raie d'émission de la lampe est plus étroite que le pic d'absorption dans la flamme, les conditions de validité de la loi de Beer sont satisfaites.

On utilise en spectrométrie deux types de sources:

- la lampe à cathode creuse (la plus répandue)
- la lampe LED

5.1.1. La lampe à cathode creuse

La lampe à cathode creuse est une source discontinue émettant des raies fines caractéristiques des atomes constituant la cathode. Dans ce spectre on isole la raie de résonance.



Exemple : λ_r du Calcium est égale à 4227 Å. La lampe au Calcium émet le spectre de Ca dans lequel se trouve la raie 4227 très pointue (0,01 Å – 0,02 Å), bien isolée. Il suffit de ne laisser passer que cette raie d'analyse.

La source la plus utilisée en spectroscopie d'absorption atomique est la lampe à cathode creuse. Elle consiste en une anode en tungstène et une cathode creuse scellées dans un tube de verre qui contient un gaz inerte, tel que l'argon, à une pression de 1 à 5 torrs. La cathode est constituée de la forme métallique de l'analyte, ou encore elle sert de support à une couche de ce métal (**Fig 7**).

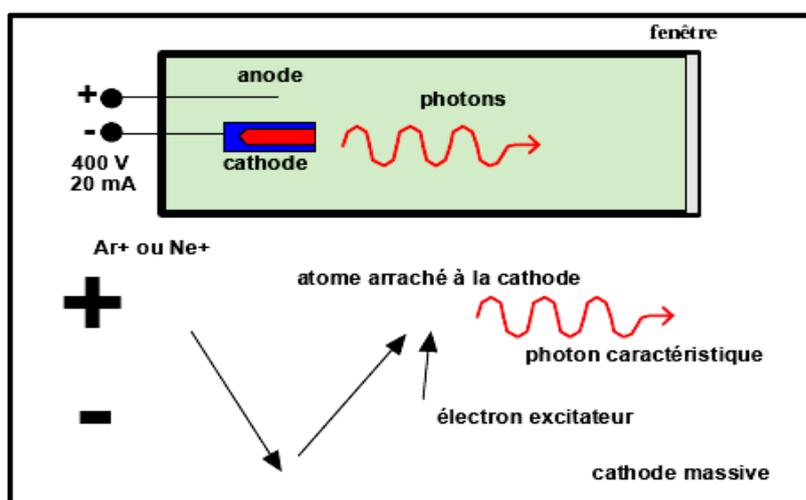


FIGURE 7 : Lampe à cathode creuse

L'application d'un potentiel d'environ 300 V entre les électrodes provoque l'ionisation de l'argon et l'apparition d'un courant de 5 à 10 mA lié au déplacement des cations d'argon vers la cathode et des électrons vers l'anode. Si le potentiel est assez élevé, les cations d'argon frappent la cathode avec une énergie suffisante pour arracher des atomes métalliques et produire ainsi une vapeur atomique ; ce procédé s'appelle la pulvérisation cathodique. Certains des atomes métalliques arrachés à la cathode passent à l'état excité et émettent leurs longueurs d'onde caractéristiques en revenant à l'état fondamental. Il est utile de rappeler que les atomes qui émettent les raies d'émission dans la lampe sont à une température beaucoup plus basse que les atomes d'analyte dans la flamme. Les raies d'émission de la lampe sont donc moins larges que les pics d'absorption de la flamme.

Les atomes métalliques pulvérisés dans la lampe se déposent ensuite sur la surface de la cathode ou sur les parois de la lampe.

On trouve sur le marché des lampes à cathode creuse pour environ 40 éléments. L'apparition de la lampe à cathode creuse est considérée comme l'événement le plus important de l'histoire de la spectroscopie d'absorption atomique.

Généralement la cathode est mono élément, ce qui impose une lampe par élément à doser. Certaines lampes à cathode creuse sont équipées d'une cathode constituée de plusieurs éléments; de telles lampes produisent des raies spectrales permettant le dosage de plusieurs espèces (Ex : Fe Co Ni, Na K, Cu Pb Zn). La sélectivité de la lampe mono élément permet cependant de limiter les risques d'interférences spectrales.

5.1.2. La lampe LED

La lampe EDL (Electrodeless Discharge Lamp) est utilisée pour des éléments comme l'aluminium, l'arsenic, le bismuth, le cadmium, le césium, le mercure, le phosphore ou le zinc.

Une petite quantité d'un de ces éléments, sous forme de sel, voire de combinaison avec un ou plusieurs autres éléments, est placée dans un bulbe de quartz contenant un gaz inerte. Le bulbe est placé dans un cylindre en céramique entouré par une bobine. Lorsque le courant passe dans la bobine, un champ se crée, ionise le gaz inerte et excite les atomes se trouvant à l'intérieur du bulbe, atomes qui émettent alors leur spectre caractéristique.

La lampe EDL donne parfois de meilleures performances et possède une durée de vie supérieure à celle de la lampe à cathode creuse.

5.1.3. Autres types de lampes : Lampes a haute brillance - lampes a décharge sans électrode

Les lampes à décharge sans électrode produisent également des spectres de raies atomiques ; leurs intensités de rayonnement sont généralement de 10 à 100 fois plus élevées que celles des lampes à cathode creuse. Ces lampes sont constituées d'un tube en quartz scellé contenant un gaz inerte, tel que l'argon, à une pression de quelques torr, et une petite quantité de l'élément à analyser sous forme métallique ou parfois sous celle de l'un de ses sels. La lampe ne comporte pas d'électrode, l'énergie étant fournie par un champ électromagnétique intense de fréquence radio ou micro-onde. L'argon s'ionise dans ce champ et les ions Ar^+ produits sont accélérés jusqu'à ce qu'ils aient assez d'énergie pour exciter (par collision) les atomes du métal considéré.

On trouve sur le marché des lampes à décharge sans électrode pour plusieurs éléments. Leurs performances ne semblent pas se comparer à celles des lampes à cathode creuse (elles sont moins bonnes).

5.2. Atomisation

La méthode de dosage par absorption atomique nécessite d'avoir les atomes à l'état fondamental, afin d'observer les raies caractéristiques de l'élément. L'atomiseur doit fournir ces atomes. Il s'agit ensuite de relier l'absorption causée par ceux-ci à leur nombre et ensuite ce nombre à leur concentration dans la solution à doser.

Pour obtenir des atomes libres, deux méthodes sont possibles suivant les éléments que l'on a à doser.

- Si l'on doit doser du mercure ou des éléments pouvant former des hydrures, ceux-ci sont facilement libérés sous forme atomique.
- Pour les autres éléments, il faut atomiser.

Pour obtenir des atomes libres à partir d'un échantillon, une technique consiste à chauffer l'échantillon de telle sorte que l'énergie thermique dissocie les particules (atomes ions ou molécules). Dans bien des cas, il faudra un chauffage énergique et une température élevée pour obtenir des atomes isolés.

5.2.1. Atomisation par flamme

5.2.1.1. Répartition des atomes dans la flamme

On pourrait penser que l'atomisation dans la flamme fournit essentiellement des atomes dans des états excités, puisque la température de la flamme est usuellement de l'ordre de 2000 à 3000 K.

En fait, lors de la dissociation thermique des molécules ou des sels, une très large proportion des atomes se trouve à l'état fondamental. Montrons cela par un petit calcul basé sur la distribution de **Boltzmann**:

Quand la solution est vaporisée dans la flamme, on obtient une population de N atomes dans différents états W_K : la répartition entre ces différents états dépend de la température T (en K) de la flamme que l'on suppose en équilibre thermodynamique. On peut calculer le nombre d'atomes N_j dans l'état W_j (énergie d'excitation) par rapport, soit au nombre total N d'atomes libres, soit au nombre N_i d'atomes à l'état fondamental (on choisit $W_i = 0$).

La loi de répartition de **Boltzmann** s'écrit en effet :

$$N_j = N \frac{g_j \exp(-W_j/K T)}{\sum_K g_K \exp(-W_K/K T)} = N_i \frac{g_j}{g_i} \exp(-W_j/K T)$$

avec K constante de **Boltzmann** : $K=1,38 \cdot 10^{-16}$ ergs K^{-1}

Avec les flammes utilisées en absorption atomique (2 000 à 3 000 °K), la valeur de N_j est souvent très faible.

5. 2.1.2. Les atomiseurs par flamme

Un atomiseur de flamme est constitué d'un nébuliseur pneumatique qui transforme l'échantillon en un brouillard, ou aérosol. Celui-ci est ensuite injecté dans un brûleur. Ce processus de transport de liquide est appelé aspiration. Sous l'effet de la grande vitesse du gaz, le liquide se disperse en fines gouttelettes de diverses tailles qui sont amenées dans la flamme. On emploie également des nébuliseurs à flux croisés où le gaz à haute pression s'écoule perpendiculairement à l'orifice du capillaire. Dans ce type de nébuliseur, le liquide est souvent pompé à travers le capillaire. Dans la plupart des atomiseurs, le gaz à haute pression est le comburant, et l'aérosol contenant le comburant est ensuite mélangé au combustible.

L'exemple d'un brûleur à flux laminaire commercial qui emploie un nébuliseur à tubes concentriques est très étudié. L'aérosol est mélangé avec le carburant et traverse une série de chicanes qui ne laissent passer que les gouttelettes les plus fines. La plus grande partie de l'échantillon s'écoule au fond de la chambre de mélange et est évacuée. L'aérosol, le comburant et le carburant pénètrent alors dans un brûleur à fente qui donne une flamme large de 5 à 10 cm.

Les brûleurs à flux laminaire produisent une flamme relativement stable et un trajet assez long, propriétés qui améliorent la sensibilité et la reproductibilité. La chambre de mélange de ce type de brûleur contient un mélange qui peut exploser par un retour de flamme si la vitesse d'écoulement est insuffisante. C'est pour parer à cette éventualité que le brûleur de la figure précédente est équipé d'évents de sécurité.

Le milieu absorbant est donc constitué par les atomes de l'élément à doser, dispersés dans une flamme.

Nous allons voir deux effets :

- Dans la flamme, la majeure partie des atomes présents se trouve à l'état fondamental (c'est à dire non excité)
- Dans cet état fondamental les atomes sont capables d'absorber sélectivement certaines radiations, la fraction absorbée étant liée à la concentration de la flamme en atomes, donc à la concentration en élément dans le liquide aspiré.

a. La flamme

Les photons $h\nu$ en provenance de la lampe doivent être absorbés par les atomes à l'état fondamental. Le système le plus simple pour les obtenir consiste à pulvériser l'échantillon liquide dans une flamme pas trop chaude et les phénomènes vus antérieurement ont lieu : désolvation, vaporisation, ... donnant une population d'atomes.

Il faut signaler que la flamme n'a pas besoin d'être très chaude. Son rôle n'est pas d'exciter les éléments, mais seulement de fournir le milieu absorbant, une population d'atomes. On utilise généralement une flamme d'énergie moyenne Air / Acétylène, par exemple, suffisante pour donner des atomes neutres et pas trop d'atomes excités. La flamme doit évidemment être stable et les précautions étudiées au chapitre précédent sont valables. Cependant elles peuvent être moins rigoureuses car la proportion d'atomes à l'état fondamental est relativement indépendante de la température de la flamme. On peut tolérer quelques variations. En effet si on a par exemple A atomes présents

- Flamme à 2000 K on aura 1 $10^{-4}\%$ des atomes excités
- Flamme à 3000 K on aura 2 $10^{-4}\%$ des atomes excités (le nombre double) mais à l'état fondamental il reste ($A - 2 \cdot 10^{-4}A$), c'est-à-dire la même quantité à 1/10000 près. Par contre, en émission l'intensité de radiation aurait doublée.

b. Structure de la flamme

Le mélange d'un combustible et d'un comburant à l'état gazeux dans des proportions convenables peut être enflammé par une augmentation ponctuelle de la température. La réaction exothermique créée se propage à partir de ce point à une vitesse dite de déflagration ; elle dépend de nombreux facteurs :

- Nature et proportion du mélange
- Dimension des orifices d'écoulement des gaz
- Température
- Degré hygrométrique, etc.

La vitesse d'écoulement des gaz doit tenir compte de ce facteur et pour obtenir une flamme stable, on contrôle les débits gazeux et on utilise le plus souvent des écoulements laminaires, ce qui suppose des parois bien lisses. Une flamme sera donc laminaire ou turbulente suivant la vitesse d'amenée des gaz ; actuellement, en absorption atomique on utilise surtout le premier type avec mélange préalable des gaz à la base du brûleur.

Lorsqu'un échantillon nébulisé est amené dans une flamme, le solvant s'évapore dans la zone de combustion primaire qui est située juste au-dessus du brûleur. Les particules solides finement divisées qui en résultent sont amenées dans la zone centrale de la flamme appelée la région interzonale. C'est dans cette partie la plus chaude de la flamme que des atomes et des ions monoatomiques se transforment à l'état gazeux à partir des particules solides. C'est également dans cette région que se produit l'excitation induisant l'émission atomique. Enfin, les atomes et les ions atteignent la partie externe de la flamme, ou zone de combustion secondaire, où une oxydation peut intervenir avant que les produits d'atomisation ne se dispersent dans l'atmosphère. Comme le passage du mélange carburant-comburant à travers la flamme est très bref, seule une fraction de l'échantillon subit l'ensemble de ces processus ; en fait, une flamme n'est pas un atomiseur très efficace.

c. Flammes classiques

- **Air – gaz de ville.** Air – butane ou propane. Leur avantage réside dans la faible vitesse de propagation. De ce fait, ils sont extrêmement favorables dans le cas d'un nébuliseur indépendant du brûleur. La sensibilité peut être accrue dans le cas de dosage Cu, Zn, Cd ... parce que les atomes restent dans la flamme pendant un temps relativement long.
- **Air – acétylène.** La vitesse est supérieure, mais la température plus élevée ; cette flamme convient pour la plupart des dosages, compte tenu du fait qu'en modifiant, dans certaines limites, les débits gazeux, on obtient une flamme non stœchiométrique soit oxydante, soit plus généralement réductrice.
- **Protoxyde d'azote – acétylène.** Il permet d'atomiser des éléments formant dans la flamme des oxydes réfractaires. La température y est élevée mais la vitesse plus faible que précédemment.
- **Oxygène – acétylène.** Oxygène – hydrogène. Avec ces flammes, on observe un débit turbulent plus difficile à maîtriser que dans les cas précédents.

- **Oxygène – méthane.** Il donne une flamme intéressante à cause des faibles débits de gaz autorisant une durée plus longue des atomes dans la flamme.

Le **tableau 1** ci-dessous donne les combustibles et les comburants courants employés en spectroscopie de flamme et le domaine approximatif de températures obtenues pour chacun de ces mélanges. Notez qu'on obtient des températures de 1700 à 2400°C lorsque l'air sert de comburant. A ces températures, seules les espèces facilement excitables, tels que les alcalins et les alcalino-terreux, émettent des spectres utilisables. Pour les métaux lourds, qui sont moins facilement excités, il faut employer l'oxygène ou le protoxyde d'azote comme comburant, ce qui permet d'atteindre des températures de 2500 à 3100°C avec des combustibles courants.

Tableau 1 : Température des flammes

| Combustible et comburant | Temperature °C |
|--|----------------|
| Gaz – air | 1700 - 1900 |
| Gaz – O ₂ | 2700 – 2800 |
| H ₂ – air | 2000 – 2100 |
| H ₂ – O ₂ | 2550 – 2700 |
| C ₂ H ₂ – air | 2100 – 2400 |
| C ₂ H ₂ – O ₂ | 3050 – 3150 |
| C ₂ H ₂ – N ₂ O | 2600 - 2800 |

d. Influence de la température de flamme

Les spectres d'émission et d'absorption sont affectés d'une manière complexe par la valeur de la température de flamme. L'élévation de la température a tendance à augmenter la population d'atomes, et donc la sensibilité. Toutefois, pour certains éléments, tels que les métaux alcalins, cette augmentation peut être plus que compensée par la perte d'atomes qui sont transformés en ions.

La température de flamme détermine également le taux d'atomes excités. Le nombre d'atomes excités et émettant des radiations, (nombre défini par la formule de Planck), est très faible voire négligeable par rapport au nombre total d'atomes présents.

Pour une raie donnée on a :

$$\frac{N_e}{N_f} = \frac{P_e}{P_f} * e^{\frac{-E_e}{KT}}$$

N_f : Nombre total d'atomes présents à l'état fondamental d'énergie E_f

N_e : Nombre d'atomes excités au niveau correspondant à l'énergie E_e

P_e et P_f : poids statistiques de l'état excité et de l'état fondamental

K : constante de Boltzmann

T : Température

Ce rapport : $\frac{N_e}{N_f} = \frac{\text{Nombre d'atomes excités}}{\text{Nombre d'atomes présents}}$ est toujours petit et dépend de la température de la flamme.

5.2.2. Atomisation électrothermique

Des dispositifs sans flamme et sans nébuliseurs permettent de s'affranchir des problèmes liés à la mise en solution de certains échantillons. Le plus classique est un four graphite (système de Masmann) dont l'élément chauffant est constitué d'un barreau (ou tube) en graphite pur de 3-4 mm de diamètre, orienté parallèlement à l'axe optique, avec une cuvette centrale destinée à recevoir quelques mg ou μl d'échantillon.

Le graphite fait office de résistance ohmique lorsqu'il est soumis à une différence de potentiel de quelques volts. Pour une tension de 8 V, par exemple, et une intensité de 400 A, la résistance permet d'atteindre environ 3000 K. Ces montages sont entourés d'une double gaine pour faire circuler un gaz inerte qui protège les éléments de l'oxydation, et pour faire circuler de l'eau pour refroidir l'ensemble.

Pour éviter toute perte par projections, la température est montée graduellement, pour sécher, éliminer de façon thermique les composants associés pouvant gêner la mesure, puis calciner et enfin atomiser l'échantillon. La puissance thermique disponible permet de porter l'échantillon à l'état de gaz atomique dans l'étape finale en 3 ou 4 secondes, de manière reproductible.

L'avantage de la technique sans flamme dans un four graphite réside, par exemple, dans la possibilité décrite ci-dessus d'éliminer des composés gênants au cours de la montée en température et dans la concentration de la vapeur d'atomes. Le parcours lumineux est nettement plus court que dans la flamme, mais dans le four on évite la dilution de cette vapeur par le solvant.

5.2.2.1. Tube de graphite avec plate-forme de l'vov

Vers 1958, les avantages du four graphite ont été décrits par L'vov (le système de cuve de Masmann a été développé au début des années 1970). Au lieu d'introduire l'échantillon directement dans le four, on peut les déposer sur une plaque de graphite glissée elle aussi dans le tube. Cette plate-forme de L'vov est chauffée par le rayonnement des parois du four; l'atomisation se produit décalée dans le temps, dans une atmosphère déjà thermiquement stabilisée.

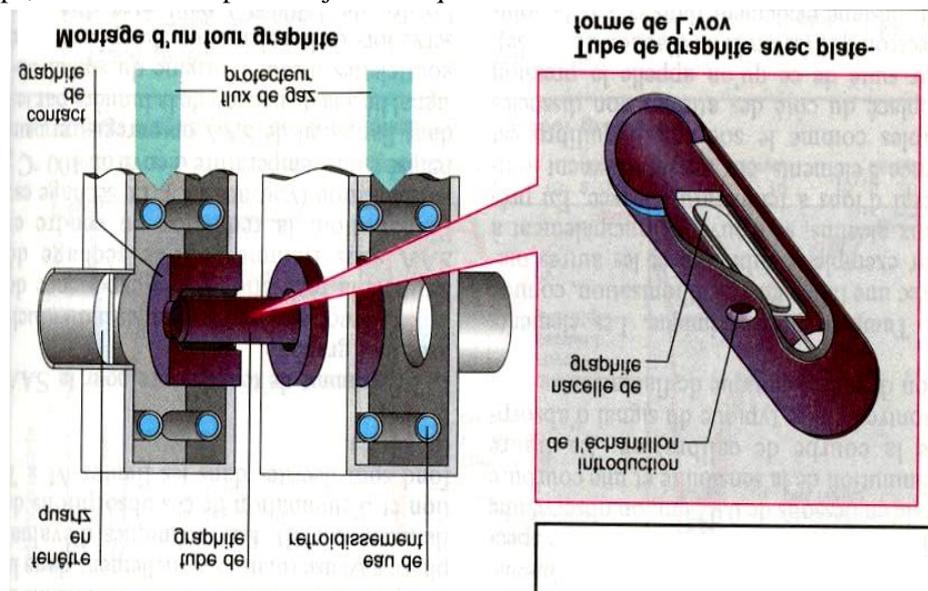


FIGURE 07 : Tube de graphite avec plate-forme de l'vov

5.2.2.2. Vaporisation chimique

Quelques éléments dont l'arsenic, le bismuth, l'étain, le sélénium sont difficilement réduits par la flamme lorsqu'ils sont dans des états d'oxydation élevés. Pour ces cas particuliers, on fait réagir l'échantillon, préalablement à la mesure, sur du borohydrure de sodium en milieu acide, dans un montage annexe en verre, et on entraîne l'hydrure volatil formé par un gaz vecteur dans une cellule en quartz placée dans la flamme.

Les hydrures, facilement thermolysés vers 1000 K, libèrent les atomes de l'élément. On utilise conjointement une source lumineuse puissante constituée par une lampe sans électrodes. Il est remarquable de rapprocher des montages actuels, l'appareil de Sir Lockyer (1875) qui comportait déjà les différentes parties des instruments modernes à four.

6. Mesures : LOI DE BEER-LAMBERT

L'absorption est un phénomène probabiliste et il faut avoir suffisamment de photons et d'absorbants pour pouvoir étudier le phénomène (et pour que les détecteurs fonctionnent). On peut remarquer que l'absorption est limitée par deux "bornes" :

- s'il n'y a pas d'espèces absorbantes, aucun photon ne sera absorbé et le milieu sera parfaitement transparent (quel que soit d'ailleurs les longueurs d'onde des photons)
- si la concentration des espèces absorbantes devient infinie, plus aucun photon ne va arriver au détecteur et le milieu sera opaque, au moins dans les bandes d'absorption.

C'est pour cette raison que les absorptions (ou) les transmissions sont exprimées en pourcentage, le premier cas correspondant à une absorption de 0% (ou une transmission de 100%), le deuxième cas correspond quant à lui à une absorption de 100% (ou une transmission de 0%) dans la bande d'absorption.

Pour les cas intermédiaire, l'absorption va varier entre 0 et 100% suivant la concentration, mais suivant aussi la longueur d'onde des photons, l'absorption étant maximum (pour une concentration donnée) au maximum du profil d'absorption.

Dans les techniques de spectrophotométrie d'absorption, on va donc utiliser des rayonnements considérés comme "monochromatiques", c'est-à-dire plus étroits que les profils d'absorption, et si possible centrés sur les maxima d'absorption où l'absorption est maximum pour une concentration donnée. Dans certains cas (spectrophotomètre d'absorption moléculaire) il faudra rechercher ces maxima d'absorption en traçant d'abord le spectre d'absorption, puis sélectionner un rayonnement "monochromatique" centré sur le maximum de la bande d'absorption, puis établir la relation entre l'absorption et le nombre d'absorbants, à cette longueur d'onde.

Pour l'établissement de la loi de Beer-Lambert on suppose donc que l'on dispose d'un rayonnement monochromatique (ou du moins de largeur plus fine que le profil d'absorption) d'intensité constante $I_{0\lambda}$ à la longueur d'onde λ correspondant en général au maximum du profil d'absorption. Comme on l'a vu dans le paragraphe sur les largeurs de raies, cette approximation est justifiée.

6.1. Expressions de la loi

On obtient:

$$\log \left(\frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} \right) = \varepsilon_\lambda l c$$

avec :

ε constante qui dépend de l'atome absorbant. l longueur de la flamme.

c concentration de la solution en élément absorbant.

$\log_{10} \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda}$ s'appelle l'absorbance ou densité optique (à ne pas confondre avec le % d'absorption).

En effet :

$$\begin{aligned} \text{absorbance} = \text{ABS} &= \log \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda l c \\ \% \text{absorption} = \%A &= 100 \frac{I_{0\lambda} - I_\lambda}{I_{0\lambda}} \\ \% \text{transmission} = \%T &= 100 \frac{I_\lambda}{I_{0\lambda}} = 100 - \%A \\ \text{ABS} &= \log_{10} \frac{100}{\%T} = \log_{10} \frac{100}{100 - \%A} \end{aligned}$$

Le % A varie entre 0 et 100.

Le % T varie entre 100 et 0.

L'absorbance à une longueur d'onde donnée est proportionnelle à la concentration des espèces absorbantes, ce qui est à la base de l'analyse quantitative.

Lorsqu'on veut faire de l'analyse quantitative par spectrophotométrie d'absorption:

- on mesure d'abord le profil ou la bande d'absorption pour déterminer le ou les maxima de pics (avec une solution de concentration donnée permettant une absorption suffisante).
- on choisit alors la longueur d'onde max pour laquelle A est maximum.
- on établit une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration connue des solutions étalon.

On doit obtenir une droite $\text{ABS} = \varepsilon l c$ passant par l'origine et dont la pente est εl .

6.2. Réception et séparation des rayonnements

Il est très rare de pouvoir utiliser une source en absorption, ou d'observer une émission ou une fluorescence, sans "trier" le rayonnement utile.

Ce "tri" s'effectue avec un système séparateur de rayonnement qui va isoler ou disperser le rayonnement dans l'espace ou dans le temps. On peut distinguer 3 types de séparateurs :

- les filtres : colorés, interférentiels, à polarisation ou optoacoustiques
- les prismes et réseaux
- les interféromètres

Le monochromateur "idéal" devrait pouvoir :

- isoler une longueur d'onde λ_0 et une seule
- avoir une bande passante la plus faible possible afin de bien isoler la raie de travail de la lumière parasite qui vient affecter l'absorption
- être stable, c'est-à-dire de ne pas dériver en longueur d'onde pour que le détecteur reçoive toujours la lumière correspondant à λ_0
- être d'un coût abordable et d'un encombrement réduit
- pouvoir travailler dans un domaine spectral le plus étendu possible Mais ces propriétés sont contradictoires et il faut trouver un compromis. Jusqu'à présent, l'utilisation d'une lampe à cathode creuse a permis de trouver un compromis acceptable, mais on peut rêver de la suppression pure et simple du monochromateur avec l'utilisation d'une source laser monochromatique et accordable dans un domaine spectral suffisamment large pour permettre l'analyse de tous les éléments du tableau périodique. En attendant que de telles sources voient le jour, il faut utiliser le bon vieux monochromateur à disperser, bien que quelques tentatives de monochromateurs à interféromètres aient vu le jour

Le domaine spectral à couvrir devrait aller de 1 à 10 eV environ, ce qui correspond aux énergies nécessaires pour exciter tous les atomes du tableau périodique (de l'hydrogène jusqu'au césium), mais on est limité vers les faibles longueurs d'onde par l'absorption de l'oxygène de l'air qui commence à partir de 190 nm, ce qui imposerait de travailler sous vide et poserait des problèmes technologiques.

6.3. La détection du rayonnement et le traitement du signal

Dans les méthodes physiques d'analyse, l'appareil utilisé fournit un résultat qui sera le plus souvent un signal électrique représentatif de la grandeur à mesurer : le détecteur est donc un "transformateur" qui fournit un courant ou une tension à partir d'une caractéristique physico-chimique.

En spectrophotométrie d'absorption, la grandeur physique observée est le flux lumineux reçu par un détecteur de photons. Il existe trois types de détecteurs:

- les détecteurs thermiques
- les détecteurs pyroélectriques
- le photomultiplicateur, que nous allons décrire ci-dessous.

Le photomultiplicateur est maintenant universellement employé: ses performances, bien supérieures à celles des cellules photoélectriques, permettent de tirer tout le parti de la supériorité de l'absorption atomique sur l'émission dans les domaines de la séparation des éléments et de la sensibilité.

Le photomultiplicateur transforme en courant tous les photons reçus : ceux de la lampe, de la flamme, du laboratoire, alors que seuls les photons issus de la cathode creuse sont intéressants. On module le faisceau lumineux émis par la lampe à la sortie de celle-ci par un cache tournant (on peut aussi alimenter la lampe en courant alternatif). Un amplificateur sélectif ne transmettra au système de lecture de l'absorption que le signal venant de la lampe, éliminant ainsi la lumière parasite.

Il faut maintenant traiter le signal pour l'amener à une valeur compatible avec la lecture faite à l'aide d'un appareil indicateur. Mais nous savons que le signal est entaché de bruit et il sera intéressant de voir comment signal et bruit sont transmis et quel est le moyen le plus efficace pour augmenter le rapport signal sur bruit.

On peut envisager de transformer le signal continu en signal alternatif d'une fréquence supérieure à 100 Hz, soit en agissant sur le signal physique : modulation d'un faisceau lumineux par la modulation du courant d'alimentation de la source de lumière ou modulation mécanique par un obturateur tournant.

Par exemple, en spectrométrie de flamme, en absorption, les photons émis par la flamme sont indésirables car reçus par le détecteur, ils viennent se mêler au rayonnement de la source et il faut les éliminer. On utilise alors la technique de la détection synchrone dont **le schéma (fig 08)** est le suivant :

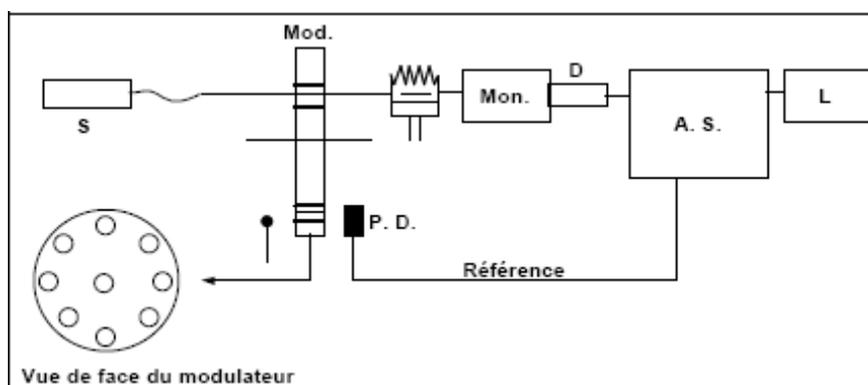


FIGURE 8 : Détection synchrone

7. Paramètres influençant la mesure

Un certain nombre de paramètres influencent de manière significative le résultat analytique. Parmi ces paramètres on peut citer :

- la longueur d'onde
- la largeur de fente
- le débit des gaz de flamme, etc.

La sensibilité, la précision, etc., dépend directement de l'intensité de la raie spectrale choisie donc de ces paramètres.

Si les paramètres matériels sont déterminants dans la qualité du résultat, plusieurs phénomènes peuvent entacher le résultat final d'erreurs importantes : c'est ce que l'on appelle les interférences. Les deux grands types d'interférences sont:

- **les interférences physiques ou spectrales**, liées par exemple à la superposition de deux raies spectrales très proches que le spectromètre ne peut pas différencier,
- **les interférences chimiques**, liées notamment à la présence d'éléments « gênants » dans la matrice d'analyse qui « masquent » l'élément à doser.

CHAPITRE IV :

SPECTROSCOPIE A EMISSION ATOMIQUE

1. Présentation du phénomène physique d'émission atomique

L'émission d'un rayonnement électromagnétique due à la désexcitation d'atomes ou de molécules qui ont été excités par un apport suffisant d'énergie est un phénomène physique bien connu. Ainsi, si on projette du sel de cuisine dans une flamme au gaz de ville, une émission jaune caractéristique au sodium apparaît (en cuisine, lorsque l'eau de cuisson que l'on a salée déborde sur un feu au gaz, la flamme devient jaune). Un sel de potassium conduira à une émission caractéristique orange.

1.1. Définition

La photométrie d'émission atomique mesure l'émission d'un rayonnement électromagnétique UV ou visible due à la désexcitation d'atomes qui ont été excités par l'énergie apportée par le transfert à une température très élevée (introduction de l'échantillon dans une flamme ou un plasma). La mesure quantitative de l'émission permet des dosages.

Les flammes utilisées dans les appareils de mesure à flamme atteignent 2000 à 3000 °C et permettent l'émission par les atomes des séries des alcalins (Na, K, Li), de quelques alcalino-terreux (Ba) et de quelques autres métaux. Les appareils à plasma qui atteignent plus de 7000 °C permettent d'élargir la gamme des atomes mesurables.

1.2. L'atomisation puis l'excitation d'atomes d'un échantillon à doser par transfert à très haute température

Par la flamme où le plasma, dont la température est très élevée, l'objectif est de casser les édifices moléculaires et de faire passer l'élément à doser (au moins partiellement) sous forme de vapeur atomique. Sous l'effet des températures élevées, certains des atomes seront excités et verront leurs électrons passer à des niveaux d'énergie supérieurs. Les niveaux excités sont instables et le retour au niveau fondamental d'énergie minimale conduira à une libération d'énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde caractéristique de l'atome qui se désexcite. C'est la mesure de cette émission à une longueur d'onde caractéristique de l'atome à doser qui fonde la photométrie d'émission atomique.

Soit l'exemple du chlorure de sodium dans une flamme air- propane (**Fig .1**). Le sodium (présent à l'état Na^+ dans l'échantillon de départ) est atomisé par la flamme ; une fraction du sodium atomique passe de l'état fondamental à un niveau excité et le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission caractéristique, notamment à 589,0 et 589,6 nm.

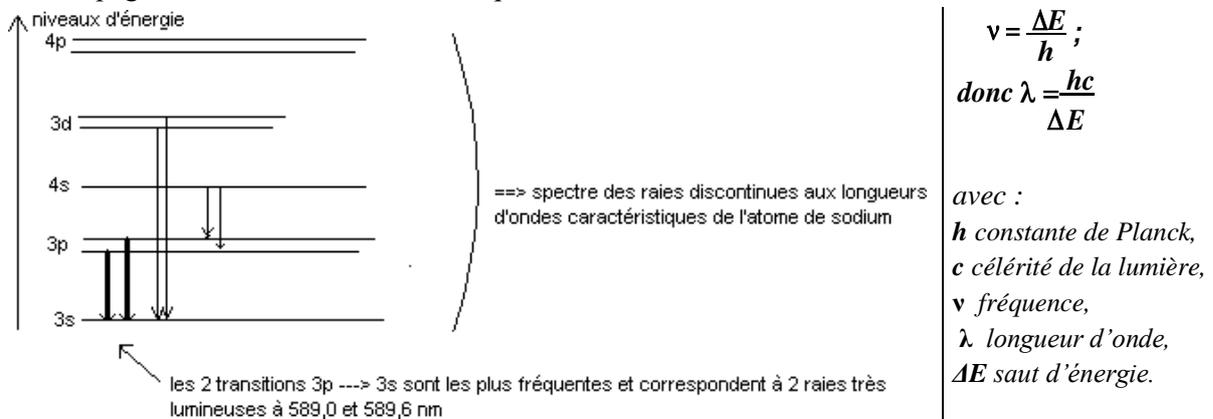


FIGURE 1 : Spectre des raies discontinues aux longueurs d'ondes caractéristiques de sodium

Le spectre présenté ci-dessus (**Fig. 1**) présente une partie seulement des transitions permises chez l'atome de sodium. Les 2 raies très proches à 589,0 et 589,6 nm correspondent à un effet de changement ou pas de spin. Déterminer a priori quelles sont les transitions énergétiques permises et leurs intensités chez un atome est du ressort de la physico-chimie quantique et est ici hors sujet. Il suffit de savoir qu'un atome donné possède un spectre de raies d'émission caractéristique, ce qui permet des identifications. En photométrie d'émission atomique, on mesure l'émission pour une longueur d'onde caractéristique de l'atome à doser pour laquelle l'émission est intense : c'est l'aspect sélectif des mesurages réalisés. Ainsi 589 nm est caractéristique du sodium ; 766-769 nm caractéristique du potassium.

2. Instrumentation :

2-1- Schéma de principe d'un photomètre de flamme (*FEP, flame emission photometry ou FES, flame emission spectrometry*)

Un photomètre de flamme va permettre de réaliser des dosages sélectifs de métaux alcalins et alcalinoterreux. Ce type de photomètre possède :

- des arrivées à débits contrôlés (par contrôle de pression) des gaz comburant et combustible ;
- un nébuleur nébulisant l'échantillon à débit constant dans la flamme ;
- un brûleur ;
- une fente de sortie mesurant le flux émis dans une zone de flamme de température constante ;
- une sélection d'une longueur d'onde caractéristique du spectre de raies de l'atome à mesurer, une photoréception de l'émission et un traitement du signal

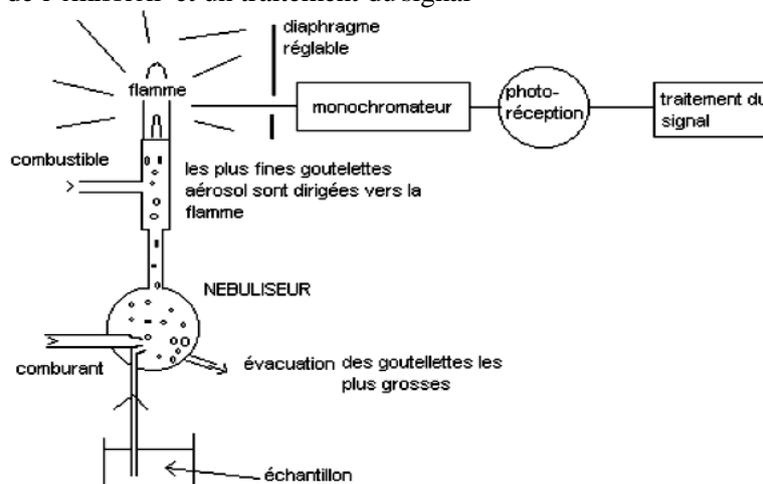


FIGURE 2 : La structure d'un photomètre de flamme

Le schéma de **la figure 2** présente la structure d'un photomètre de flamme. La partie nébuleur a été détaillée. La nébulisation utilise généralement l'effet Venturi : le comburant en provenance d'un réservoir de gaz sous pression traverse un conduit qui se termine par un orifice étroit qui entraîne une vitesse de sortie élevée et une dépression alentour. C'est là qu'est placée l'extrémité d'un tube plongeant dans l'échantillon à analyser. L'échantillon est aspiré à débit continu constant et est nébulisé. Les grosses gouttelettes qui perturberaient la flamme sont éliminées lors de la traversée d'un bol où elles se déposent sur les parois. Le nébuleur doit absolument fournir un débit constant d'échantillon dans la flamme.

Il existe d'autres systèmes de nébulisation que ceux fondés sur l'effet Venturi, par exemple à ultrasons.

2-2- Présentation d'un spectromètre d'émission atomique à plasma par couplage inductif (ICP-AES : *inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry* ; ou ICP-OES (*O pour optical, car on peut analyser les raies ioniques en ICP*)).

L'échantillon à analyser est introduit sous forme d'aérosol (nébulisation sous gaz argon) dans une torche à plasma d'argon (**Fig. 3**). Le plasma est obtenu par couplage inductif d'où le sigle ICP : *Inductively Coupled Plasma*. Il suffit de retenir que la température du plasma atteint plus de 7000. Les édifices moléculaires sont détruits, une vapeur mixte atomique et ionique est créée.

De l'argon est introduit dans l'axe d'une bobine d'induction alimentée par un courant électrique de haute fréquence. Après « allumage » par introduction d'une pièce métallique à l'intérieur des spires (de la bobine), il va se créer un plasma d'argon vers 6000 à 10000°C (l'argon est en partie ionisé dans le plasma).

L'échantillon est introduit sous forme d'un aérosol gainé d'argon

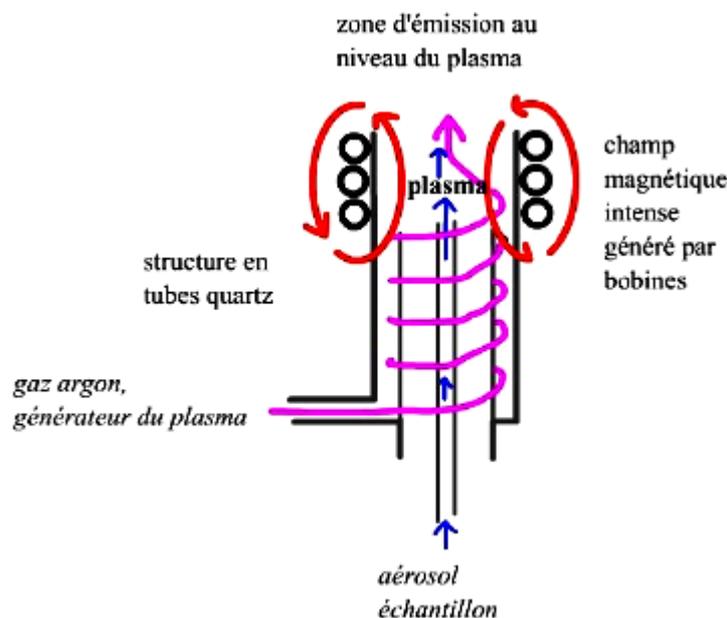


Figure 3 : Introduction d'un échantillon dans une torche à plasma d'argon

On retiendra que le :

- nébuliseur nébulisant l'échantillon à débit constant dans la torche à plasma sous débit d'argon ;
- L'appareil mesure un spectre d'émission et pas seulement l'émission à une longueur d'onde donnée (monochromateur à balayage, polychromateur, spectre sur capteur CDD ...) = analyse spectrale.
- Le traitement du spectre obtenu débouche en théorie sur l'analyse simultanée de plusieurs éléments. On cherche dans le spectre la présence de raies isolées spécifiques d'éléments donnés (330 nm pour Na, 232,0 pour Ni, 283,3 pour Pb, 396,2 pour Al...). Ce qui n'est pas toujours évident même en traitement informatique du signal.

3. Justification de l'aspect quantitatif de l'émission atomique

Soit un système permettant d'introduire un échantillon sous forme d'un aérosol très fin (cela signifie qu'il est introduit sous forme d'un fin brouillard de gouttelettes de quelques μm de diamètre) dans une flamme ou un plasma et ce à débit continu et constant.

Soit la flamme très stable et assez chaude pour l'atomisation de l'élément à doser ou alors soit le plasma très stable. On obtient une flamme stable donnant des zones de température parfaitement constante en mettant en œuvre la combustion à débit continu et constant de 2 gaz : le combustible et le comburant. Les plasmas sont quant à eux maîtrisés au niveau du débit d'argon et du courant d'induction.

En théorie, si on choisit de mesurer le rayonnement émis à une longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser, l'intensité est proportionnelle à sa concentration.

Soit C la concentration en élément X à doser de l'échantillon.

Si le débit d'introduction de l'échantillon nébulisé dans la flamme est constant, alors :

$$D_X = k C \quad (\text{a})$$

(avec k coefficient constant pour l'analyse et D_X le débit total en X à doser dans la zone mesurée de la flamme). Si la température de flamme ou de plasma est constante, le rendement d'atomisation de X est constant et le rapport entre les atomes X à l'état fondamental et à l'état excité est un coefficient donné constant, donc :

$$D_{at^*}/D_X = k' \quad (\text{b})$$

(avec D_{at^*} pour les atomes excités et k' coefficient constant). Or, l'émission à un instant t est proportionnelle au nombre d'atomes excités. On a ainsi :

$$\varphi_e = k'' D_{at^*} \quad (\text{c})$$

(avec φ_e flux lumineux émis et k'' coefficient constant).

La combinaison de (a), (b) et (c) montre ainsi qu'à débit nébulisé et à température d'excitation constante) φ_e est proportionnel à C .

Remarque (1) : A chaque instant, seule une fraction très faible des atomes à doser obtenus est excitée. Cette fraction est en équilibre dynamique, elle émet un flux de photons d'intensité constante aux longueurs d'onde correspondant au spectre de raies des atomes excités. On peut revoir à ce propos un cours de physique sur la statistique de Boltzman (à 2000°K la fraction d'atomes de sodium excités pour l'émission à 589,0 nm est de $9,9 \cdot 10^{-6}$; à 4000°K cette fraction est de $4,4 \cdot 10^{-3}$,...).

La relation de Boltzmann qui donne la fraction d'atomes excités à une température donnée est :

$$\frac{N_e}{N_0} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}}$$

avec : N_e nombre d'atomes excités, N_0 nombre d'atomes à l'état fondamental, ΔE écart d'énergie entre niveau excité et fondamental, T température absolue, k constante de Boltzmann.

Remarque(2) : en fait, une partie de l'énergie émise sous forme de photons peut être absorbée par un élément (de même espèce) non excité (excitation par photon de λ convenable). La linéarité est une pseudo-linéarité ...

4. Bilan concernant les fonctions de la flamme ou du plasma, applications

La flamme d'un appareillage FEP ou le plasma d'un appareil ICP-OES remplit plusieurs fonctions :

- chaleur suffisante pour la création de la vapeur atomique de l'élément à doser ;
- excitation thermique de l'élément à doser.

Selon sa température, telle ou telle flamme est plus ou moins apte à atomiser et exciter tel ou tel élément à doser.

Il convient de se référer aux données de la littérature. La photométrie d'émission atomique de flamme est limitée aux dosages d'éléments alcalins ou alcalino-terreux Na, K, Ca, Li, Fe, Ba ... (qui sont en fait sous forme ionisée Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^{2+} , Fe^{2+} avec Fe^{3+} , Ba^{2+} ... dans la plupart des échantillons biologiques). Les flammes utilisées en pratique sont décrites dans **le tableau 01** ci-dessous :

Tableau 01 : Les flammes utilisées en pratique

| Comburant utilisé | pour le combustible correspondant | Temperature |
|-------------------|-----------------------------------|--|
| dioxygène | propane | 2000°C, adaptée pour doser Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . |
| dioxygène | butane | |
| dioxygène | acétylène | |
| protoxyde d'azote | acétylène | 3200°C, adaptée pour doser Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . |

Les températures des plasmas d'argon (plus de 8000°K) permettent d'élargir théoriquement la gamme des éléments mesurables à tous les éléments sauf l'argon. Mais l'analyse des spectres d'émissions n'est pas toujours totale car ils sont très complexes. Ils contiennent les émissions de transition des différents atomes de l'échantillon ajoutées à celles des ions correspondants générés ajoutées à d'éventuelles bandes moléculaires (MgOH par exemple).

Applications : Dans les liquides biologiques comme le plasma sanguin ; les produits pharmaceutiques ; les produits alimentaires, les boissons ; les rejets industriels, les eaux usées ; les produits minéraux utilisés en métallurgie ...

5. Réalisation des mesures

5.1. Généralités concernant l'exécution des mesures

Classiquement, en FEP, on règle le monochromateur à une longueur d'onde caractéristique et si possible spécifique de l'élément à doser. Mais, on l'a vu, les appareillages ICP-OES suivent l'émission sur un large spectre de longueurs d'onde et permettent l'analyse de plusieurs éléments en simultané.

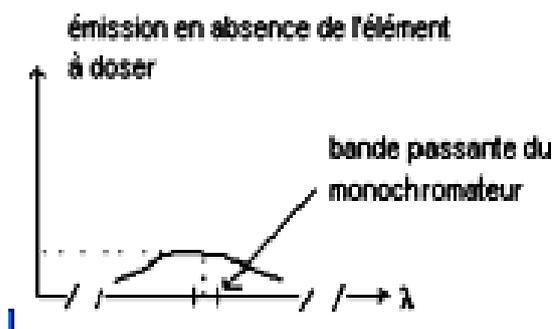
Les dosages sont réalisés par comparaison avec les résultats de l'émission obtenus pour des solutions étalons de l'élément à doser. On établit une fonction d'étalonnage dans la zone pseudo-linéaire de la fonction **émission = f(concentration)**, là où la sensibilité sera la meilleure.

Les meilleurs appareils sont ceux qui permettent des mesures mettant en œuvre l'étalonnage avec étalon interne (introduction d'un élément étranger mesurable à une 2^o longueur d'onde caractéristique différente de celle de l'élément à mesurer). Ceci permet d'éliminer les inconnus liés aux traitements préalables aux mesures des échantillons à doser et d'éliminer les erreurs dues aux variations éventuelles du débit de nébulisation.

La sensibilité et la détectabilité sont excellentes même si elles sont souvent inférieures à ce qu'on obtient en absorption atomique (voir pourquoi dans le chapitre absorption atomique). On peut réaliser des dosages de traces. La verrerie en verre est donc non convenable pour les dosages de traces puisque le verre peut adsorber et libérer les ions à doser de façon non négligeable.

5.2. Exécution des mesures en FEP

Les flammes conduisent à un certain nombre de particularités. La flamme créée par la combustion combustible-comburant, émet de la lumière selon un spectre appelé spectre de fond de flamme. Dans la flamme, le solvant de dilution et la matrice de l'échantillon à mesurer émettent un spectre lumineux. Il convient donc de régler le « zéro » d'émission de l'appareil en nébulisant une matrice et un solvant judicieusement choisis. Il faudra aussi en tenir compte pour réaliser les solutions étalons.

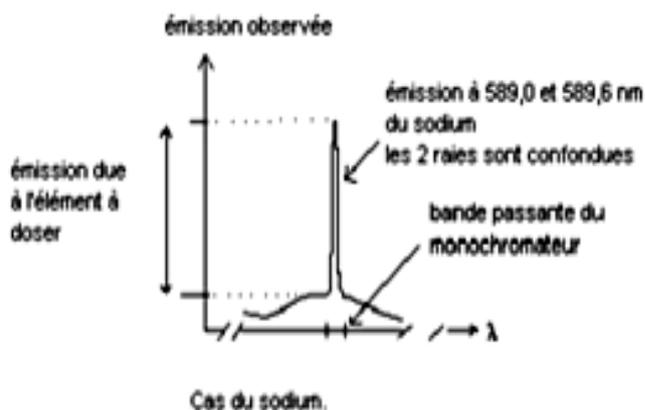


En absence de l'élément à doser, il se produit une émission due au fond de flamme + Effet solvant + effet matrice.

La figure 4 présente le spectre de cette émission.

A la longueur d'onde du dosage (bande passante du monochromateur sur la figure 4), le fond d'émission est pris en compte pour le « Zéro ».

FIGURE 4 : Spectre d'émission en l'absence de l'élément à doser.



En présence de l'élément à doser, l'émission caractéristique de l'élément à doser vient s'ajouter au fond d'émission. C'est cette augmentation de l'émission qui est mesurée.

La figure 5 utilise l'exemple du dosage du sodium.

FIGURE 5 : Spectre d'émission du sodium.

L'élément à doser peut exister sous forme de formations chimiques stables dans certaines flammes. Le dosage est donc faussé par défaut puisqu'on mesure les atomes excités et donc on ne mesure pas l'élément à doser demeuré dans les formations chimiques stables. C'est par exemple le cas de l'oxyde de calcium, de certains phosphates et silicates de calcium dans les flammes air/propane ou air/butane.

La présence dans l'échantillon à mesurer d'autres anions ou cations que ceux de l'élément à doser peut modifier le rendement d'atomisation de la flamme. Le dosage est ainsi perturbé par de tels interférents.

Plusieurs solutions permettent de remédier à ces phénomènes :

- Changer de flamme pour une flamme plus chaude, déstabiliser les formations stables par ajouts de réactifs. Passer à de l'ICP-OES ...

- Les solvants pour réaliser les dilutions, les étalons prennent en considération les phénomènes cités ci-dessus. Il convient de préparer les échantillons et les étalons à l'aide de solvants amenant les « perturbateurs » selon leurs proportions connues dans l'échantillon à doser. Il convient donc de connaître l'origine de l'échantillon à doser.

- Etalonner par la technique des additions d'étalons à l'essai (méthode dite des ajouts dosés).

5.3. Exécution des mesures en ICP-OES

Les températures très élevées des plasmas entraînent généralement la totalité des éléments à doser sous forme atomique. Une fraction des atomes passe même alors sous forme ionisée par expulsion d'électrons dans le plasma. On constate ainsi que les effets de matrice en ICP-OES sont souvent négligeables. Les étalonnages sont alors simplifiés. En revanche, l'analyse des spectres obtenus où se mêlent les différentes raies des différents atomes et ions correspondants de l'échantillon plus d'éventuelles bandes moléculaires (en présence de MgOH par exemple) est souvent délicate.

Des appareils à atomisation laser existent.

CHAPITRE V :

SPECTROSCOPIE DE MASSE

1. Introduction

La spectrométrie de masse est une méthode d'identification de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans un échantillon. Les appareils qui mettent en œuvre cette technique sont des spectromètres de masse. Ils se répartissent en 5 catégories distinctes suivant leur conception. Certains utilisent, après ionisation, des champs électriques et magnétiques, d'autres uniquement des champs électriques. Les appareils sont utilisés seuls ou, le plus souvent, en aval de techniques séparatives (*exemple* : chromatographie en phase gazeuse) ou d'analyse thermique (identification des espèces libérées après une décomposition). La technique est très répandue en raison de son couplage possible avec d'autres techniques (polyvalence) et de son extrême sensibilité.

2. Principe de base

La technique est basée sur la détermination de la masse des molécules ou atomes d'un échantillon. Une petite partie de l'échantillon est transformée en ions. Ces derniers sont ensuite soumis à des champs électriques et éventuellement magnétiques et leur trajectoire dépendra du rapport m/z .

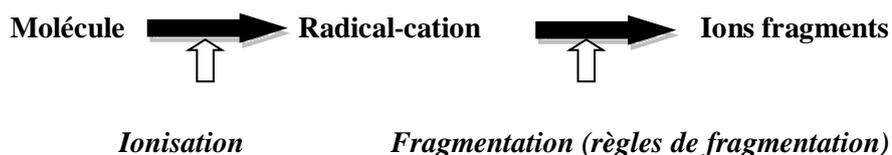
m = masse de l'atome ou de la molécule.

z = nombre de charges portées par l'atome ou la molécule.

Tous les spectromètres, quelle que soit leur conception, font apparaître les étapes suivantes :

2.1. Ionisation :

L'échantillon est porté à l'état gazeux ou liquide et ionisé dans la source de l'appareil (nombreux procédés). Un composé formé de molécules organiques conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation. Il existe également des fragmentations au cours desquelles les ions se réarrangent.



2.2. Accélération

Les ions sont extraits de la source puis accélérés et focalisés par des lentilles électroniques (champs électriques). Le but est d'accroître leur énergie cinétique.

2.3. Séparation

Les ions sont ensuite discriminés (« filtrés ») suivant leur rapport m/z par l'analyseur. Certains analyseurs utilisent un champ magnétique, d'autres un champ électrique. Certains appareils combinent plusieurs types d'analyseurs en série.

2.4. Détection

Après séparation, les ions terminent leur course dans le capteur d'un détecteur.

Remarque :

Les molécules de taille moyenne ou petite ($M < 1000 \text{ g/mol}$), génèrent en général des ions porteurs d'une charge unitaire ($z = 1$). L'ordre croissant des masses est dans ce cas le même que celui du rapport m/z .

Le document de travail donné par l'appareil s'appelle le spectre de masse. Il en existe deux sortes :

- *Le spectre de fragmentation (Fig 1)*

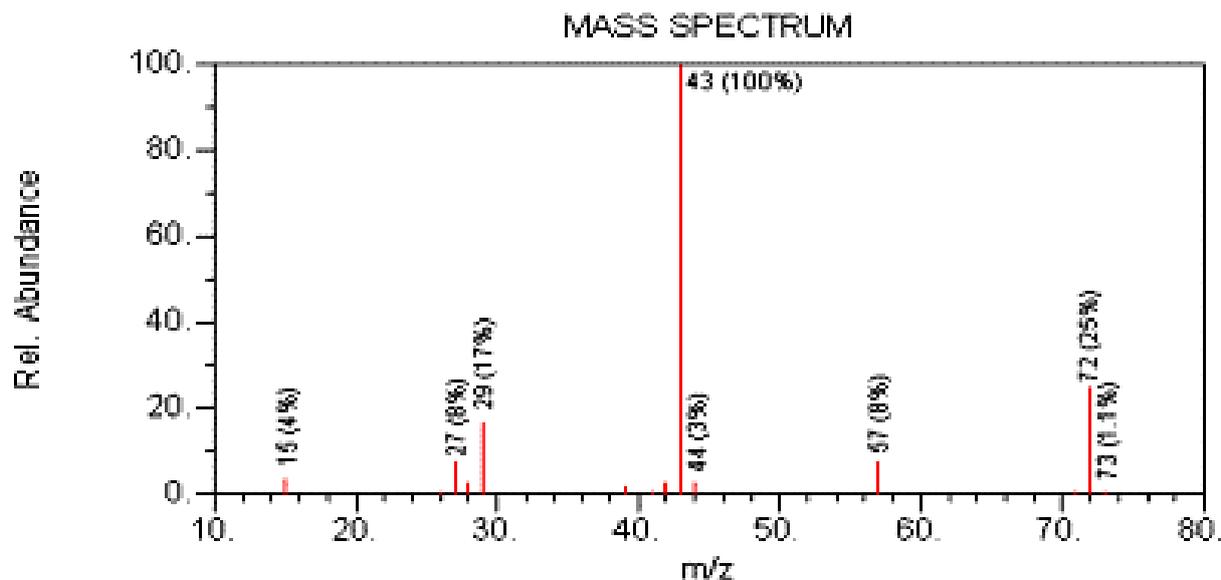


FIGURE 1 : Spectre de fragmentation de la 2-butanone C_4H_8O

- *Le spectre continu (Fig 2)*

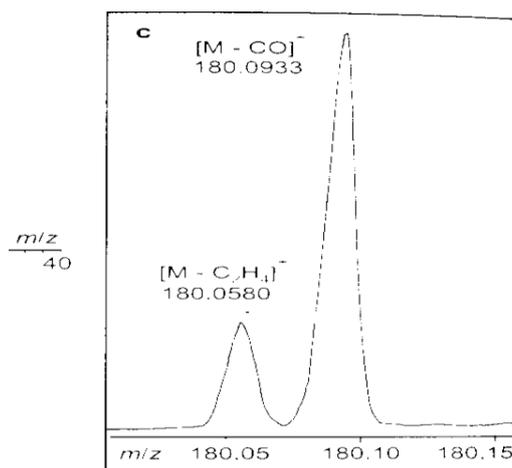
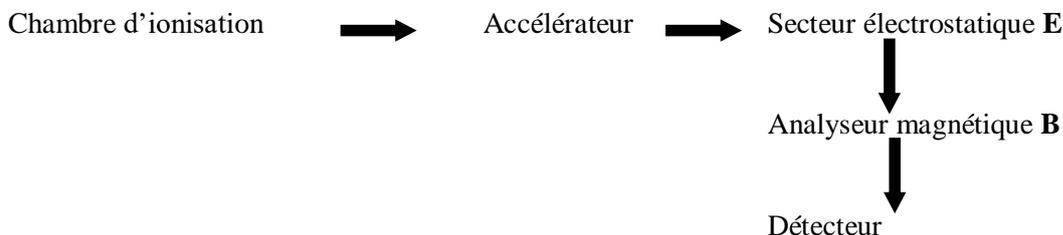


FIGURE 2 : Spectre continu de la 2-butanone

3. Les spectromètres de type EB

Ces appareils sont directement issus de l'appareil original de Bainbridge (1933). Ils donnent des rapports très précis pour m/z mais sont limités en masse.



4. Les analyseurs à temps de vol

Le principe de ces appareils qui permettent d'atteindre des masses très élevées ($m/z \rightarrow 300 \text{ g.mol}^{-1}$) est le suivant ; les atomes ou molécules sont tout d'abord ionisés comme dans tous les spectromètres de masse. Les ions résultants sont ensuite accélérés par une série de plaques portées à des potentiels négatifs croissants. Ils ont alors la même énergie à la dispersion déjà évoquée près mais des vitesses différentes. La séparation se fait dans un tube de vol (où il n'y a aucun champ) et on mesure simplement le temps que mettent les ions pour atteindre un détecteur distant de L .

Pour que ce dispositif fonctionne, il faut que tous les ions « démarrent » en même temps. On provoque une ionisation instantanée (de quelques nanosecondes avec un laser par exemple), répétée un grand nombre de fois pour améliorer la qualité du signal. La qualité de la mesure (résolution ...) est d'autant meilleure que les ions de même masse arrivent en même temps sur le détecteur. On utilise souvent un réflecteur ou miroir électrostatique pour les refocaliser.

Les ions de même masse mais légèrement plus rapides pénètrent plus profondément dans le réflecteur. Leur trajectoire est ainsi allongée et ils sont « rattrapés » par les plus lents.

5. Les analyseurs à filtre quadripolaire par transmission

Les appareils précédents sont très performants en terme de résolution mais aussi assez coûteux. Les appareils à analyseurs à filtre quadripolaire sont moins encombrants, moins performants, moins coûteux et aussi plus répandus. On les utilise souvent après un appareil de séparation ou d'analyse thermique mais aussi dans les détecteurs de fuite pour le vide (on détecte ici l'hélium) ou pour les analyses de gaz (**Fig. 3**).

Les ions ne sont ici que très légèrement accélérés ; ils entrent dans le filtre avec une énergie de l'ordre de quelques dizaines d'eV. La tension dans l'accélérateur V_z vaut quelques dizaines de volts. Le quadripôle est constitué de quatre barres métalliques de section hyperbolique. Elles sont soumises à une tension continue U (ou $-U$) à laquelle on superpose une tension alternative V_{RF} .

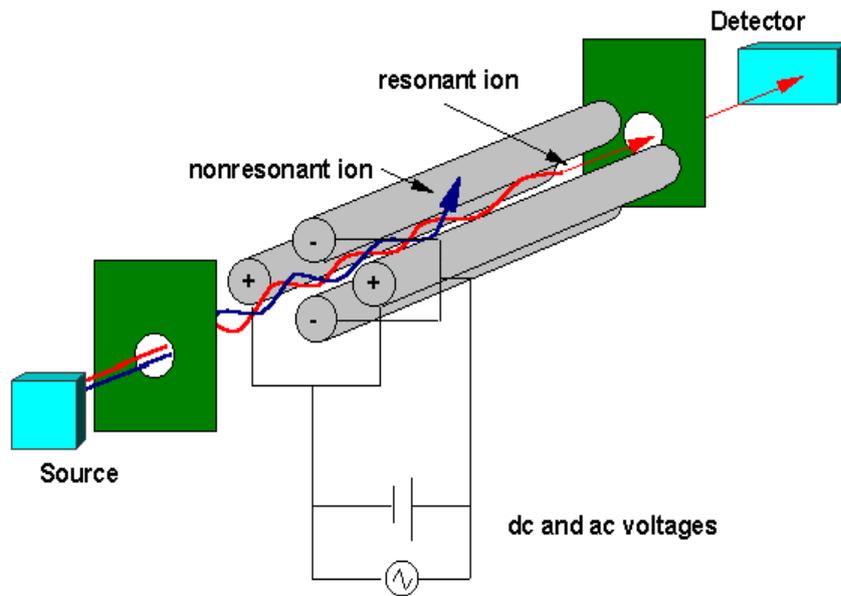


FIGURE 3 : Analyseurs à filtre quadripolaire par transmission

Pour comprendre comment un tel dispositif peut trier les ions, nous allons considérer deux cas particuliers.

- soit un ion sans composante de vitesse suivant Oy . Il est soumis à une force variable qui n'a pas de composante suivant Oy . Sa trajectoire reste dans le plan xOz .
 - s'il est lourd, il ne pourra pas suivre les variations d'orientation du champ provenant de V_{RF} et ne sera sensible qu'à U . Sa trajectoire est peu perturbée et il arrive au détecteur.
 - s'il est léger, il oscillera avec une amplitude croissante et finira par heurter une des deux barres du plan xOz .

- *On a ainsi un filtre passe-haut pour les ions.*

- soit un ion sans composante de vitesse suivant Ox . Il est soumis à une force variable qui n'a pas de composante suivant Ox . Sa trajectoire reste dans le plan yOz .
 - s'il est lourd, il sera inexorablement attiré par les barres négatives et finira par les heurter.
 - s'il est léger, il pourra éventuellement être récupéré grâce à ses oscillations.

- *On a ainsi un filtre passe-bas pour les ions.*

Pour des valeurs de U , V_M et v données, on définit ainsi une fenêtre de largeur environ $1u$. On obtient le spectre en m/z soit en faisant varier la fréquence soit en faisant varier les tensions U et V_M .

6. Les analyseurs à piégeage d'ions par quadripôle

Ces analyseurs qui fonctionnent avec un champ électrique variable sont constitués de deux électrodes de forme torique et d'une électrode annulaire. Ces dernières définissent un espace intérieur dans lequel des ions décrivent des trajectoires complexes (faible pression d'hélium, 0.01 Pa) sous l'effet d'un champ radiofréquence produit par l'électrode annulaire.

Pour une valeur donnée de la tension, les ions d'un rapport m/z particulier ont des oscillations axiales croissantes et vont jusqu'à être expulsés par les trous de l'électrode inférieure. Pour obtenir le spectre de masse, on augmente progressivement la tension et les ions sont expulsés tour à tour dans l'ordre croissant de m/z .

Ces analyseurs sont :

- peu coûteux ;
- peu encombrants ;
- très sensibles (il faut peu de matière pour obtenir un bon spectre) ;
- peu étendus en gamme ;
- moyennement répétables ;
- toujours utilisés en aval d'un appareil de séparation.

Il existe un dernier type d'analyseurs moins répandu qui permet d'obtenir les masses avec une grande précision : les analyseurs à résonance cyclotronique. Dans ce cas, la fréquence de rotation des ions dans une « boîte » métallique dont les parois sont portées à des potentiels positifs sous l'effet d'un champ magnétique varie avec m/z .

7. Les grandeurs importantes

- **La limite en masse** : Tout appareil a une limite supérieure pour le rapport m/z qui dépend de la technologie choisie.
- **La sensibilité** : Il s'agit de la quantité d'échantillon utilisée par seconde (10^{-12} g/s ou 10^{-15} mol/s) pour obtenir un signal d'intensité normalisée.
- **Le pouvoir de résolution** : Pour les spectres de fragmentation, cette notion n'a pas de sens. Tout au plus peut-on dire que la résolution est d'une unité en m/z : on distingue le pic à 27 du pic à 28 ou 29 mais c'est tout.

Pour les spectres continus, le pouvoir de résolution est donné par le rapport entre m/z et $\Delta(m/z)$.

$\Delta(m/z)$ = largeur du pic à mi-hauteur pour un pic isolé ;

$\Delta(m/z)$ = largeur du pic à 5% de la hauteur quand on considère deux pics voisins.

R varie de quelques 10^2 à quelques 10^6 (analyseurs à résonance cyclotronique).

8. Les procédés d'ionisation

Tableau 01 : Les différents types d'ionisation

| Méthodes d'ionisation | Analytes | Introduction de l'échantillon | Gamme de masse | Avantages des méthodes |
|---|--|--|-------------------------|--|
| <i>Electron Impact (EI)</i> | Petite molécule volatile | GC ou liquide/solide probe | Jusqu'à 1,000 Daltons | Technique dure polyvalente fournit des informations sur la structure |
| <i>Chemical Ionization (CI)</i> | Petite molécule volatile | GC ou liquide/solide probe | Jusqu'à 1,000 Daltons | Pic d'ions moléculaires par méthode douce [M+H] ⁺ |
| <i>Electrospray (ESI)</i> | Peptides et protéines nonvolatile | Chromatographie liquide ou syringe | Jusqu'à 200,000 Daltons | Technique douce d'ionisation souvent chargée |
| <i>Fast Atom Bombardment (FAB)</i> | Carbohydrates Organometallics Peptides nonvolatile | Echantillon mixé dans matrice visqueuse | Jusqu'à 6,000 Daltons | Technique douce mais plus difficile: ESI ou MALDI |
| <i>Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)</i> | Peptides Protéines nucléotides | Echantillon mixé dans une matrice solide | Jusqu'à 500,000 Daltons | Technique douce utilisée pour les grandes masses |

La méthode consiste à provoquer des collisions entre la substance à analyser passée à l'état gazeux et un faisceau d'électrons d'énergie comprise entre 50 et 100 eV.

Le rendement est de l'ordre de 10^{-4} et la méthode très « cassante ». Elle entraîne une fragmentation importante des ions. Pour accroître l'intensité du pic moléculaire M, il faut réduire l'énergie des électrons vers 20 eV

8.1. Ionisation chimique positive (CI)

La méthode implique une réaction entre les molécules du composé M et des ions obtenus par bombardement électronique d'un gaz comme le méthane (CH₄), l'ammoniac (NH₃) ou le butane (C₄H₁₀) introduit en même temps dans la source de l'appareil.

8.2. Bombardement par atomes rapides (FAB)

C'est une ionisation par impact d'atomes lourds non ionisés (Ar, Xe) sur l'échantillon dispersé dans une matrice liquide peu volatile. Pour les composés polaires et peu volatils.

8.3. Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Le composé à étudier est incorporé dans une matrice organique. L'énergie thermique déposée par un laser pulsé UV est transférée par la matrice au composé. Celui-ci est désorbé et ionisé. La technique est douce si bien qu'une partie importante des ions produits ne sont pas fragmentés.

8.4. Ionisation par plasma d'argon

L'échantillon en solution est nébulisé dans un plasma d'argon formé à proximité d'un petit orifice situé à l'entrée de l'analyseur. Les ions sont alors aspirés dans l'analyseur par le vide.

8.5. Ionisation par l'intermédiaire d'un spray

Ce type est retrouvé après des appareils d'électrophorèse ou de chromatographie.

La phase liquide est transformée en un fin brouillard. Les molécules du brouillard sont ensuite ionisées par un champ électrique (capillaire métallisé porté à un potentiel élevé), par des photons (10 eV) ou par ionisation chimique (par des molécules ionisées par décharges corona avec une pointe portée à haute tension).

Ces méthodes douces permettent d'obtenir des ions multichargés (z peut dépasser 30). On peut ainsi avoir accès à des ions de grande masse puisque c'est le rapport m/z qui est important. On obtient un spectre constitué d'enveloppes ioniques. Dans une enveloppe (pour une valeur m/z moyenne donnée), il y a une différence d'une unité de charge entre deux pics consécutifs.

9. Les détecteurs d'ions

Les détecteurs sont des multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées ou continues.

Dans le premier cas, les ions entrent dans le détecteur et sont déviés par un champ électrique vers une cathode de conversion qui libère des électrons après que les ions l'ont frappée. Les électrons ainsi libérés sont accélérés vers une première dynode. Ils frappent cette dernière qui libère à son tour un nombre d'électrons bien supérieur. Avec une vingtaine de dynodes placées en cascade, on peut atteindre des gains de l'ordre de 10^8 . Ces détecteurs sont donc très sensibles.

Pour les multiplicateurs d'électrons à dynode continue le principe est le même. Les ions sont déviés vers la cathode de conversion en forme de cornet et les chocs successifs sur les parois provoquent la multiplication des électrons.

10. Quelques applications

10.1. Identification au moyen d'une spectrothèque

L'identification des composés se fait par comparaison avec des spectres de produits parfaitement connus contenus dans une bibliothèque de spectres. Les plus importantes contiennent environ 280 000 spectres différents.

On sélectionne d'abord une dizaine de pics principaux dans le spectre inconnu ce qui permet, par comparaison avec les spectres stockés, de réduire considérablement le nombre de possibilités.

On effectue ensuite une comparaison sur la totalité du spectre. A partir des critères de masse, de rareté des pics et d'intensité, les spectres possibles sont classés par ordre décroissant de similarité (indice de 0 à 1000 (identité)).

10.2. Analyse de la composition élémentaire des ions (recherche de la masse)

Avec les spectres haute résolution ($R > 10\,000$) : On calcule, à partir des masses isotopiques exactes des éléments supposés être présents, toutes les formules empiriques qui peuvent correspondre aux masses expérimentales.

Là encore chaque solution possible est accompagnée d'un indice de correspondance. On associe d'autres critères tels que la règle de l'azote : si un composé contient un atome d'azote, sa masse est impaire.

10.3. Avec les abondances isotopiques :

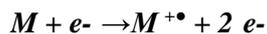
Le principe repose sur la composition isotopique des éléments qui sont presque tous constitués de plusieurs isotopes.

Un ion moléculaire donnera donc plusieurs pics à M , $M+1$, $M+2$... dont les intensités relatives sont caractéristiques.

11. Fragmentation des molécules organiques

La fragmentation (favorisée par exemple par l'ionisation électronique) résulte de l'instabilité de l'ion moléculaire organique initialement formé.

La molécule dont la masse M est paire (sauf s'il y a un nombre impair d'atomes d'azote) devient un radical-cation au nombre impair d'électrons :



Le radical-cation ainsi obtenu va se fragmenter. Compte tenu du grand nombre de molécules dans l'appareil, le spectre traduira toutes les possibilités de fragmentation avec des intensités proportionnelles aux différentes probabilités.

Comment s'opère la fragmentation ? Il y a deux situations :

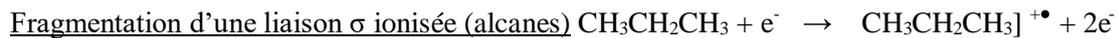


ou



Les fragments stables, ioniques ou neutres, ont plus tendance à se former.

Exemples :



L'ionisation du propane se fait par perte d'un e^- d'une liaison C-C.

Il y a ensuite fragmentation majoritaire en un radical méthyle et un cation isopropyle (plus stable qu'un cation méthyle).

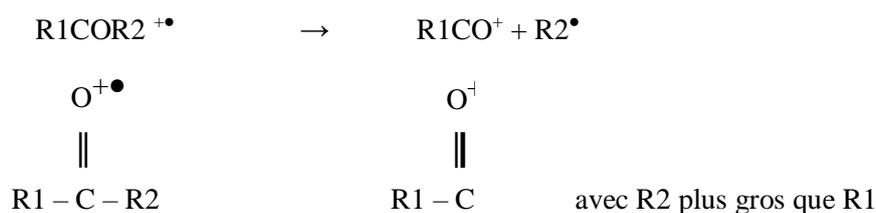


Fragmentation d'une cétone

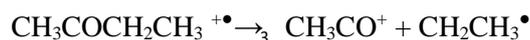
L'ionisation d'une cétone se fait par arrachement d'un électron d'un des doublets libres de l'oxygène.



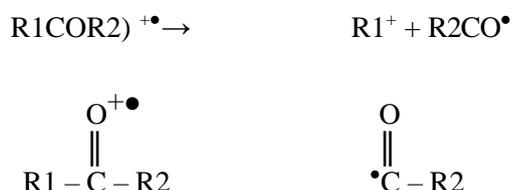
Lors de la fragmentation, l'élimination de la plus grosse chaîne alkyle sous forme de radical est favorisée :



Exemple :



On observera également les autres ions fragments R2CO^+ , R1^+ et R2^\bullet avec une abondance moindre



CHAPITRE VI :

**SPECTROSCOPIE A RESONANCE MAGNETIQUE
NUCLEAIRE**

1. Définition de la RMN

Certains noyaux sont comparables à de petits aimants, qui soumis à un champ magnétique intense peuvent sous l'action d'un champ de radio fréquence (RF) convenable, absorber une certaine quantité d'énergie : c'est *le phénomène de résonance*. Il se traduit par le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable.

2. Quels sont les noyaux capables de fournir une résonance ?

Tous les noyaux ne présentent pas de résonance, il en existe deux types :

- ☐ Les noyaux sensibles au champ magnétique externe qui possèdent un spin nucléaire **I** égal à $\frac{1}{2}$ comme le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , l'azote ^{15}N ou le fluor ^{19}F . Ils ont une circulation de charge sphérique, et possèdent deux moments magnétiques.
- ☐ Les noyaux à spin **I** supérieur à $\frac{1}{2}$: le deutérium ^2H l'azote ^{14}N , l'oxygène ^{17}O ou encore le soufre ^{33}S ont une circulation de charge non sphérique et possèdent un moment quadripolaire nucléaire. Tous ces noyaux sont capables de résonner mais dans des conditions différentes.
- ☐ Les noyaux non sensibles possèdent tous un nombre de masse et un nombre atomique pairs. La parité de ces deux valeurs entraîne un moment magnétique nucléaire unique. Les noyaux de carbone ^{12}C ou d'oxygène ^{16}O possèdent un spin **I** égal à 0.

3. Condition de résonance

Certains noyaux, par exemple ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{129}Xe ..., se comportent magnétiquement comme de petits aimants.

Un **proton** libre ^1H placé dans un champ magnétique extérieur \vec{B}_0 ne peut s'orienter que de deux façons.

Ces deux états, α et β , appelés états de spin nucléaire, sont énergétiquement différents (**Fig. 1**).

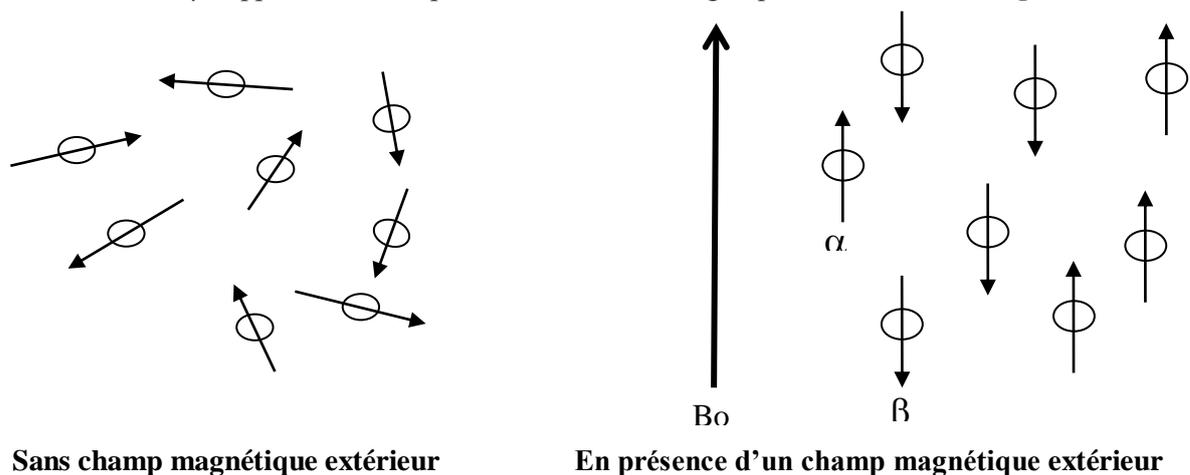
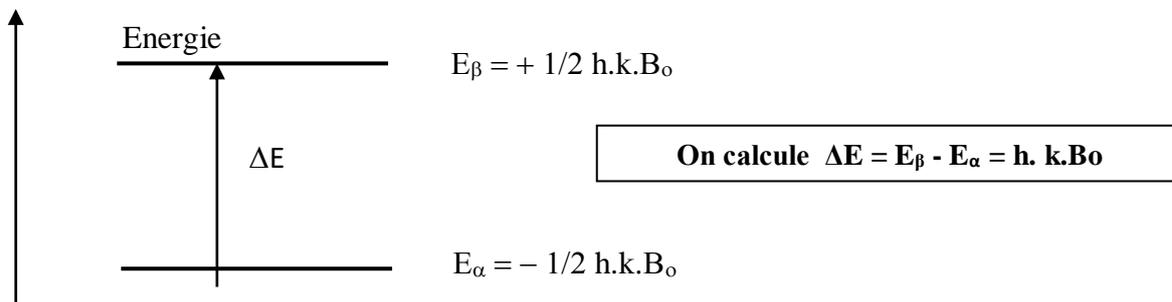


FIGURE 1. Orientations des noyaux dans un champ magnétique appliqué

La résonance magnétique nucléaire correspond au « retournement du spin nucléaire » par absorption d'un photon de fréquence ν_0 . On a une transition de l'état α vers l'état β .



k = constante caractéristique d'un type de noyau
 h = constante de Planck

L'énergie étant quantifiée, on a : $\Delta E = h \cdot \nu_0$

Soit $\nu_0 = k \cdot B_0$ est la condition de résonance

La fréquence d'absorption ou de résonance du proton libre est d'autant plus forte que le champ appliqué est fort.

4. Déplacements chimiques caractéristiques du proton : δ

4.1. Effets d'écran

Pour obtenir la résonance, on fixe la radiofréquence ν_0 du spectromètre et on règle la valeur du champ B tel que $B = B_0$.

Dans l'atome d'hydrogène, un électron gravite autour du noyau et provoque ainsi la formation d'un champ B_i qui s'oppose au champ émis B_0 . On dit qu'il y a effet d'écran ou blindage du noyau. Dans une molécule, les électrons voisins vont aussi jouer ce rôle.

Le noyau subit alors le champ $B_s = B - B_i$. Le champ subi par le noyau est inférieur au champ nécessaire à la résonance B_0 . La fréquence ν_0 étant maintenue constante, la condition de résonance $\nu_0 = k \cdot B_0$ n'est plus satisfaite.

Pour retrouver les conditions de résonance en maintenant constante la fréquence ν_0 , il faut augmenter l'intensité du champ B pour compenser les effets de la circulation électronique qui provoquent ce champ induit B_i et retrouver l'intensité B_0 nécessaire à la résonance au niveau du noyau. On dit que l'atome résonne à champ plus fort que le noyau isolé ou que le signal de l'atome est blindé par rapport à celui du noyau.

4.2. Molécule de référence

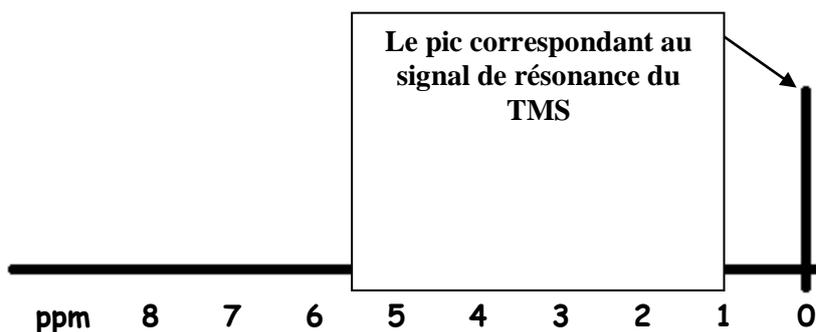
Pour comparer les différentes absorptions, on choisit un composé de référence, le tétraméthylsilane ou TMS.

Ses 12 protons ont tous le même environnement et sont tous fortement blindés. L'absorption se fait à champ fort : B_{TMS} .

4.3. Déplacement chimique

L'écart entre les différents champs mesurés est faible. On porte alors en abscisse la valeur d'une grandeur appelée déplacement chimique, notée δ et exprimée en ppm (partie par million).

$$\delta_i = \frac{B_{TMS} - B_i}{B_{TMS}} \cdot 10^6$$



où B_i et B_{TMS} sont les champs de résonance du noyau i étudié et des noyaux du TMS. Pour amener les valeurs de δ à des valeurs raisonnables, le rapport est multiplié par 10^6 d'où le nom de ppm (parties par million). Pour le proton les déplacements chimiques vont de 0 à 15 ppm.

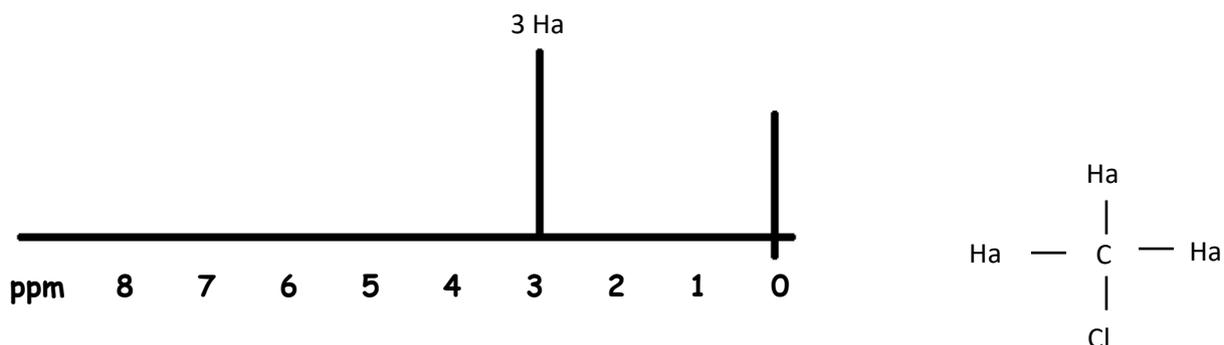
L'intérêt du déplacement chimique réside dans le fait qu'il s'agit d'une grandeur relative, indépendante de la fréquence de travail ν_0 utilisé dans le spectromètre et qui diffère d'un appareil à l'autre.

5. Courbe d'absorption

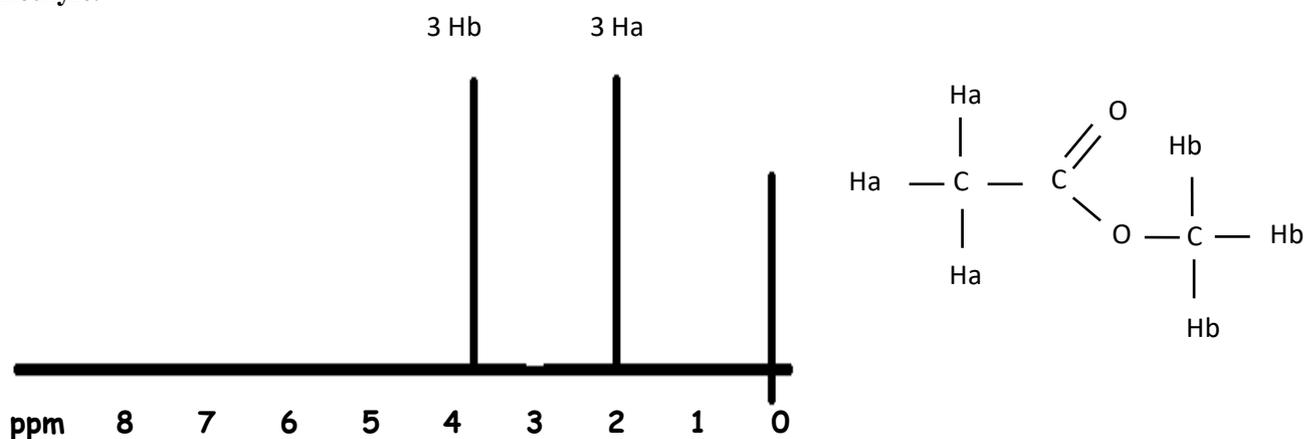
Dans les premiers spectromètres de RMN, la fréquence de l'onde électromagnétique était fixe et la résonance était obtenue par un lent balayage du champ qui augmentait de gauche à droite sur les spectres. Ce sens a été conservé pour le champ. Du fait de cette convention, le déplacement chimique croît de droite à gauche sur un spectre.

Deux protons ayant le même environnement sont deux protons équivalents : ils ont alors le même déplacement chimique.

Exemple 1 : Courbe d'absorption des 3 protons équivalents du chlorométhane.



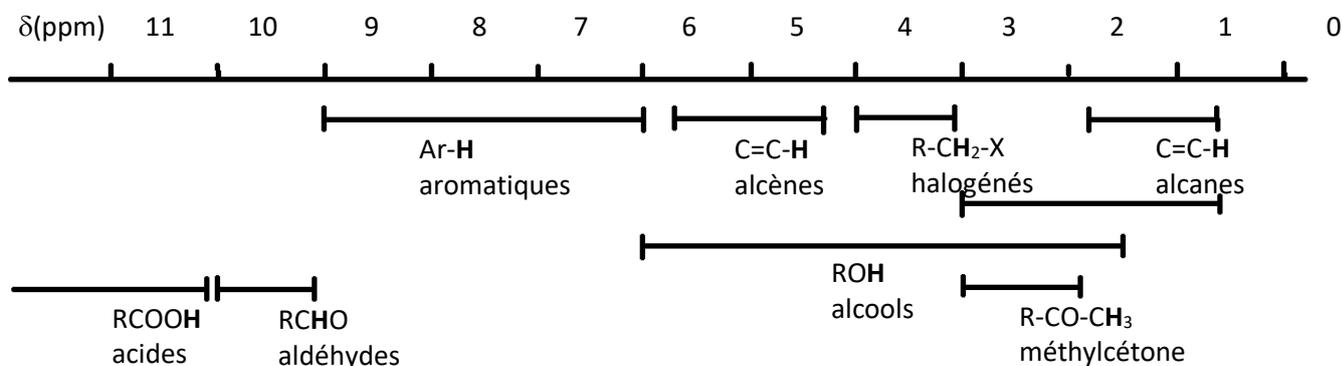
Exemple 2 : Courbe d'absorption des 2 groupes de 3 protons équivalents de l'éthanoate de méthyle.



6. Facteurs influençant le déplacement chimique

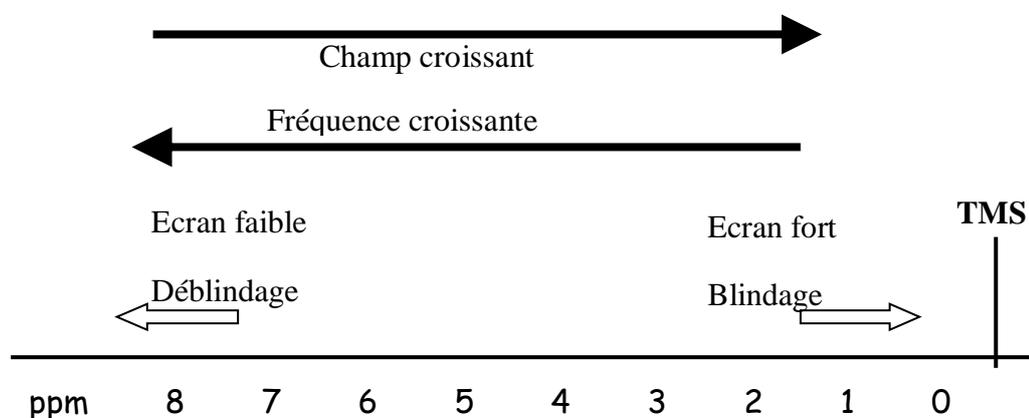
Les déplacements chimiques sont caractéristiques des divers environnements du proton, donc des groupements voisins en chimie organique. On donne le **tableau 1** indicatif suivant :

Tableau 1 : Les déplacements chimiques des différents groupements



De façon générale :

- Les alcanes sont fortement blindés.
- Dans beaucoup de cas le déplacement chimique peut s'expliquer par l'électronégativité.
- Les groupes aromatiques induisent de fort déplacement chimique également mais ceci ne s'explique pas par l'électronégativité. Les déblindages s'effectuent par circulation des électrons π . La proximité d'un système aromatique diminue la densité d'électron autour des noyaux proches.
- Ces déplacements chimiques peuvent être très grands de l'ordre de 10 ppm.

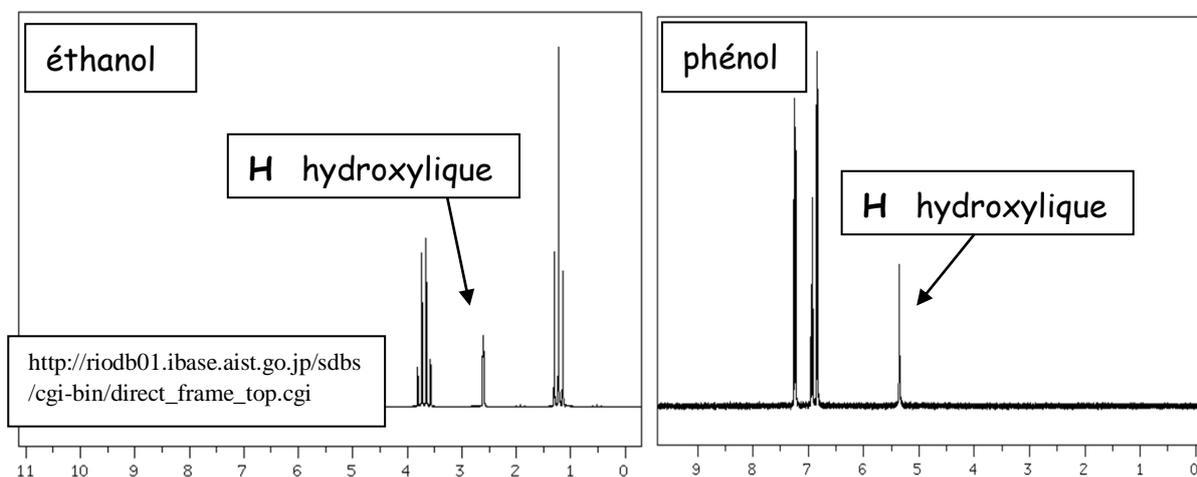


Remarque : Cas des protons des alcools

La plus ou moins grande mobilité du proton des alcools est fonction de la structure du reste de la molécule, du solvant, de la température, de la concentration, etc. Cette mobilité pour les alcools conduit à un domaine de déplacement chimique particulièrement étendu.

Il est donc difficile de prévoir le déplacement chimique d'un proton hydroxylique.

Exemple avec l'éthanol ($\delta = 2,60$ ppm) et le phénol ($\delta = 5,35$ ppm)



7. Courbe d'intégration

Dans un spectre RMN l'énergie absorbée par une espèce donnée de protons est proportionnelle au nombre de protons mis en jeu. C'est-à-dire que l'intensité du signal, qui est mesurée par sa surface, est proportionnelle au nombre de protons correspondants.

L'aire sous un pic est proportionnelle aux nombres de protons équivalents

Un dispositif appelé intégrateur permet de mesurer la surface des différents pics ou d'ensembles de pics proches (appelés massifs).

L'appareil trace alors sur le spectre une courbe possédant des paliers appelée courbe d'intégration. Le rapport des hauteurs entre deux paliers est égal au rapport des nombre de protons impliqués dans les massifs correspondants. La courbe ne donne donc pas le nombre absolu de protons d'un pic mais leur proportion relative dans ce pic (**Fig. 2**).

La hauteur du palier correspondant aux 3 groupes $-CH_3$ (9 protons) est de 45 mm . Celle du palier correspondant au proton isolé est de 5 mm, soit bien les 1/9 de 45 mm.

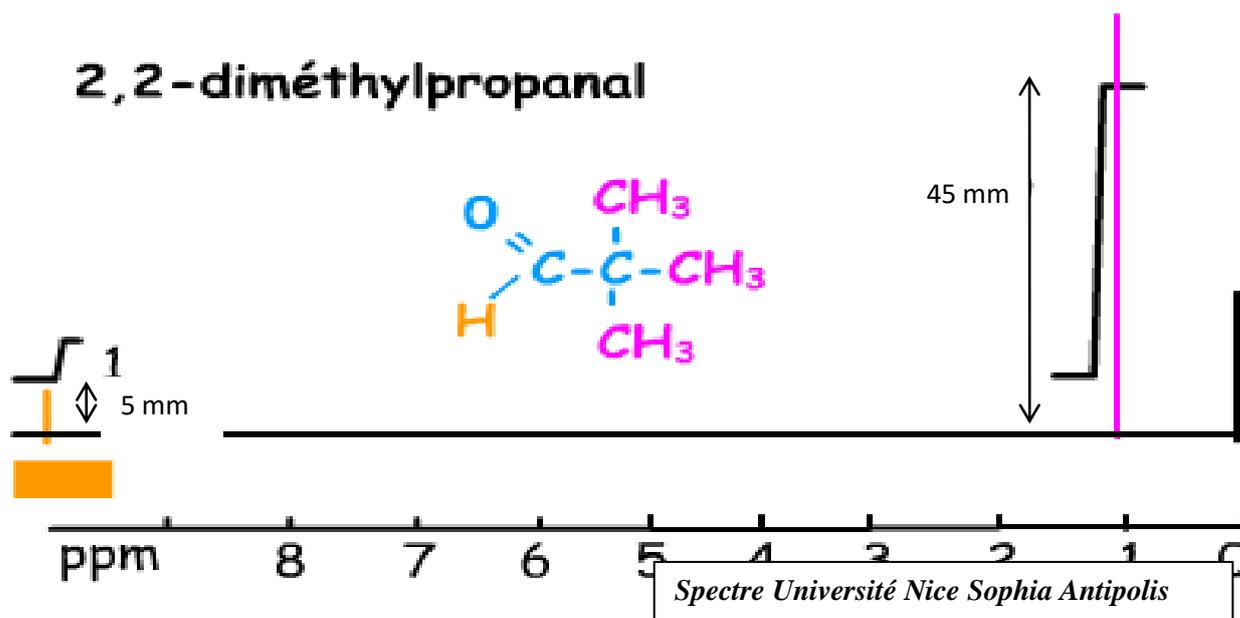


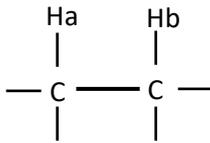
FIGURE 2 : Spectre RMN 2,2-diméthylpropanal.

8. Le couplage spin/spin de premier ordre

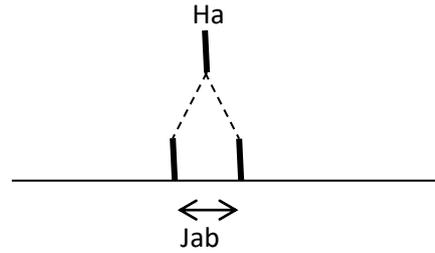
De nombreux spectres contiennent plus de pics que la molécule contient de protons. En effet, la résonance des protons équivalents produit un groupe de pics centrés sur δ et équidistants les uns des autres.

Ceci est dû aux interactions des protons avec les protons voisins. Deux noyaux peuvent interagir au travers de la molécule par le biais de la liaison chimique. Cette interaction n'est pas négligeable et donne une structure fine au spectre RMN.

8.1. Couplage 1 ; 1



Ha et Hb sont non équivalents



La présence d'un proton sur le carbone voisin se traduit par un dédoublement du pic d'absorption de **Ha**

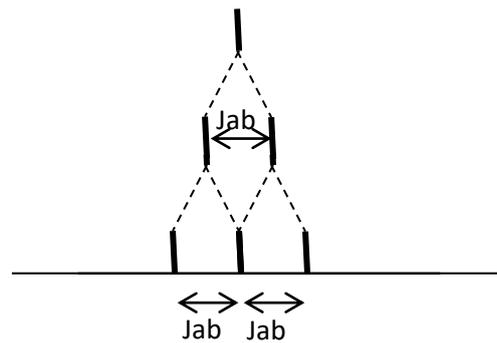
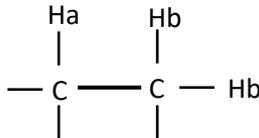
La distance entre les 2 pics est appelée **constante de couplage J**. Elle est de l'ordre de 6 à 10 Hz.

On dit que la résonance de **Ha** par le couplage avec **Hb** donne un doublet de constante de couplage **Jab**.

De la même façon, la résonance de **Hb** se traduit par un doublet.

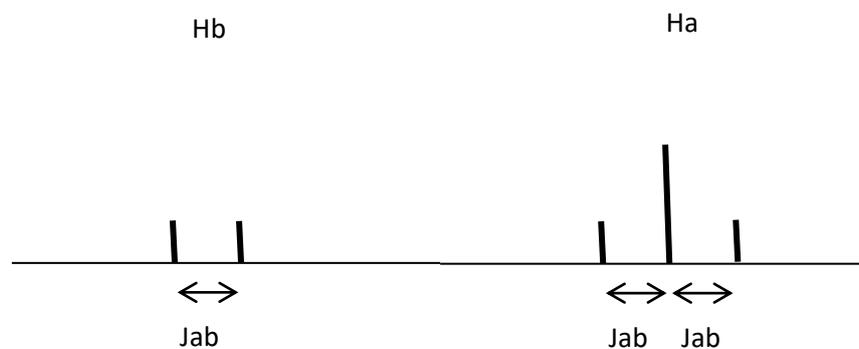
8.2. Couplage 2 ; 1

La présence de deux protons équivalents voisins entraîne un couplage de constante équivalente : on observera ainsi un triplet d'intensité 1 ; 2 ; 1.



Ha et Hb sont non équivalents

La résonance de **Ha** par le couplage avec **Hb** donne un doublet lui-même scindé en deux doublets de **constante de couplage Jab** : on obtient un triplet d'intensité 1 ; 2 ; 1. On obtient au final



8.3. Généralisation : règle des $n+1$

Un groupe de m protons équivalents avoisinants n protons équivalents apparaît sous la forme d'un multiplet de $(n+1)$ pics dont la somme des aires est proportionnelle à m .

Le groupe de protons m ne doit pas être équivalent au groupe de protons n .

Les intensités relatives des pics sont données par la règle du triangle de Pascal (**Tab 02**).

Tableau 2 : Les intensités relatives des pics

| Nombre de H équivalents voisins | Nombres de pics | Nom du multiplet | Intensités relatives |
|---------------------------------|-----------------|------------------|----------------------|
| 0 | 1 | singulet | 1 |
| 1 | 2 | doublet | 1 1 |
| 2 | 3 | triplet | 1 2 1 |
| 3 | 4 | quadruplet | 1 3 3 1 |
| 4 | 5 | quintuplet | 1 4 6 4 1 |
| 5 | 6 | sextuplet | 1 5 10 10 5 1 |
| 6 | 7 | heptuplet | 1 6 15 20 15 6 1 |

9. Appareillage :

Un spectromètre de R.M.N. est constitué d'un électro-aimant à l'origine de B_0 . L'élévation de température nécessite la mise en place d'un circuit de refroidissement de l'aimant. Pour des champs importants (2 tesla et plus), on a recours à des cryoaimants utilisant des bobines supraconductrices refroidies à l'hélium liquide (**Fig. 3**).

Les appareils de routine actuels utilisent des électro-aimants dont les champs magnétiques valent 1,409 ; 2,115 ; 5,872 et 11,743 correspondant respectivement à 60, 90, 250 et 500 MHz, pour la résonance du proton. On utilise d'ailleurs très souvent cette grandeur, la fréquence, pour caractériser l'appareil. Dans ces appareils à onde continue, la fréquence est fixée par l'émetteur et on fait un balayage en faisant varier très légèrement le champ B_0 à l'aide d'un variateur de champ pour obtenir la résonance.

Mais un besoin de sensibilité et de résolution plus élevées ont conduit à la production d'appareils de fréquence allant de 200 à 500 et même 600 MHz. Pour tous les appareils de fréquence supérieure à 100 MHz, on utilise des cryoaimants.

Le spectromètre est aussi équipé d'un émetteur-récepteur de radiofréquence : il s'agit d'une bobine alimentée par un courant alternatif. Le tube contenant l'échantillon est placé dans une sonde, qui contient les bobines d'émission et de réception, et sur un support spécial « spinner » qui permet de faire tourner l'échantillon autour de son axe vertical dans le but d'améliorer l'homogénéité du champ.

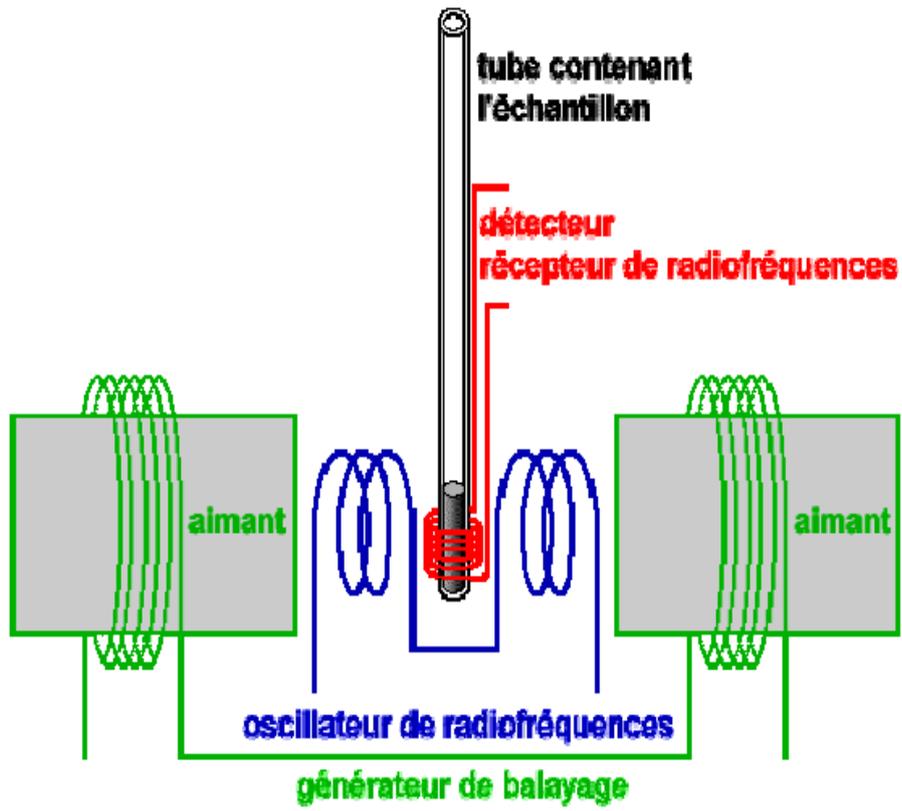


FIGURE 3 : Schéma d'un spectromètre R.M.N.

CHAPITRE VII :

SPECTROSCOPIE A INFRAROUGE

1. Le rayonnement infrarouge

Le rayonnement infrarouge (**IR**) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1}) (**Fig. 1**).

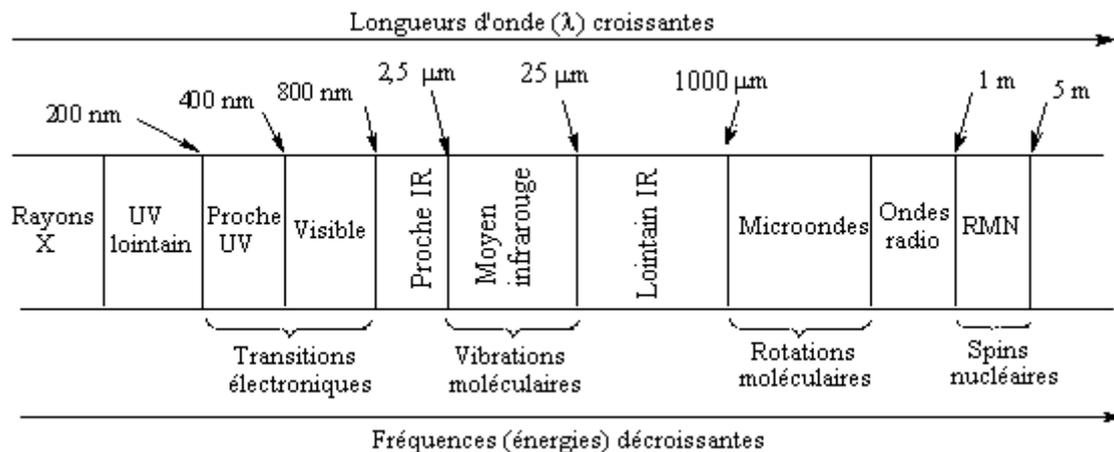


Figure 1 : Domaines de l'IR dans le spectre électromagnétique

Les radiations infrarouges traversent facilement l'atmosphère, même brumeuse. On utilise cette propriété en photographie aérienne, pour prendre des vues panoramiques par temps couvert. L'infrarouge sert aussi au chauffage domestique ou industriel et au séchage des vernis et peintures, du bois, des cuirs, des papiers et pellicules photographiques, à la déshydratation des fruits et légumes. L'une des applications militaires les plus importantes concerne l'autoguidage par infrarouge des missiles. L'infrarouge peut aussi servir pour les appareils de visée nocturne. En thérapie, les rayons infrarouges activent les processus cellulaires, en particulier la cicatrisation.

Dès 1924, on s'est aperçu que l'énergie du rayonnement infrarouge moyen coïncidait avec celle des mouvements internes de la molécule. Ainsi, la relation entre l'absorption d'un rayonnement IR par une molécule et sa structure moléculaire est mise en évidence. Même si les régions du proche IR et du lointain IR ont suscité un certain intérêt, l'utilisation de la spectroscopie moyen IR reste la plus adaptée pour l'élucidation de la composition moléculaire d'un composé.

Les spectromètres IR sont construits à partir d'éléments principaux, avec quelques différences au niveau des matériaux utilisés ou de leur montage selon le domaine de l'IR exploité et selon le type d'interaction entre la matière et le rayonnement.

2. Sources lumineuses de radiations IR

2.1. Sources thermiques

Dans les sources thermiques, la radiation lumineuse est le résultat de l'échauffement d'un filament métallique parcouru par un champ électrique. Les sources thermiques présentent de nombreux avantages. Elles émettent des radiations lumineuses couvrant une grande plage de longueurs d'onde. L'intensité de la source est forte, ce qui réduit les problèmes d'amplification du signal. Enfin, les sources thermiques restent stables pendant de longues périodes.

Les filaments des sources thermiques émettent de l'énergie d'une manière comparable à celle d'un *corps noir*. La surface sous la courbe densité d'énergie = $f(\lambda)$ représente l'énergie émise W pour toutes les longueurs d'onde. W augmente rapidement en fonction de la température $W = \sigma T^4$ avec $\sigma = 5,67 \cdot 10^{-8} \text{ W.m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$. La forme de la courbe est donnée par la relation de Planck (**Equation 1**) :

$$W(\lambda, T) = \left(\frac{8\pi h c}{\lambda^5} \right) \frac{1}{e^{\frac{hc}{\lambda k T}} - 1} \quad (1)$$

Dans le cas de la spectroscopie moyen infrarouge, en se basant sur la courbe d'émission du corps noir, les sources lumineuses retenues fonctionnent à une température d'environ 1000 K, puisque cette température correspond à un pic d'émission maximum dans ce domaine. Cependant, étant donné que l'énergie totale émise augmente comme la puissance quatrième de la température, il est nécessaire, pour disposer d'une énergie suffisante, d'appliquer une température plus élevée, typiquement entre 1600 et 2400 K.

* **Dans le moyen infrarouge**, les sources les plus utilisées sont :

- **filament de globar** : c'est une baguette de carbure de silicium SiC, diamètre de 5 à 7 mm, longueur de 4 à 7 cm. Il fonctionne à des températures de l'ordre de 1300 °C et rayonne un spectre continu entre 10000 et 250 cm⁻¹ avec une émission maximale à 5300 cm⁻¹.

- **filament de Nichrome** : c'est un fil résistant bobiné sur une plaque réfractaire et isolante dont l'émission infrarouge entre 2 et 15 μm est suffisante pour les spectromètres de routine. Enroulé en spirale et échauffé électriquement, il fournit une source de vie plus longue qu'un Globar ou un filament de Nernst, mais aussi d'énergie radiante plus faible.

* **Dans le domaine du proche IR**, les lampes les plus utilisées sont en quartz-tungstène-halogène (QTH) (gamme spectrale : 250-2500 nm, soit 40000-4000 cm⁻¹).

* **Dans le domaine du lointain IR**, classiquement, la source est une lampe à vapeur de mercure (limite : 10 cm⁻¹). La limite de 10 cm⁻¹ pour un spectromètre à source classique n'est réalisable qu'avec des échantillons de l'ordre de 1 cm² de surface. Des brillances bien plus importantes que pour la lampe à vapeur de mercure peuvent être obtenues avec une source synchrotron : on n'améliore que légèrement la limite basse fréquence de l'instrument, mais la brillance permet de travailler sur de très petits échantillons.

L'avantage du rayonnement synchrotron réside dans sa luminance. Même si le flux de photons total émis par un corps noir (type Globar) est plus élevé que celui produit par une source synchrotron, la luminance ou brillance obtenue avec un synchrotron est bien supérieure (d'un facteur 103) à celui d'une source classique, du fait de la très faible divergence angulaire du faisceau (**Fig. 2**).

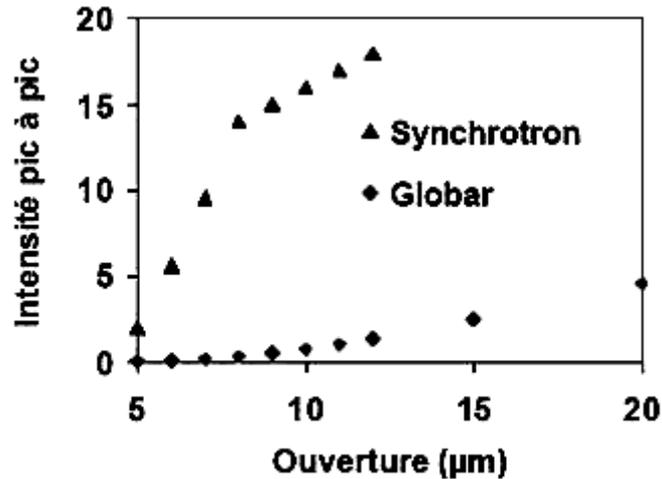


FIGURE 2 : Intensité d'un interférogramme avec une source synchrotron et une source Globar pour différentes ouvertures.

2.2. Diodes émettrices de lumière

Les diodes émettrices de lumière (DEL) utilisent un semi-conducteur à base de gallium à jonction de type *p-n*. Un potentiel adéquat amène les électrons et les trous à se recombiner, de sorte que l'énergie est libérée sous forme de lumière, dans une bande étroite de longueur d'onde. Les DEL les plus communes à base de GaAs, émettent dans la région 900-970 nm (**Fig. 3**), avec des bandes passantes comprises entre 20 et 100 nm.

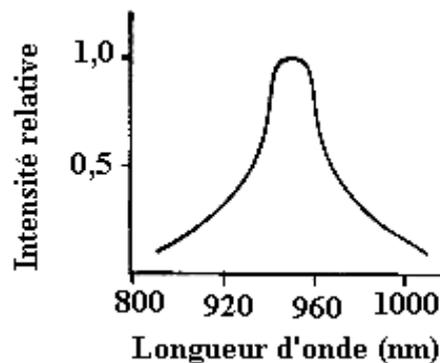


FIGURE 3 : Répartition spectrale d'une DEL émettant dans le proche infrarouge

Les DEL sont très stables en longueur d'onde et très robustes. Contrairement aux sources thermiques, elles peuvent être allumées et éteintes très rapidement et un grand nombre de fois.

3. Types de spectromètres

Il existe deux grands types d'appareils. Leurs différences résident essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'onde.

3.1. Spectromètres dispersifs

Les premiers spectromètres infrarouges sont de type dispersif. Ces appareils sont conçus selon le schéma de principe représenté sur la figure 4 :

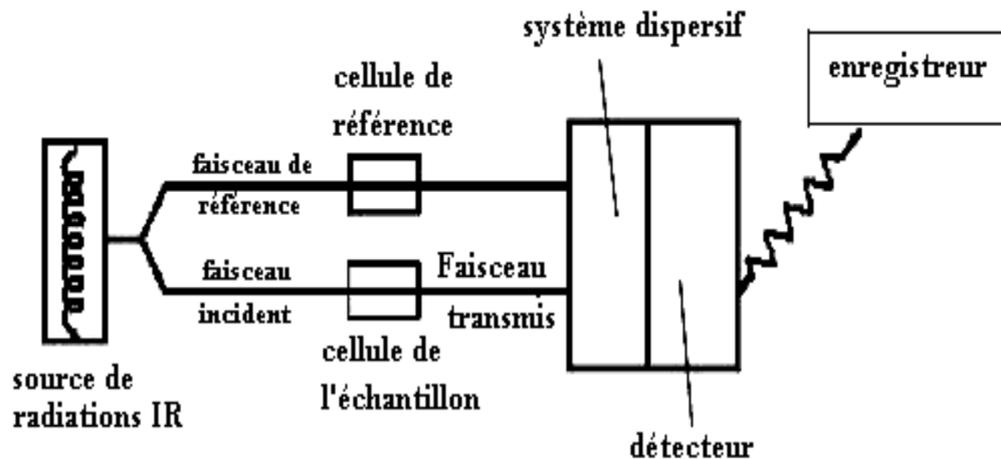


Figure 4 : Schéma de principe d'un spectromètre IR dispersif

Ces instruments séparent les fréquences de l'énergie émise à partir de la source infrarouge à l'aide d'un prisme (en chlorure de sodium utilisable jusqu'à 650 cm^{-1} ou en bromure de potassium utilisable jusqu'à 400 cm^{-1}) ou de réseaux, éléments dispersifs plus efficaces (bloc de silice sur lequel on a gravé des traits, métallique en surface).

Le détecteur mesure la quantité d'énergie pour chaque fréquence qui passe à travers l'échantillon. Il en résulte un spectre qui est le tracé de l'intensité en fonction du nombre d'onde $I = f(\nu)$. Les détecteurs utilisés antérieurement étaient de type thermique (thermocouples).

Les inconvénients de ces appareils sont :

- la relative lenteur des mesures (étant donné que l'instrument mesure chaque fréquence individuellement, l'enregistrement d'un échantillon prend de 10 à 15 minutes),
- la relative insensibilité (la détection nécessite une quantité raisonnable de produit pour une analyse exploitable). Actuellement, il est nécessaire de détecter 0,01% d'un composé dans une matrice ou 10 ppb d'une substance dans l'air.
- la complexité mécanique (existence de certaines parties mobiles toutes sujettes à des problèmes de casse mécanique).

3.2. Spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR) (non dispersifs)

Les spectromètres FT-IR ont été développés pour apporter une réponse aux limitations des spectromètres dispersifs. La difficulté principale à résoudre était celle de la lenteur de l'acquisition. Il était indispensable d'imaginer un dispositif mesurant toutes les fréquences *simultanément*. Ce dispositif est l'*interféromètre*.

3.2.1. Fonctionnement du spectromètre FT-IR

Un spectromètre FT-IR comporte essentiellement cinq parties (Fig.5) :

- Une source lumineuse ;
- Un dispositif permettant de générer les interférences : l'**interféromètre** (voir description ci-après) ;
- Un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (porte-échantillon) dépendant du mode de mesures utilisé (réflexion ou transmission) ;
- Un détecteur ou capteur photosensible: Le spectromètre FT-IR peut comporter un ou plusieurs détecteurs, pouvant être de type :
 - pyroélectrique (générant un courant proportionnel au différentiel de température entre les 2 faces du détecteur) comme les détecteurs DTGS (*Deuterated Tri-glycine Sulfate*),
 - photoélectrique (générant une différence de potentiel par l'absorption de photons) comme les détecteurs MCT (*Mercurie Cadmium Tellure*) qui sont constitués d'un monocristal en alliage de mercure-cadmium-tellure déposé sur un support inerte.
- Enfin, le convertisseur analogique numérique qui interroge le détecteur à des intervalles réguliers et transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique.

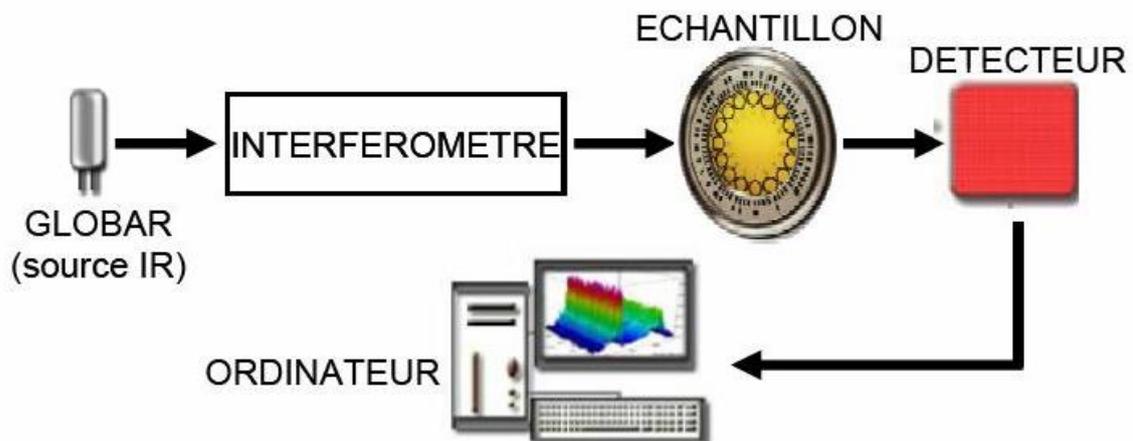


FIGURE 5 : Schéma de principe d'un spectromètre FT-IR

L'interféromètre

Cet instrument permet de mesurer les longueurs d'onde par production d'interférences. L'interféromètre de **Michelson (1891)** utilisé pour la mesure est formé d'une lame séparatrice semi-transparente qui divise le faisceau issu de la source en deux faisceaux, l'un réfléchi vers un miroir fixe, l'autre transmis vers un miroir mobile (**Fig. 6**). Le miroir mobile, perpendiculaire au miroir fixe, bouge à une vitesse constante le long de son axe ($x=qq$ mm). Donc, un des faisceaux parcourt un chemin optique fixe, l'autre un chemin optique de longueur variable à cause du miroir mobile. La phase des ondes sur ces deux trajets optiques est donc modifiée en déplaçant le miroir mobile.

Ces deux faisceaux se recombinaient alors sur la séparatrice. Le signal sortant de l'interféromètre résulte en ces 2 faisceaux interférant entre eux (interférogramme) : quand la différence de chemin optique entre les faisceaux correspond à un multiple entier de la longueur d'onde d'une bande, on obtient une interférence constructive. Une interférence négative est obtenue lorsque la différence correspond à un multiple entier impair du quart de la longueur d'onde. L'ensemble des interférences positives et négatives produit un interférogramme. De manière générale, lorsqu'on fait varier x , on observe alternativement des maxima et des minima au niveau de l'intensité du faisceau résultant.

Cet interférogramme possède la propriété que chaque point (fonction de la position du miroir mobile) qui constitue le signal possède une information sur chaque fréquence infrarouge provenant de la source. L'interféromètre produit un *signal unique* contenant toutes les informations requises pour produire un spectre. Il peut être mesuré très rapidement (de l'ordre de grandeur de la seconde).

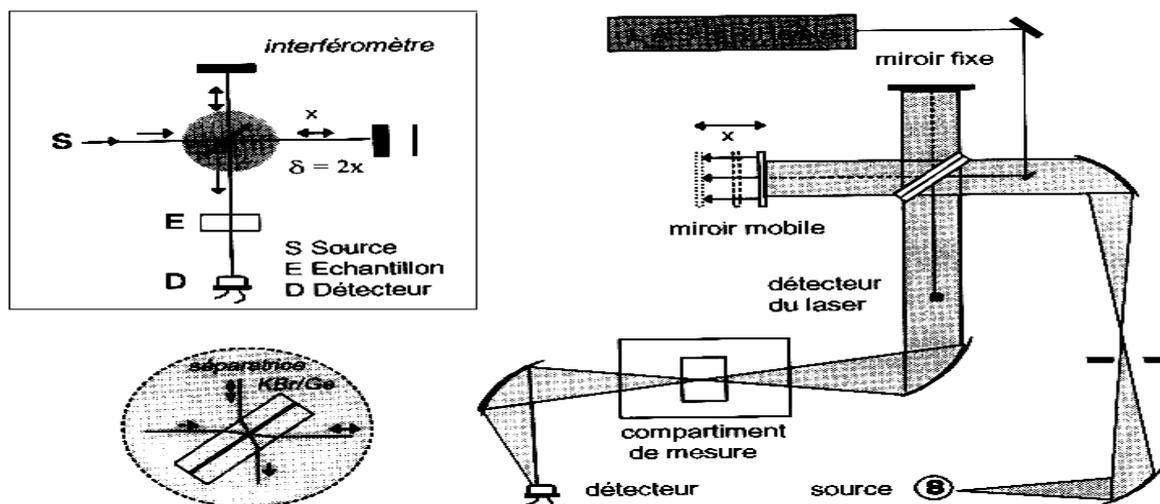


FIGURE 6 : L'interféromètre de Michelson et chemin optique dans le spectromètre FT-IR

Le faisceau sortant de l'interféromètre est réfléchi vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Il arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est une signature de l'intensité en fonction du déplacement du miroir $I=f(\delta)$. Cet interférogramme ne peut être interprété directement. Le tracé $I = f(\nu)$ est obtenu à l'aide d'un traitement mathématique appelé *transformée de Fourier*. Cette dernière est calculée (Fourier Transform (FT) inverse de l'interférogramme) à l'aide d'un ordinateur qui permet de visualiser finalement le spectre $I = f(\nu)$.

3.2.2. Génération du spectre FT-IR

Le processus de génération du spectre de l'échantillon comporte 4 étapes (**Fig. 7**):

- 1 - enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau de référence sur le support porte-échantillon
- 2 - enregistrement d'un interférogramme simple-faisceau de l'échantillon
- 3 - transformation de Fourier inverse des interférogrammes et opérations post-Fourier
- 4 - calcul du spectre d'absorbance (ou de transmittance) à partir des spectres simple faisceau

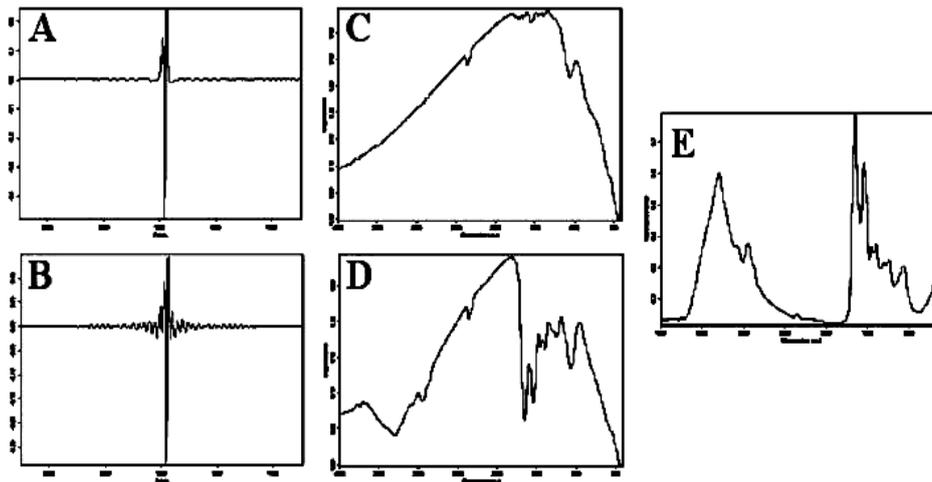


FIGURE 7 : Génération du spectre FT-IR

- (A) Interférogramme de référence
 (B) Interférogramme échantillon
 (C) Spectre simple faisceau de référence
 (D) Spectre simple faisceau échantillon
 (E) Spectre en absorbance

3.2.3. Résolution spectrale

La notion est illustrée sur **la figure 8**. Un écart d entre deux bandes sur l'échelle des nombres d'onde est observable lorsqu'une modulation périodique de $1/d$ est constatée sur l'interférogramme : pour obtenir une séparation correcte de d entre deux bandes dans le domaine des nombres d'onde, il faut au minimum mesurer l'interférogramme sur une distance $x=1/d$.

Par exemple, une résolution spectrale de 4 cm^{-1} demandera au minimum un déplacement x du miroir mobile de 0,25 cm. En conclusion, plus on augmente le parcours du miroir mobile, plus on augmente la résolution spectrale.

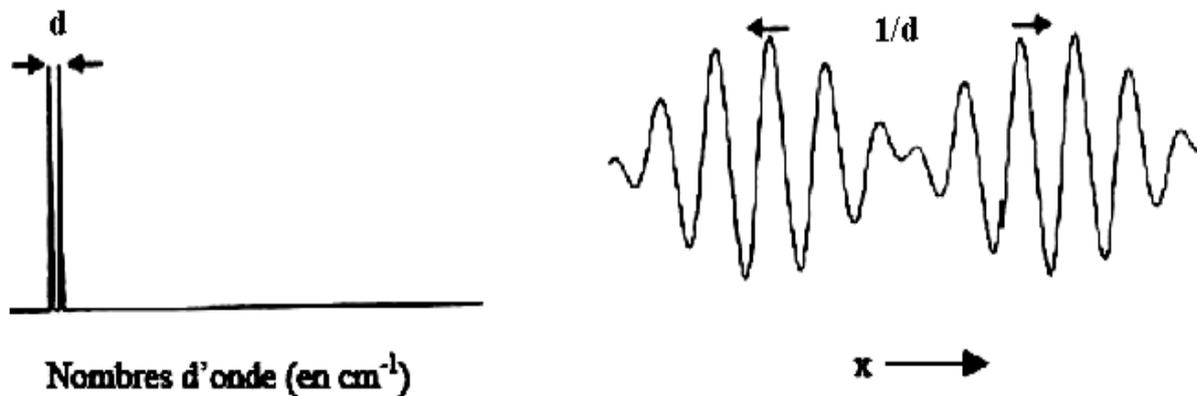


FIGURE 8 : Deux (2) signaux spectraux espacés de d et leur interférogamme

3.2.4. Avantages de la spectroscopie FT-IR

- Rapidité: du fait d'une mesure simultanée de toutes les fréquences, la mesure dure quelques secondes. Un spectre de $800\text{-}8000\text{ cm}^{-1}$ de résolution de 2 cm^{-1} , mesuré en 30 minutes sur un spectromètre dispersif, sera collecté en 1 seconde au même rapport signal/bruit.
- Reproductibilité et fiabilité
- Haute résolution spectrale
- Simplicité mécanique : la seule partie mobile de l'instrument est le miroir mobile.
- Calibration interne : ces spectromètres sont auto-calibrés et ne nécessitent jamais de calibration par l'utilisateur. Un laser He-Ne permet de repérer avec précision la position du miroir mobile.
- Sensibilité : la sensibilité est très largement améliorée par rapport aux systèmes dispersifs. La possibilité de réaliser plusieurs acquisitions permet d'améliorer considérablement le rapport signal/bruit. La très bonne sensibilité permet d'envisager des applications en *contrôle qualité* (identification de contaminants par exemple). Il est en outre possible d'effectuer des *analyses quantitatives* de grande précision avec ce type de spectromètre.

4. Microspectroscopie FT-IR

La microspectroscopie infrarouge est le couplage entre un spectromètre IR et un microscope. Cette technique permet d'utiliser les potentialités de la spectroscopie FT-IR à l'échelle microscopique pour l'étude de micro-échantillons (taille $\approx 10\text{ }\mu\text{m}$). Le rôle du microscope est de conduire le rayon IR de l'interféromètre à l'échantillon de manière colinéaire au chemin optique visible, sur une zone quasiment ponctuelle (quelques micromètres).

Le microscope est relié à un spectromètre FT-IR et est muni d'une platine (porte-échantillon) motorisée, d'un détecteur et d'objectifs. Les lentilles en verre étant opaques aux radiations IR, le microscope utilise des optiques réfléchissantes (miroirs dorés ou argentés). Le mouvement de la

platine est contrôlé à l'aide d'un logiciel et peut être réglé avec une précision sub-micrométrique. La plupart des objectifs de microscopes IR ont des ouvertures donnant des résolutions spatiales de l'ordre de quelques microns à plusieurs dizaines de microns suivant l'ouverture utilisée. *La résolution spatiale peut être définie comme la capacité à mesurer le spectre d'un objet sans contamination par les informations provenant d'objets placés hors du champ délimité par l'ouverture.*

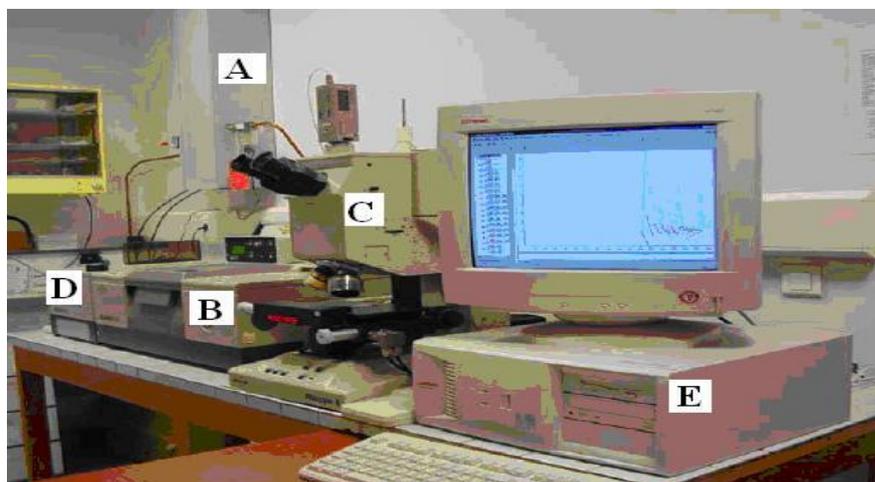
Dans certains cas, le microscope IR peut être placé dans une enceinte de purge (azote gazeux ou air sec) (**Fig. 9**) pour assurer une protection efficace contre les influences atmosphériques (vapeur d'eau et gaz carbonique). L'échantillon à analyser est placé sur la platine motorisée et amené au centre du champ de vision du microscope. Un passeur d'échantillon peut être utilisé. C'est un accessoire couplé au spectromètre, qui comporte un porte-échantillon (platine), un système de reconnaissance par code-barre et un système d'entraînement et permet d'analyser jusqu'à 15 échantillons dans les mêmes conditions.

En micro-spectroscopie FT-IR, les modes d'enregistrement sont la transmission si l'épaisseur de l'échantillon est compatible avec une absorbance raisonnable (de l'ordre d'une unité). Sinon, le mode de réflexion s'applique à des échantillons plus épais ou à des dépôts sur des supports réfléchissants.

Actuellement, la micro-spectroscopie FT-IR est largement utilisée dans de nombreux domaines.

Exemple : - Application à des échantillons biologiques à l'échelle moléculaire (lipides, protéines, polysaccharides et ADN...), cellulaire (bactéries, levures et cellules...) et tissulaire (peau, aorte, cerveau, sein, colon et divers organes...) :

- Identification et typage de levures
- Compréhension de l'effet de divers agents sur les bactéries



A : Système de purge

B : Spectromètre FT-IR

C : Microscope

D : Module passeur d'échantillons

E : Micro-informatique

FIGURE 9 : Micro-spectromètre FT-IR avec système de purge et passeur d'échantillon

5. Spectroscopie photoacoustique (PAS)

En 1880, Bell découvre que, lorsque la lumière est focalisée sur un diaphragme mince, il y a émission d'un son. Cependant, les applications de ce phénomène n'ont pu se développer que beaucoup plus tard, dans les années 1970.

En spectroscopie photoacoustique (PAS), un *événement optique* est transformé en *événement acoustique*. Dans un premier temps, la lumière est absorbée par l'échantillon disposé dans une cellule scellée (**Fig. 10**). L'affaiblissement non radiatif de cette lumière absorbée produit un transfert de chaleur à la surface de l'échantillon. Ce gradient thermique produit alors des ondes de pression (signal acoustique) pouvant être détectées par un microphone. Ce signal, lorsqu'il est tracé en fonction de la fréquence, donne un spectre proportionnel au spectre d'absorption de l'échantillon.

La PAS est une technique non destructive, facile à mettre en œuvre et applicable à tous types d'échantillons même les plus opaques et permet de réaliser des études qualitatives et quantitatives.

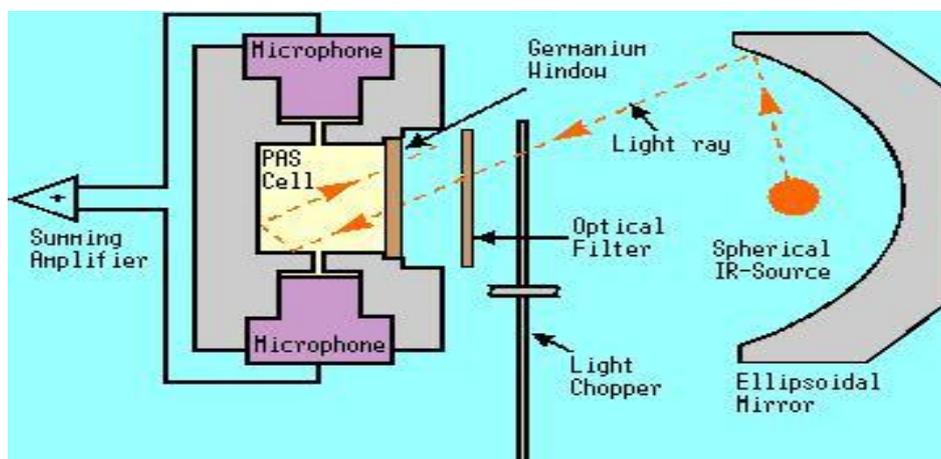


FIGURE 10 : Schéma de principe du spectromètre photoacoustique (PAS).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Gitzhofer .F**, cours techniques de caractérisation des matériaux sur <http://www.chimie.usherbrooke.ca/cours/gch740/document/chapitre%205%20Analyse%20%C3%A9%A9mentaire.pdf>.
- **Gunther .H, Suffert .J-J, Ourisson .G, (1994)**, La spectroscopie de RMN, Masson 2.225.84029.6.
- **Hesse .M, Meier .H et Zeeh .B, (1997)**. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson, 2-225-83050-9.
- **Jacobs Het Coll, Tetrahedron 1993, p. 6 045.**
- **Laverdière .F, Holstein .A, Thiebaut .L , Mallee .R, Gravejat .G et Desclozeaux .B, (1995)**. Dossier Couplage : Les principales méthodes d'analyse , p5.
- **Malcom H. Levitt, Wiley, (2008)**. Spin dynamics, 2nd edition.
- **Mendham .J, Denney .R, C, Barnes .J,D et . Thomas M,J, K, (2005)**. Analyse chimique quantitative de Vogel, 6ème édition De Boeck.
-
- **Moutte .J**, Notes sur l'analyse par spectrométrie d'émission atomique à source plasma, Ecole des Mines de Saint-Etienne sur <http://www.emse.fr/~moutte/ecole/chromato/IcpAesIntroduction.pdf>.
- **Murray .R, (1992)**. Instrumentation in analytical chemistry, Louise Voress 0.8412.2202.9.
- **Péré .J,P, (1999)**.Techniques spectroscopiques en biochimie analytique, CRDP Aquitaine.
- **Primer .A, (1996)**. Fundamental of modern uv-visible spectroscopy Hewlett-Packard® Company 12-5965-5123E.
- **Rouessac .F, Rouessac .A, (1998)**. Analyse Chimique. Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. Cours et Exercices Résolus » 4ème Ed.; Dunod, Paris.
- **Rouessac .F, Rouessac .A et Cruché .D (2004)**. Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition, Paris.
- **Séamus P J Higson, (2003)**. Analytical Chemistry, Oxford University Press.
- **Skoog . D.A., West ., D.M, Holler . F.J., (1997)**. Chimie Analytique, *De Boek & Larcier* 7ème édition Paris & Bruxelles.
- <http://scdurca.univ-reims.fr/exl-doc/GED00000629.pdf>
- <http://www.emse.fr/fr/transfert/spin/formation/ressources/sam96/fichierspdf/general.pdf>
- <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/spectroscopie/gbdocspedagogiques.html>