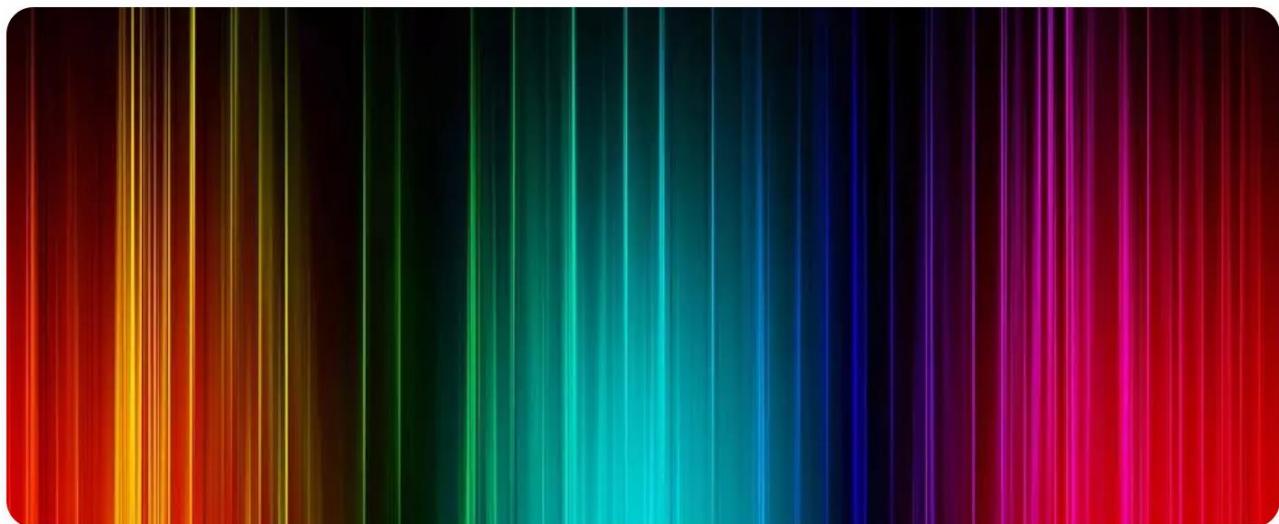


*République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Centre Universitaire Nour El-Bachir d'El-Bayadh  
Institut de Sciences  
Département de sciences de la Nature et de la Vie.*



# *Méthodes Spectrales*

Préparé par Dr. Mehdi Yamina.



**Année universitaire 2024-2025**

## **Préface**

Le présent polycopié est destiné aux étudiants de Master en Biochimie, mais il peut également être utile aux étudiants de Licence en Biologie. Il propose un programme exhaustif regroupant les méthodes spectroscopiques d'analyse les plus couramment employées pour la caractérisation des produits de synthèse organiques ainsi que des extraits naturels. Ce document est le fruit des enseignements dispensés dans le cadre du module consacré aux méthodes spectrales pour le niveau M01 en Biochimie Appliquée. Les cours sont présentés de manière simplifiée, accompagné de plusieurs exemples de spectres pour favoriser la compréhension de ce module. Le polycopié se compose de six chapitres, à savoir :

- **Chapitre I : Introduction aux méthodes spectrales**
- **Chapitre II : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire (UV, Vis, IR)**
- **Chapitre III : Spectrométrie à fluorescence (Fluorimétrie)**
- **Chapitre IV: Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)**
- **Chapitre V : Spectrométrie d'émission atomique**
- **Chapitre VI : Spectrométrie de masse (SM)**
- **Chapitre VII : Résonnance magnétique nucléaire (RMN)**

# Chapitre 01

## Introduction aux méthodes spectrales

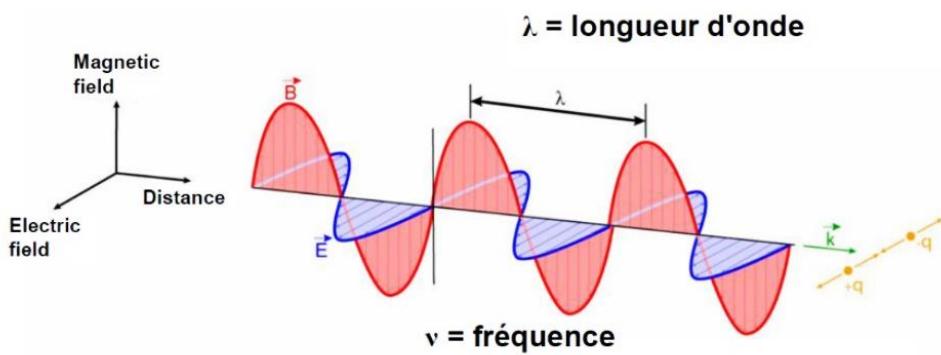
I.1.	Introduction.....	01
I.2.	Rayonnement électromagnétique.....	01
I.3.	Nature de la lumière.....	03
I.4.	Relation de la lumière et couleurs.....	03
I.5.	Spectre.....	04
I.6.	Spectroscopie.....	07
I.7.	Historique de la spectroscopie.....	08
I.8.	Domaines d'application de la Spectroscopie.....	10

### I.1. Introduction

Les chimistes étudient la façon dont les différents rayonnements électromagnétiques interagissent avec les atomes et les molécules. La *spectroscopie* est la science qui permet de comprendre la dynamique d'interaction entre la matière et le rayonnement électromagnétique. Tout comme il y a différents types de rayonnement électromagnétique, il y a différents types de spectroscopie en fonction de la fréquence de l'onde électromagnétique utilisée. Exemple : la spectroscopie dite UV-Vis étudie ce qu'il se passe dans les atomes et les molécules quand des photons des domaines ultraviolet et visible (de longueurs d'onde comprises entre 10 et 700 nm) sont absorbés ou émis. Alors, en fonction de ces interactions, la spectroscopie peut revêtir différentes formes, telles que la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie électronique, la spectroscopie d'absorption, la spectroscopie d'émission, la spectroscopie atomique, la spectroscopie moléculaire, etc.

### I.2. Rayonnement électromagnétique

Les rayonnements électromagnétiques sont essentiellement émis par les vibrations des électrons atomiques, qui engendrent une interaction entre un champ électrique et un champ magnétique, entraînant la formation d'un couple constitué d'un champ électrique et d'un champ magnétique formant une onde électromagnétique. En réalité, le rayonnement électromagnétique est une forme d'énergie qui se présente par une onde électromagnétique qui se propage dans le vide à la même vitesse que celle de la lumière de  $3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$ . Seule une partie de ces ondes est visible sous forme de lumière. Une onde électromagnétique comporte à la fois un champ électrique et un champ magnétique oscillant à la même fréquence.



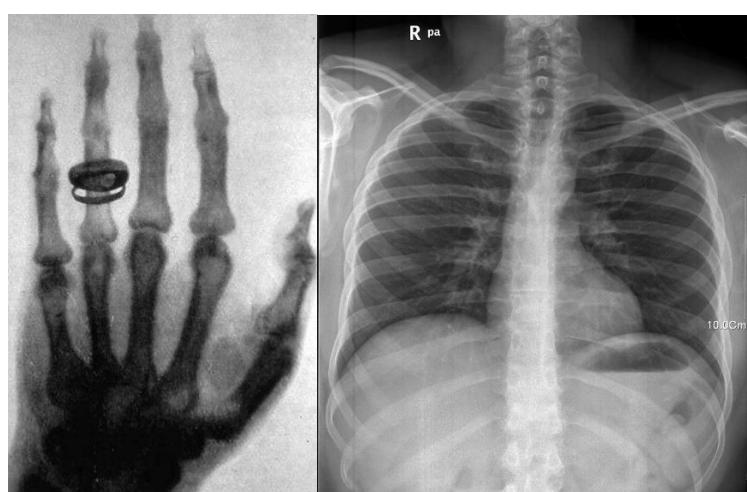
**Figure 01 : Schéma d'une onde électromagnétique décomposée en deux champs : électrique et magnétique**

La *fréquence* d'une onde correspond au nombre de vibrations effectuées par l'onde en une seconde et s'exprime en Hertz et la *longueur d'onde* est la distance entre deux points consécutifs identiques (longueur de la perturbation).

On peut classer les rayonnements électromagnétiques selon leur effet sur la matière en deux classes :

*Les rayonnements ionisants* : sont ceux qui provoquent l'ionisation de l'atome ; c'est à dire l'arrachage d'un ou plusieurs électrons comme les rayons X et  $\gamma$  émis par certains dispositifs médicaux en radiographie ([fig.02](#)), donc des sources artificielles. Cela peut rendre la matière instable.

En radiographie médicale, l'image obtenue sur le film révèle les structures osseuses, zones pour lesquelles l'absorption des rayons X est forte ([fig.02](#)). À mesure que les utilisations des rayonnements ionisants se multiplient, les dangers qu'ils peuvent comporter pour la santé, s'ils ne sont pas correctement utilisés ou confinés, augmentent également. Dans la mesure où une exposition prolongée aux rayons X, ou une exposition répétée avec des répits trop courts pour l'organisme peut provoquer des brûlures (radiomés) mais aussi des cancers et des anomalies chez le nourrisson et l'enfant de moins d'un an.



**Figure 02 : Radiographie ; à gauche : une des premières radiographies, prise par Wilhelm Röntgen et à droite : Rayon X sur poumons humains.**

Les personnels travaillant avec des rayons X doivent suivre une formation spécifique, se protéger et être suivis médicalement (ces mesures peuvent être peu contraignantes si l'appareil est bien « étanche » aux rayons X).

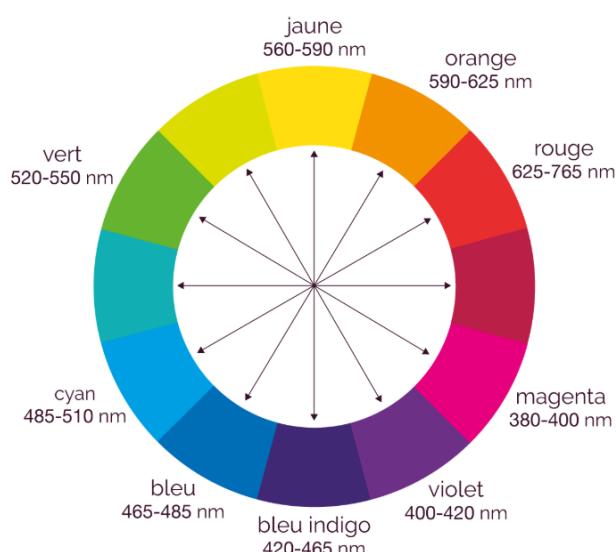
*Rayonnement non-ionisants* : lorsque les rayonnements ayant un quantum d'énergie trop faible pour ioniser l'atome, ils peuvent cependant le faire passer dans un état d'énergie supérieur ou plus élevé (atome excité). Ces rayonnements non-ionisants correspondent aux radiations électromagnétiques de faible énergie :  $E > 10 \text{ eV}$ , tels que les radiations UV, visibles, infrarouges, micro-ondes et ondes radio (*fig.04*). Le principal effet de ces rayonnements non-ionisants est de provoquer un chauffage du corps (agitation thermique).

### I.3. Nature de la lumière

De nombreux phénomènes de notre vie quotidienne illustrent la diffusion de la lumière. En effet, le bleu du ciel, la couleur blanche du lait, le scintillement des étoiles et l'absorption de la peinture sont des exemples où la diffusion de la lumière est responsable de l'effet observé. D'une autre façon, la lumière peut être modélisée sous la forme d'une onde qui se déplace dans l'espace. Cette onde possède deux composantes perpendiculaires : l'une électrique et l'autre magnétique (*fig.01*). La lumière désigne alors les ondes électromagnétiques visibles par l'œil humain, c'est-à-dire comprises dans des longueurs d'onde de 380 nm à 780 nm ; c'est la plage que notre œil perçoit, mais les animaux peuvent enregistrer des rayonnements avec d'autres longueurs d'onde.

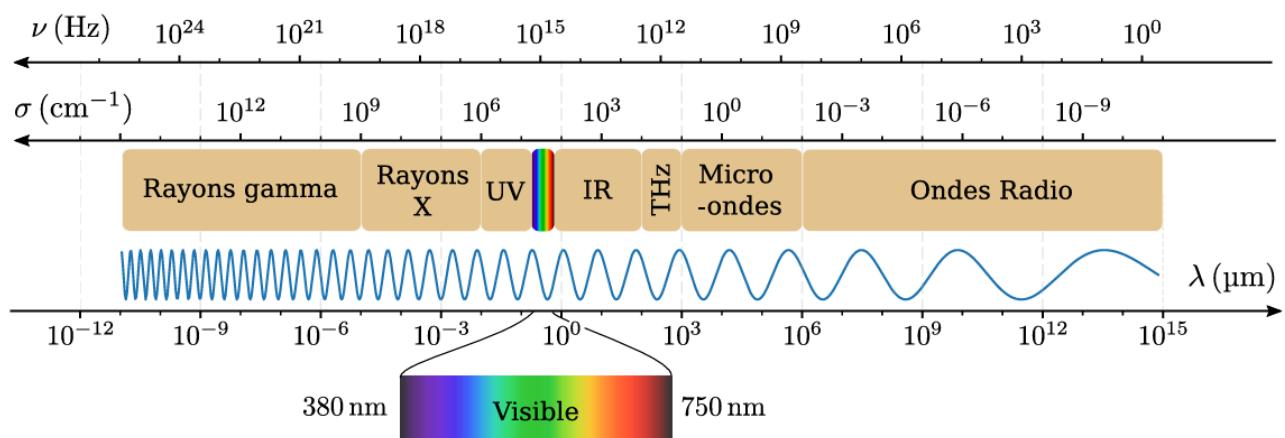
### I.4. Relation de la lumière et couleurs

Le spectre de la lumière blanche est appelé « spectre solaire » et comprend toutes les couleurs de l'arc-en-ciel. Mais la lumière comporte également des rayonnements de plus haute énergie (les ultraviolets) et de plus basse énergie (les infrarouges). C'est Newton qui propose pour la première fois au XVII<sup>e</sup> siècle un cercle des couleurs chromatiques (*fig.03*) basé sur la décomposition de la lumière blanche.



**Figure 03 : Cercle des couleurs chromatiques**

Outre la lumière visible, par extension, on appelle parfois "lumière" d'autres ondes électromagnétiques, telles que celles situées dans les domaines infrarouge et ultraviolet. Le rayonnement électromagnétique désigne une forme de transfert d'énergie linéaire. La lumière visible est un rayonnement électromagnétique, mais ne constitue qu'une petite tranche du large spectre électromagnétique. La gamme des ondes électromagnétiques est très étendue, depuis les basses fréquences des ondes radio jusqu'au rayons cosmiques. L'ensemble de toutes ces ondes électromagnétiques constitue le spectre électromagnétique ([fig.04](#)). Le rayonnement électromagnétique couvre une large gamme de longueurs d'onde, allant des ondes radio aux rayons X et gamma où on peut ainsi répartir l'intensité d'un rayonnement électromagnétique en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou de l'énergie.



**Figure 04: Spectre électromagnétique et l'ensemble de ses domaines**

À chaque fréquence d'oscillation  $\nu$  est donnée le nombre d'onde  $\sigma = \nu/c$  et la longueur d'onde  $\lambda$  d'une onde électromagnétique de même énergie se propageant dans le vide.

Les méthodes spectroscopiques peuvent être classées en fonction de la région du spectre électromagnétique utilisée ou produite lors de la mesure. Les régions des rayons gamma, des rayons X, de l'ultraviolet (UV), du visible, de l'infrarouge (IR), des micro-ondes et des radiofréquences (RF) ont été utilisées.

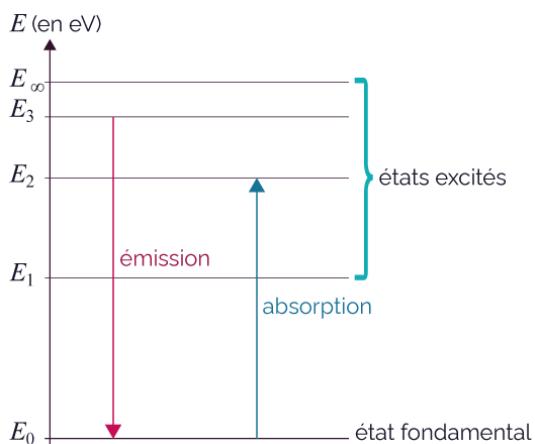
## I.5. Spectre

Un spectre est une image ou une représentation graphique des intensités ou des énergies sous forme de radiations électromagnétiques émises, absorbées ou réfléchies par un matériau, souvent affiché en fonction de la longueur d'onde ou d'une couleur ou encore de la fréquence. Chaque raie dans le spectre, représente une radiation indicative d'une couleur ou d'une fréquence spécifique, permet l'analyse des interactions entre la matière et le rayonnement électromagnétique.

### I.5-1. Spectres d'absorption et d'émission

L'absorption de la lumière permet à un atome ou une molécule de passer à un état excité, et il existe une tendance à restaurer les populations à leurs valeurs d'équilibre.

*A-Niveaux d'énergie d'excitation des atomes :* l'atome possède une énergie interne quantifiée. Si on lui fournit une énergie extérieure, l'atome va absorber cette énergie. Le seul moyen dont il dispose pour accroître son énergie, c'est que l'un des électrons périphériques passe sur une orbite où l'énergie est plus grande, c'est à dire sur une orbite plus éloignée (orbite vide). En effet, un électron ne peut pas absorber ou libérer de l'énergie c'est-à-dire rayonné qu'en passant d'un niveau (orbite) à un autre. La quantité d'énergie absorbée ou émise est égale à la différence d'énergie entre les deux niveaux (relation de Planck). Les valeurs d'énergie qu'un atome peut absorber sont les énergies d'excitation électroniques et sont représentées sur un diagramme d'énergie ([fig.05](#)).



**Figure 05 : Diagramme de niveaux d'énergie de l'atome**

- Un atome dans un état d'énergie  $E_2$  peut passer à un état d'énergie plus faible  $E_1$  en émettant un photon d'énergie  $|\Delta E| = |E_2 - E_1|$ .
- De la même manière, un atome peut passer d'un état d'énergie  $E_1$  à un niveau d'énergie plus forte  $E_2$  s'il吸rbe un photon d'énergie  $|\Delta E| = |E_2 - E_1|$ .

Pour les atomes, les niveaux d'énergie se retrouvent sur leur spectre d'émission et d'absorption.

Sur ces spectres apparaissent des raies colorées ou sombres pour les longueurs d'onde des photons émis ou absorbés par l'atome. Les spectres de raies d'émission et d'absorption d'un atome sont composés de toutes les radiations que cet atome peut émettre ou absorber. Les longueurs d'onde de ces radiations dépendent des niveaux d'énergie impliqués et sont donc caractéristiques de l'atome considéré. Par conséquent, on distingue deux types de spectre :

**a-Spectre d'absorption** marqué par des raies sombres sur un fond brillant (clair); lorsque le rayonnement continu traverse un matériau transparent, une partie du rayonnement peut être absorbée. Si cela se produit, le rayonnement résiduel, lorsqu'il est passé à travers un prisme, génère un spectre

avec des gaps, appelé spectre d'absorption. En raison de l'absorption d'énergie, les atomes ou les molécules passent d'un état d'énergie faible (l'état initial ou état fondamental) à un état d'énergie supérieure (l'état excité) où la durée de cette transition d'absorption d'énergie est très brève 10-18 s. La figure 06 (à droite) illustre ce processus d'excitation, pour le cas de l'atome de sodium, qui est quantifié. Le rayonnement électromagnétique qui est absorbé a une énergie exactement égale à la différence d'énergie entre les états excités et fondamental.

**b-Spectre d'émission** est marqué par des raies brillantes sur un fond sombres ; le spectre de la lumière émise par un gaz à basse pression préalablement excité par une décharge électrique ou par chauffage est un spectre de raies d'émission. Les raies colorées correspondent aux photos émis par le gaz (fig.06 : à gauche).

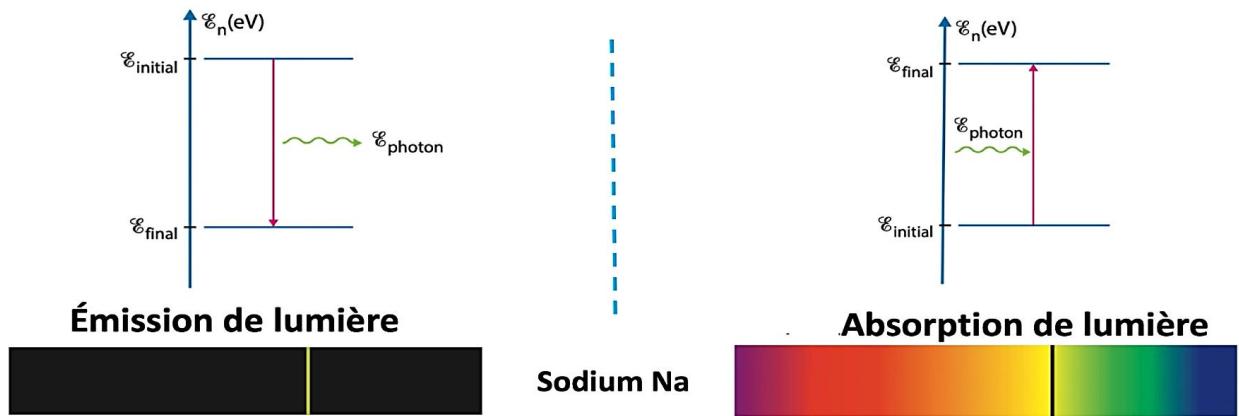


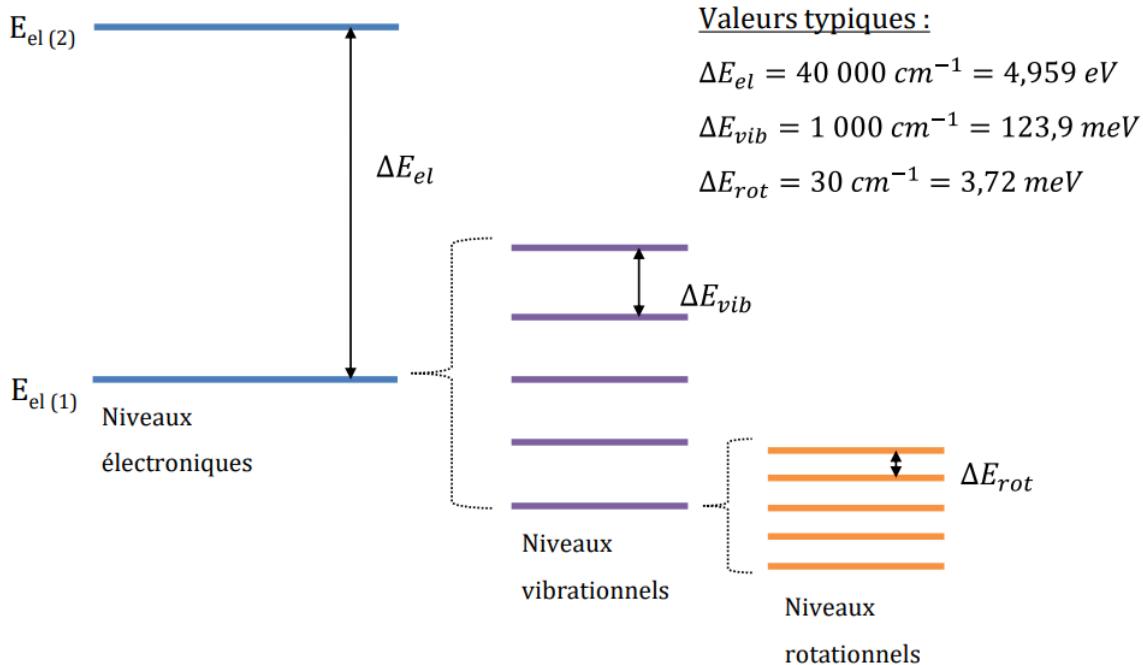
Figure 06 : Spectre d'absorption et d'émission de sodium

**B-Niveaux d'énergie d'excitation des molécules :** le diagramme d'énergie d'une molécule est plus complexe que pour l'atome car en plus des niveaux électroniques (fig.07), il y a d'autres niveaux car la molécule peut absorber de l'énergie par d'autres mécanismes. Chaque molécule possède différents niveaux d'énergie : des niveaux d'énergie électroniques, vibrationnels et rotationnels. A chaque niveau d'énergie électronique correspond plusieurs niveaux d'énergie vibrationnels et à chaque niveau d'énergie vibrationnel correspond plusieurs niveaux d'énergie rotationnels, comme le montre la Figure 07:

**Niveaux d'excitation électroniques :** l'absorption d'un photon d'énergie appropriée (domaine UV-Visible) fait passer une molécule de l'état fondamental à un état électronique excité. Une telle transition correspond au passage d'un électron dans une orbitale inoccupée d'énergie supérieure. De même, un électron pourra passer sur une orbitale vide, il y a donc une série de niveaux.

**Niveaux de vibration :** les liaisons entre atomes ne sont pas rigides, les atomes vibrent naturellement les uns par rapport aux autres. En cas d'apport d'énergie extérieure le phénomène de vibration augmente : augmentation de l'énergie de vibration.

**Niveaux de rotation :** si la molécule est libre de ses mouvements elle peut tourner autour de son centre de gravité. Ce phénomène existe dans les gaz et les vapeurs mais est négligeable dans les liquides et les solides.



**Figure 07 : Diagramme d'énergie d'une molécule:** les niveaux bleus sont les niveaux électroniques, les niveaux violets sont les niveaux vibrationnels et les niveaux orange sont les niveaux rotationnels.

Il est possible d'exciter chacun de ces niveaux d'énergie en utilisant une source lumineuse dont la longueur d'onde est adaptée. Les niveaux d'énergie électroniques sont excités par la lumière ultraviolette (UV), visible et proche infrarouge, entre 300 nm et 1,5  $\mu\text{m}$  de longueur d'onde. Les niveaux vibrationnels sont excités par des sources émettant dans le moyen infrarouge, entre 1,5 et 25  $\mu\text{m}$ . Et enfin, les niveaux d'énergie rotationnels sont excités par des sources émettant dans le lointain infrarouge, au-delà de 25  $\mu\text{m}$ .

## I.6. Spectroscopie

Etymologiquement, le nom "*spectroscopie*" est formé à partir de deux mots, l'un latin "*spectrum*" : il trouve ses racines lui-même dans "*spectro*" lequel est le fréquentatif de "*specio*" : un mot latin qui signifie "*je regarde*". Le terme "*spectrum*" en latin désigne "*spectre*", "*fantôme*" ou plus généralement "*illusion*", c'est-à-dire ce que l'on voit mais qui n'a pas d'existence réelle. La spectroscopie est principalement méthode d'analyse qui s'intéresse à l'absorption, à l'émission ou à la

diffusion de radiations électromagnétiques par des atomes ou des molécules. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules du fait de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière (*tab.01*). De plus, cette méthode présente plusieurs avantages : requiert de petites quantités, est non destructive et très précise.

Étant donné que les molécules comprennent plusieurs noyaux ainsi que des électrons, leurs mouvements internes sont plus complexes que ceux des atomes, et leurs diagrammes de niveaux d'énergie et spectres présentent par conséquent de nouvelles caractéristiques non observées dans ceux des atomes. L'analyse de ces caractéristiques fournit des informations utiles sur la structure moléculaire, les longueurs de liaison et les énergies de liaison (*tab.01*). Avec la diffraction, la spectroscopie moléculaire est une source principale d'informations expérimentales sur la liaison chimique ainsi que sur la structure et la forme des molécules.

**Tableau 01 : Effet d'une radiation électromagnétique sur la matière**

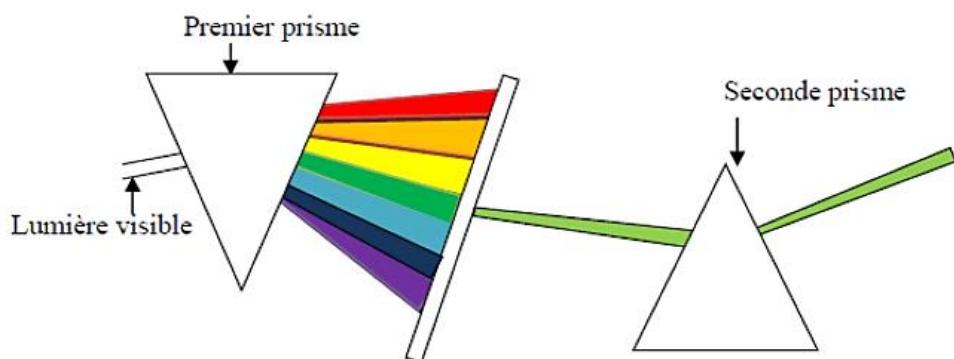
Nom	Longueur d'onde	Energie	Fréquence (Hz)	Interaction onde/Molécules	Exemple de source
<b>Rayon gamma</b>	< 10 pm	>124 keV	> 30 EHz	Ionisation moléculaire	Réactions nucléaires
<b>Rayon X</b>	10 pm – 10 nm	124 keV – 124 eV	30 EHz - 30 PHz	Ionisation moléculaire	Appareil de radiologie médicale
<b>Ultraviolet</b>	10 nm – 390 nm	124 eV – 3,2 eV	30 PHz – 750 THz	Excitation électronique	Soleil
<b>Visible</b>	390 nm – 750 nm	3,2 eV -1,7 eV	770 THz – 400 THz	Excitation électronique	Soleil
<b>Infrarouge</b>	750 nm – 0,1 mm	1,7 eV - 12,4 meV	400 THz – 3THz	Vibration des liaisons	Soleil
<b>Micro-ondes</b>	1 mm – 1 m	1,24 meV - 1,24 µeV	300 GHz – 300 MHz	Rotation des molécules	Rayonnement thermique
<b>Ondes radio</b>	1 m – 100 000 km	1,24 µeV – 12,4 feV	300 MHz – 3 Hz	Retournement de spin	Radars, Étoiles, Antennes radio

*nm : nanomètre, m : mètre, km : kilomètre, eV : electronvolt, meV : mégaélectronvolt, µeV : microélectronvolt, feV : femtoélectronvolt, Hz : Hertz, MHz : Méghertz, GHz : Gigahertz, THz : Térahertz, PHz : Petahertz.*

### I.7. Historique de la spectroscopie

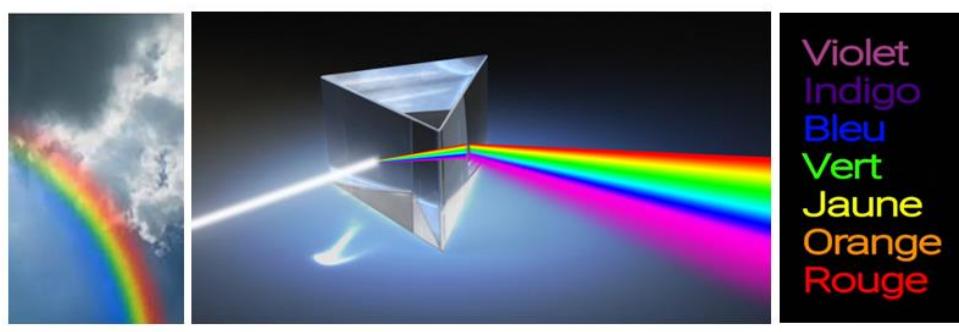
Les méthodes expérimentales de spectroscopie ont débuté dans la région visible, plus accessible du spectre électromagnétique, où l'œil pouvait être utilisé comme détecteur. En effet, le point de départ de la spectroscopie est largement attribué aux travaux d'Isaac Newton (1642-1727), présentés dans son *Traité d'optique* publié en 1704. Où il établit les fondements de l'analyse de différentes couleurs par la dispersion de la lumière blanche du soleil à travers un prisme en verre

triangulaire. Ses célèbres expériences en 1665 sur la dispersion de la lumière blanche en un éventail de couleurs expliquent que la lumière polychromatique (rayons solaires) est composée de rayons se réfractant de manière variée lors de leur passage au travers d'un prisme (ce qui serait désigné aujourd'hui comme lumière monochromatique). Ces couleurs sont en fait une succession de radiations visibles de longueurs d'onde continuellement variables. Newton montra ensuite que les couleurs du spectre ne peuvent pas se décomposer en de nouvelles couleurs : Exemple : si on envoie de la lumière verte sur un prisme, on retrouve la même lumière en sortie ([fig.07](#)). Cette lumière est dite monochromatique.



**Figure 07: Expérience d'Isaac Newton**

La réfraction de la lumière blanche dans le prisme fait apparaître 7 couleurs différents. Ce phénomène s'explique par le fait que chacune des couleurs de la lumière possède sa propre longueur d'onde donc sa propre fréquence, et par conséquence l'indice de réfraction de chaque couleur est différent donc elle dévie toute à une onde différente.



**Un Arcs-en-ciel Diffraction de la lumière blanche par un prisme**

**Figure 08 : Phénomènes de diffraction de la lumière**

W.H. Wollaston (1766-1828) a observé en 1802 quelques raies sombres dans le spectre solaire, qu'il interprète comme le résultat de la division d'un faisceau de lumière solaire en six catégories lors du phénomène de réfraction. Des études plus poussées menées par J. Fraunhofer (1787-1826) en 1814 montrent un nombre bien plus élevé de raies sombres dans le même spectre,

parmi lesquelles certaines, les plus marquées, sont classées selon un système de notation qui correspond à des lettres de l'alphabet (raies D pour le sodium, raies H et K pour le calcium ionisé, etc.). Cependant, ce n'est qu'autour de 1860 que Bunsen (1811-1899) et Kirchhoff (1824-1887) ont commencé à développer le spectroscope à prisme comme un appareil intégré destiné à être utilisé en tant qu'instrument analytique. Les premières applications consistaient en l'observation des spectres d'émission de divers échantillons dans une flamme, donnant naissance aux tests de flamme pour divers éléments, ainsi qu'à l'étude du soleil. En 1800, William Herschel fit l'expérience avec un thermomètre de mesurer la température dans différentes zones du spectre solaire ; il montra qu'une chaleur existait au-delà du rouge dans le domaine spectral. Il appela ces radiations les infrarouges. En 1801, Ritter démontra que des radiations existaient au-delà du violet.

### I.8.Domaines d'application de la Spectroscopie

La spectroscopie est une technique analytique essentielle dans les laboratoires scientifiques, permettant une multitude d'applications. Elle est principalement utilisée pour l'identification des molécules, en fournissant des spectra uniques qui facilitent la reconnaissance des composés. De plus, elle joue un rôle crucial dans la détermination des structures moléculaires, offrant des informations détaillées sur la disposition des atomes. L'étude des cinétiques de réaction bénéficie également de l'utilisation de la spectroscopie, permettant aux chercheurs de suivre l'évolution des concentrations des réactifs et des produits au cours du temps. Par ailleurs, elle est indispensable pour élucider les mécanismes réactionnels en révélant des étapes intermédiaires spécifiques dans les transformations chimiques. Enfin, la spectroscopie est fréquemment utilisée pour les dosages, où elle permet de quantifier les analytes avec précision, que ce soit dans des échantillons biologiques, environnementaux ou industriels. Ces diverses applications font de la spectroscopie un outil incontournable en chimie analytique, en biochimie et en recherche scientifique. Elle peut être utilisée à diverses fins, telles que la mesure de composés toxiques dans le sang ou différents composés dans les aliments, l'exploration des structures électroniques et la réalisation d'analyses élémentaires, etc.

<b>Chapitre 02</b>	<b>Spectroscopie d'absorption moléculaire</b>	
<b>II.1.</b>	<b>Définitions et principes .....</b>	<b>11</b>
<b>II.2.</b>	<b>Spectrophotométrie UV-Vis .....</b>	<b>11</b>
<b>II.3.</b>	<b>Loi de BeerLambert .....</b>	<b>17</b>
<b>II.4.</b>	<b>Dosage par étalonnage .....</b>	<b>19</b>
<b>II.5.</b>	<b>Spectrophotométrie IR .....</b>	<b>20</b>
<b>II.6.</b>	<b>Principe de l'IR.....</b>	<b>20</b>
<b>II.7.</b>	<b>Appareillage de l'IR.....</b>	<b>23</b>

## 1.Définitions et principes

La spectrométrie d'absorption moléculaire est une technique applicable à l'analyse qualitative et à l'analyse quantitative qui permet le mesurage de la concentration d'un composé dissous dans une solution. Les rayonnements électromagnétiques exploités en spectroscopie d'absorption moléculaire vont de l'ultraviolet jusqu'aux ondes radio dont la région ultraviolette (UV) du spectre électromagnétique s'étend de 190 à 400 nm, alors que la région visible (la lumière) s'étend de 400 à 750 nm, voire 800 nm (*voir chapitre 01*).

La spectroscopie ultraviolet-visible est un procédé de dosage qu'une méthode de détermination de structures. Non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en travaux pratique de chimie ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. Par exemple le dosage des ions nitrate dans les eaux de piscine ou la détermination de la pureté de l'ADN et de certaines protéines après leur extraction. Cette technique peut être également utilisée pour le contrôle de qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires.

## 2.Spectrophotométrie UV-Vis

La spectroscopie est l'ensemble des techniques qui permettent d'analyser : - la lumière émise par une source lumineuse - la lumière transmise ou réfléchie par un corps absorbant. L'interaction de la

lumière avec la matière est à l'origine de la majeure partie des phénomènes électriques, magnétiques, optiques et chimiques observés dans notre environnement proche.

## Molécules

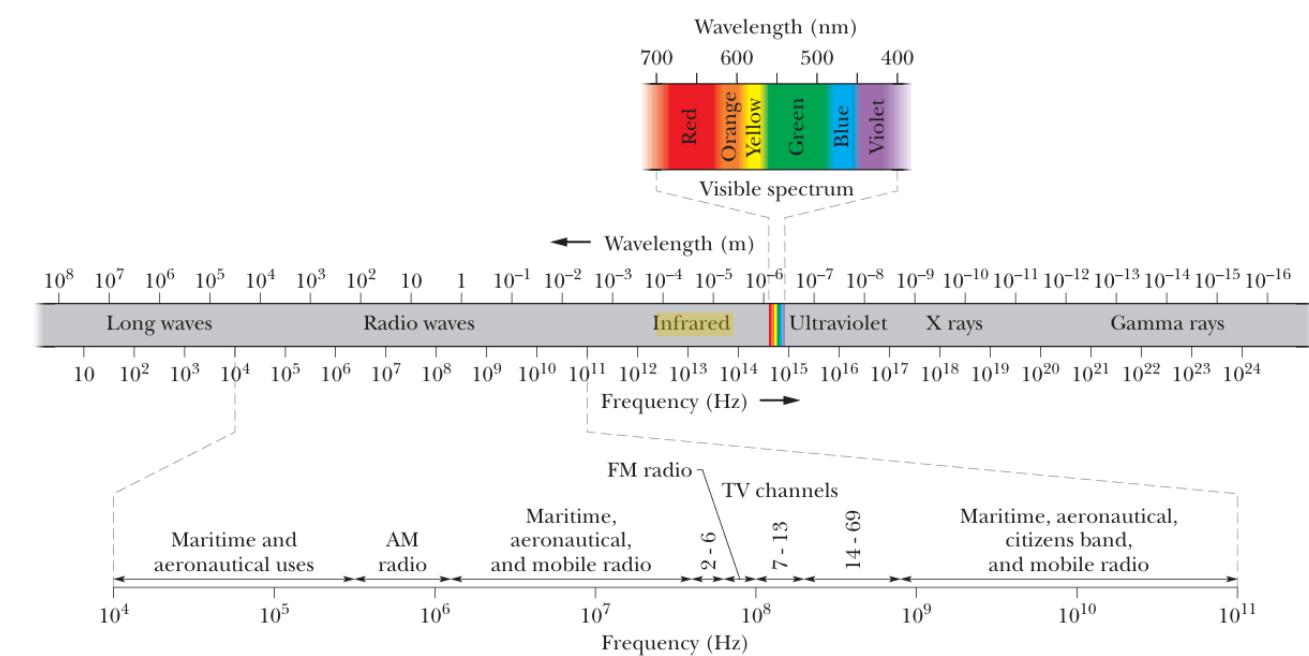
Les molécules ont une structure tridimensionnelle définie, décrite par leurs longueurs de liaison et leurs angles de liaison, et déterminée par les liaisons covalentes qui maintiennent les molécules ensemble.

La plupart des molécules organiques et des groupes fonctionnels sont transparentes dans les portions du spectre électromagnétique que nous appelons les régions ultraviolet (UV) et visible (VIS), correspondant à des longueurs d'onde variant de 190 nm à 800 nm.

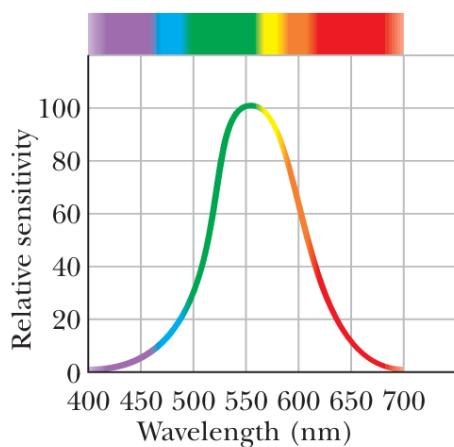
La spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-Vis) mesure l'atténuation d'un faisceau de lumière qui passe à travers un échantillon avec absorption à des longueurs d'onde ( $\gamma$ ) plus ou moins spécifiques. La concentration d'un analyte dans une solution peut être déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde et en appliquant la loi de Beer-Lambert. Cette méthode n'est pas appliquée dans les laboratoires de contrôle de qualité en raison de ses limites de sensibilité mais est utilisée dans les trousseaux de mesure de terrain en réalisant des réactions spécifiques dont les produits de réaction absorbent dans l'UV ou le visible.

## Niveaux énergétiques

En spectroscopie ultraviolet-visible, les transitions responsables de l'absorption du rayonnement électromagnétique dans cette région du spectre sont des transitions entre niveaux d'énergie électroniques. Lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie, un électron est promu d'une orbitale occupée vers une orbitale vacante d'énergie potentielle supérieure. Généralement, la transition la plus probable est celle de l'orbitale moléculaire occupée la plus haute en énergie vers l'orbitale moléculaire vacante la plus basse en énergie.



## Spectre électromagnétique



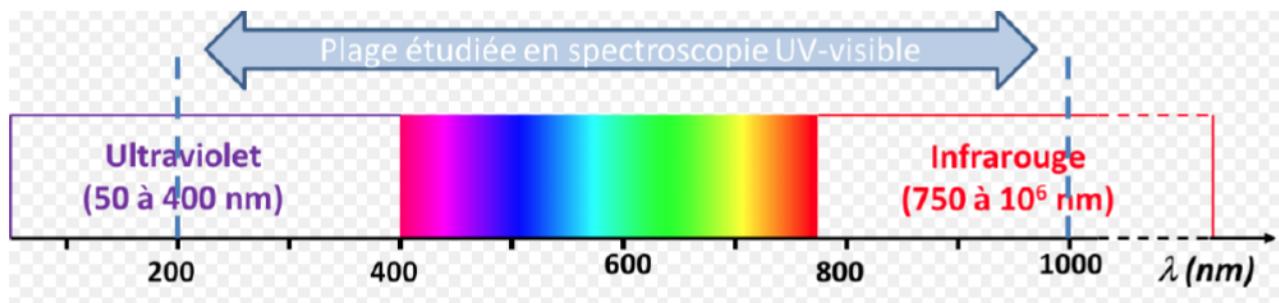
**Sensibilité relative de l'œil humain moyen aux ondes électromagnétiques à différentes longueurs d'onde. Cette portion du spectre électromagnétique à laquelle l'œil est sensible est appelée lumière visible.**

### Domaines d'application

La spectrophotométrie est utilisée dans divers domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc..., aussi bien au laboratoire que sur site industriel. Exemple : Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux dosages de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS.

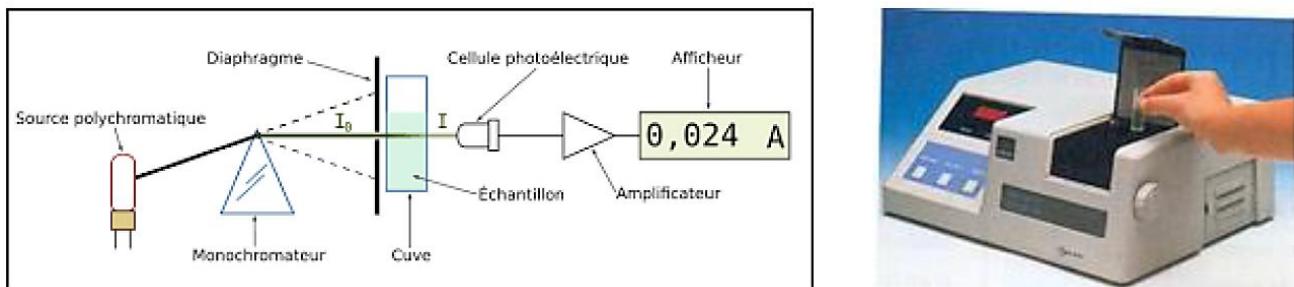
### Principe du spectroscopie UV-Visible

Lorsque les radiations électromagnétiques rencontrent la matière, on observe une interaction entre matière et onde électromagnétique. On parle de spectroscopie UV-visible, lorsque ces interactions sont observées dans le domaine UV-Visible (UV: 200 à 400nm et Visible 400 à 800nm).

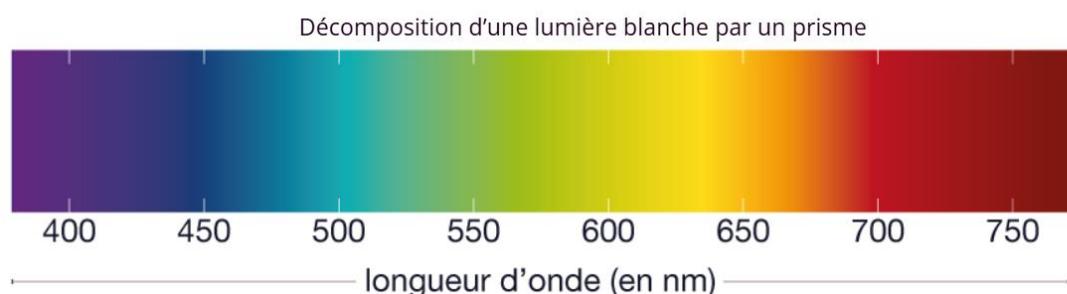
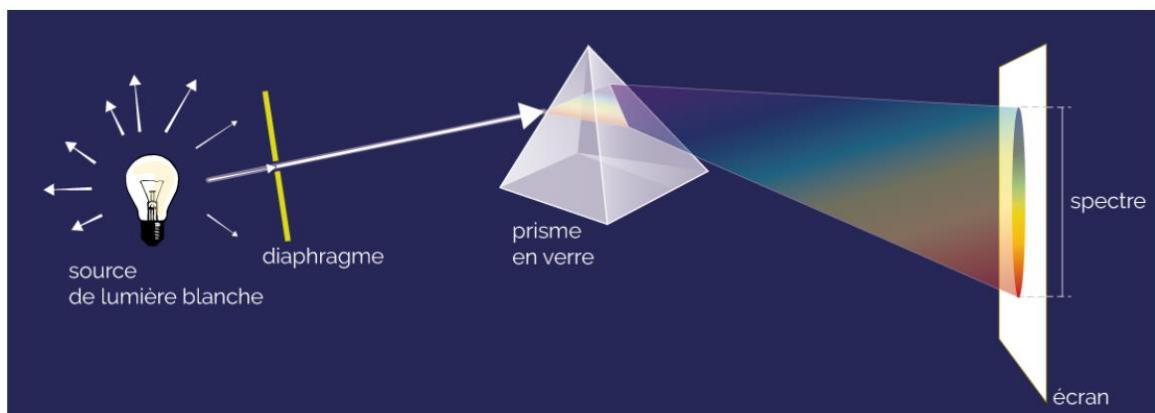


Le spectrophotomètre fait passer une radiation (lumière) monochromatique (une seule longueur d'onde) à travers une longueur L (longueur de la cuve) de solution et mesure l'absorbance A (grandeur

liée à la quantité de lumière absorbée par la solution). Un spectrophotomètre permet de visualiser ces bandes d'absorptions.

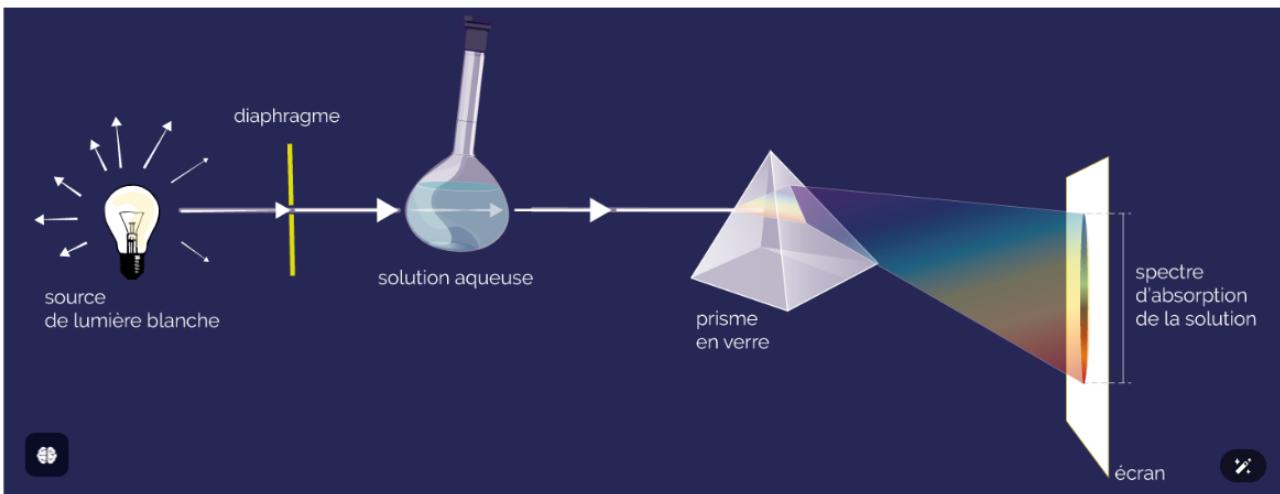


On trace ainsi des spectres de transmission, ou bien d'absorption. Le spectre de transmission renseigne sur tout ce qui n'a pas été absorbé. Le spectre d'absorption se déduit directement du spectre de transmission. Il renseigne sur toutes les radiations absorbées.



Les ultraviolets : rayonnements qui restent assez énergétiques, ils sont nocifs pour la peau. Heureusement pour nous, une grande part des ultraviolets est stoppée par l'ozone atmosphérique qui sert de bouclier protecteur des cellules. Leurs longueurs d'onde s'échelonnent de  $10^{-8}$  m à  $4.10^{-7}$  m.

Le domaine visible : correspond à la partie très étroite du spectre électromagnétique perceptible par notre œil. C'est dans le domaine visible que le rayonnement solaire atteint son maximum ( $0,5 \mu\text{m}$ ) et c'est également dans cette portion du spectre que l'on peut distinguer l'ensemble des couleurs de l'arc en ciel, du bleu au rouge. Il s'étend de  $4.10^{-7}$  m (lumière bleue) à  $8.10^{-7}$  m (lumière rouge).

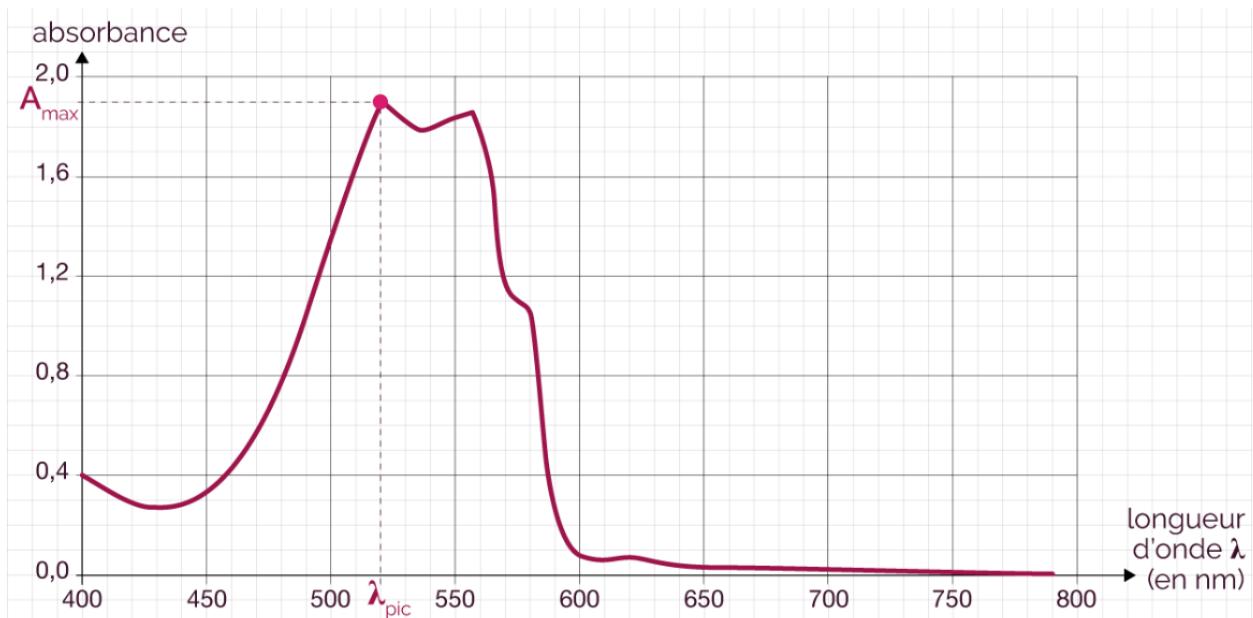


### Exemple

On compare le spectre d'absorption d'une solution aqueuse de permanganate de potassium au spectre de la lumière blanche.



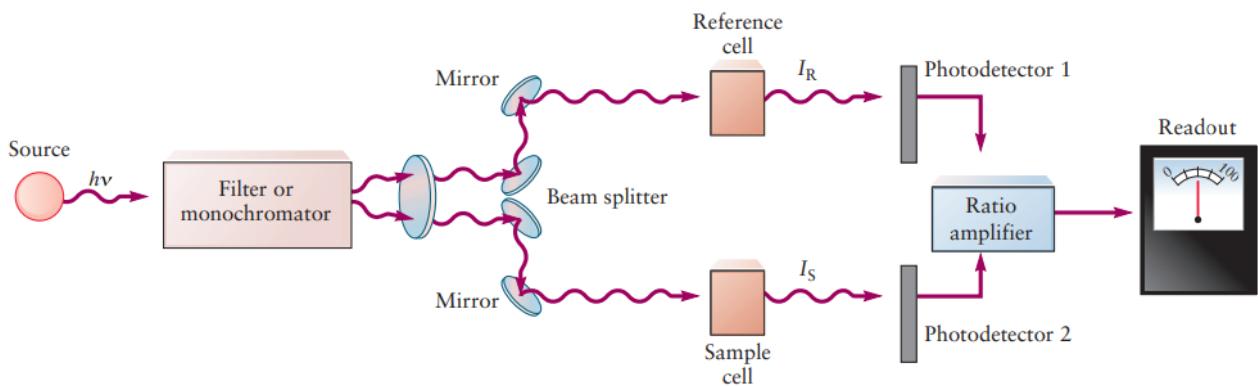
Spectre d'absorption de la solution de permanganate de potassium  
On observe que la solution de permanganate de potassium absorbe la couleur verte.



Courbe d'absorbance d'une solution de permanganate de potassium

## Spectrophotomètre de double faisceau

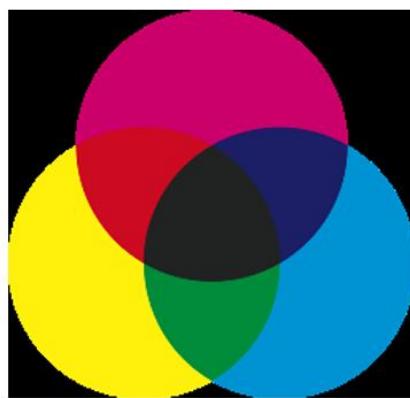
Les spectres d'absorption moléculaire sont enregistrés par des spectrophotomètres. La lumière provenant de la source est dirigée vers un prisme ou un réseau pour sélectionner une longueur d'onde spécifique  $\lambda$ , qui passe ensuite à travers l'échantillon confiné dans une cellule. L'intensité de la lumière transmise à travers la cellule d'échantillon,  $IS$ , est mesurée. Pour éliminer les effets indésirables dus à l'absorption ou à la diffusion de la lumière aux parois de la cellule, le faisceau incident est en réalité divisé en deux parties, dont l'une passe à travers une cellule de référence de la même taille et de la même forme que la cellule d'échantillon. Le spectrophotomètre peut être étalonné pour enregistrer un graphique soit de la transmittance  $T=IS/IR$  ou de l'absorbance  $A=\ln(\frac{I_0}{I})$  en fonction de  $\lambda$  pendant que la longueur d'onde est balayée sur la plage d'intérêt. L'ampleur du signal est liée aux propriétés de l'échantillon comme suit. La transmittance  $T$  diminue (et l'absorbance  $A$  augmente) à mesure que la longueur de la cellule  $l$  augmente.



**Principe du spectrophotomètre de double faisceau .**

## Couleurs des objets : cercle chromatique

La couleur d'un objet éclairé en lumière blanche correspond aux radiations qu'il n'absorbe pas et qu'il transmet, quand il est transparent, ou qu'il diffuse, quand il est opaque.



*Figure 1. Couleurs fondamentales et complémentaires en absorption*

Les trois couleurs fondamentales étant le bleu, le jaune et le rouge, le mélange de deux d'entre elles est la complémentaire de la troisième (Figure 1). Ainsi le bleu est complémentaire de l'orangé (= rouge + jaune) etc. Ce sont les règles appliquées en peinture, où les absorptions des pigments et

colorants se cumulent par mélange. En mélangeant une fondamentale et son complémentaire on absorbe pratiquement tout le spectre visible et on obtient un gris plus ou moins foncé.

La Fig. 2 montre le spectre de quelques filtres de couleur pour photographie, ce qui permet de vérifier qu'une substance colorée吸 principalement dans la région de la couleur complémentaire.

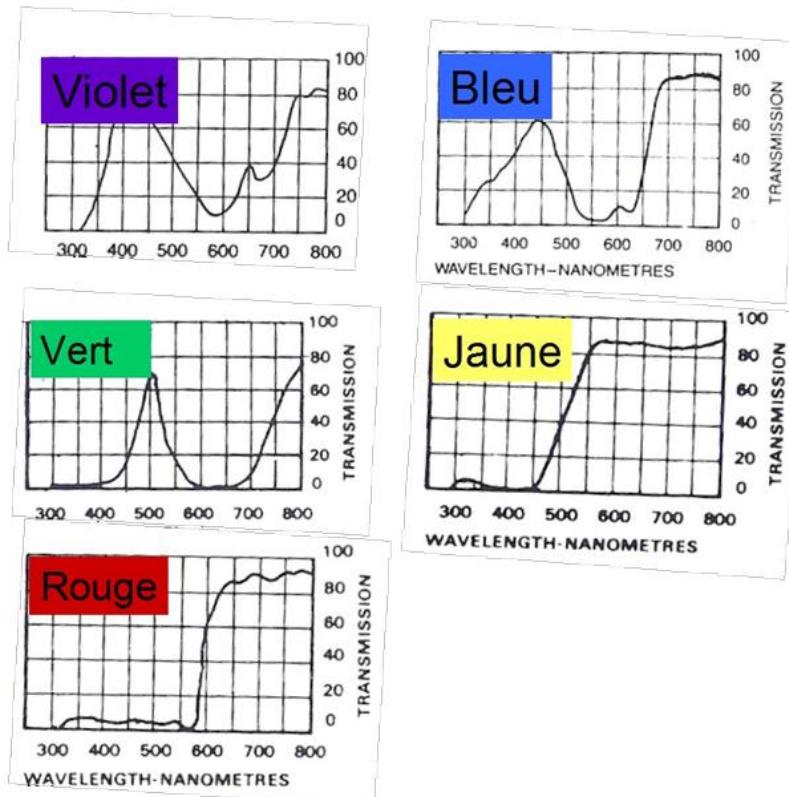
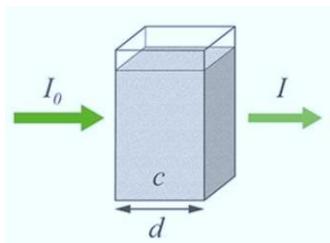


Fig. 2. Spectres d'absorption de quelques filtres colorés.

### 3. Loi de Beer-Lambert

L'absorbance dépend de la couleur de la radiation, de sa longueur d'onde  $\lambda$ . Soit  $I_0$  l'intensité de la lumière incidente et  $I$  l'intensité de la lumière transmise. Le spectrophotomètre compare  $I$  et  $I_0$  à travers soit la transmittance  $T$  ( $T = I / I_0$ ) ou l'absorbance  $A = -\log T$ . (les 2 mesures sont possibles).



-Si l'énergie associée à la radiation de longueur d'onde  $\lambda$  1 n'est pas du tout absorbée par la solution étudiée alors  $A(\lambda 1) = 0$ . L'énergie est transmise à  $100 / 100 = 1 = 10^0 = T$ .

-Si l'énergie associée à la radiation de longueur d'onde  $\lambda_2$  est absorbée à 99 % par la solution étudiée alors  $A(\lambda_2) = 2$ . L'énergie est transmise à  $1 / 100 = 0,01 = 10 - 2 = T$

-Il faut régler le zéro en plaçant le solvant dans la cuve et l'absorbance doit être nulle.

L'absorbance A est proportionnelle à la concentration de la solution selon la Loi de **Beer-Lambert**.

$$A = \epsilon \times L \times C$$

Avec :

**A** : absorbance de la solution (sans unité)

**L** : longueur de la solution traversée par la lumière (en cm)

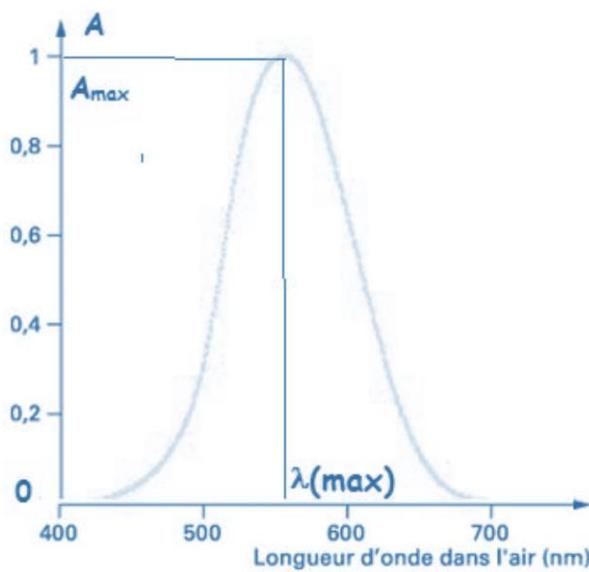
**C** : concentration de la solution (en mol.L<sup>-1</sup>)

$\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire (en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

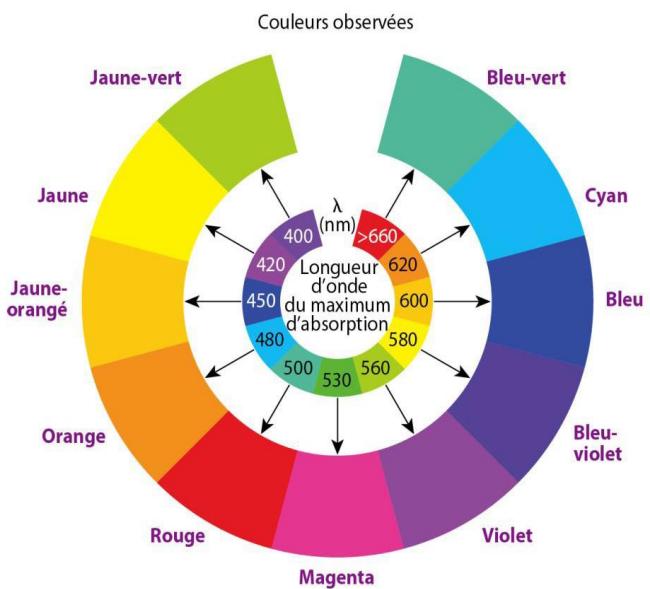
$\epsilon$  dépend de la nature de la solution et de la longueur d'onde

Une espèce chimique est caractérisée en spectroscopie UV-visible par la longueur d'onde  $\lambda$  (max) du maximum d'absorption et par la valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon (\lambda_{\text{max}})$  correspondante.

On trace tout d'abord le spectre d'absorption  $A = f(\lambda)$  afin de déterminer le maximum d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$ .



Cette longueur d'onde  $\lambda_{\text{max}}$  est directement liée à la substance étudiée et à sa couleur éventuelle. En effet, la radiation préférentiellement absorbée correspond à la couleur complémentaire de celle de la substance:



Exemple :  $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$ , la solution absorbe la couleur orange, elle est alors bleue (couleur complémentaire) (voir flèche)

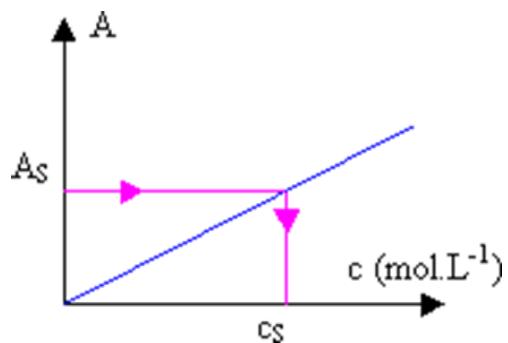
Remarque: une substance incolore absorbe dans l'UV :  $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$

Lorsqu'une espèce吸ue dans plusieurs domaines de longueurs d'onde, sa couleur résulte de la synthèse additive des couleurs complémentaires des radiations absorbées.

Exp : Le vert de bromocrésol absorbe à  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$  et à  $\lambda_{\text{max}} = 615 \text{ nm}$ , les couleurs complémentaires sont jaune-orange et bleu-vert, le mélange donne du vert.

## 4. Dosage par étalonnage

On peut ensuite effectuer une détermination de concentration de la substance en effectuant un dosage par étalonnage. On réalise alors plusieurs solutions de concentration connues pour lesquelles on détermine l'absorbance A à la valeur de  $\lambda$  max. On trace la courbe d'étalonnage, A en fonction de C. En mesurant l'absorbance AS d'une solution inconnue et en la reportant sur la courbe, on détermine la concentration CS de la solution inconnue.



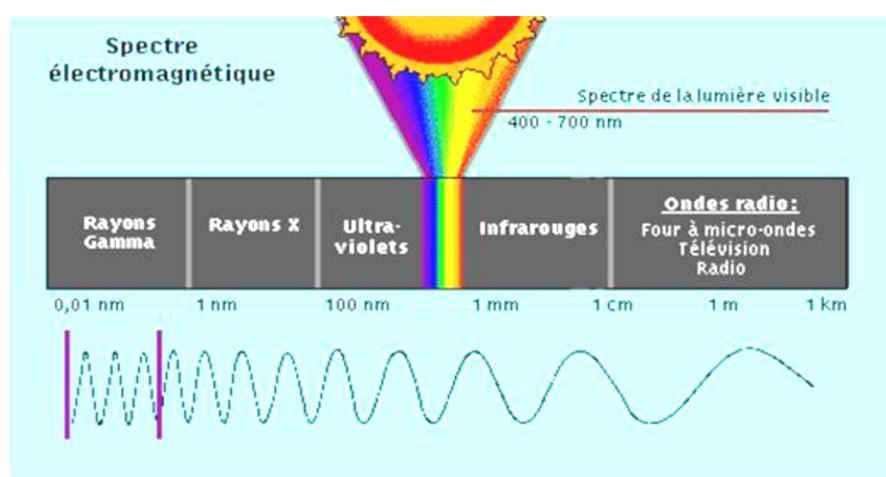
## 5.Spectrophotométrie IR

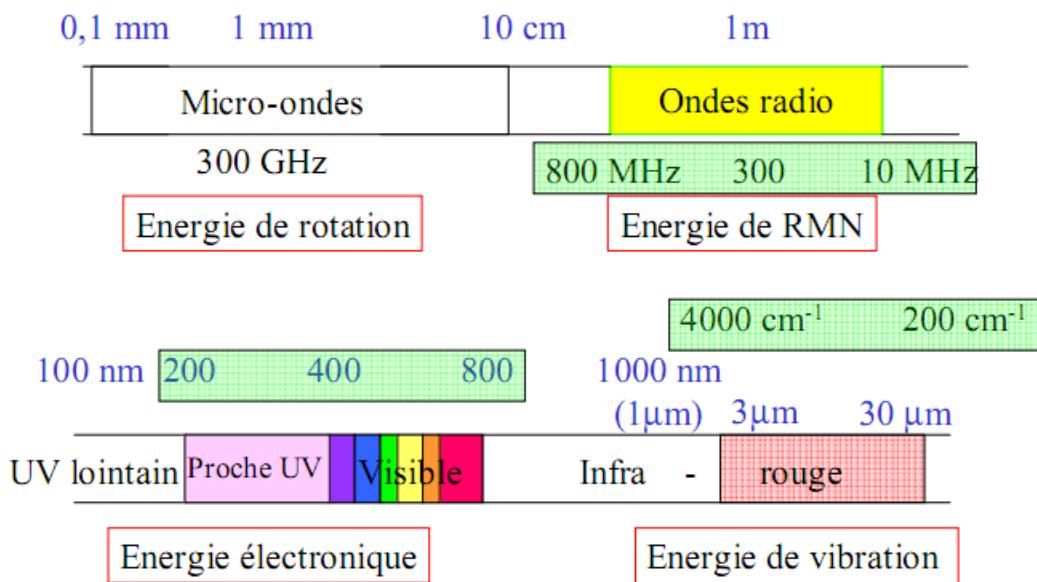
L'infrarouge est un rayonnement émis par tous les corps dont la température est supérieure au zéro absolu (-273°C). En télédétection, on utilise certaines bandes spectrales de l'infrarouge pour mesurer la température des surfaces terrestres et océaniques, ainsi que celle des nuages. La gamme des infrarouges couvre les longueurs d'onde allant de  $8.10^7\text{m}$  à  $10^{-3}\text{ m}$ .

## 6. Principe de l'IR

Quel que soit leur état physique, les atomes d'une molécule ne sont pas immobiles : ils subissent des vibrations d'elongation ou de déformation à une fréquence bien déterminée qui dépend des atomes mais aussi de l'environnement de la liaison. Pour une fréquence donnée de lumière IR absorbée, ces liaisons rentrent en résonance : l'énergie apportée est alors consommée : les molécules absorbent et la transmittance T (proportion d'énergie transmise par un échantillon) diminue. Si on représente sur un graphe l'évolution de la transmittance T en fonction du nombre d'onde  $\zeta$  (la fréquence divisée par la vitesse de la lumière dans le milieu), on observe des variations.

La liaison atomique est fondamentalement composée de charges électroniques, combinées dans un état stable. Selon la nature des atomes la liaison peut présenter un caractère de dipôle électrique si le centre de gravité des charges négatives, (les électrons de liaisons) est différent du centre de gravité des charges positives, (les noyaux). Ceci se produit de façon permanente quand les atomes liés ont des électronégativités différentes. La liaison est alors dite polaire. Cela ce produit aussi, mais de façon transitoire, notamment dans le cas de gros nuages électroniques, du fait des mouvements des électrons quand ils sont soumis à un champ électrique local intense. La liaison est alors dite polarisable.





$$\sigma = 1 / \lambda \text{ (en } \text{cm}^{-1})$$

Un spectre IR renseigne donc sur la nature des liaisons dans une molécule, sur ses groupes caractéristiques. Une transmittance de 100% signifie que l'échantillon n'absorbe rien, d'où des bandes vers le bas en cas d'absorption.

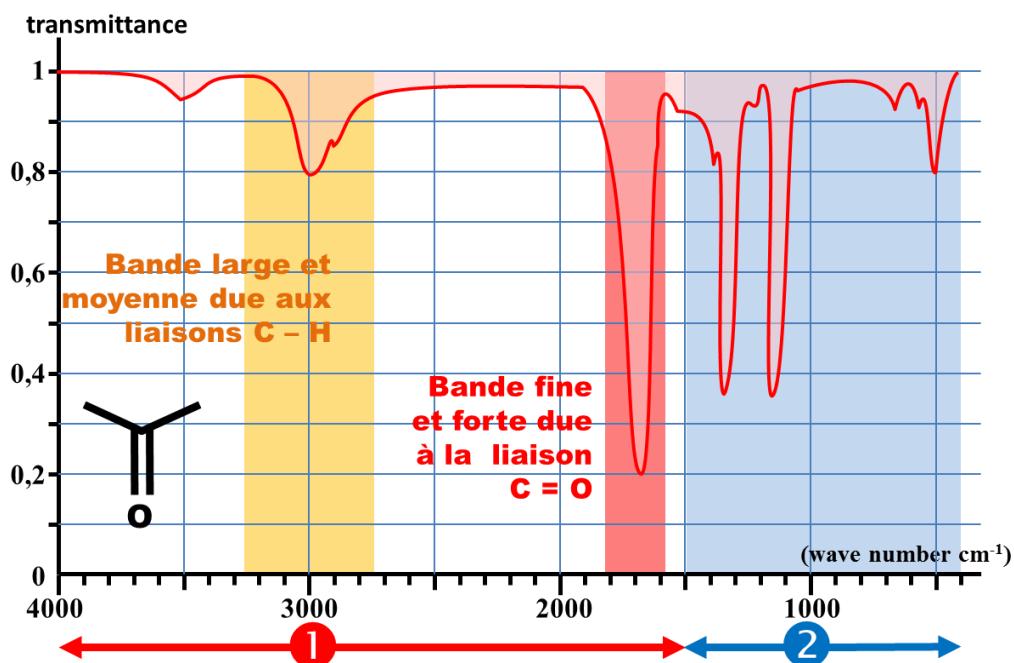


Figure 00 : Allure des spectres IR

## 6. Exploitation des spectres IR

### Zone 1: Nombre d'onde compris entre 1500 et 4000 $\text{cm}^{-1}$

Cette zone (Zone diagnostique) ne contient qu'un nombre limité de bandes, correspondant à des types de liaisons particulier. Chaque bande est caractérisée par :

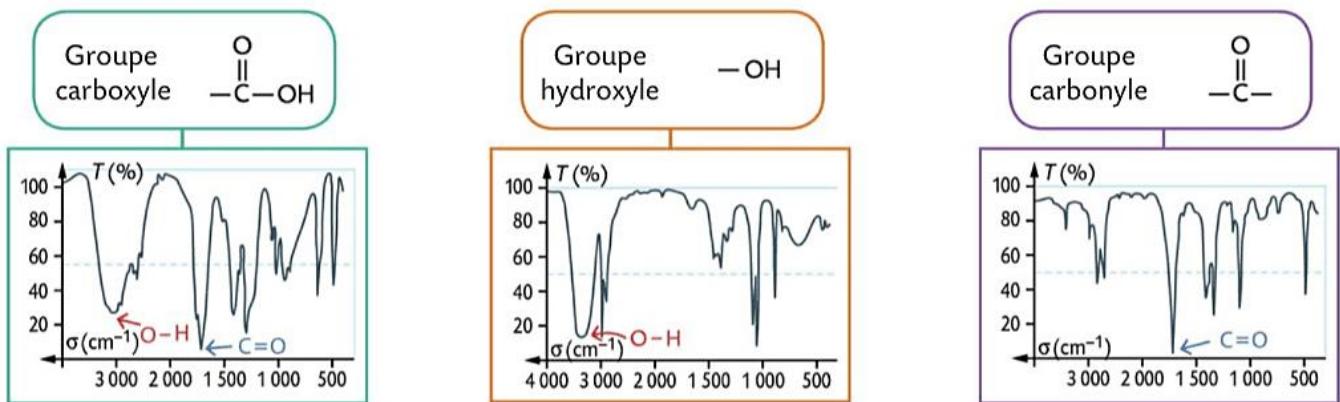
- Son nombre d'onde.
- Sa largeur (large ou fine)

-Son intensité (faible, moyenne ou forte)

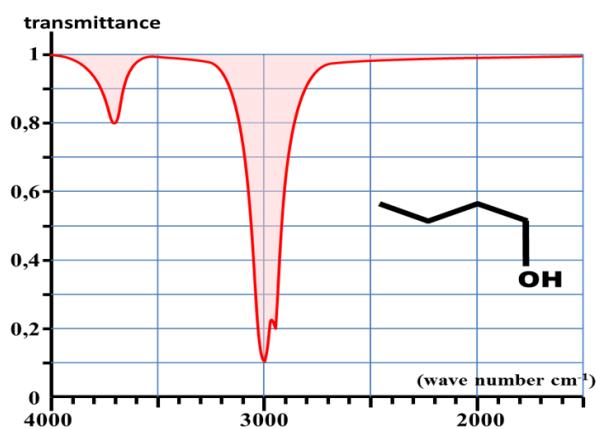
### Zone 2: Nombre d'onde compris entre 400 et 1500 cm<sup>-1</sup>

Il s'agit d'une zone très riche en bandes d'absorption pour les molécules organiques possédant plusieurs atomes de carbone. Elle n'est généralement exploitée qu'en comparaison avec un spectre de référence. Cette zone s'appelle l'*empreinte digitale* de la molécule.

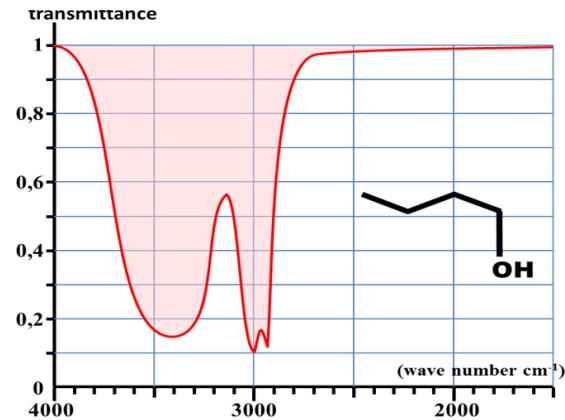
Exemples :



### Type de liaison

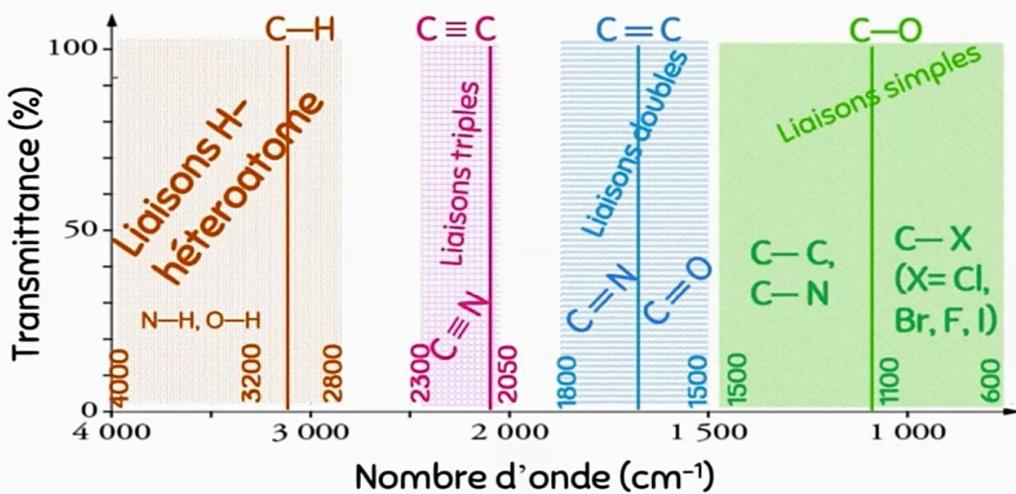


*Spectre d'absorption du butan-1-ol en phase gazeuse*



*Spectre d'absorption du butan-1-ol en phase condensée*

Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaisons chimiques. Les nombres d'onde sont exprimés en cm<sup>-1</sup>:



## 7. Appareillage

Dans un spectromètre infrarouge un rayon de lumière infrarouge est produit et séparé en deux faisceaux. L'un passe au travers de l'échantillon, l'autre au travers d'une référence qui est parfois le composé dans lequel l'échantillon a été dissous. Les faisceaux sont ensuite réfléchis jusqu'à un détecteur, après être passés par un séparateur qui alterne rapidement les faisceaux entrant dans le détecteur. Les deux signaux sont comparés et le spectre ainsi obtenu tracé.



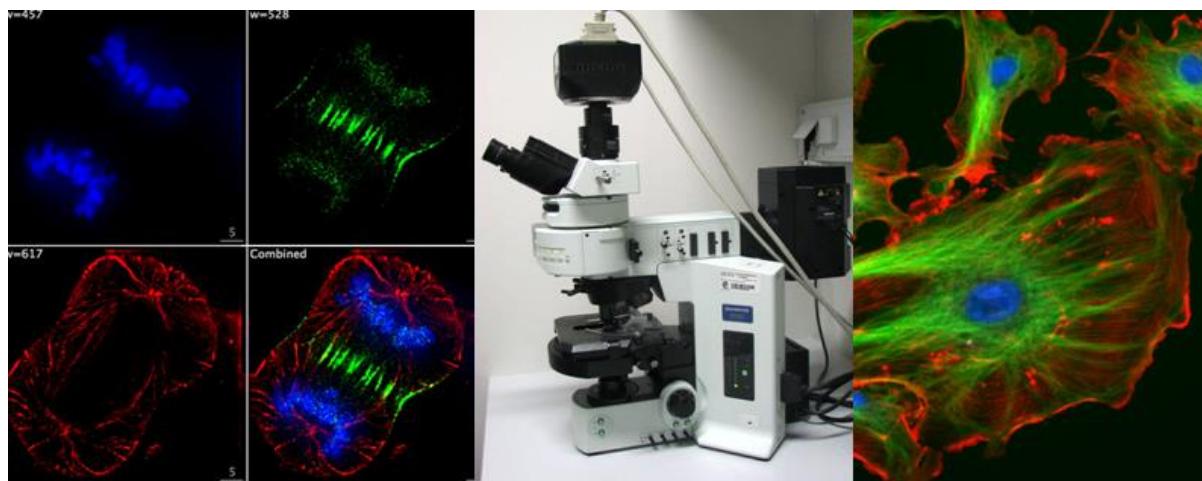
Figure : Principe et appareillage du spectromètre infrarouge

<b>Chapitre 03</b>	<b>Spectroscopie de fluorescence</b>	
<b>III.1.</b>	<b>Définition et principe .....</b>	<b>24</b>
<b>III.2.</b>	<b>Origine et principe de la fluorescence .....</b>	<b>26</b>
<b>III.3.</b>	<b>Types et appareillage.....</b>	<b>27</b>
<b>III.4.</b>	<b>Applications.....</b>	<b>31</b>

### **III.1. Définition et principe**

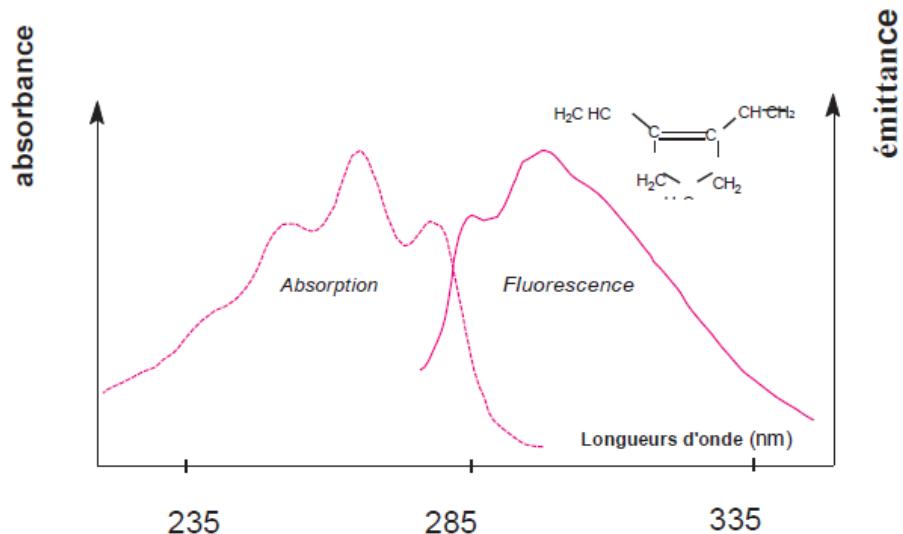
Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides (cristaux moléculaires ou ioniques), qu'ils soient purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Parmi les applications en analyse de ce phénomène, baptisé 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.

La fluorescence est une technique d'analyse utilisant le phénomène de fluorescence. On appelle fluorescence la propriété que possède certaines substances d'émettre un rayonnement électromagnétique, lorsqu'elles sont excitées par un faisceau lui-même électromagnétique.



Fluorescence et phosphorescence se distinguent par les états excités à l'origine de l'émission. Dans le premier cas, on parle d'état excité singulet et d'en l'autre d'état excité triplet. Le premier paramètre les distinguant est la durée de vie d'émission. Elle se déduit de la mesure de l'intensité de la luminescence en fonction du temps. La phosphorescence, qui implique le passage d'un état singulet à un état triplet par inversion de spin, est retardée : le temps séparant l'excitation de l'émission est plus long que dans le cas de la fluorescence. Si le temps qui sépare l'irradiation de l'émission est inférieur à 1  $\mu$ s, on parle de fluorescence. Dans l'autre cas, il s'agit de phosphorescence.

La figure ci-après 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.



**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*

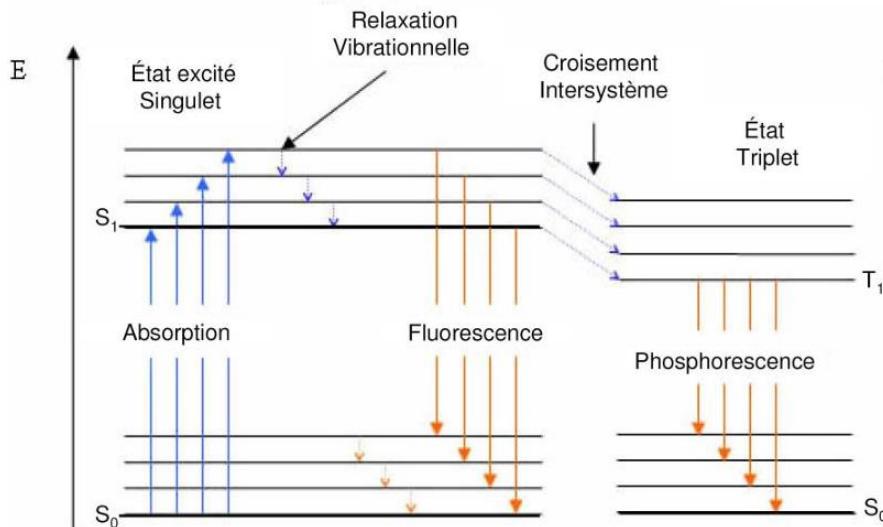
### III.2. Origine et principe de la fluorescence

Après absorption d'un photon par une molécule et passage de S<sub>0</sub> à S<sub>1</sub>, le retour à l'état fondamental S<sub>0</sub> de la molécule peut s'effectuer de différentes façons comme le montre le diagramme de Jablonski qui permet de distinguer les transitions non radiatives et des dés excitations radiatives. Les transitions radiatives S<sub>1</sub>→S<sub>0</sub> correspondent à une émission fluorescente caractérisée par la longueur d'onde d'émission. L'introduction d'un cation d'un métal de la deuxième ou troisième ligne permet d'avoir accès à l'état triplet (T<sub>1</sub>) par couplage spin-orbite. Lors de l'excitation d'une molécule par absorption de photon, la molécule passe de l'état S<sub>0</sub> à S<sub>1</sub>. A partir de cet état S<sub>1</sub>, un couplage spin-orbite permet d'atteindre l'état triplet T<sub>1</sub> de plus basse énergie. La transition radiative T<sub>1</sub>→S<sub>0</sub> est responsable de la phosphorescence et est caractérisée par une longueur d'onde d'émission.

**Exemple:** Un rayonnement fluorescent (émission) est produit lorsque des électrons passent par deux phases:

**1/Absorption:** de l'état fondamental singulet (S<sub>0</sub>) à un état singulet excité S<sub>1</sub> ou à S<sub>2</sub> (second état excité).

**2/Emission:** à partir de S<sub>1</sub> retour à l'état fondamental en émettant des photons.

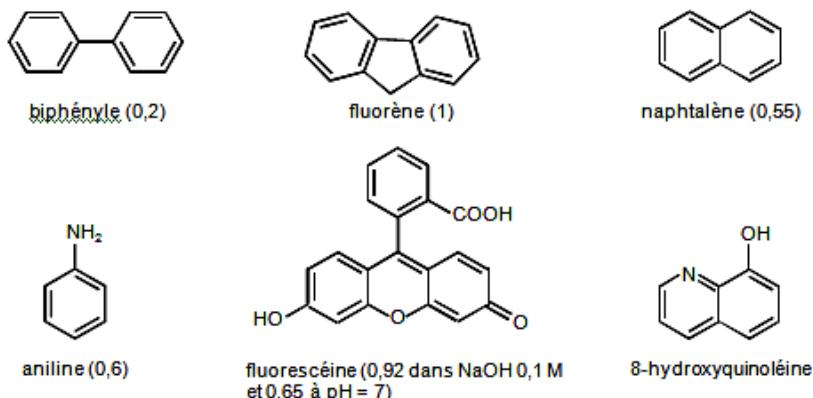


**Diagramme de Pérrin Jablonski**

Le passage de l'état singulet (fluorescence) à l'état triplet (phosphorescence) se fait par un croisement intersystème. Ce croisement intersystème est favorisé avec les complexes de métaux de transition tels que l'osmium (II), le ruthénium (II), l'iridium (III), le platine (II). Ces ions de transition de la deuxième et de la troisième série ont un couplage spin- orbite fort favorisant le passage de l'état

singulet vers l'état triplet. Les composés de métaux de transition, comme les complexes du platine (II) faisant l'objet de cette thèse, présentent des propriétés de luminescences intéressantes.

- **La phosphorescence** correspond à un mode de désexcitation plus complexe. Après la phase d'absorption correspondant au transfert d'un électron dans un niveau S1 (état singulet), on assiste, si la relaxation vibrationnelle est assez lente, au retournement de spin de l'électron pour conduire à un état T1 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.
- 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. 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.

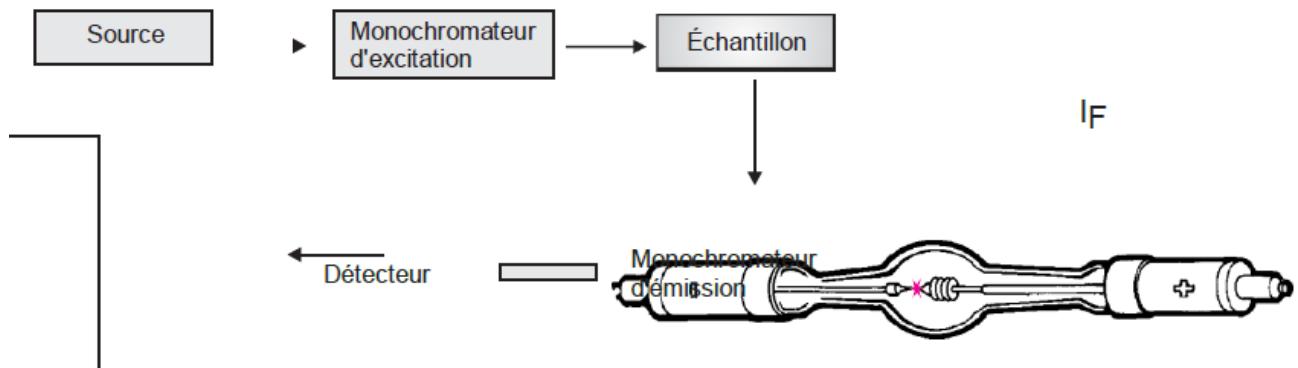


### Composés fluorescents aromatiques

#### III.3. Types et appareillage

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. 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).



### **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 :

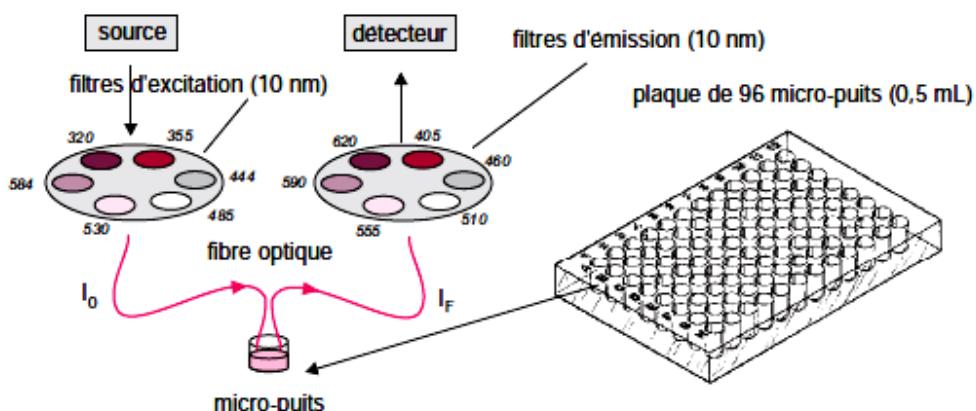
- les fluorimètres à rapport de fluorescence,
- les spectrofluorimètres.

#### **a-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. 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).



**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.

### b-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. 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).

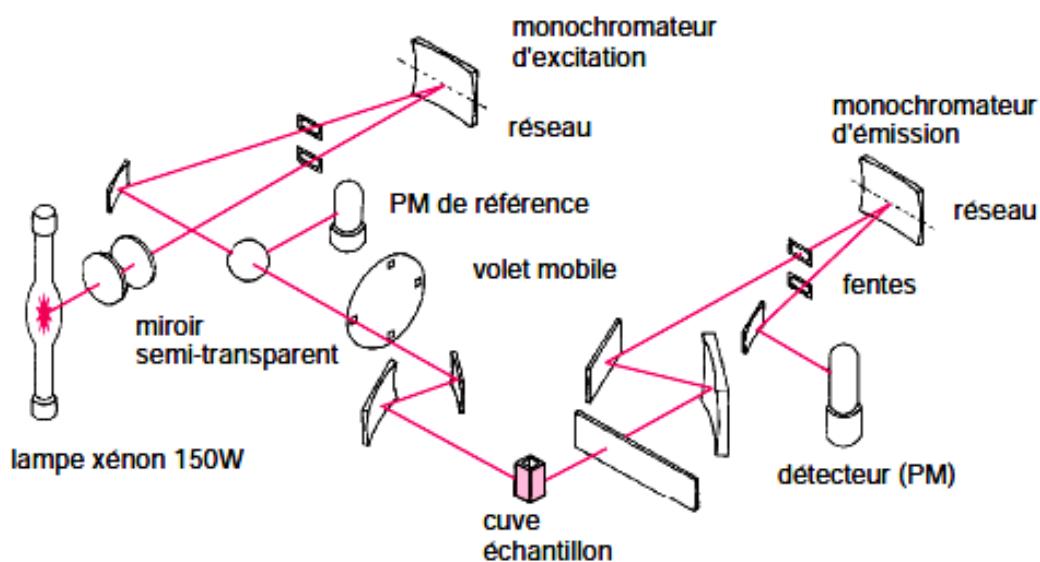


Schéma du spectrofluorimètre Shimadzu F-4500

Une fraction du faisceau incident, réfléchie 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).

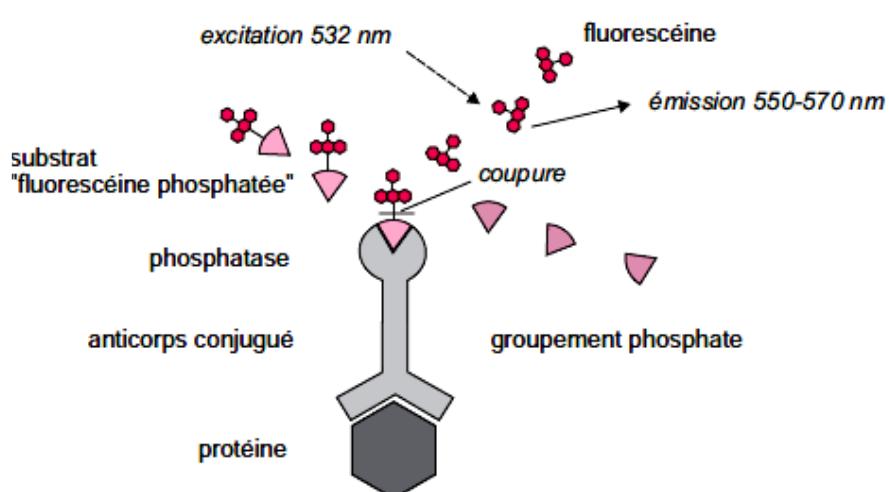
Certains instruments permettent la mesure des durées de vie de fluorescence, bien que celles-ci soient très courtes. Il existe plusieurs méthodes basées soit sur l'enregistrement de la courbe de décroissance

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.

### III.4. Applications

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. 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.



Processus d'un dosage de protéine par chimifluorescence en biochimie

En analyse par HPLC, 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 HPLC. 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.

<b>Chapitre 04</b>	<b>Spectroscopie d'absorption atomique</b>	
<b>IV.1.</b>	<b>Définition et principe.....</b>	<b>33</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Appareillages. ....</b>	<b>35</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Mesures : LOI DE BEER-LAMBERT.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.4.</b>	<b>Paramètres influençant la mesure.....</b>	<b>49</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Applications.....</b>	<b>49</b>

#### **IV.1. Définition et principe**

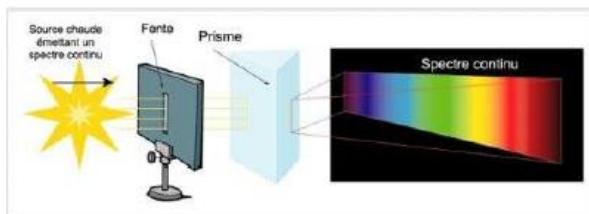
La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et l'émission de flamme (EF), encore appelée photométrie de flamme, permettent de doser dans pratiquement toute sorte d'échantillon, un ou plusieurs éléments prédefinis choisis dans une liste en contenant environ 70 (métaux et non métaux). Les appareils correspondants 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 µg/L.

#### **Illustration et interprétation des phénomènes concernés : Expérience de Kirchhoff**

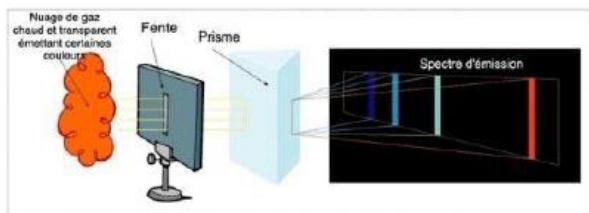
Vieilles de plus d'un siècle les expériences de Kirchhoff, à qui l'on doit également l'invention du spectroscope, permettent d'illustrer les principes de l'absorption et de l'émission atomique (**Fig 1**).

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).

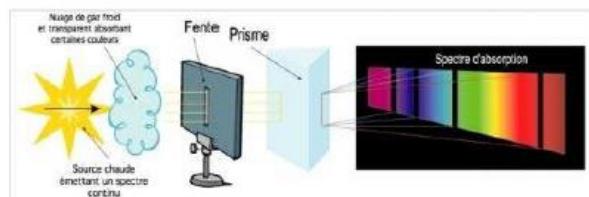
Enfin si on associe les deux sources précédentes en plaçant sur le trajet optique de la flamme du bec Bunsen, en aval de la source polychromatique, on obtient sur l'écran un spectre comparable à celui présenté ci-dessous, si ce n'est qu'il apparaît des raies sombres à l'endroit des raies d'émission de 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**



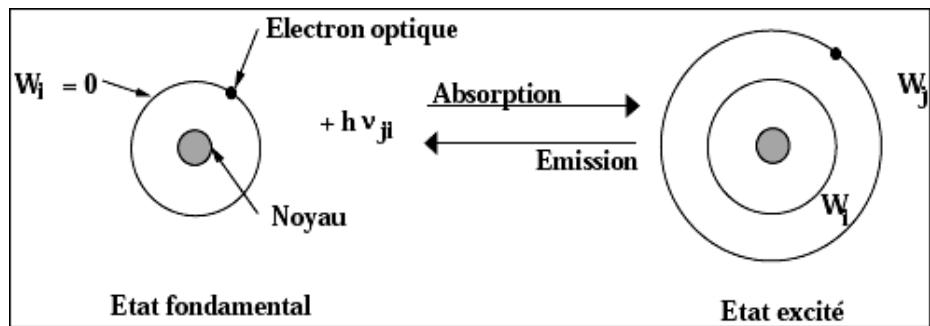
**Na est présent sous une forme qui absorbe la lumière**

### 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.

### Principe

Dans le cas de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), c'est l'absorption d'une source de lumière à la longueur d'onde caractéristique de l'élément mis à l'état d'atomes neutres en phase vapeur. La source de lumière qui traverse la flamme est constituée par une lampe à cathode creuse, dont la 26 longueur d'onde de l'émission correspond à l'élément à doser. Le rapport des intensités incidente et transmise, est proportionnel à la quantité d'atomes de l'élément à doser et permet de déterminer sa concentration dans la solution par rapport à la gamme de calibration. On peut schématiser cette interaction matière-rayonnement par la figure suivante



### 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.

## IV.2. Appareillages

### Mise en œuvre de la technique

L'appareil est schématisé ci-dessous:

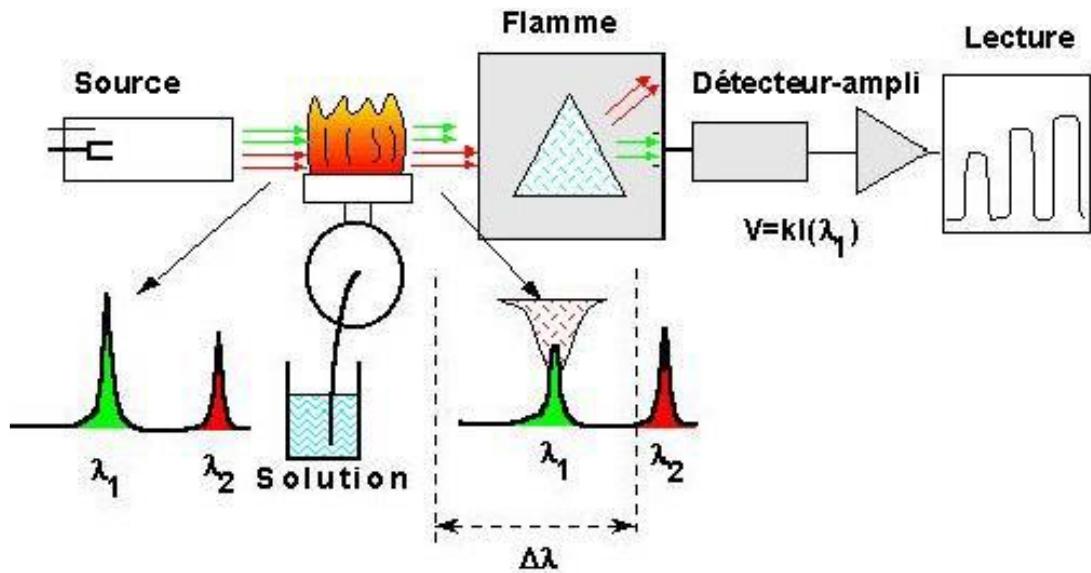
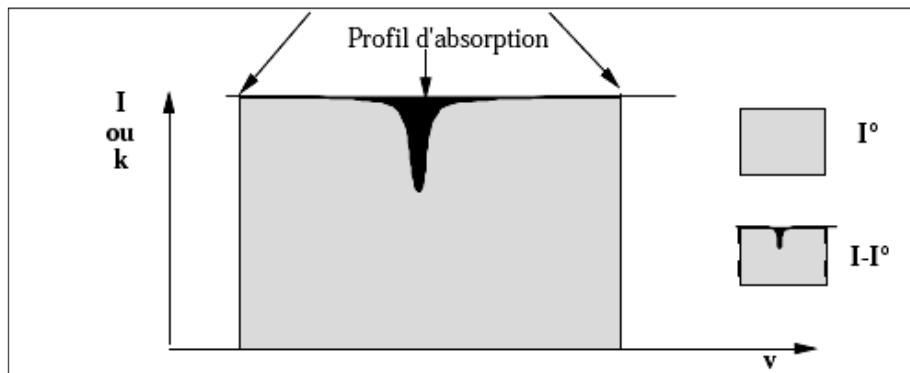


Schéma de principe du spectrophotomètre d'absorption atomique

#### 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'adsorption. 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. Voyons cela sur la figure suivante:

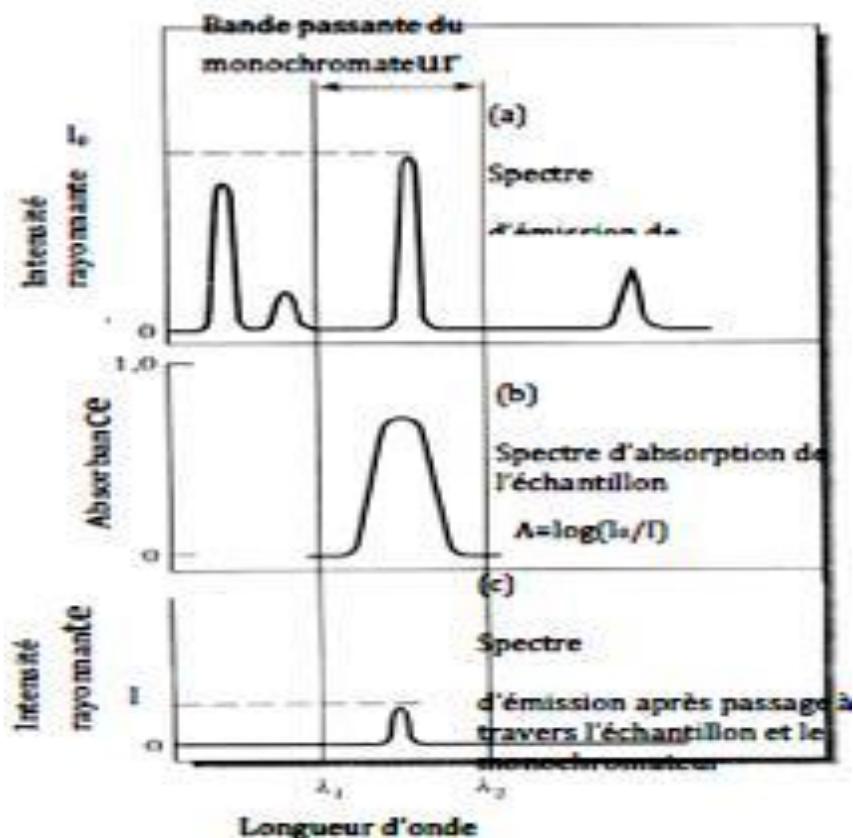


### Cas d'une trop grande bande passante du monochromateur d'où une sensibilité faible

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'étroitesse 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.



### Mesure les 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 (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 (b) représente le spectre d'absorption de flamme de l'analyte entre les longueurs d'onde  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$ ; 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.

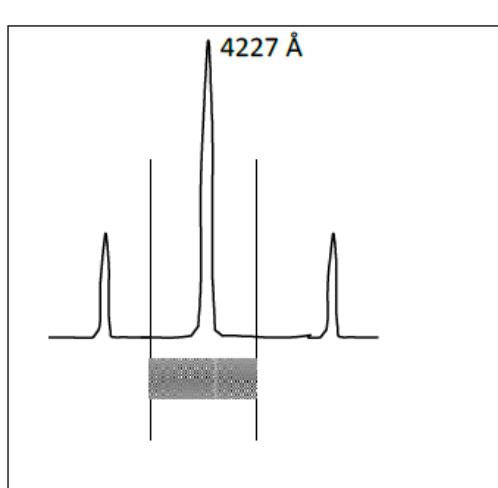
On utilise en spectrométrie deux types de sources:

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

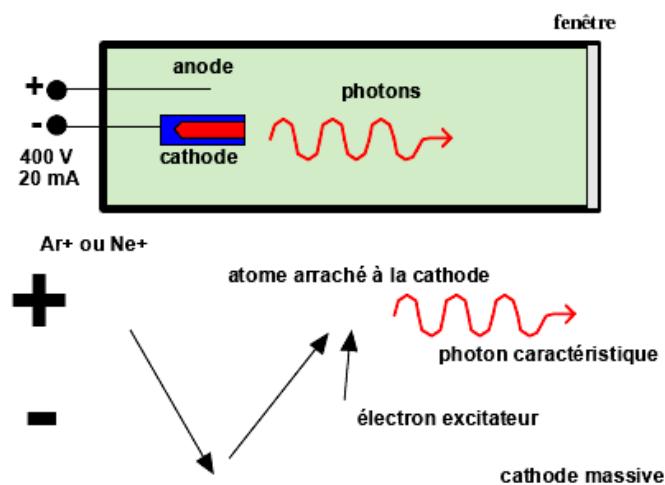
#### **La lampe à cathode creuse**

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 :**  $\lambda_r$  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 inert, 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.



Spectre du calcium



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.

## **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.

## **Autres types de lampes : Lampes à haute brillance - lampes à 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 torrs, 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<sup>+</sup> 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).

## **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.

### **Atomisation 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 haut 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.

## 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 : désolvatation, 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<sup>-4</sup>% des atomes excités
- Flamme à 3000 K on aura 2 10<sup>-4</sup>% des atomes excités (le nombre double) mais à l'état fondamental il reste (A - 2 10<sup>-4</sup>A), c'est-à-dire la même quantité à 1/10000 près. Par contre, en émission l'intensité de radiation aurait doublée.

## 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'aménée 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-là 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.

### 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 stoechiométrique 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 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.

## Température des flammes

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

### 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.

### 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 Masman) 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.

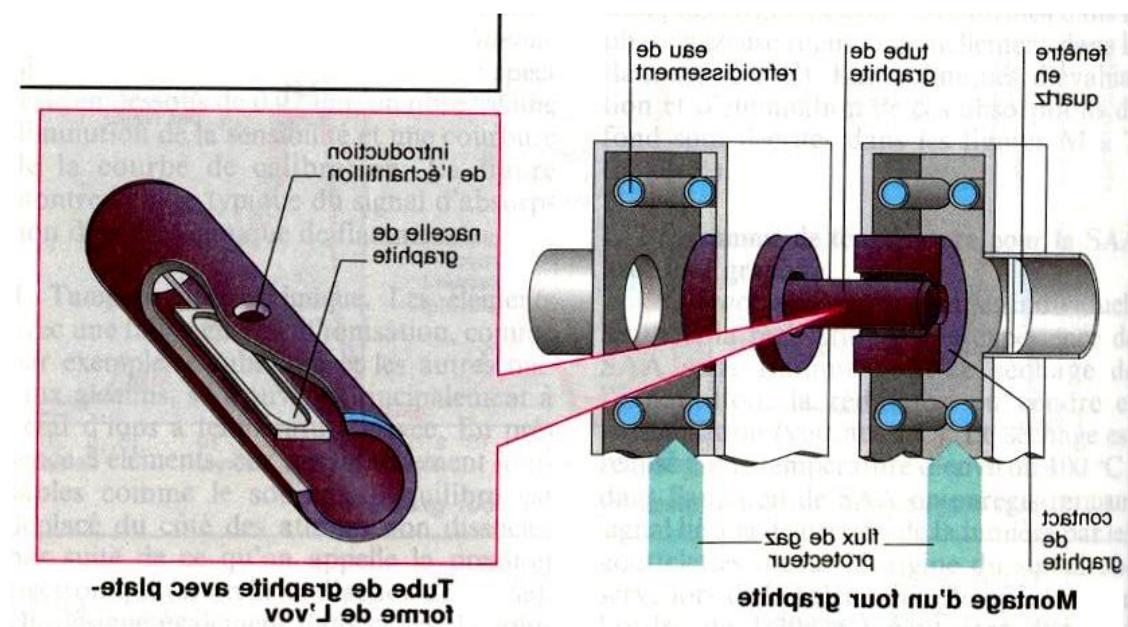
Pour éviter toute perte par projections, la température est montée graduellement, pour sécher, éliminer de façon thermique les composants associés pouvant gêner la mesure, puis calciner et enfin atomiser

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.

### **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.



**Tube de graphite avec plate-forme de l'vov**

### **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.

#### IV.3. Mesures : LOI DE BEER-LAMBERT

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

- si 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'absorbeurs, 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  $\lambda$  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.

On obtient:

$$\log_{10} \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

avec :

$\epsilon$ : 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 :

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

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 **ABS = el c** passant par l'origine et dont la pente est **el**.

### 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  $\lambda_0$  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  $\lambda_0$
- 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 disperseur, 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 césum), 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.

### **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.

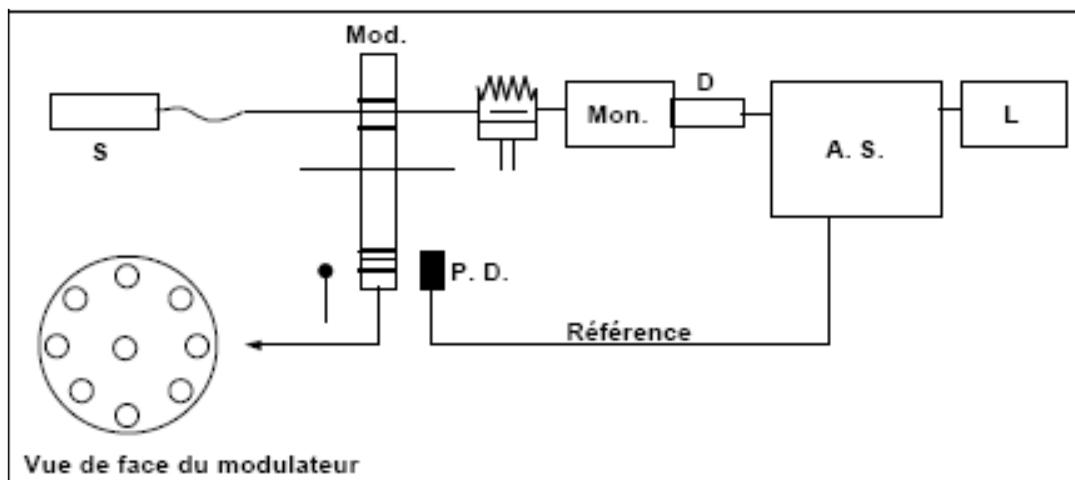
Le photomultiplicateur est maintenant universellement employé: ses performances, bien supérieures à celles des cellules photoélectriques, permettent de tirer tout le parti de la supériorité de l'absorption atomique sur l'émission dans les domaines de la séparation des éléments et de la sensibilité.

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:



Détection synchrone

#### **IV.4. 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.

#### **IV.5. Applications**

La SAA permet l'analyse de presque tous les métaux; elle est utilisée dans des domaines différentes (pharmaceutique, contrôle de qualité , chimique, médicale ...etc.).

- Dosage du zinc dans les préparations d`insuline ;
- Analyse des eaux potables ;
- Dosage des résidus toxiques dans les aliments ;
- Dosage de Mg dans les suppléments nutritionnels ;
- Dosage du Ca dans les os.

<b>Chapitre 05</b>	<b>Spectroscopie d'émission atomique</b>	
<b>V.1.</b>	<b>Définition et principe.....</b>	<b>50</b>
<b>V.2.</b>	<b>Appareillages.....</b>	<b>53</b>
<b>V.3.</b>	<b>Applications .....</b>	<b>56</b>

## **V.1. Définition et principe**

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.

### **Présentation du phénomène physique d'émission atomique**

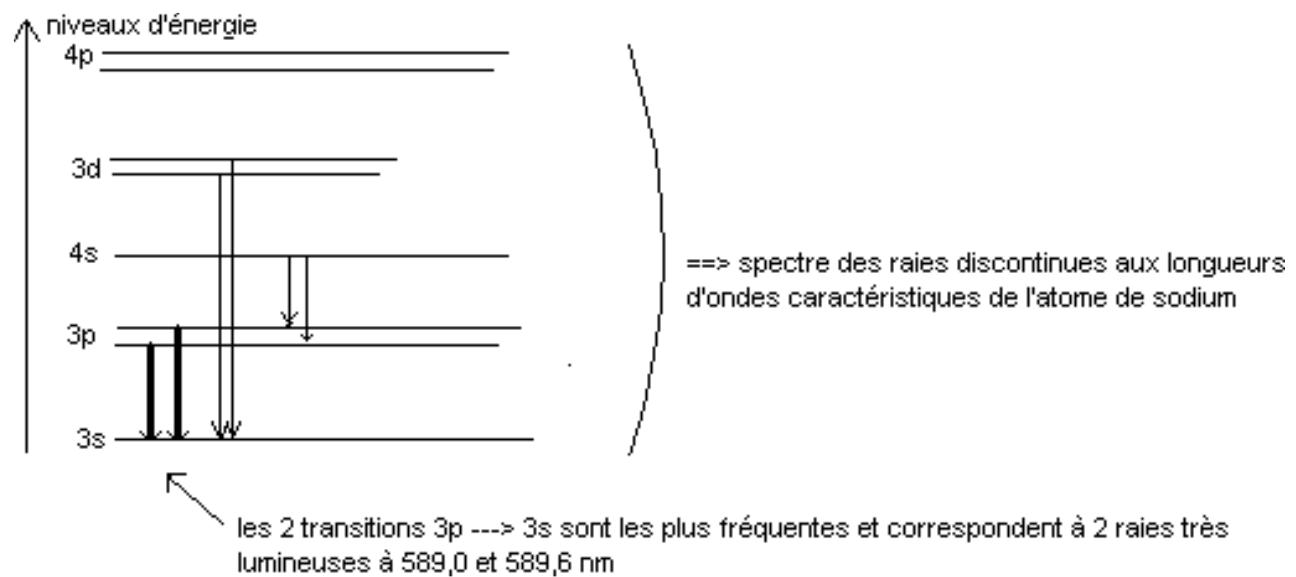
L'émission d'un rayonnement électromagnétique dû à la désexcitation d'atomes ou de molécules qui ont été excités par un apport suffisant d'énergie est un phénomène physique bien connu. Ainsi, si on projette du sel de cuisine dans une flamme au gaz de ville, une émission jaune caractéristique au sodium 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.

### **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. Le sodium (présent à l'état Na<sup>+</sup> 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.



### Spectre des raies discontinues aux longueurs d'ondes caractéristiques de sodium

$$\nu = \frac{\Delta E}{h};$$

donc  $\lambda = \frac{hc}{\Delta E}$

avec :

*h* constante de Planck,

*c* célérité de la lumière,

*v* fréquence,

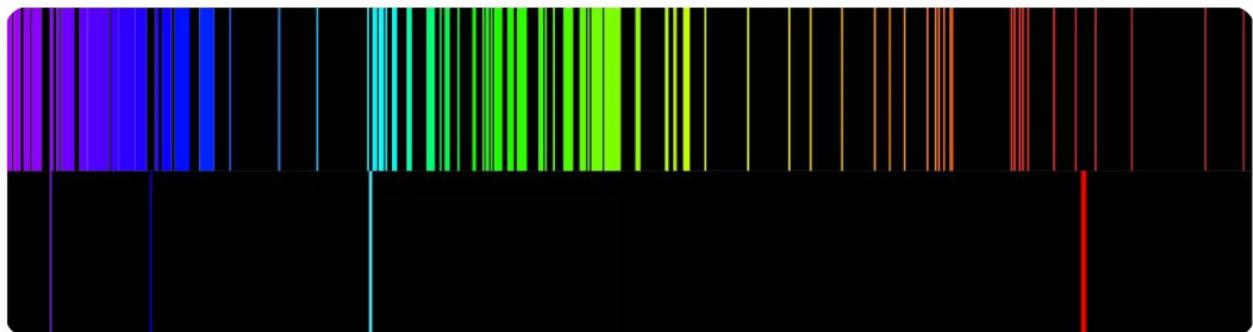
*λ* longueur d'onde,

$\Delta E$  saut d'énergie.

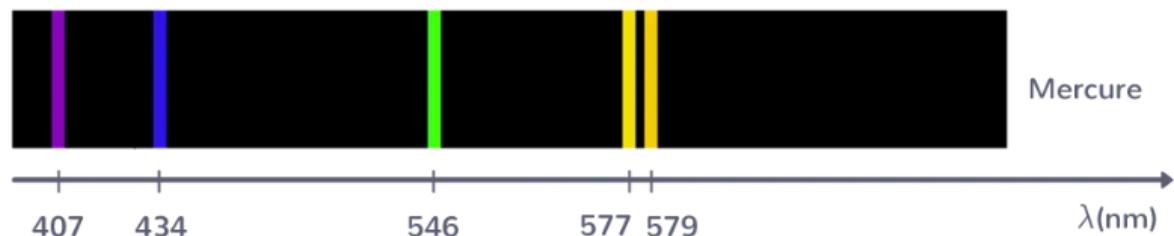
Le spectre présenté ci-dessus présente une partie seulement des transitions permises chez l'atome de sodium. Les 2 raies très proches à 589,0 et 589,6 nm correspondent à un effet de changement ou pas de spin. Déterminer a priori quelles sont les transitions énergétiques permises et leurs intensités chez 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.

### Spectrophotométrie d'émission atomique

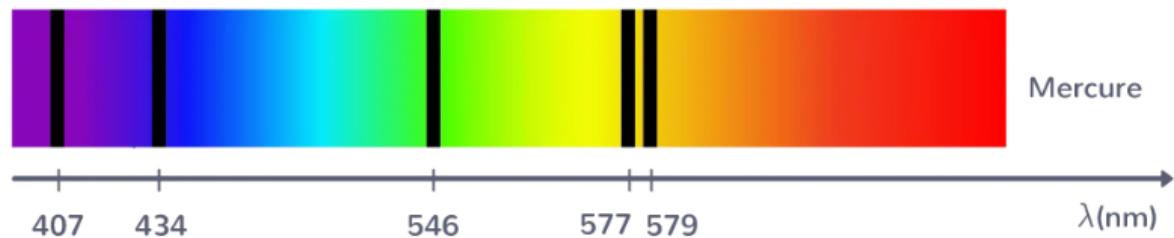


**Le spectre d'émission du fer et d'hydrogène :** le spectre d'émission du fer (Fe, en haut) comporte de nombreuses raies. Au contraire, celui de l'hydrogène (H, en bas) n'en comporte que peu.



Spectre de raies d'émission de l'atome de mercure

Le spectre de la lumière transmise par un gaz à basse pression éclairé par une lumière blanche est un spectre de raies d'absorption. Les raies noires correspondent aux photons absorbés par le gaz.



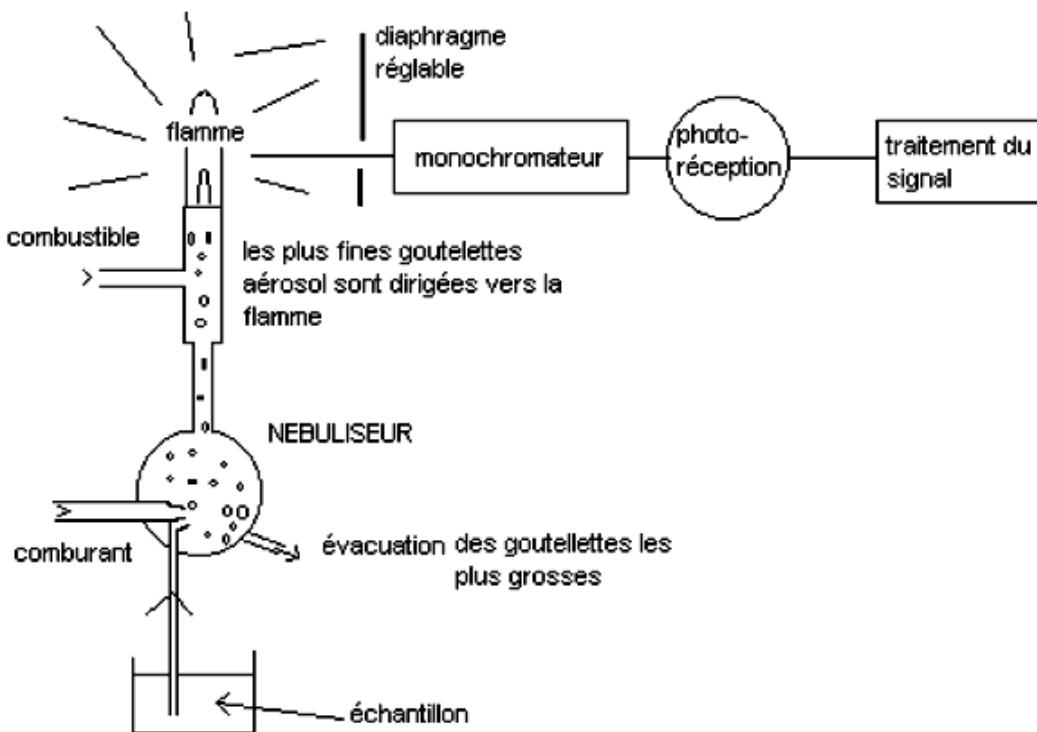
Spectre de raies d'absorption de l'atome de mercure

## V. 2. Appareillages

### a- 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 nébuliseur 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



Structure d'un photomètre de flamme

Le schéma de la figure présente la structure d'un photomètre de flamme. La partie nébuliseur 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

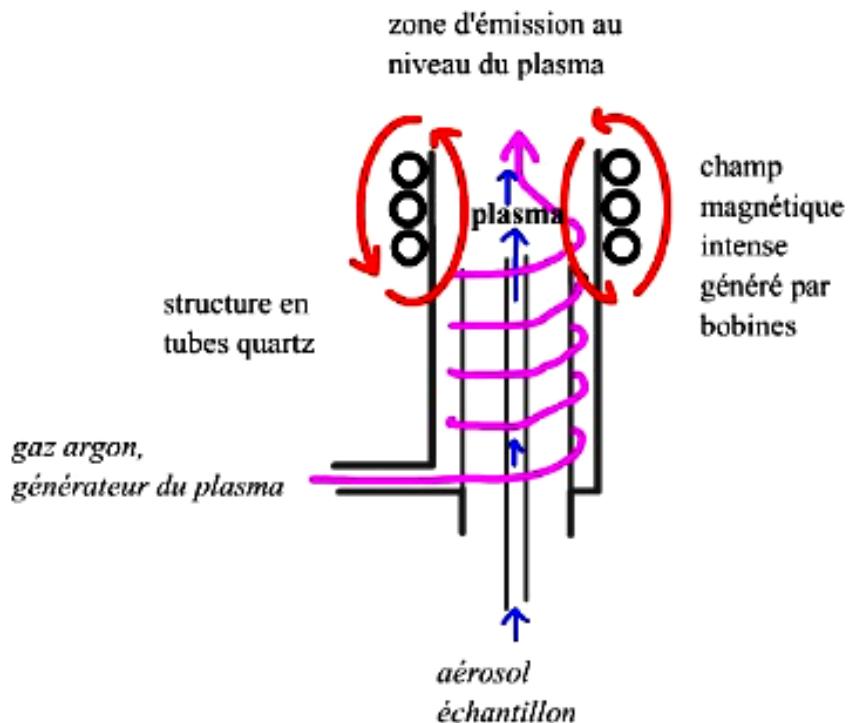
bol où elles se déposent sur les parois. Le nébuliseur doit absolument fournir un débit constant d'échantillon dans la flamme.

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

**b-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. 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



#### 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.

### **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  $\mu\text{m}$  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.

### **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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  avec  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ... dans la plupart des échantillons biologiques). Les flammes utilisées en pratique sont décrites dans **le tableau 01** ci-dessous :

## Les flammes utilisées en pratique

<b>Comburant utilisé</b>	<b>pour le combustible correspondant</b>	<b>Temperature</b>
dioxygène	propane	2000°C, adaptée pour doser $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}$ .
dioxygène	butane	
dioxygène	acétylène	
protoxyde d'azote	acétylène	3200°C, adaptée pour doser $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}$ .

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).

**V.3. 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 ...

<b>Chapitre 06</b>	<b>Spectroscopie de masse</b>	
<b>VI.1.</b>	<b>Définition et principe.....</b>	<b>57</b>
<b>VI.2.</b>	<b>Appareillages. ....</b>	<b>59</b>
<b>VI.3.</b>	<b>Les différents types d'ionisation .....</b>	<b>63</b>
<b>VI.4.</b>	<b>Applications .....</b>	<b>65</b>

## **VI.1. Définition et principe**

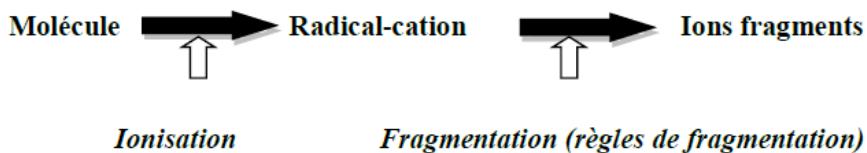
La spectrométrie de masse est rapidement devenue l'une des techniques analytiques les plus importantes. La spectrométrie de masse est largement utilisée en chimie et en biologie pour déterminer les structures des molécules complexes et pour identifier les molécules présentes dans de nombreux échantillons différents. Elle est également devenue très importante en géologie, en paléontologie, en sciences judiciaires et en chimie clinique. La spectrométrie de masse (SM) est un outil analytique puissant et polyvalent permettant d'obtenir des informations sur l'identité d'un composé inconnu, sa masse moléculaire, sa composition élémentaire, et dans de nombreux cas, sa structure chimique.

### **Principe**

Dans le spectromètre de masse, les molécules analytes sont converties en ions en leur appliquant de l'énergie. Les ions formés sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) et dirigés vers un transducteur qui convertit le nombre d'ions (abondance) en signal électrique. Les ions de différents rapports masse/charge sont ensuite dirigés vers le transducteur de manière séquentielle par balayage ou peuvent frapper un transducteur multicanal simultanément. L'abondance des ions tracée en fonction du rapport masse/charge est appelée spectre de masse. Souvent, des ions à charge unique sont produits dans la source d'ionisation, et le rapport masse/charge est simplement abrégé en masse, de sorte que le spectre est tracé comme le nombre d'ions en fonction de la masse,. Cependant, cette simplification pratique ne s'applique qu'aux ions à charge unique.

### **a-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.



### b-Accélération

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

### c-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.

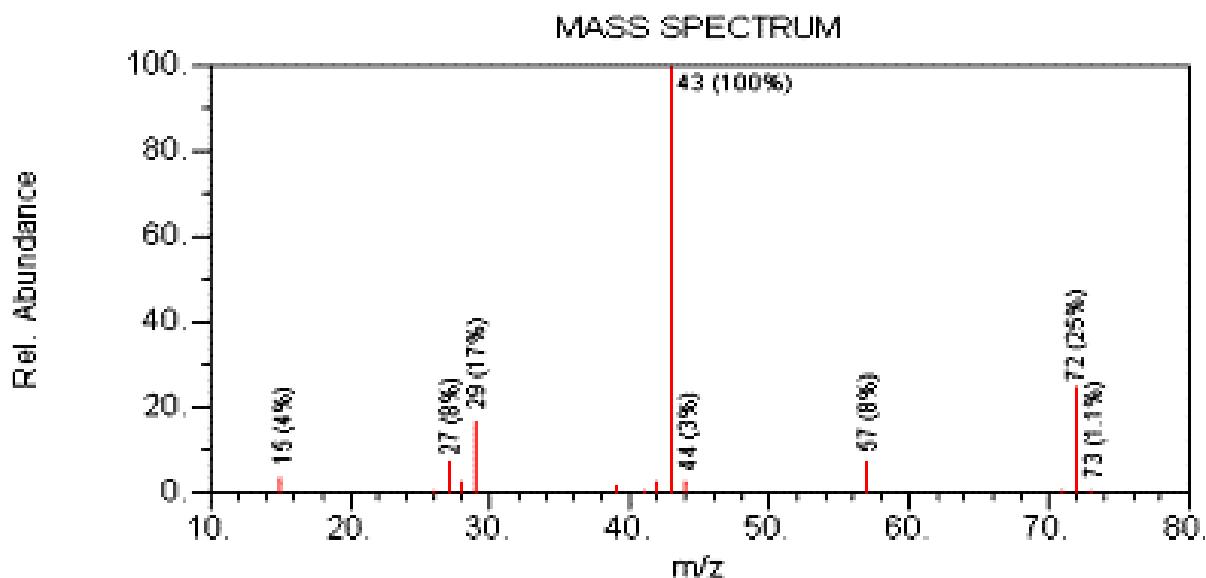
### d-Détection

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

**Remarque :** les molécules de taille moyenne ou petite ( $M < 1000$  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  $m/z$ .

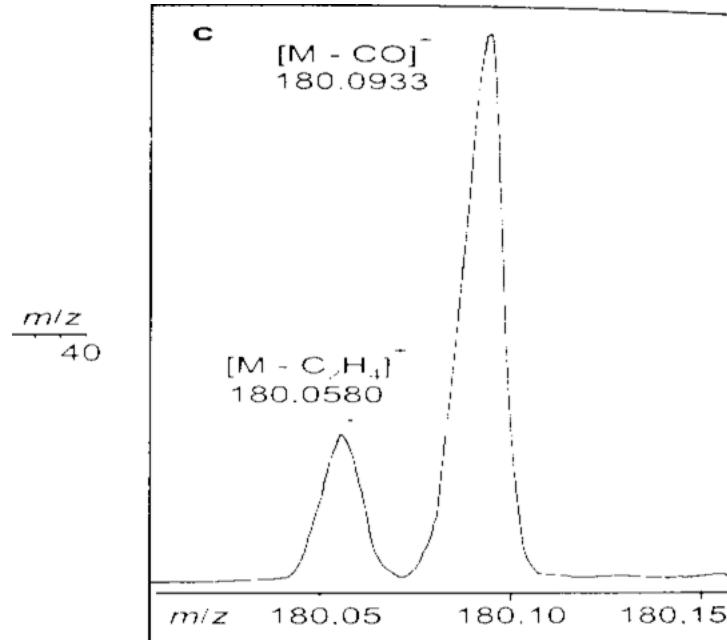
Le document de travail donné par l'appareil s'appelle le spectre de masse. Il en existe deux sortes :

- *Le spectre de fragmentation :*



*Spectre de fragmentation de la 2-butanone C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O*

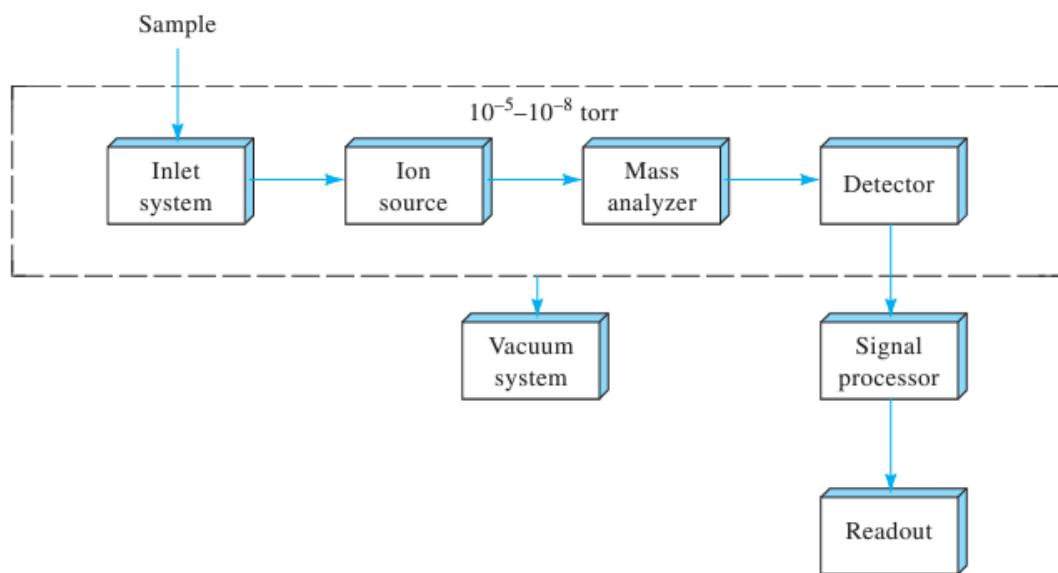
### - Le spectre continu



Spectre continu de la 2-butanone

## VI.2. Appareillage

La figure suivante montre les différentes composantes d'un spectrophotomètre de masse :



Composantes du spectrophotomètre de masse

## Type de spectrométrie de masse

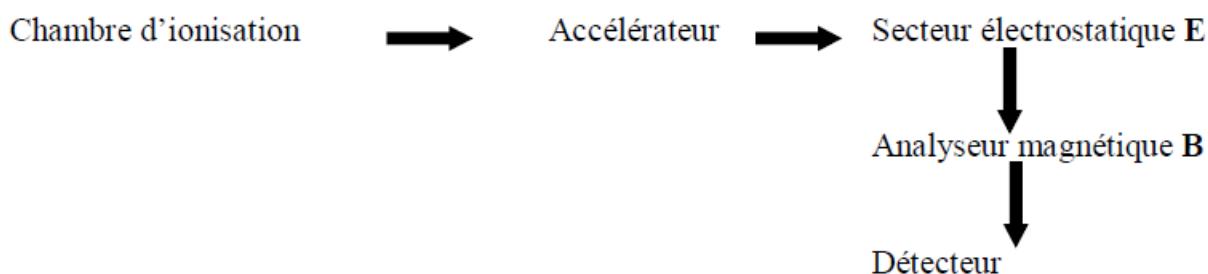
La spectrométrie de masse peut être divisée de manière pratique en spectrométrie de masse atomique ou élémentaire et en spectrométrie de masse moléculaire.

**La spectrométrie de masse atomique** est un outil quantitatif qui peut déterminer presque tous les éléments du tableau périodique. Les limites de détection sont souvent plusieurs ordres de grandeur meilleures que celles des méthodes optiques.

D'autre part, **la spectrométrie de masse moléculaire** est capable de fournir des informations sur les structures des molécules inorganiques, organiques et biologiques, ainsi que sur la composition qualitative et quantitative de mélanges complexes.

### a-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.



### b-Les analyseurs à temps de vol

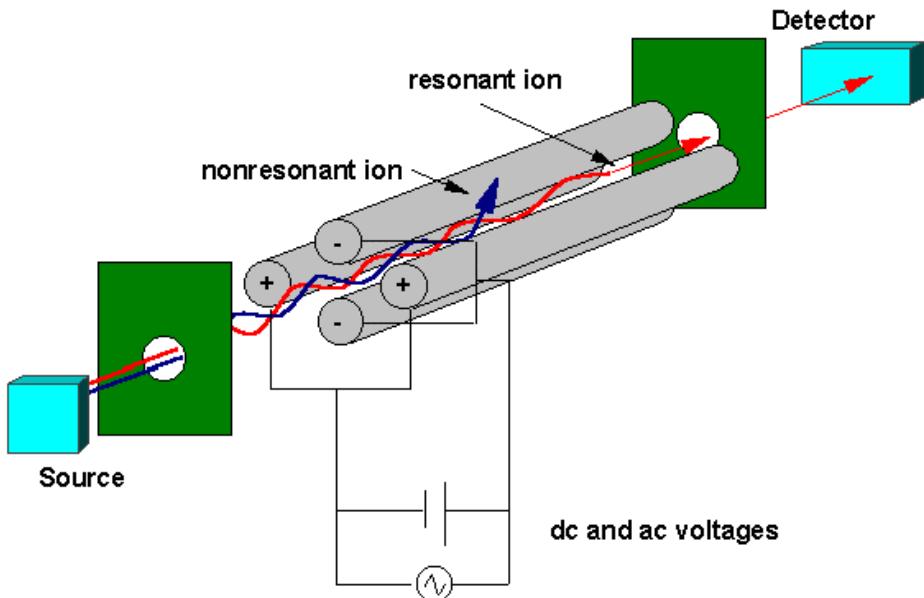
Le principe de ces appareils qui permettent d'atteindre des masses très élevées ( $m/z \rightarrow 300 \text{ g.mol}^{-1}$ ) est le suivant ; les atomes ou molécules sont tout d'abord ionisés comme dans tous les spectromètres de masse. Les ions résultants sont ensuite accélérés par une série de plaques 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.

### c-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.

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 VRF.



### 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 VRF 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  $U$ ,  $VM$  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  $VM$ .

**d-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  $m/z$ .

**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 102 à quelques 106 (analyseurs à résonance cyclotronique).

### VI.3. Les différents types d'ionisation

Le tableau ci-après montre les différents procédés 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

### **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 (CH<sub>4</sub>), l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) ou le butane (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>) introduit en même temps dans la source de l'appareil.

### **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.

### **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.

### **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.

### **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.

## **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 108. 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.

#### **VI.4. Applications**

##### **a-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)).

##### **b-Analyse de la composition élémentaire des ions (recherche de la masse)**

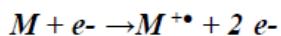
Avec les spectres haute résolution ( $R > 10\ 000$ ) : On calcule, à partir des masses isotopiques exactes des éléments supposés être présents, toutes les formules empiriques qui peuvent correspondre aux masses expérimentales. Là encore chaque solution possible est accompagnée d'un indice de correspondance. On associe d'autres critères tels que la règle de l'azote : si un composé contient un atome d'azote, sa masse est impaire.

##### **c-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  $M$ ,  $M+1$ ,  $M+2\dots$  dont les intensités relatives sont caractéristiques.

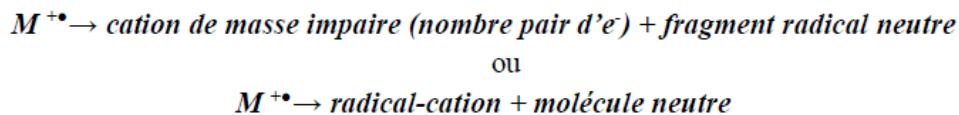
#### **Fragmentation des molécules organiques**

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 :



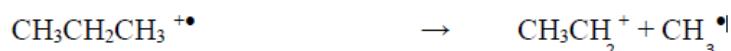
Les fragments stables, ioniques ou neutres, ont plus tendance à se former.

Exemples :

Fragmentation d'une liaison  $\sigma$  ionisée (alcanes)  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3 + e^- \rightarrow [\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3]^{+\bullet} + 2e^-$

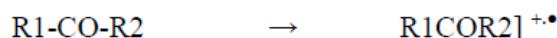
L'ionisation du propane se fait par perte d'un  $e^-$  d'une liaison C-C.

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

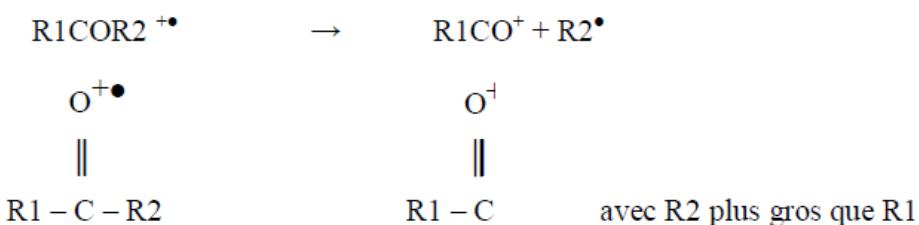


Fragmentation d'une cétone

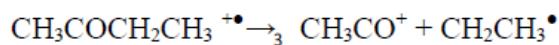
L'ionisation d'une cétone se fait par arrachement d'un électron d'un des doublets libres de l'oxygène.



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  $\text{R}_2\text{CO}^+$ ,  $\text{R}_1^+$  et  $\text{R}_2^+$  avec une abondance moindre



<b>Chapitre 07</b>	<b>Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire</b>	
<b>VII.1.</b>	<b>Définition et principe.....</b>	<b>68</b>
<b>VII.2.</b>	<b>Appareillages. ....</b>	<b>59</b>
<b>VII.3.</b>	<b>Applications.....</b>	<b>77</b>

## VII.1. Définition et principe

**IRM:** imagerie basée sur le principe de résonance magnétique nucléaire, en présence d'un champ magnétique les noyaux absorbent de l'énergie venant d'une onde radiofréquence ce qui modifie leur aimantation. Tous les noyaux ne réagissent pas de la même façon.

### Spectroscopie RMN

- L'énergie des états de spin nucléaire est éclatée dans un champ magnétique appliqué de manière externe. L'absorption de radiations radiofréquences peut provoquer des transitions entre ces deux états.
- Le décalage chimique est une mesure de l'environnement chimique du proton.
- La découpe spin-spin identifie le nombre de protons équivalents attachés à un atome de carbone et est utile pour identifier les groupes fonctionnels.

### Définition du 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 :

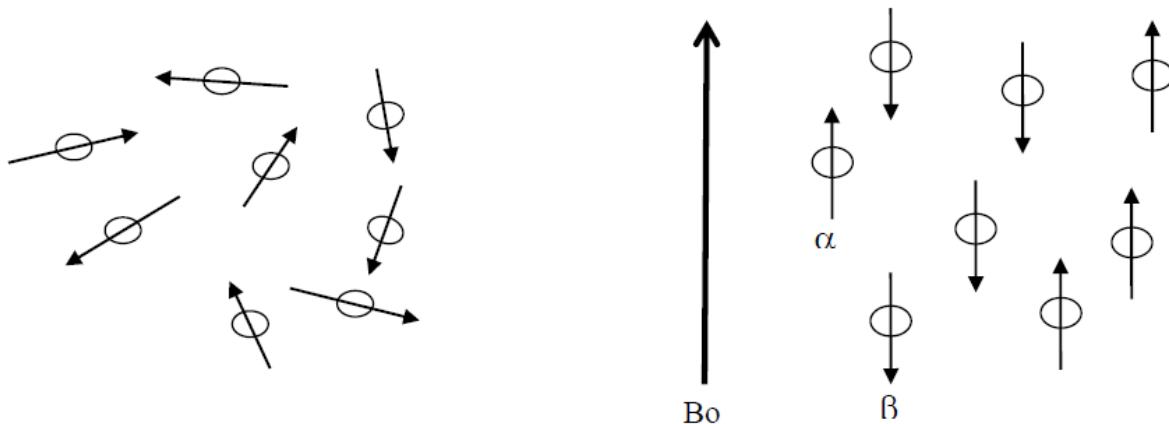
- Les noyaux sensibles au champ magnétique externe qui possèdent un spin nucléaire  $I$  égal à  $\frac{1}{2}$  comme le proton  $^1H$ , le carbone  $^{13}C$ , le phosphore  $^{31}P$ , l'azote  $^{15}N$  ou le fluor  $^{19}F$ . Ils ont une circulation de charge sphérique, et possèdent deux moments magnétiques.
- 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.

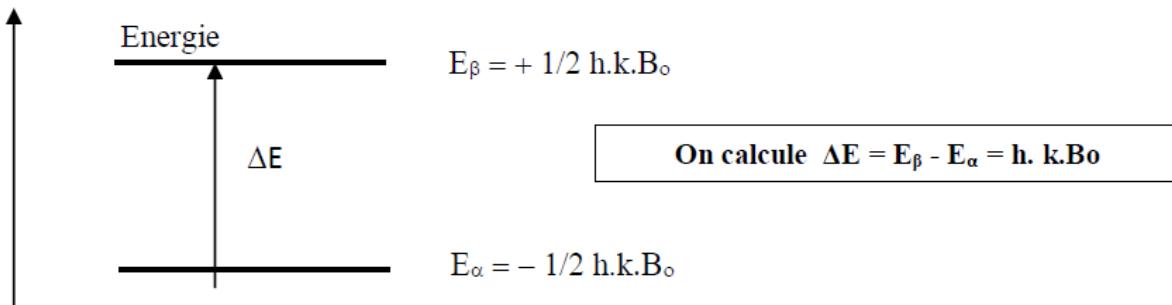
Un **proton** libre  $^1H$  placé dans un champ magnétique extérieur  $\vec{B}_0$  ne peut s'orienter que de deux façons.

Ces deux états,  $\alpha$  et  $\beta$ , appelés états de spin nucléaire, sont énergétiquement différents (**Fig. 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  $v_0$ . On a une transition de l'état  $\alpha$  vers l'état  $\beta$ .



$k$  = constante caractéristique d'un type de noyau

$h$  = constante de Planck

L'énergie étant quantifiée, on a :  $\Delta E = h.v_0$

Soit  $v_0 = k.B_0$  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 : $\delta$

##### 4.1. Effets d'écran

Pour obtenir la résonance, on fixe la radiofréquence  $v_0$  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  $v_0$  étant maintenue constante, la condition de résonance  $v_0 = k.B_0$  n'est plus satisfaite.

Pour retrouver les conditions de résonance en maintenant constante la fréquence  $v_0$ , 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

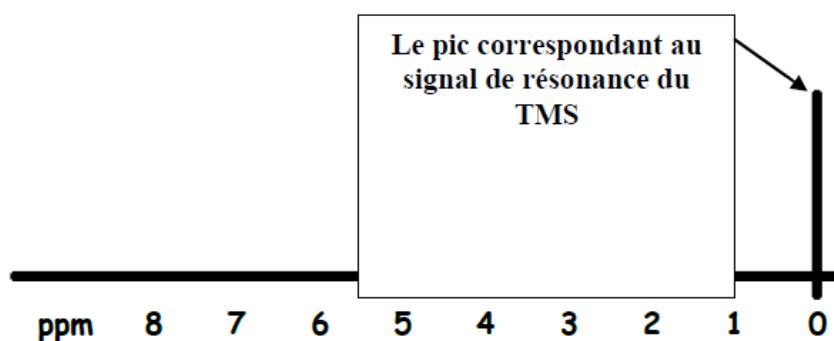
Pour comparer les différentes absorptions, on choisit un composé de référence, le tétraméthylsilane ou TMS.

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  $\delta$  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  $\delta$  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.

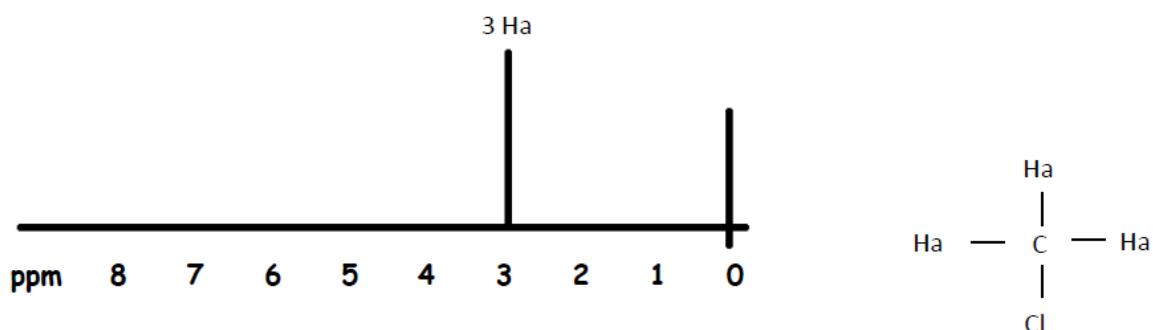
L'intérêt du déplacement chimique réside dans le fait qu'il s'agit d'une grandeur relative, indépendante de la fréquence de travail  $v_0$  utilisé dans le spectromètre et qui diffère d'un appareil à l'autre.

### 5. Courbe d'absorption

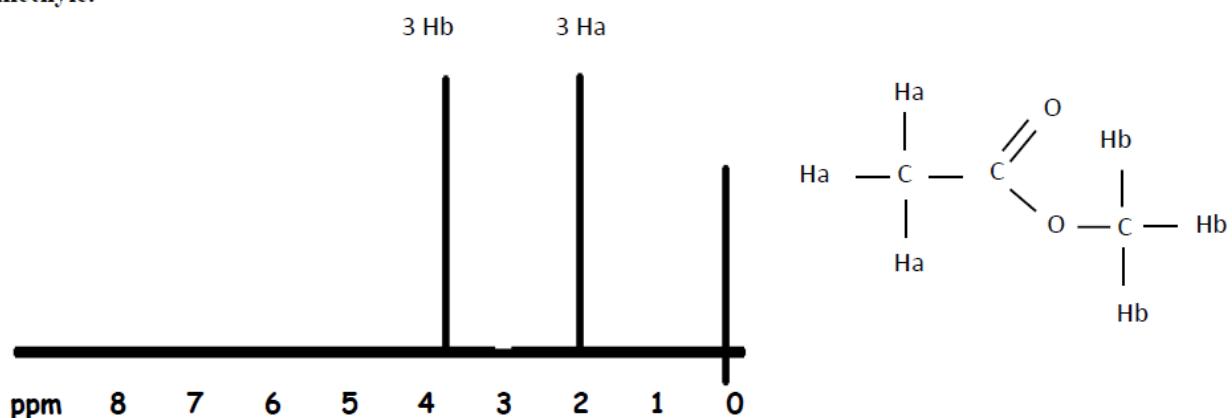
Dans les premiers spectromètres de RMN, la fréquence de l'onde électromagnétique était fixe et la résonance était obtenue par un lent balayage du champ qui augmentait de gauche à droite sur les spectres. Ce sens a été conservé pour le champ. Du fait de cette convention, le déplacement chimique croît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



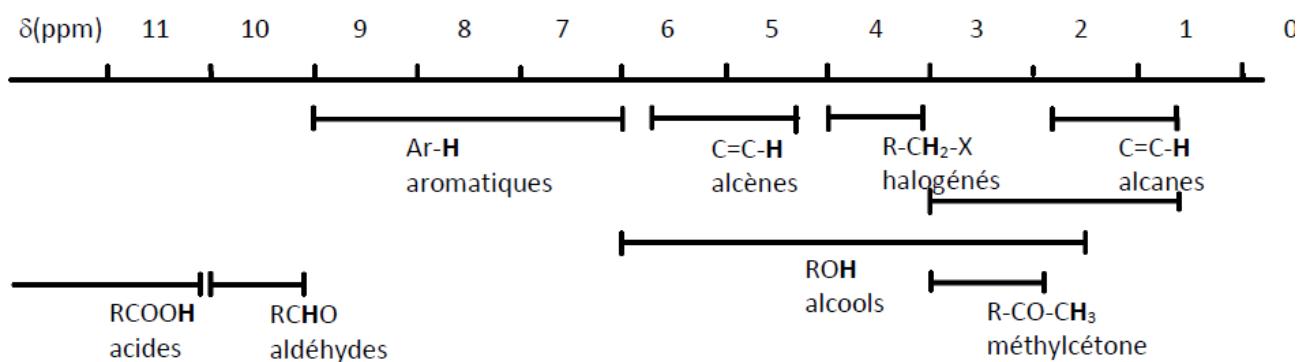
Exemple 2 : Courbe d'absorption des 2 groupes de 3 protons équivalents de l'éthanoate de méthyle.



## 6. Facteurs influençant le déplacement chimique

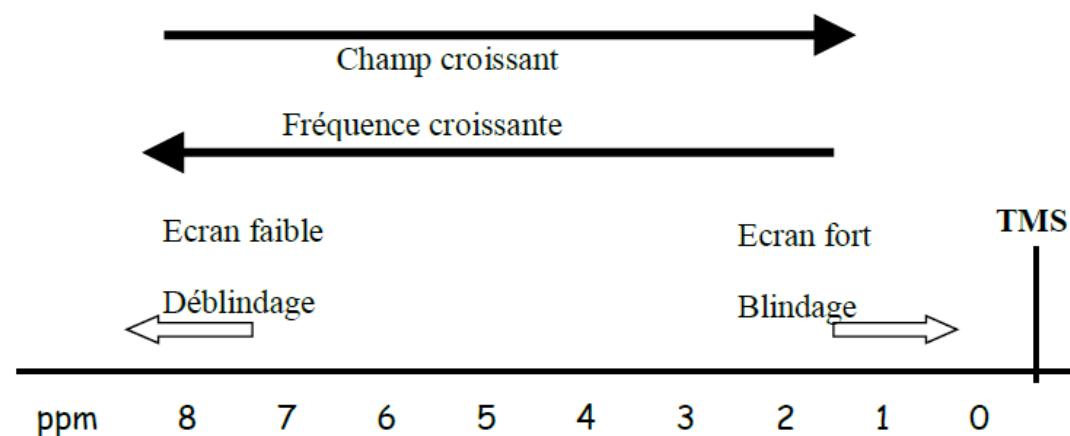
Les déplacements chimiques sont caractéristiques des divers environnements du proton, donc des groupements voisins en chimie organique. On donne le **tableau 1** indicatif suivant :

Tableau 1 : Les déplacements chimiques des différents groupements



De façon générale :

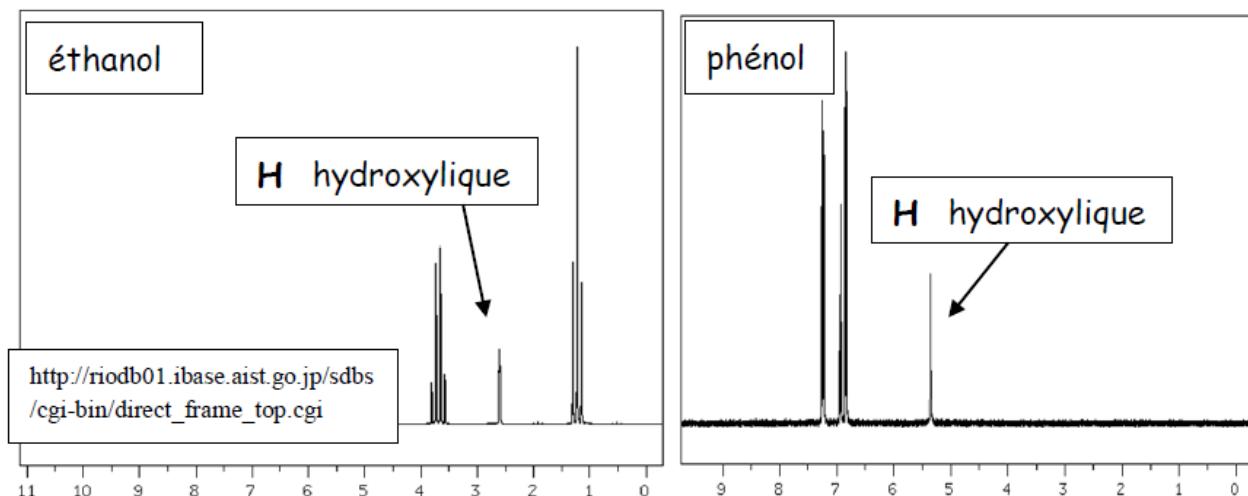
- Les alcanes sont fortement blindés.
- Dans beaucoup de cas le déplacement chimique peut s'expliquer par l'électronégativité.
- Les groupes aromatiques induisent de fort déplacement chimique également mais ceci ne s'explique pas par l'électronégativité. Les déblindages s'effectuent par circulation des électrons  $\pi$ . 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 protones 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.

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  $-\text{CH}_3$  (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.

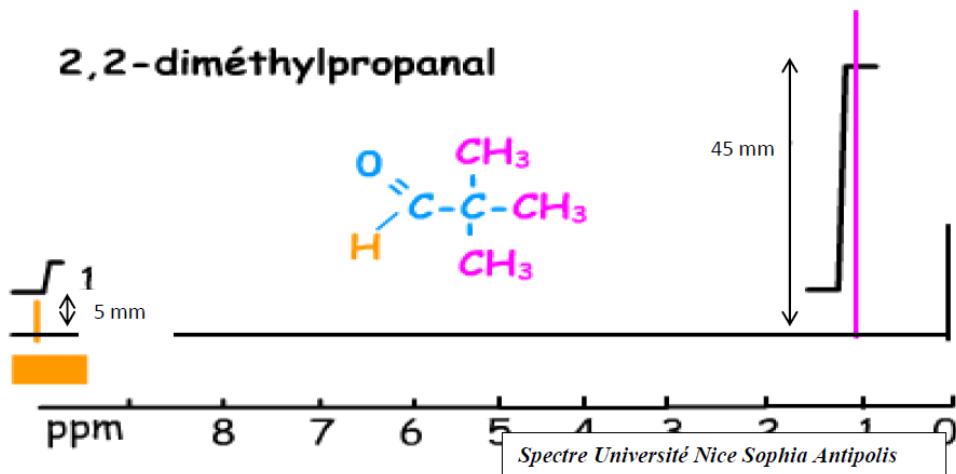


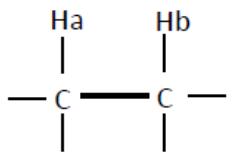
FIGURE 2 : Spectre RMN 2,2-diméthylpropanal.

## 8. Le couplage spin/spin de premier ordre

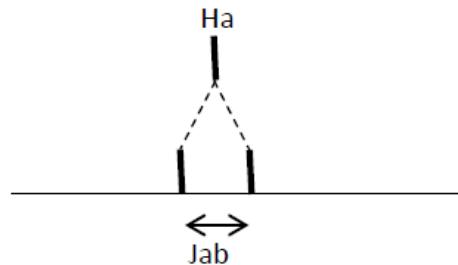
De nombreux spectres contiennent plus de pics que la molécule contient de protons. En effet, la résonance des protons équivalents produit un groupe de pics centrés sur  $\delta$  et équidistants les uns des autres.

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**.

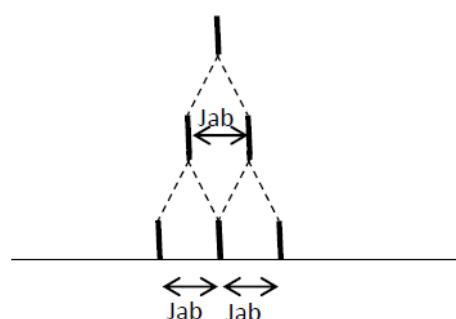
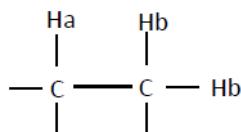
De la même façon, la résonance de **Hb** se traduit par un doublet.

### 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.

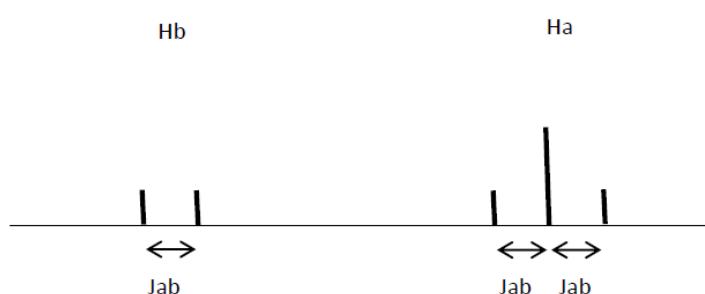
#### 8.2. Couplage 2 ; 1

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

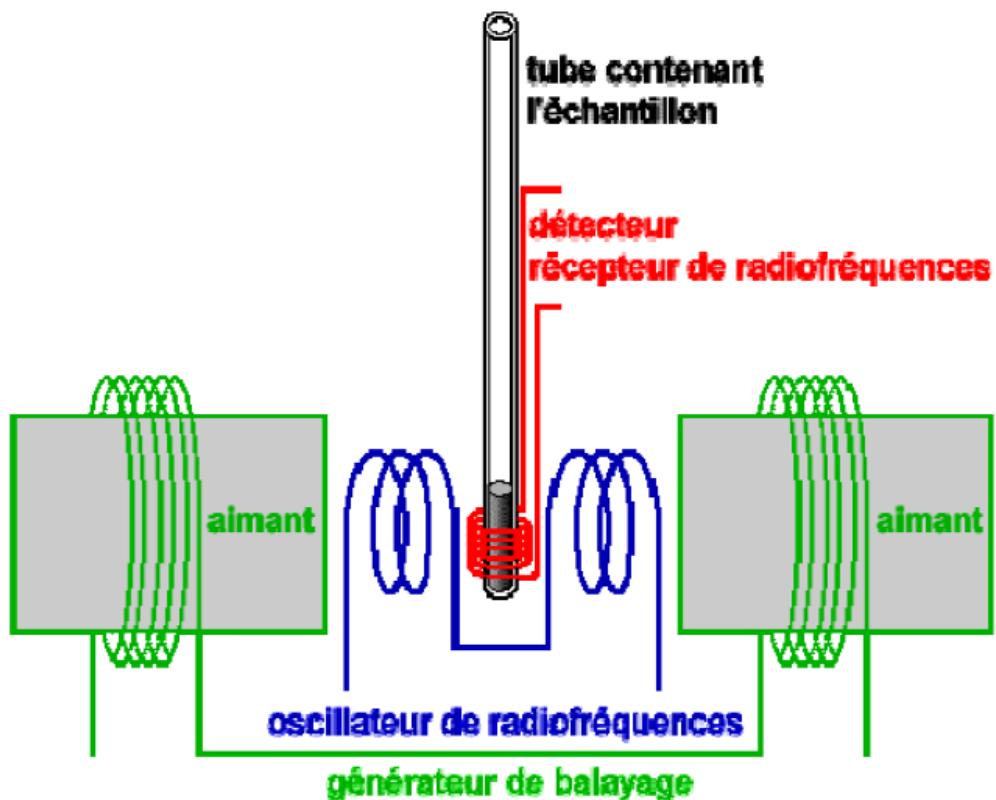
### 9. Appareillage :

Un spectromètre de R.M.N. est constitué d'un électro-aimant à l'origine de B0. 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 B0 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.**

### VII. 3. Applications

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique analytique puissante utilisée dans divers domaines de la science et de l'ingénierie. C'est donc une technique polyvalente, indispensable dans de nombreux domaines de recherche et d'application :

#### a-Chimie et Biochimie

- Analyse Structurale : La RMN permet de déterminer la structure des molécules organiques, en fournissant des informations détaillées sur la configuration atomique et la dynamique des molécules.
- Dynamique Moléculaire : Elle aide à étudier les mouvements atomiques et les interactions au sein des protéines et des complexes biologiques.

#### b-Médecine

- Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) : Technique d'imagerie médicale très utilisée pour visualiser des structures internes du corps humain, notamment les tissus mous, les cerveaux, et les articulations.

- Diagnostic Métabolique : Utilisation de la RMN pour détecter des métabolites spécifiques dans le corps, aidant au diagnostic de diverses maladies.

#### ***c-Sciences des Matériaux***

- Caractérisation de Matériaux : La RMN est utilisée pour analyser la structure et la composition des matériaux, des polymères aux solides cristallins.
- Études de Propriétés Magnétiques : Investiguer les propriétés magnétiques des matériaux pour des applications en électronique et en magnétisme.

#### ***d-Agro-alimentaire***

- Analyse des Aliments : La RMN peut être employée pour étudier la composition et la qualité des aliments, comme l'analyse des huiles, des produits laitiers ou des boissons.

#### ***e-Pharmaceutique***

- Développement de Médicaments : Elle joue un rôle crucial dans la découverte et le développement de nouvelles molécules, en permettant l'analyse de leur structure, leur pureté et leur interaction avec d'autres substances.

## Références Bibliographiques

- Biémont, Émile. 2008. *Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale*. 1re édition. Bruxelles : Éditions De Boeck Université, 2008. ISBN 978-2-8041-5065-5.
- Kaidar, K., & Alekseev, S. (2019). *Introduction to Spectroscopy: A Comprehensive Guide for Chemists*. Wiley.
- Burke, C. (2022). *Spectroscopy: Theory and Applications*. NY Research Press. ISBN 978-1632388421.
- Fleming, I., & Williams, D. (2019). *Spectroscopic methods in organic chemistry (7th ed.)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18252-6>
- Miller, R. A., & Smith, J. F. (2021). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (10th ed.). Cengage Learning.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. & Crouch S. R. 2014. *Fundamentals of analytical chemistry* (9th ed.). Brooks/Cole, Cengage Learning. ISBN-13: 978-0-495-55828-6, ISBN-10: 0-495-55828-1
- Hollas, J. M. 2004. *Modern Spectroscopy*. 4th ed., Wiley, ISBN 0 470 84416 7, 483p.
- Oxtoby, D. W., Gillis, H. P., & Campion, A. (2008). *Principles of Modern Chemistry* (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN-13: 978-0-534-49366-0, ISBN-10: 0-534-49366-1
- Atkins, P. W., & Friedman, R. (2011). *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press.
- Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., & Vyvyan J. R. (2015). *Introduction to Spectroscopy*. Fifth ed. Cengage Learning. ISBN: 978-1-285-46012-3.
- Droua Z., 2018. Cours de Chimie Structure de la matière, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, Faculté de Génie Civil et d'Architecture, Département de Génie Civil, 86p.
- Haddi, B. (2018). *Caractérisation diélectrique d'un mélange de titanate et d'oxyde (résine époxyde, BaTiO<sub>3</sub>, Cu<sub>2</sub>O) fritté en fonction de la fréquence*. Thèse de Doctorat, Département d'électronique, Faculté de Technologie, Université Ferhat Abbas - Sétif 1. 173 p.
- Verlhac, C. 2022. *Couplages électromagnétiques et thermiques pour la nanophotonique haute température*. Thèse de Doctoral, 09 September, Université Paris-Saclay, 179 p.
- Elalofi, R. (2003). *Propagation du rayonnement en milieu diffusant: étude de transition entre régime balistique et régime diffusif et des fluctuations temporelles d'intensité*. Thèse de doctorat d'État, Université de Metz.
- Brunel M., Burle N., Chérigier-Kovacic L., Chevalier O., Coulié K., Micolau G. & Patris J. (2015). Chapitre 4: Optique: Généralités. Physique L1. Pearson France. pp. 67-73.

- Bonn F. et Rochon G. 1992. *Précis de télédétection*. Volume 1 : *Principes et méthodes*. Aupelf-Uref, coll. Presses Universitaires du Québec, Montréal.
- Bordenave, A. 2019. *Évolution tectono-sédimentaire d'une marge continentale passive en régime d'obduction : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie et de son domaine offshore (Sud-Ouest Pacifique)*. Thèse de doctorat en Sciences de la Terre, École Doctorale Montaigne Humanités (ED 480), Université Bordeaux Montaigne. 367 p.
- Benabdellah, G. 2021. *Interaction rayonnement-matière*. Polycopié pédagogique destiné aux étudiants en 1ère année Master, Faculté des Sciences de la Matière, Département de Physique, Université Ibn Khaldoun – Tiaret, 70 pages.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). 2023. Rayonnements ionisants et effets sur la santé, <https://www.who.int/fr/>
- Rouxel J. 2015. *Conception et réalisation de cellules photoacoustiques miniaturisées pour la détection de traces de gaz*. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, École doctorale n° 547 : Sciences Technologies Santé, 27 novembre 2015.
- Halliday, D., Resnick, R., & Walker, J. (2014). *Fundamentals of physics* (10th ed.). Wiley, 1450P.
- Newton I. (1704). *Opticks: Or, a treatise of the reflections, refractions, inflections and colours of light*. London: Sam. Smith.
- Diaz Rosado J. C. (2013). *Étude et développement de la spectroscopie d'émission optique sur plasma induit par laser pour la réalisation d'analyses de terrain : application à l'analyse en ligne de métaux dans les liquides* (Thèse de doctorat, Université Paris-Sud). HAL Id : tel-00818909. <https://theses.hal.science/tel-00818909v1>
- Oxtoby, D. W., Gillis, H. P., & Campion, A. (2008). *Principles of Modern Chemistry* (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN-13: 978-0-534-49366-0, ISBN-10: 0-534-49366-1
- Djouama, H. (2018). *Aspects structuraux et électroniques de complexes organométalliques alcynyles luminescents*. Thèse de doctorat en Science, Département de Sciences de la Matière, Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider-Biskra. 200 p.
- Benali, A. H. (2016). Chapitre III : Interaction Rayonnement – Matière. Dans *Année universitaire 2016/2017*. El-oued : Faculté de SNV, EHLU. Disponible sur : <https://computationalvisuatek.com/interaction-rayonnement-matiere/>
- BENTABET Nesrine Cours de Méthodes Physico-Chimiques d'Analyse : Méthodes spectrales, Centre universitaire Belhadj Bouchaib – Ain Témouchent Institut des Sciences, Département des sciences de la nature et de la vie.

## **Webographie**

- [\*https://www.maxicours.com/se/cours/determiner-la-couleur-d-une-solution-a-partir-du-spectre-uv-visible/\*](https://www.maxicours.com/se/cours/determiner-la-couleur-d-une-solution-a-partir-du-spectre-uv-visible/)
- [\*https://www.maxicours.com/se/cours/exploiter-un-diagramme-de-niveaux-d-energie/\*](https://www.maxicours.com/se/cours/exploiter-un-diagramme-de-niveaux-d-energie/)
- [\*https://www.maxicours.com/se/cours/exploiter-un-diagramme-de-niveaux-d-energie/\*](https://www.maxicours.com/se/cours/exploiter-un-diagramme-de-niveaux-d-energie/)
- [\*http://unterrichtsbeispiele2.rihant.de/unspf/2010\\_Strasbourg\\_Pigault\\_AbsorptionFluorescence/co/14\\_parametres\\_fla.html\*](http://unterrichtsbeispiele2.rihant.de/unspf/2010_Strasbourg_Pigault_AbsorptionFluorescence/co/14_parametres_fla.html)