



Université 8 mai 1945 Guelma



Faculté des sciences de la nature et de la vie
et des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Niveau : Master I Biochimie Appliquée

Biochimie Instrumentale

Présenté par Mme SERIDI BRAIK Asma
Maitre de Conférence

Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

1.4. Fluorimétrie

Chapitre I: Méthodes spectrales

Introduction

R.E.M.

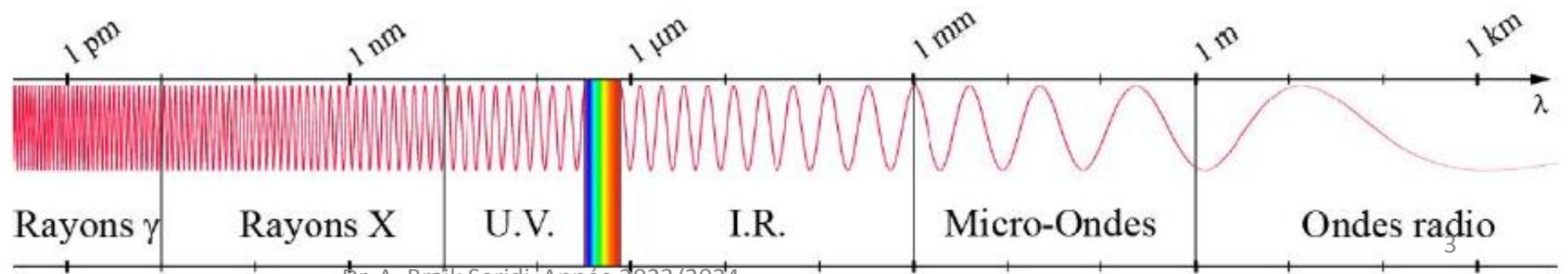
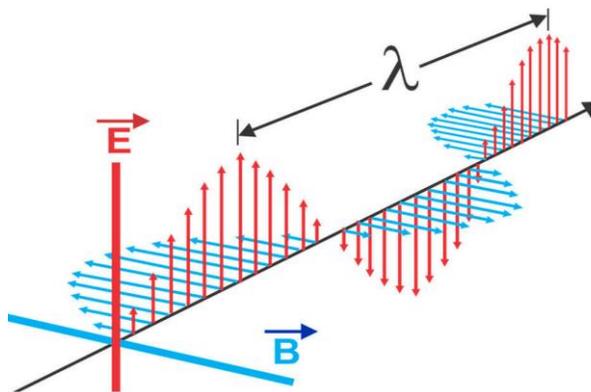
- Un rayonnement électromagnétique constitué d'un champ magnétique B et d'un champ électrique E . Ils sont perpendiculaires et varient de façon sinusoïdale

Spectroscopie

- Etude des interactions entre les rayonnement électromagnétiques (R.E.M.) et la matière (atomes/molécules) pour en modifier l'énergie

Spectre

- Ensemble de raies résultant de la décomposition du R.E.M
- Très vaste et s'étend sur 10^{14} au moins en longueur d'onde, des rayons X à très courte longueur d'onde ($\lambda=10^{-13}$ m) aux grandes ondes de radio (1000 m)
- Seul un très petit domaine est visible par l'homme: de 400 à 800 nm environ



Chapitre I: Méthodes spectrales

Introduction

Spectre

Caractéristiques du R.E.M.

- Energie E
- Fréquence ν
- Longueur d'onde λ
- Nombre d'ondes $\bar{\nu}$

Énergie d'un rayonnement

L'énergie E d'un photon associé à un rayonnement de longueur d'onde λ vaut :

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad E = h \cdot \nu \quad \text{Loi de Planck}$$

E : énergie du photon (J)

h : constante de Planck égale à $h = 6,63 \times 10^{-34}$ J·s

c : vitesse de la lumière égale à $c = 3,00 \times 10^8$ m·s⁻¹

λ : longueur d'onde associée (m)

On définit le nombre d'onde $\bar{\nu}$, autre grandeur caractéristique d'un rayonnement, selon :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

$\bar{\nu}$: nombre d'onde (m⁻¹)

λ : longueur d'onde (m)

Chapitre I: Méthodes spectrales

Introduction

Domaine de la spectroscopie

- Tout le spectre électromagnétique
- Les techniques spectroscopiques sont utilisées, des rayons X aux micro-ondes: 10^{-13} à 10^{-1} m

Techniques

- Nombreuses et variées

Phénomènes spectroscopiques

- Se manifestent de diverses manières mais tous gouvernés par un nombre limité de principes généraux, relativement simples: Absorption, émission, diffusion

Objectifs de la spectroscopie

- Obtenir des informations sur la structure des molécules (IR, UV et micro-ondes)
- Etude de l'interaction entre la lumière et la matière
- Détermination des niveaux d'énergie électronique , les longueurs de liaisons , les angles de liaisons et forces de liaisons
- Utiliser les lois de l'absorption pour faire une analyse quantitative (dosage)

Introduction

Interaction lumière-Matière Echange d'énergie entre le R.E.M. et la matière

Répartition de l'énergie dans la matière

- Energie électronique $E_{\text{élec}}$: due aux électrons des atomes ou des molécules
- Energie vibrationnelle E_{vib} : de vibration des atomes dans une liaison
- Energie rotationnelle E_{rot} : de rotation de l'ensemble d'une molécule
- Energie nucléaire : propre des noyaux (terme nucléaire)

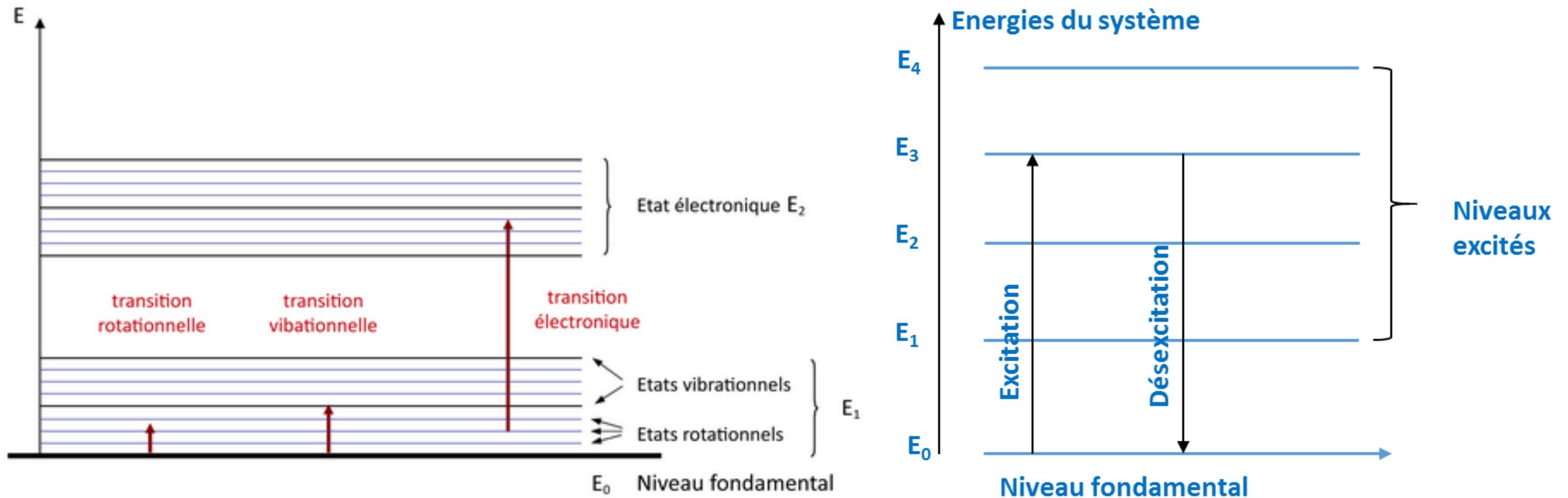
- Ces formes d'énergie sont quantifiées, elles prennent une suite discontinue de valeurs qu'on appelle niveaux d'énergie

- Niveau fondamental (E_0) : état stable à basse température, seules les basses énergies sont possibles
- Niveaux d'excitation (E_1, E_2, \dots) : état où l'énergie est augmentée par différents processus, thermique, électrique ou électromagnétique
- La désexcitation/relaxation : l'état d'excitation instable tend à revenir à un niveau d'énergie inférieure, en cédant l'excès d'énergie qu'on lui a communiqué

Chapitre I: Méthodes spectrales

Introduction

Interaction lumière-Matière



Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

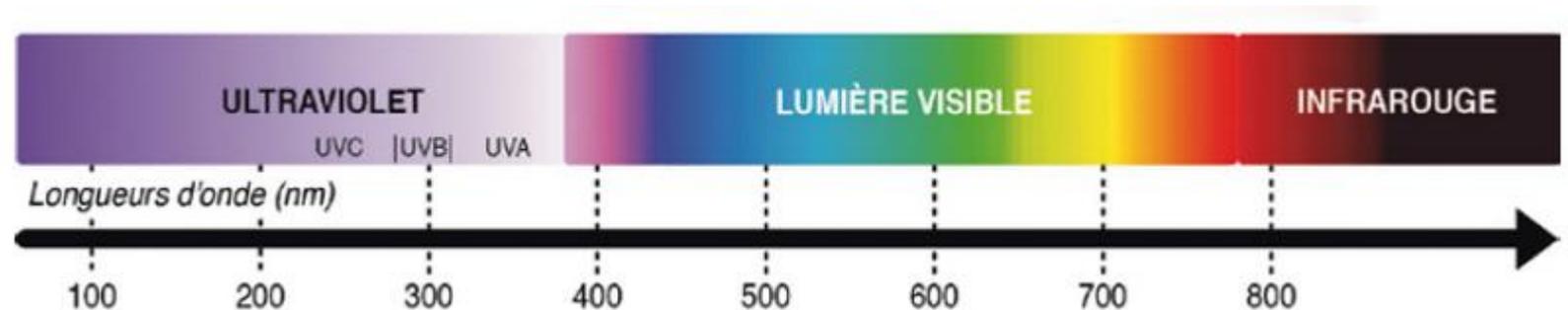
1.4. Fluorimétrie

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Intérêt de la spectroscopie UV-Vis

- Large domaine d'applications
- Analyses quantitatives (loi de Beer-Lambert)
- Grande sensibilité : limite de détection $\approx 10^{-5}$ M
- Précision : 1 - 5% erreur
- Simplicité, rapidité



Domaine spectral UV-Vis

- Ce domaine spectral désigne la partie du spectre électromagnétique qui réunit trois plages de longueurs d'onde appelées:
 - Proche UV (185-400 nm)
 - Visible (400-700 nm)
 - Très proche infrarouge (700-1 000 nm)

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Domaine spectral UV-Vis

- L'absorption de la lumière dans ce domaine spectral a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les électrons des liaisons des espèces présentes (molécules) dans l'échantillon observé
- Sous l'action d'un REM du domaine de l'UV/visible les molécules absorbent des photons de la source lumineuse
- L'énergie correspondantes est captée par un ou plusieurs des électrons superficiels des liaisons des molécules
- Cette interaction photons-électrons de molécule entraîne une modification des états énergétique électronique, de vibration et de rotation de la molécule selon l'équation :

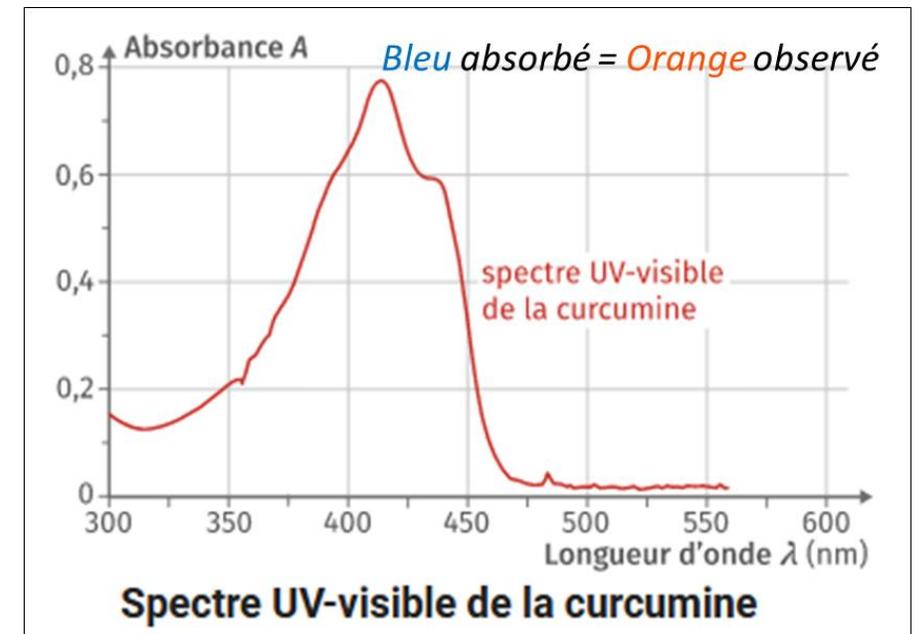
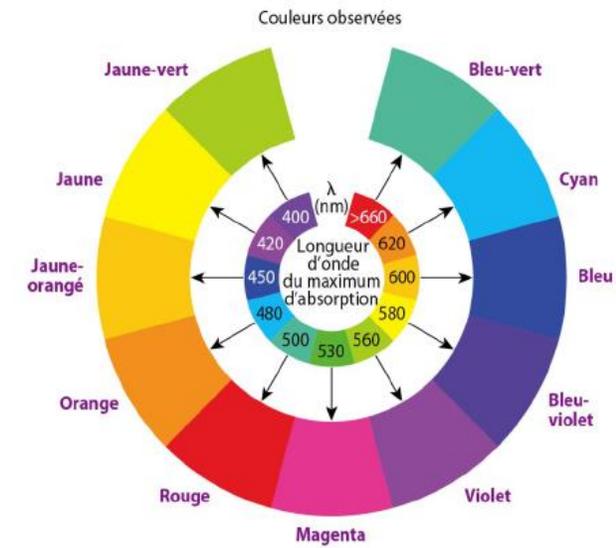
$$\Delta E_{\text{élec}} = \Delta E_{\text{élec}} + \Delta E_{\text{vib}} + \Delta E_{\text{rot}} \quad (\text{avec } \Delta E_{\text{élec}} > \Delta E_{\text{vib}} > \Delta E_{\text{rot}})$$

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Spectre UV-Vis

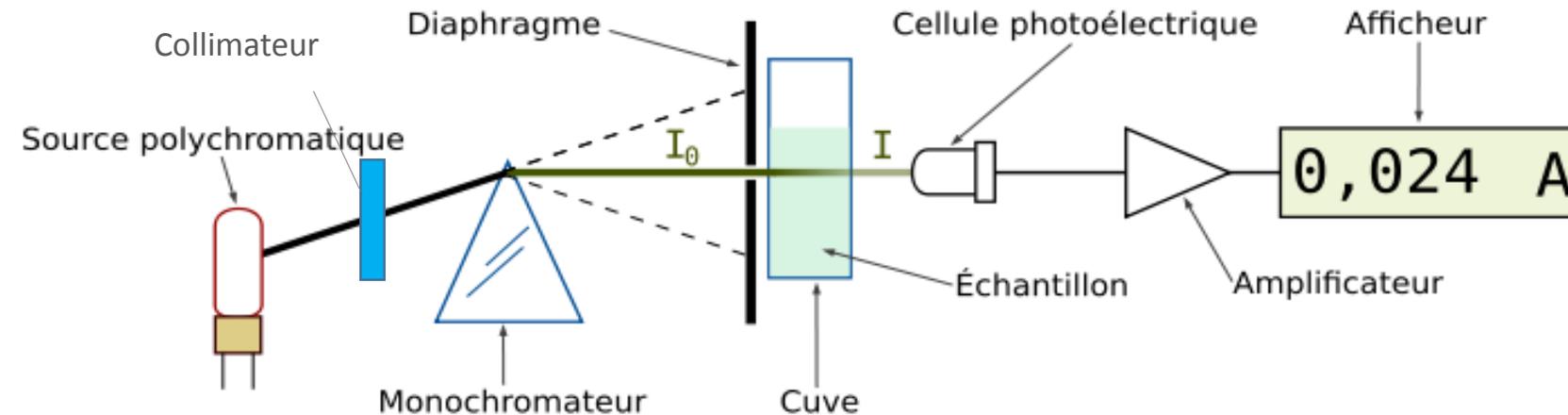
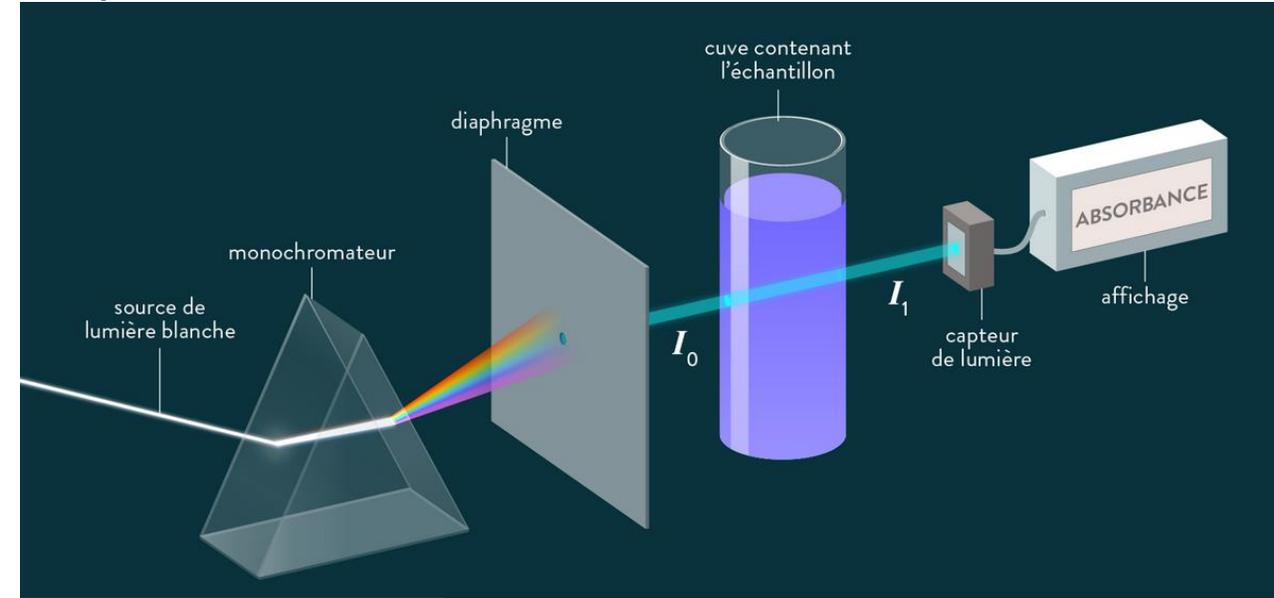
- Les spectrophotomètre UV-visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de l'absorbance ou de la transmittance, en fonction de la longueur d'onde repérée (λ en nm) ou en nombre d'onde (ν en cm^{-1})
- En spectroscopie UV-visible, une molécule est caractérisée par
la longueur d'onde (λ_{max}) du maximum d'absorption
la valeur du coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda_{\text{max}})$ correspondante
- La longueur d'onde du maximum d'absorption donne une idée de la couleur à l'aide du cercle chromatique et des couleurs complémentaires.



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Appareillage / Spectrophotomètre



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Appareillage / Spectrophotomètre

1- Source de lumière

- Inexistence de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale UV/Vis
- Les spectromètres comportent deux lampes à usage de sources :
 - l'une pour la partie proche UV (<350 nm): *lampe à arc au deutérium*
 - l'autre pour la partie s'étendant vers le visible (>350 nm): *lampe à incandescence avec un filament en tungstène et une enveloppe en verre de silice*

2- Système dispersif/ monochromateur

- Ensemble d'éléments qui permettent de séparer les différentes longueurs d'ondes dans un faisceau polychromatique
- Le monochromateur est formé de réseau plan (prisme) ou concave (comportant 600 et 1 200 traits/mm pour la gamme du visible, 1 800 et 2 400 traits/mm pour celle de l'UV)
- Le monochromateur comprend un système mécanique permettant de diriger le faisceau de longueur d'onde choisie vers une fente de sortie sur le diaphragme
- La présence de collimateur de lumière avant le monochromateur est indispensable pour rendre les rayons lumineux parallèles

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Appareillage / Spectrophotomètre

3- Compartiment des cellules/Cuves/Dispositifs de mesure

- Sur le trajet optique du spectrophotomètre un emplacement libre est réservé pour y placer une cellule ou un autre dispositif adapté à l'état physique de l'échantillon étudié (gaz, liquide)
- Pour les deux grands types d'analyse (enregistrement de spectre ou dosage), le composé se trouve en solution

4- Détecteur

- Le détecteur convertit l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint (lumière transmise I) en un signal électrique
- La sensibilité dépend de la longueur d'onde

5- Dispositif de fourniture et de traitement de données

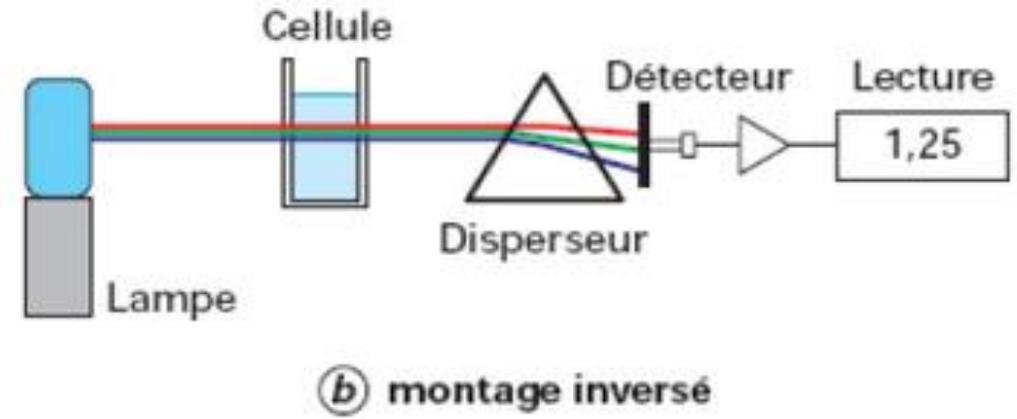
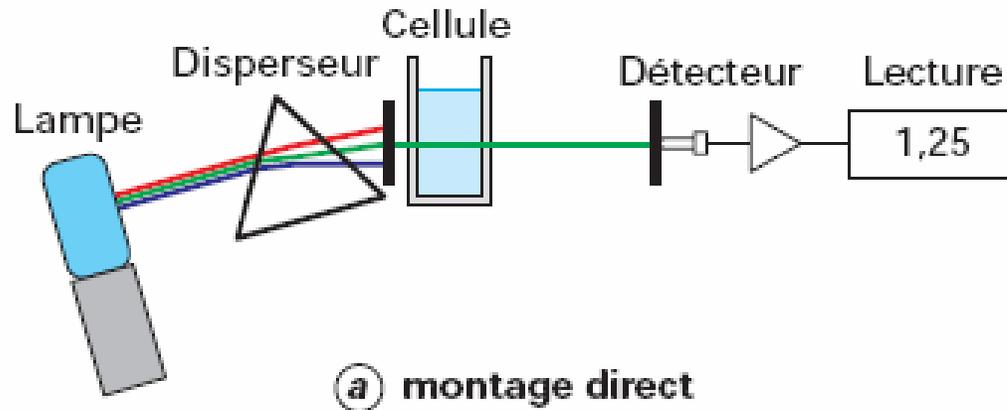
- Les spectrophotomètres modernes sont fabriqués avec des microprocesseurs incorporés, pour la commande et la surveillance des opérations de l'instrument
- Ces systèmes fournissent une interface à un système informatique avec le logiciel de commande des opérations de l'instrument, de la collecte et de traitement de données

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Appareillage / Spectrophotomètre

Spectromètre monofaisceau à optique directe

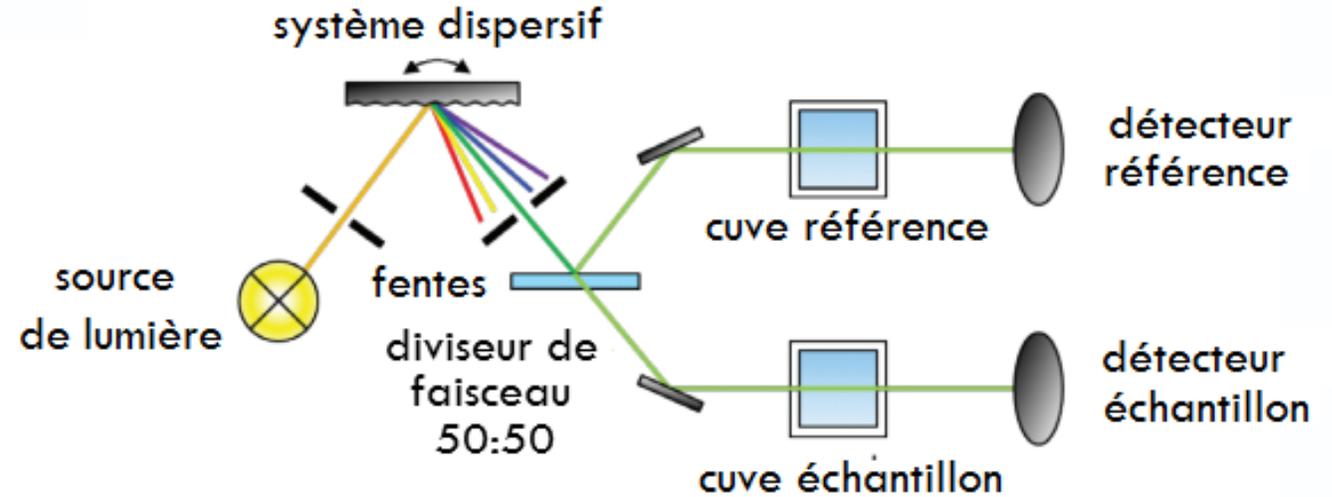


Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Appareillage / Spectrophotomètre

Spectromètre à optique double faisceau



- La mesure d'absorbance exige de comparer à la même longueur d'onde la solution échantillon de concentration inconnue et un témoin (référence) correspondant au solvant seul ou à une solution contenant des réactifs du dosage mais sans le composé à doser (blanc analytique)
- Les spectromètres à optique double faisceau disposent d'un miroir diviseur de faisceau, l'un traverse l'échantillon et l'autre sert de parcours de référence
- La mesure de l'absorbance est très précise et la compensation des variations d'intensité entre échantillon et témoin est faite automatiquement

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Transmittance/Absorbance

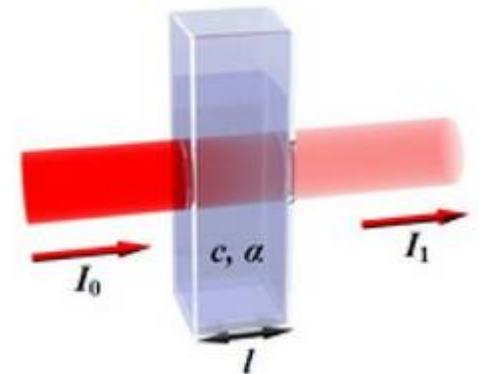
La **transmittance** T est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) selon que l'échantillon est passé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur

T est exprimée par un nombre fractionnaire compris entre 0 et 1 ou sous forme de pourcentage

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad T\% = \frac{I}{I_0} \times 100$$

L'**absorbance** A dite aussi densité optique (**DO**) est la grandeur définie par:

$$A = -\log T = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$



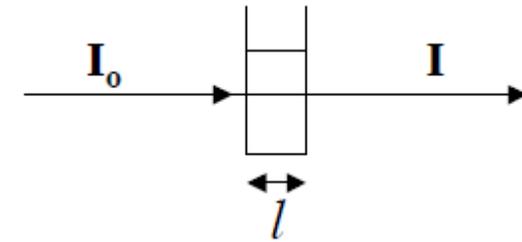
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Loi quantitative de Beer-Lambert

La loi de Beer et Lambert relie l'absorbance à la concentration d'un composé en solution, pour de faibles concentration et à une longueur d'onde donnée

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times l \times C$$



A_{λ} : paramètre sans dimension

l : est l'épaisseur de la solution traversée (cm)

C : concentration molaire de la solution (Mol.L^{-1})

ε_{λ} : coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde λ de la mesure
il est calculé pour la seule longueur d'onde du maximum d'absorption

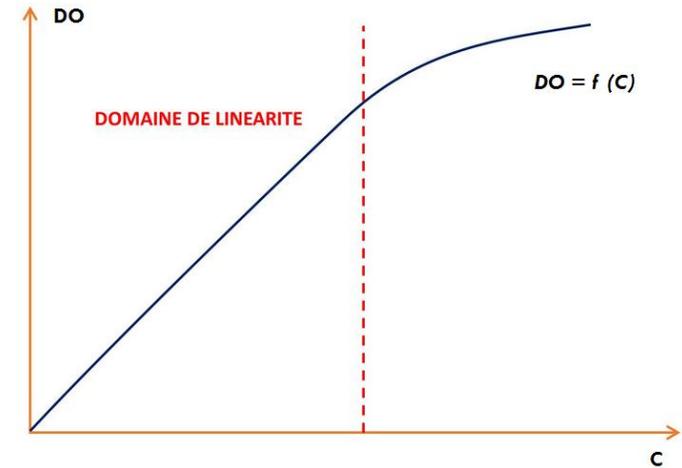
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer et Lambert est vérifiée que si les conditions suivantes sont respectées:

- Monochromatisme du faisceau incident:
un monochromateur isole à partir d'une source continue de lumière, une bande de radiations aussi étroite que possible dite bande passante
- Solutions très diluées: ($< 10^{-2} \text{ Mol.L}^{-1}$) : la loi de Beer-Lambert est une loi limite car elle ne devient constante qu'aux dilutions infinies
- Pas de réflexion, de diffusion ou de fluorescence du faisceau incident : dans un milieu trouble (solution colloïdale, suspension) une partie de l'énergie lumineuse sera absorbée mais une autre partie est diffusée et échappe ainsi à la mesure
- la substance ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident
- la substance ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant

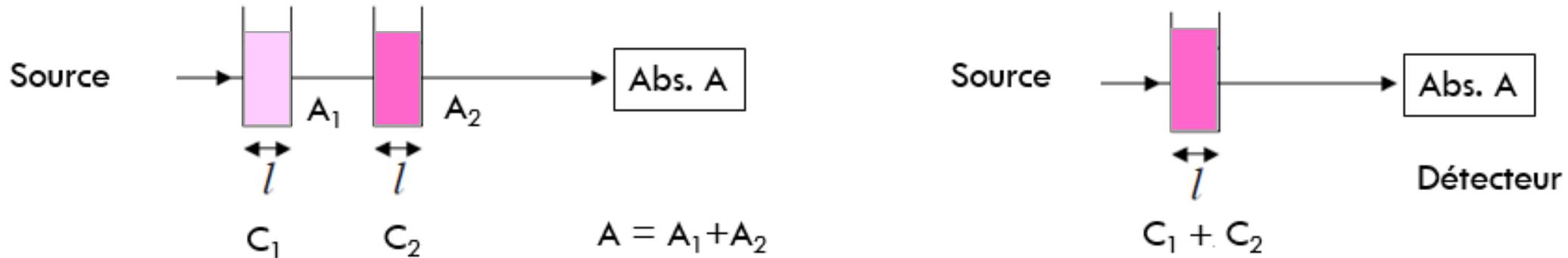


Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Additivité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer- Lambert est additive



En ayant les mêmes concentrations (des deux solutions de composé 1 et 2) et dissouts dans le même solvant, l'absorbance totale d'un mélange de composés 1 et 2 est égale à la somme des deux absorbances respectives du composé 1 et du composé 2 mesurées séparément à une longueur d'onde donnée

$$A = A_1 + A_2 = l (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)$$

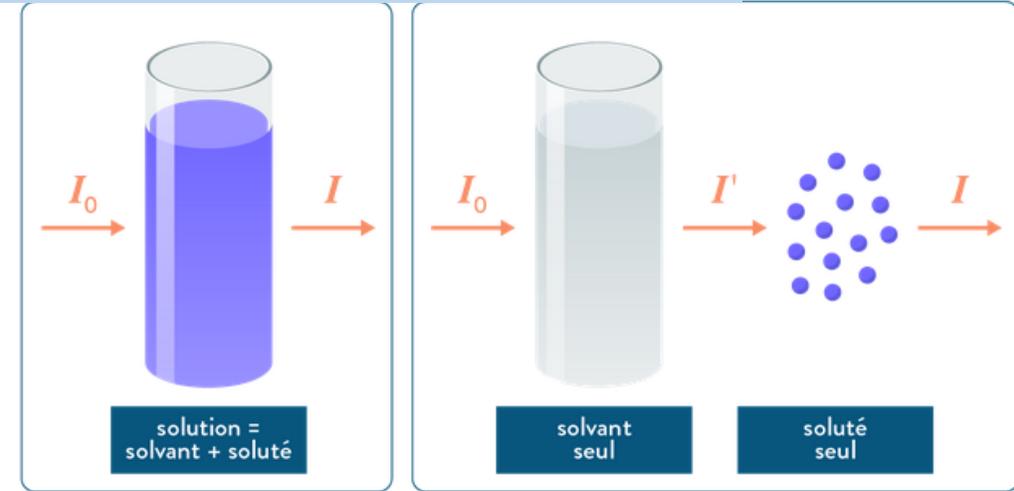
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV

Dosage spectrophotométrique

La mesure de l'absorbance comporte ces étapes:

- Choisir la longueur d'onde (λ_{\max}) puis afficher le zéro optique
- Procéder à l'étalonnage en mesurant l'absorbance du solvant (afficher une absorbance nulle)
- Mesure de l'absorbance de la solution testée
- L'absorbance de la molécule en solution est la différence des deux absorbances mesurées



$$A (\text{soluté}) = A (\text{solution}) - A (\text{solvant})$$

Concernant le solvant

- Pouvoir de dissolution
- Transparent dans la zone d'intérêt
- Absence d'impuretés,
- Solvants volatils : boucher la cellule

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Dosage spectrophotométrique

Conditions d'une bonne méthode de dosage

- Spécificité :** la réaction colorée doit être spécifique de la substance à doser (qui doit être seule à réagir avec les réactifs de coloration)
- Solubilité :** le produit coloré obtenu doit être soluble et la solution doit être limpide
- Stabilité :** la coloration doit être stable pendant un certain temps, pour permettre d'effectuer les lectures sans que la coloration n'évolue
- Sensibilité :** la réaction colorée doit être sensible, pour permettre de doser des solutions de faibles concentrations

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Dosage spectrophotométrique

Méthode directe de dosage

- Elle consiste à mesurer A (DO) et à calculer C en utilisant directement la relation $A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C$
- Elle nécessite de connaître le coefficient d'extinction ε de la substance à doser à la longueur d'onde choisie, et de bien caler le monochromateur avec des lames étalons, car ε varie avec la longueur d'onde

Méthode de comparaison avec un étalon

Elle consiste à :

- mesurer dans les mêmes conditions l'absorbance $A_{\text{éch}}$ de la solution à doser échantillon et l'absorbance $A_{\text{étal}}$ d'une solution étalon ou standard de concentration connue $C_{\text{étal}}$
- calculer la concentration de la solution à doser $C_{\text{éch}}$ en utilisant l'équation suivante :

$$C_{\text{éch}} = (A_{\text{éch}} \times C_{\text{étal}}) / A_{\text{étal}}$$

Elle suppose mais ne vérifie pas la linéarité

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Dosage spectrophotométrique

Méthode de dosage avec une gamme étalon/ d'étalonnage

Elle consiste à

- préparer une **gamme de dilutions** à partir d'une solution étalon mère
- mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons filles, et tracer la courbe d'étalonnage $A = f(c)$
- l'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions
- la **DO_{éch}** est reportée sur la courbe d'étalonnage et la valeur de la concentration de l'échantillon **C_{éch}** est déduite par détermination graphique
- la concentration **C_{éch}** de l'échantillon est peut également être calculée en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de type $Y = a X + b$

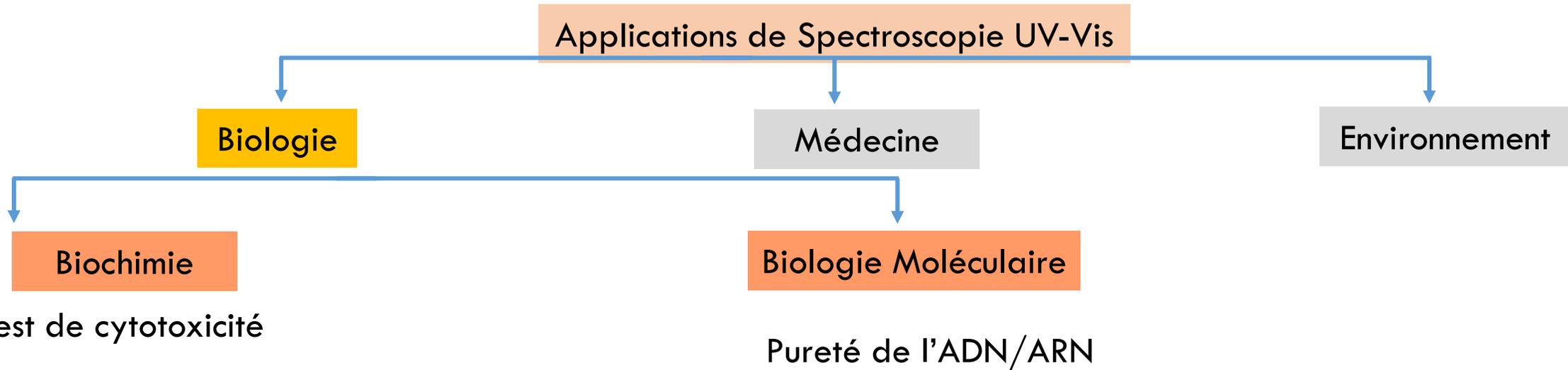
où Y est la DO et X est la C

Elle permet de vérifier la linéarité, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

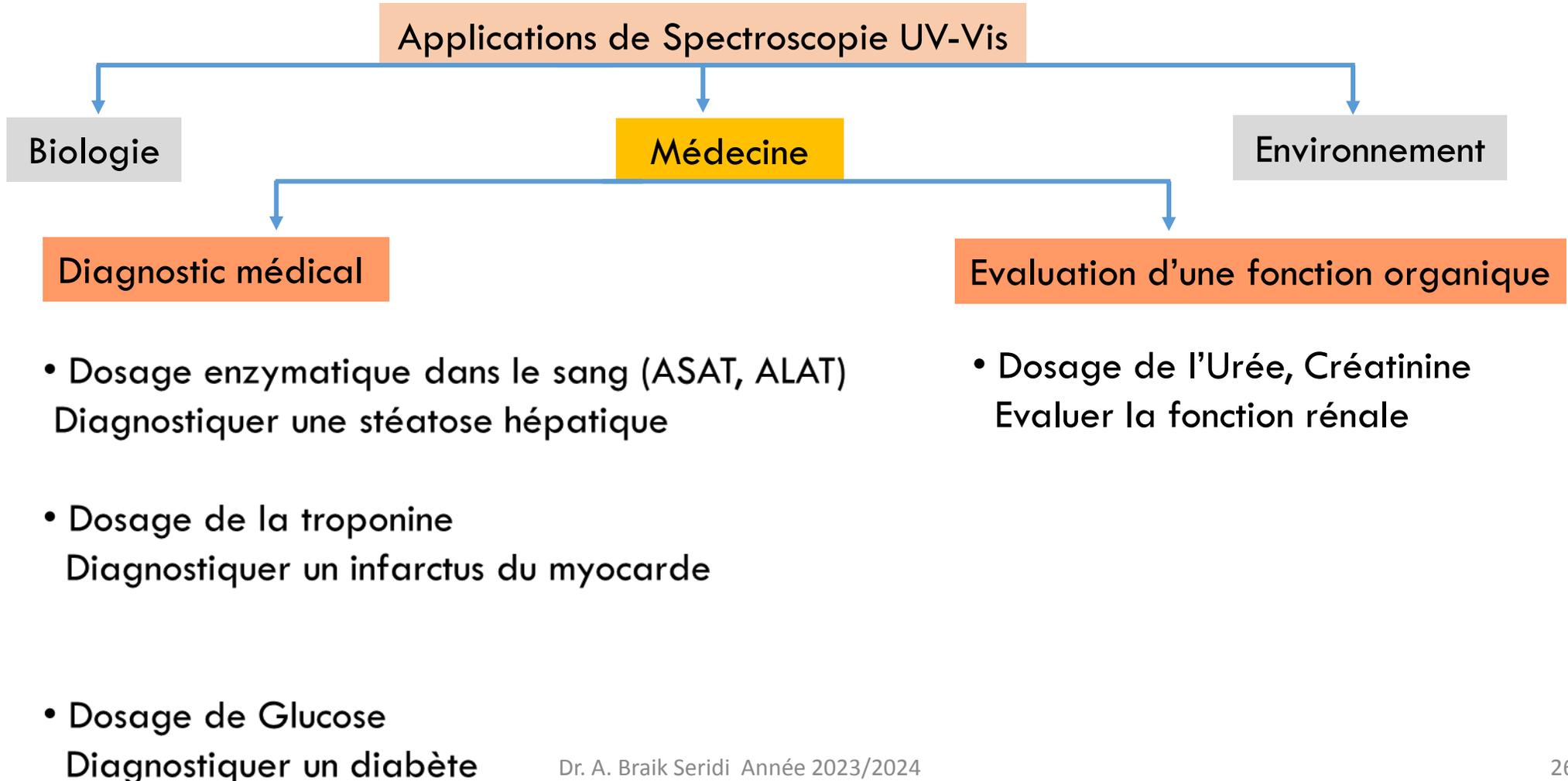
Application de la spectroscopie UV-Vis



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

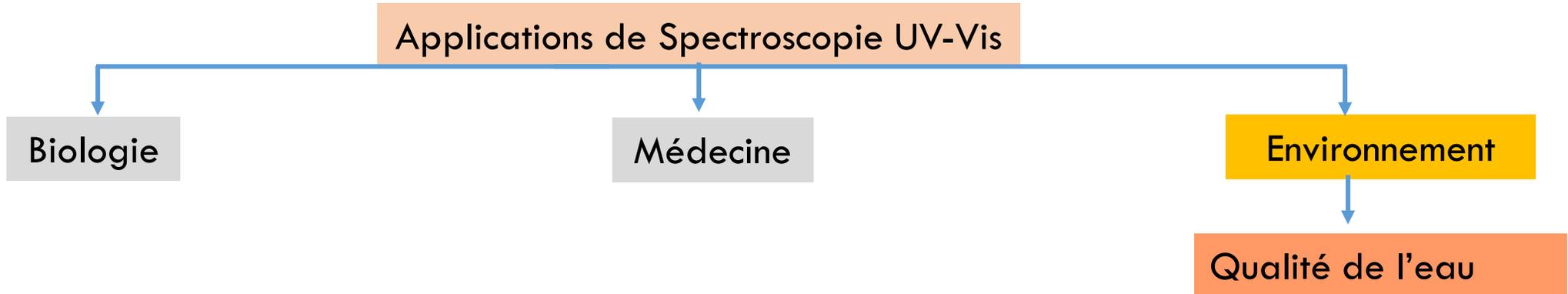
Application de la spectroscopie UV-Vis



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire / de l'UV-Visible

Application de la spectroscopie UV-Vis



Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

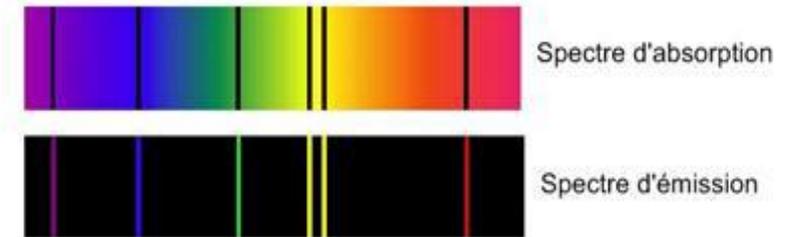
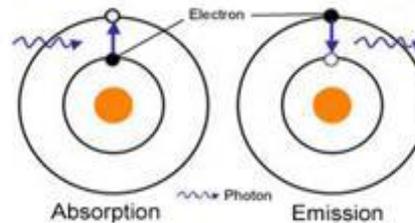
1.4. Fluorimétrie

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Phénomènes d'absorption et d'émission atomiques

Principe de base

Règle de Kirchhoff



« Un corps soumis à certaines conditions d'excitation, ne peut émettre que les radiations qu'il est susceptible d'absorber dans les mêmes conditions »

Absorption atomique

Phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un REM à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Il en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (**Spectre d'absorption**)

Émission atomique

Phénomène observé lorsqu'un REM est émis par des atomes ou des ions excités qui retournent à l'état fondamental. Il en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (**Spectre d'émission**)

Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

1.4. Fluorimétrie

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Définition/Caractéristiques

- La SAA est une méthode d'analyse élémentaire qualitative et/ou quantitative basée sur le phénomène d'absorption du REM UV-Visible par les vapeurs atomiques dans un domaine énergétique de l'ordre des transitions électroniques
- La SAA permet l'analyse de presque tous les métaux et métalloïdes (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc....) dans les échantillons biologiques, métallurgiques, archéologiques, pharmaceutiques et atmosphériques
- La SAA peut être appliquée au dosage des éléments majeurs (domaine analytique de la SAAF : 0,1 à 10 mg/cm³) que d'éléments traces ou ultratracés (domaine analytique de la SAAE : 0,0001 à 0,1 mg/cm³)
- Applications sont très nombreuses

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Définition/Caractéristiques

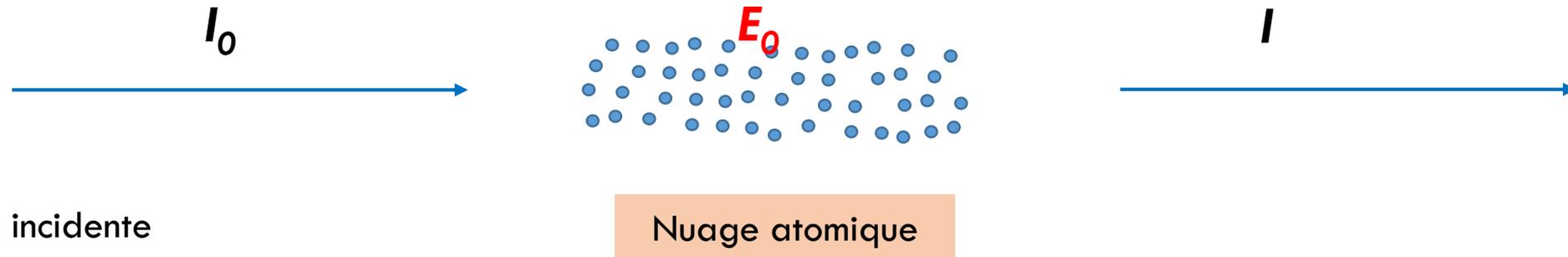
Caractéristiques de la SAA

- **Grande sensibilité :** mesure d'éléments de concentrations inférieure au $\mu\text{g/L}$ (ppm, ppb)
- **Rapidité :**
flamme : 200 échantillon/h
four 30 : échantillons/h
- **Limite de détection:**
flamme : 0,001 jusqu'à 0,02 ppm
four : 0,002 jusqu'à 0,01 ppb
- **Exactitude :**
flamme : 1-2 % erreur relative
four : 2-5 % erreur relative
- **Dosage :**
flamme : solution et suspension
four : solution, suspension et poudre

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Principe



I_0 : intensité incidente

I : intensité transmise

E_0 : état d'énergie fondamental

En SAA, la concentration est obtenue à partir de mesure de l'intensité lumineuse (à une longueur d'onde spécifique de l'élément à doser) par application de la loi de Beer-Lambert. La linéarité n'est vérifiée que pour les faibles concentrations

$$A = k \cdot C$$

A : Absorbance (sans unité)

C : Concentration de l'élément

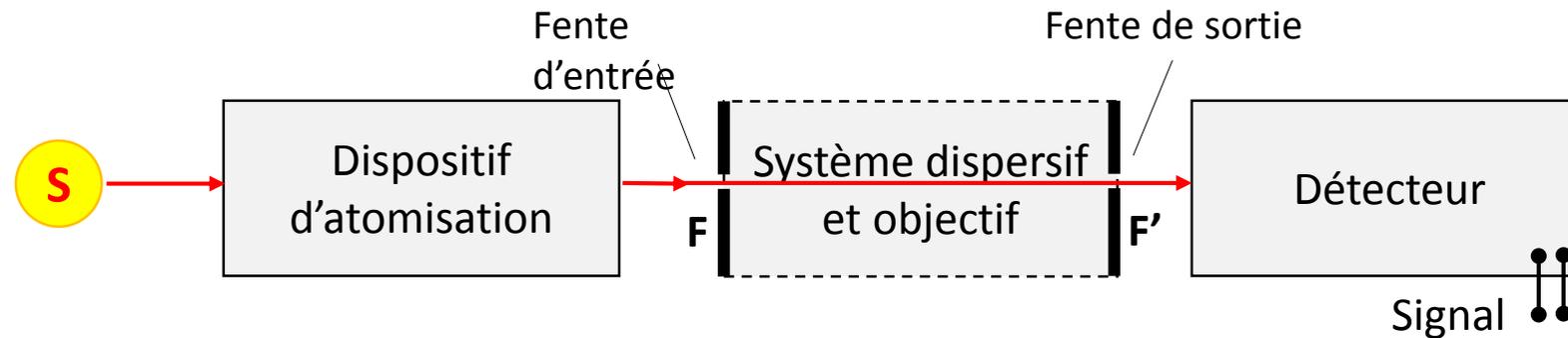
k : Coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Appareillage

1. Source de lumière
2. Atomiseur
3. Monochromateur/système dispersif
4. Détecteur



Chapitre I: Méthodes spectrales

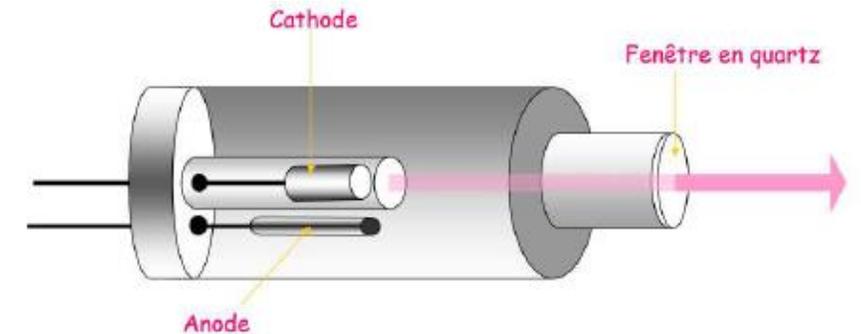
1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Appareillage

1. Source de lumière

- le rôle de la source primaire est de produire une radiation lumineuse à la longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser (raie d'émission) qui sera absorbée dans l'atomiseur par la raie d'absorption

- Exemple:
- lampes à cathode creuse (*Hollow Cathode lamps HCL*): la cathode doit contenir l'élément à analyser
 - lampes à décharge sans électrode: réservée aux éléments volatils tels que As, Hg, Sb, Bi, P
 - lampes xénon à impulsion



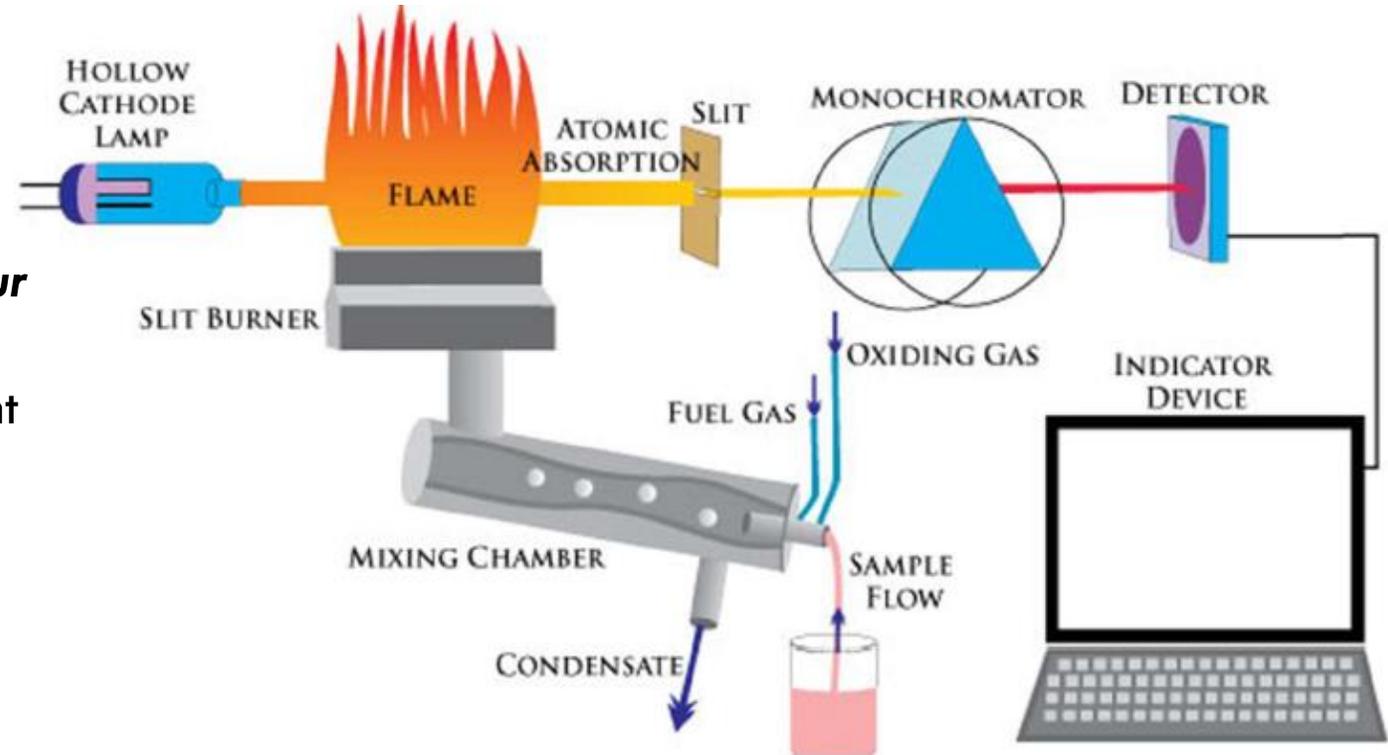
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Appareillage

2. Atomiseur de flamme

- **Atomiseur de flamme = un nébuliseur + un brûleur**
- Atomiseur: brûleur à fente laminaire, alimenté par un mélange combustible/comburant
- Echantillon aspiré et pulvérisé en aérosol (fines gouttelettes) par un nébuliseur pneumatique
- Les gouttelettes les plus grosses sont éliminées
- Mélange aérosol/carburant arrive au brûleur qui libère une large flamme composée de quatre zones
- Le solvant est éliminé dans la zone primaire. les sels ou particules solides sont alors atomisés



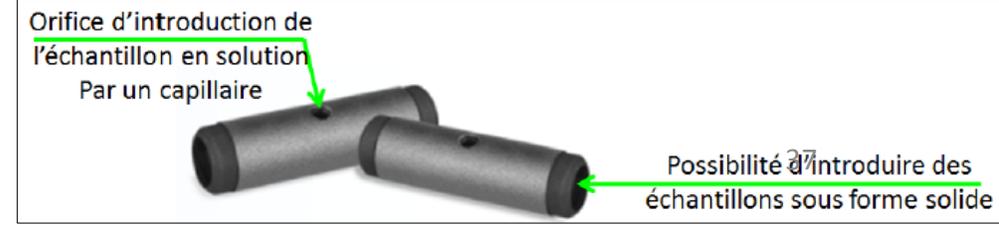
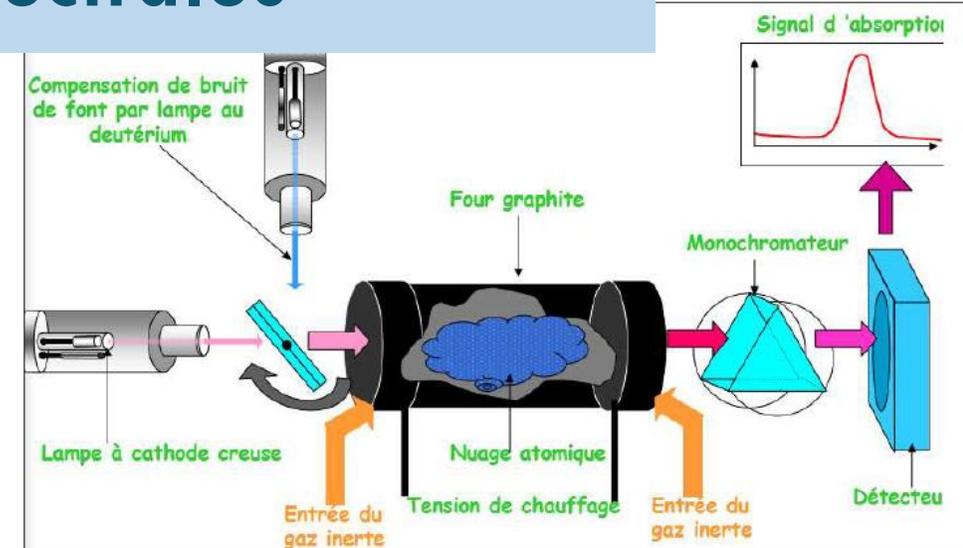
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Appareillage

2. Atomiseur électrothermique

- **Atomiseur = Four graphite**
- Lorsque le seuil de détection de l'atomiseur de flamme excède la valeur requise, l'emploi d'un atomiseur électrothermique est utile. Sa limite de détection est de l'ordre de ppb
- L'atomisation se produit dans un four en graphite cylindrique (2-3 cm de long et 0,5 cm de diamètre), ouvert aux deux extrémités et qui contient un trou au centre pour la présentation des échantillons
- Le chauffage du four se fait selon un programme spécifique pour l'analyte en 04 étapes
- les échantillons solides peuvent être analysés directement sans traitement préalable et/ou mise en solution



1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Appareillage

3. Monochromateur/système dispersif

- La plupart des instruments de SAA sont munis d'un monochromateur
- Son rôle consiste à choisir la raie la plus intense et d'éliminer toutes les raies (les raies du gaz de remplissage dans la source, d'éventuelles impuretés ou de l'atomiseur)
- La largeur de raie d'émission (de la source) représente déjà une première sélection

4. Détecteur

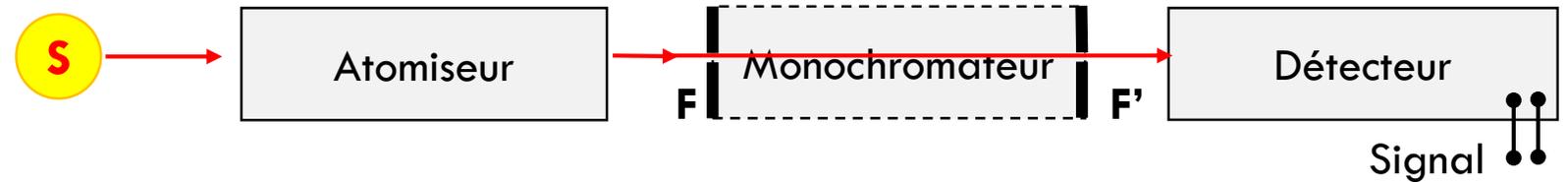
- Le détecteur mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances
- Il est relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition
- On détermine :
 - $Absorbance\ spécifique = Absorbance\ totale - Absorbance\ non\ spécifique$**
 - L'absorption spécifique est due à l'élément à doser (sur une raie)
 - L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice
- Des mesures permettent la correction des absorptions non spécifiques

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

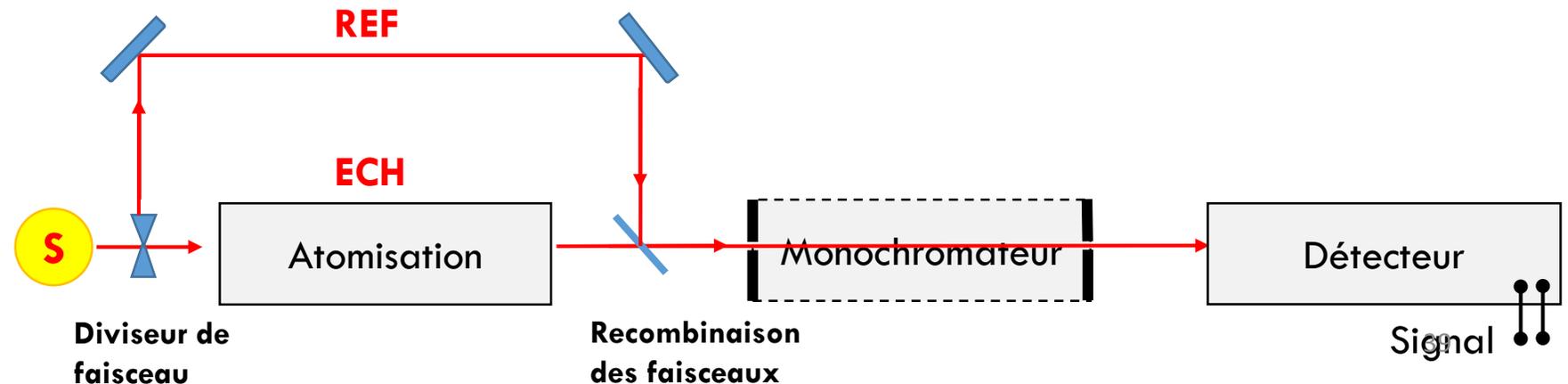
Appareillage

SAA à simple faisceau



SAA à double faisceau

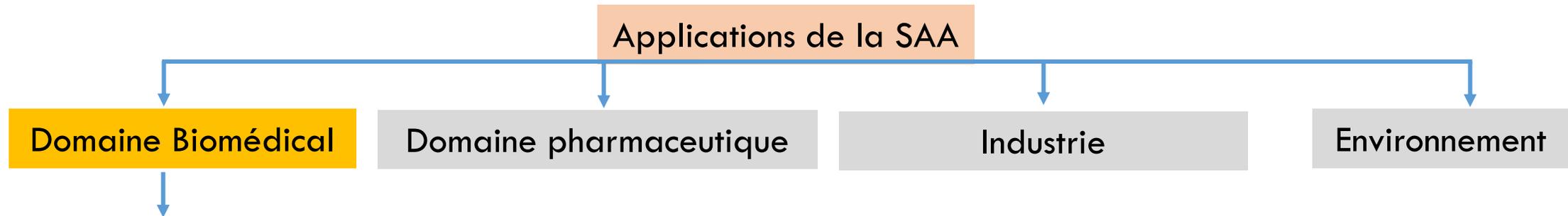
- Le deuxième faisceau contourne l'atomiseur et subit les atténuations dues à l'air, aux pertes de lumière (pas celles dues à l'absorption par l'atomiseur)
- Il permet de tenir en compte des fluctuations de l'émission de la source



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Application



- Analyse des tissus animaux et végétaux (richesse en Fe, Ca, Cu , Zn)
- Analyse des liquides biologiques
- Dosage du Ca, Sr, Zn dans les os

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Application

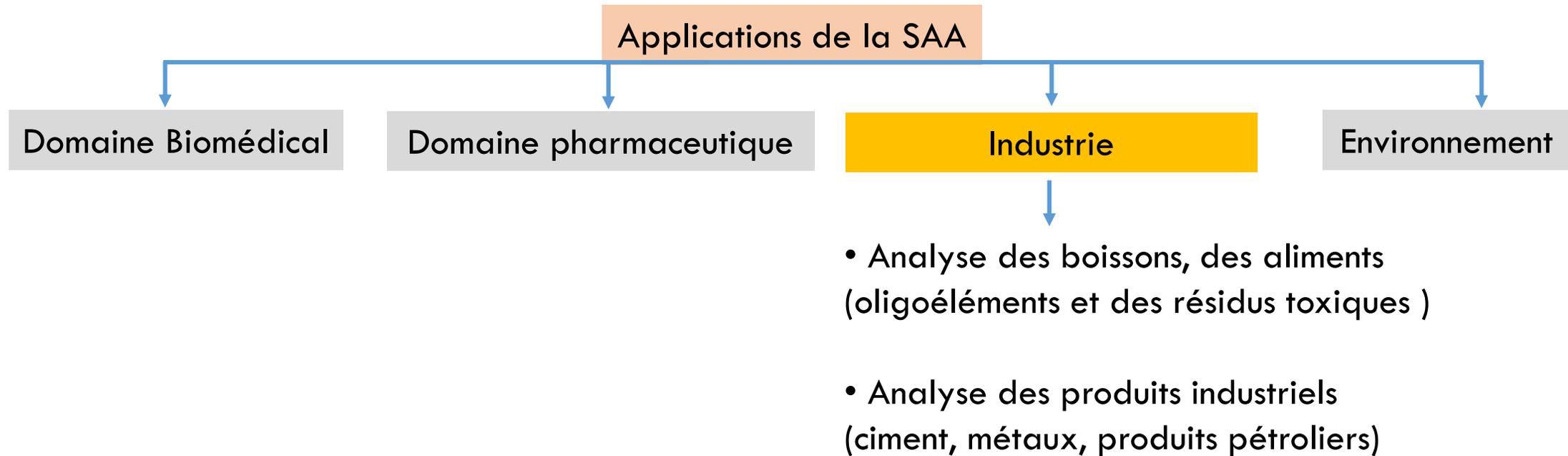


- Dosage du zinc dans les préparations d'insuline ou d'oxyde de zinc
- Dosage du cobalt dans la Vit B12
- Dosage du mercure dans les antiseptiques organo-mercuriels
- Dosage de l'Al et de Mg dans les pansements gastriques
- Dosage de Mg dans les suppléments nutritionnels
- Dosage du Ca dans les préparations à base de Ca
- Recherche de Cd, Zn dans les préparations injectables
- Recherche d'impuretés

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

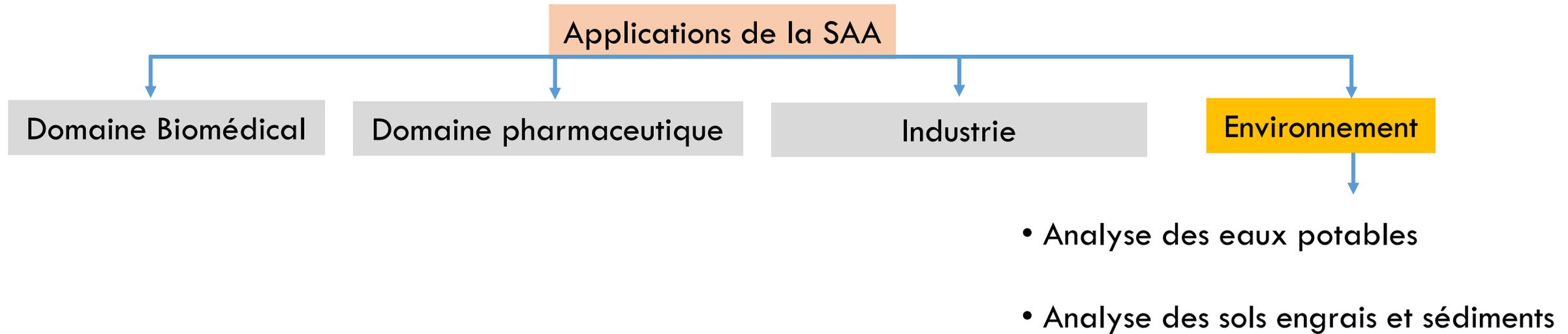
Application



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.2. Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Application



Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

1.4. Fluorimétrie

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Définition/Intérêt

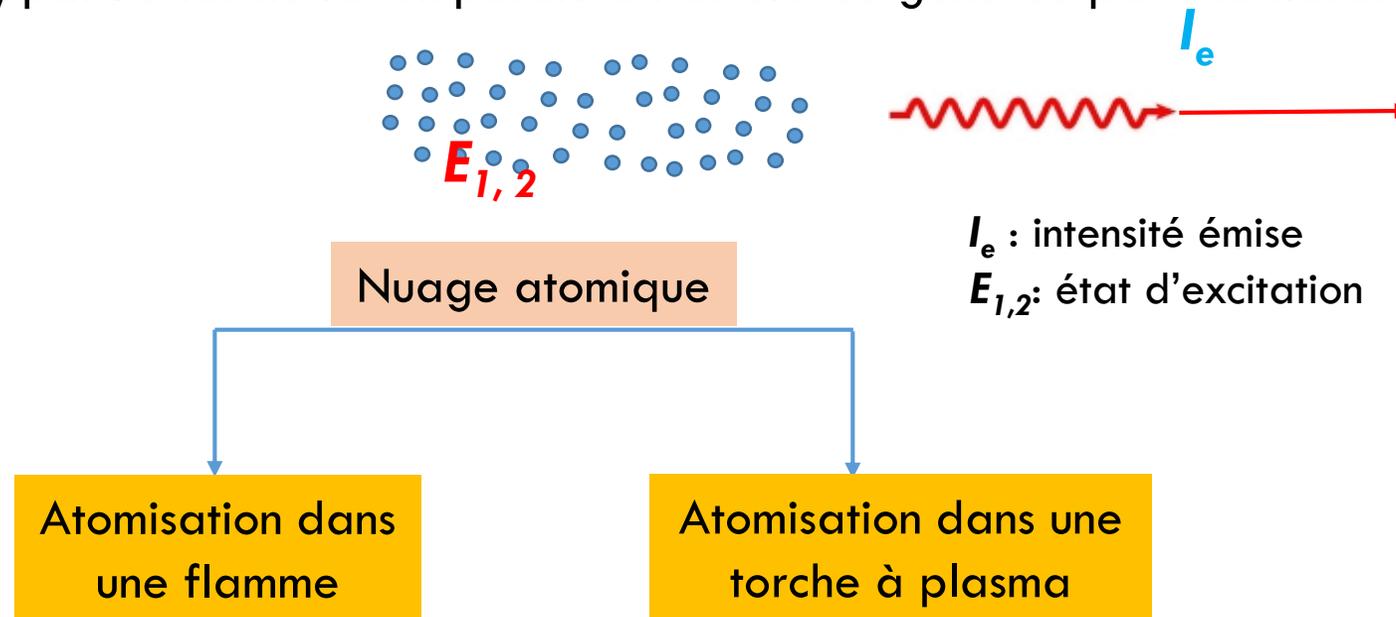
- La SEA est une méthode générale d'analyse élémentaire qualitative et quantitative
- Contrairement à la SAA qui ne permet de doser que des éléments préalablement sélectionnés, la SEA permet une analyse simultanée multi-élémentaire sans choix préalable, à partir de raies spécifiques à chacun d'entre eux
- On peut donc faire une analyse qualitative de composition, même si l'échantillon est inconnu au départ
- La rapidité et les limites de détection (inférieures au ppb) font de la SEA une des grandes méthodes d'analyse élémentaire polyvalente

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Principe

- L'analyse par SEA repose sur l'étude des radiations UV-Vis émises par les atomes passés dans un état excité (généralement ionisé) par l'effet de la température très élevée générée par une flamme ou des plasmas



I_e : intensité émise
 $E_{1,2}$: état d'excitation

- En SEA, on mesure l'intensité du rayonnement émis selon la loi de Beer et Lambert :

$$I_e = K \cdot C$$

I_e : Intensité du rayonnement émis

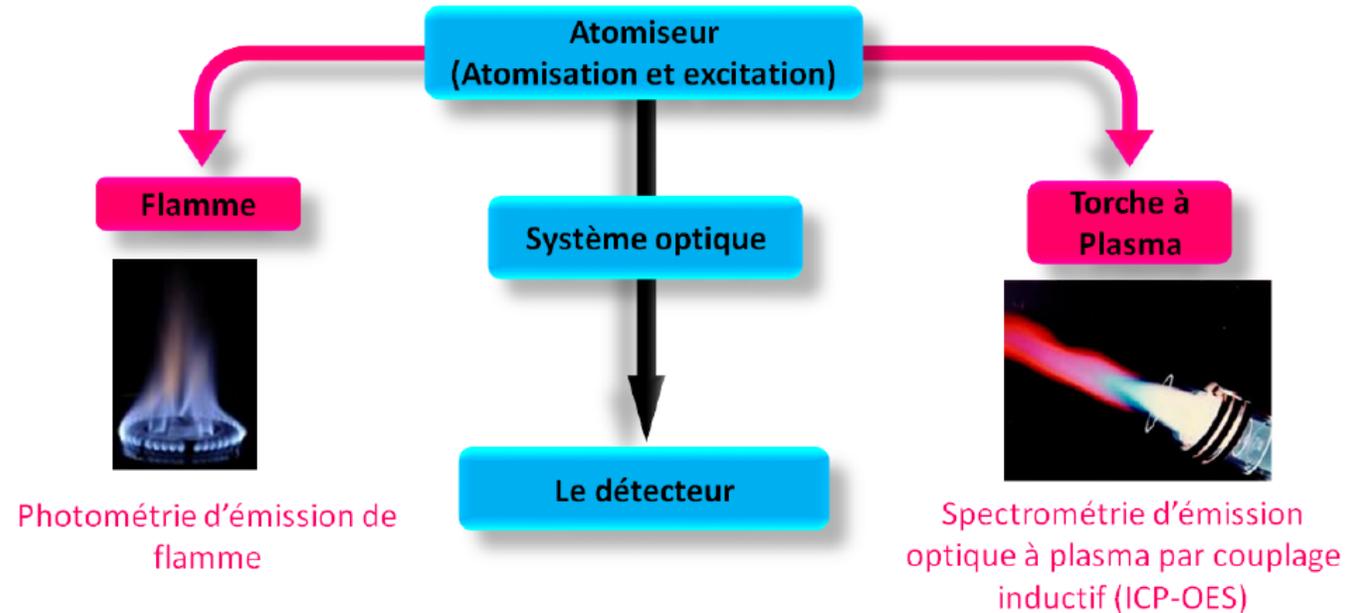
C : Concentration de l'élément

k : Coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie.

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Appareillage



- Un SEA a généralement une composition identique à celle d'un SAA

1. Source / Atomiseur
2. Dispositif dispersif
3. Détecteur

- En émission la source des radiations est l'échantillon lui-même. L'atomiseur transforme l'échantillon en un gaz atomique et l'excite

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Appareillage

1. Source de lumière

Pour transformer l'échantillon à l'état d'atomes excités, on fait appel à des atomiseurs basés sur

- la flamme
- les plasmas de gaz
- les étincelles
- les lasers
- les décharges luminescentes

2. Dispositif dispersif

Il doit être de grande qualité compte-tenu de la complexité de l'émission lumineuse plusieurs montages coexistent pour analyser le rayonnement incident en séparant ses différentes composantes

3. Détecteur

Détecteur pour une précision plus grande les instruments disposent soit de capteur bidimensionnel soit de plusieurs détecteurs positionner pour recevoir des raies particulières

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

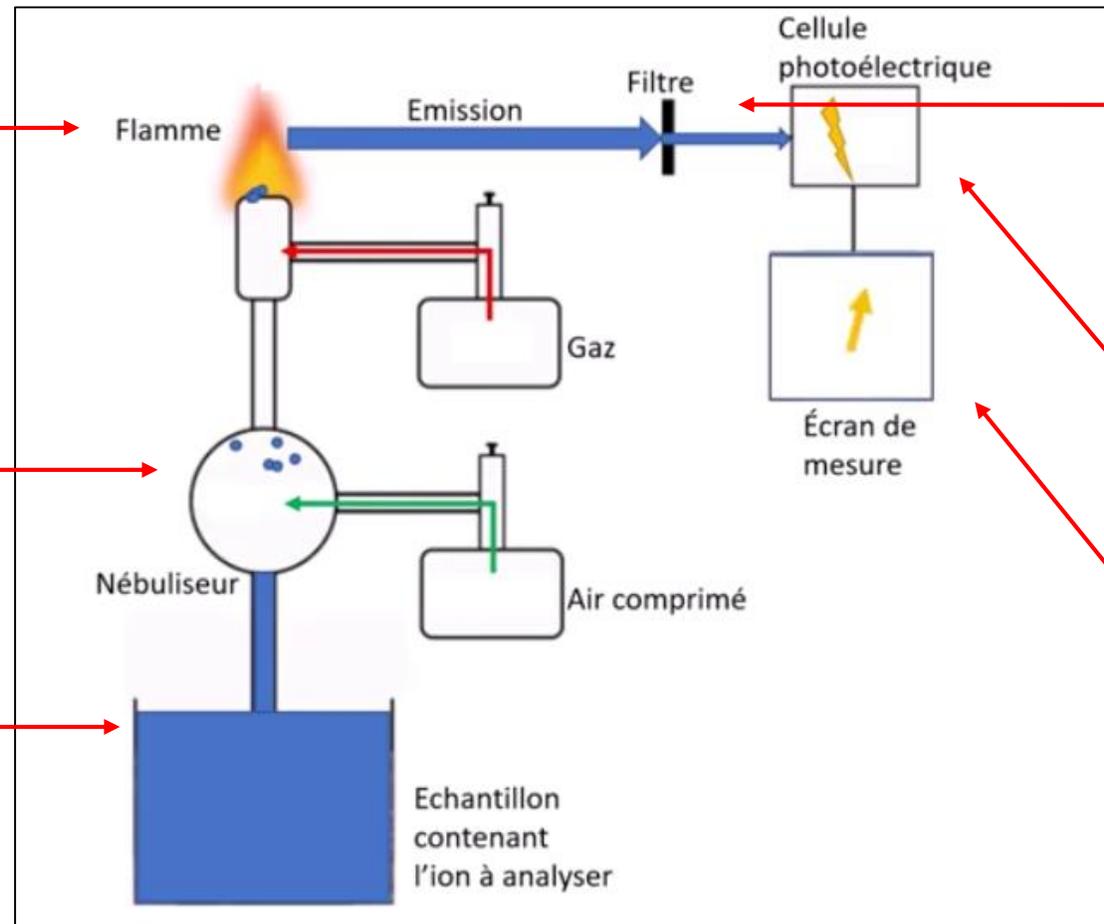
Appareillage

Spectrophotométrie d'émission de flamme

Les électrons sont excités dans la flamme → Emission dans un filtre

Le nébuliseur vaporise l'échantillon et l'envoie dans la flamme alimentée par un gaz

L'échantillon est envoyé dans le nébuliseur qui fonctionne avec de l'air comprimé



Le filtre sélectionne les raies d'émission caractéristiques de l'atome étudié

La lumière est transmise à une cellule photoélectrique

Le détecteur permet de transformer cette lumière en signal électrique ayant une intensité mesurée est affichée sur un écran

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Appareillage

Spectrophotométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif (ICP-OES / ICO-AES)

- Pour l'étude des échantillons en solution, le meilleur procédé pour dissocier leurs atomes constitutifs consiste à faire appel au plasma qui génère des température très élevées.
- Plongés dans ce milieu les atomes s'ionisent et deviennent émissif. Cette source particulière porte le nom de torche à plasma inductif (ICP Inductively Coupled Plasma) → **ICO-AES**

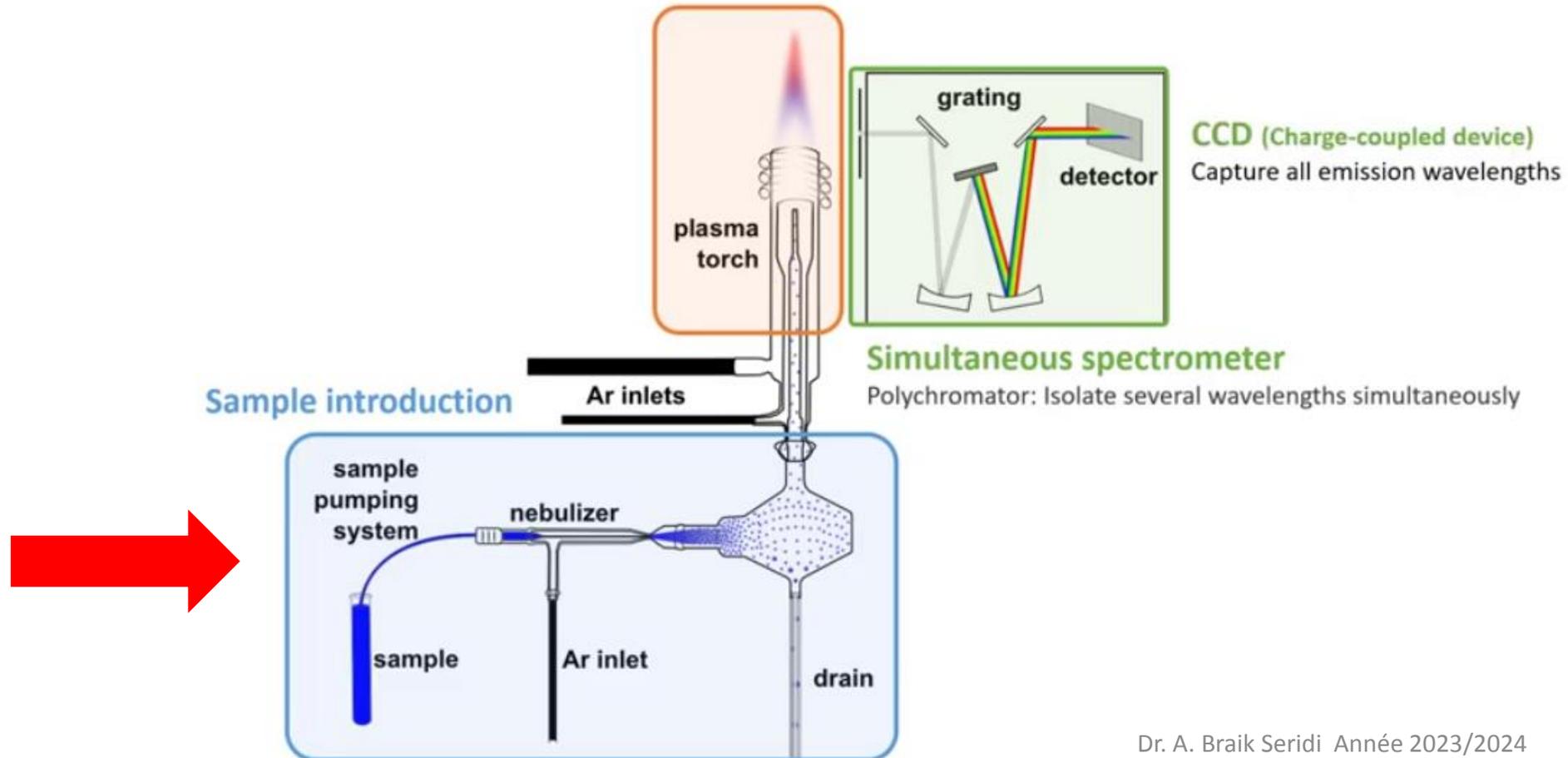
Atomization T (°C)	Flame	ICP
		
	1700 – 3150	4000 – 6000

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Appareillage

Spectrophotométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif (ICP-OES / ICP-AES)



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Appareillage

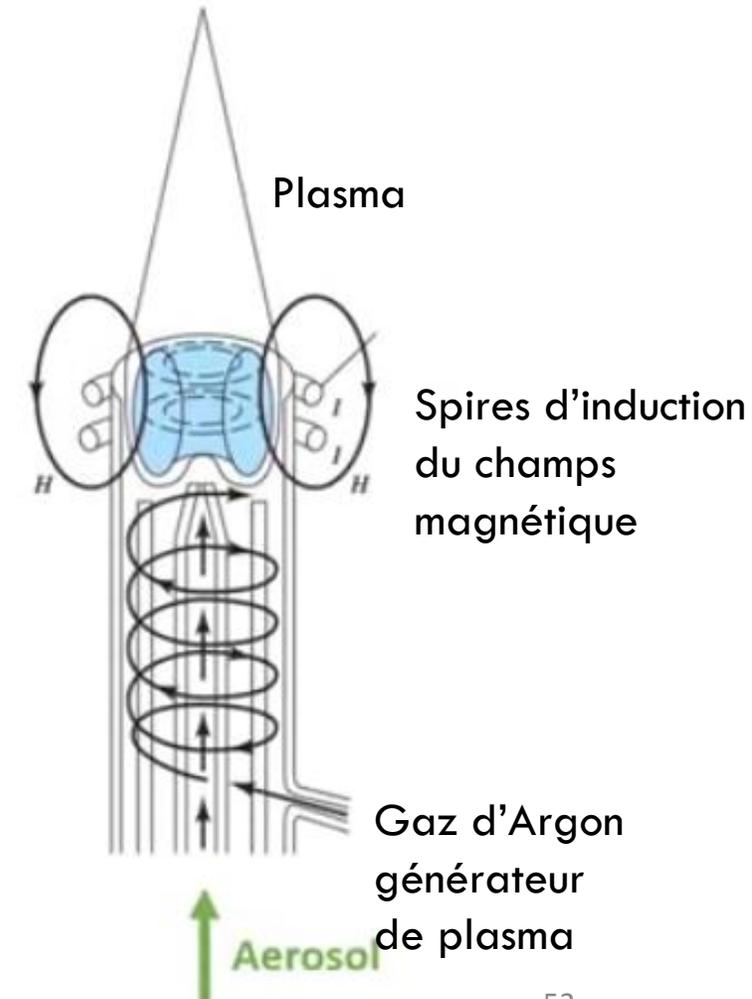
Spectrophotométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif (ICP-OES)

Plasma

- 4^{ème} état de la matière
- Constitué d'atomes isolés et d'électrons
- Les atomes sont à l'état d'équilibre entre leur forme neutre et leur forme ionisé

Torche à plasma

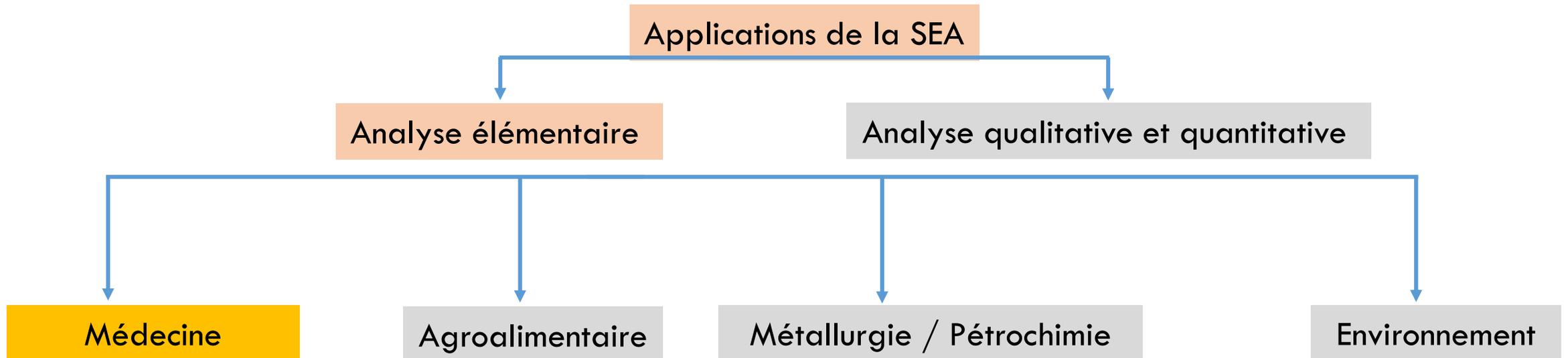
- Le plasma n'est pas une flamme
- Montage en verre de silice
- Le plasma est créé par exposition de l'argon à une décharge électrique qui crée des ions et des électrons
- C'est un plasma d'argon confiné par un champ magnétique créé par radiofréquence
- La température dépasse les 9000 °K
- A cette température, il y a excitation et/ou ionisation des atomes



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Application

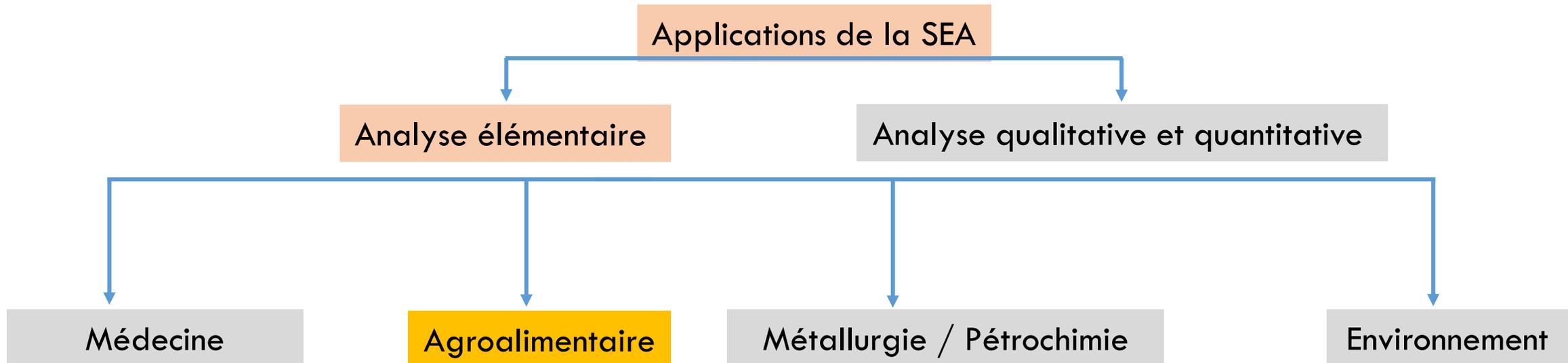


- Métaux lourds dans les cheveux, les ongles

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Application



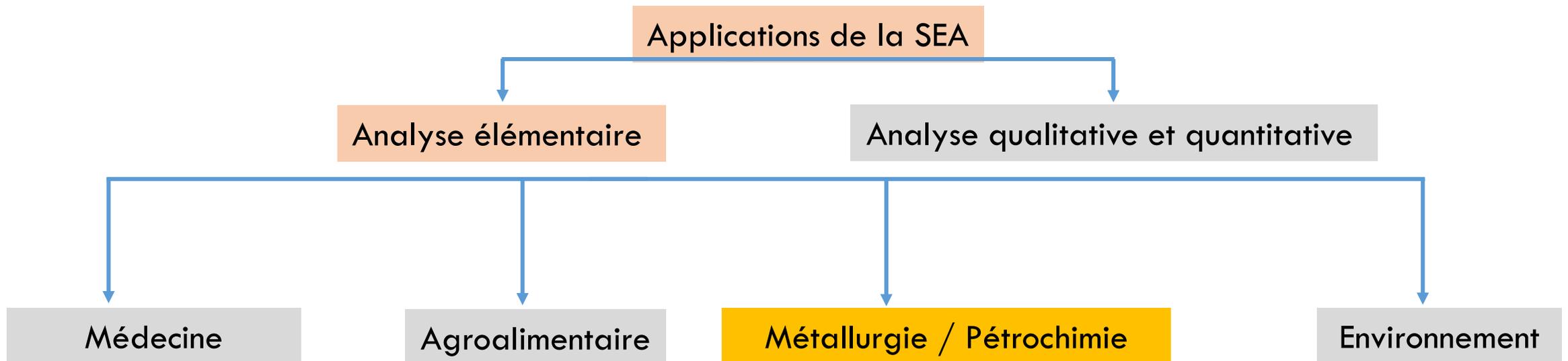
- Analyse des denrées alimentaires

Métaux dans le poisson, les céréales

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Application

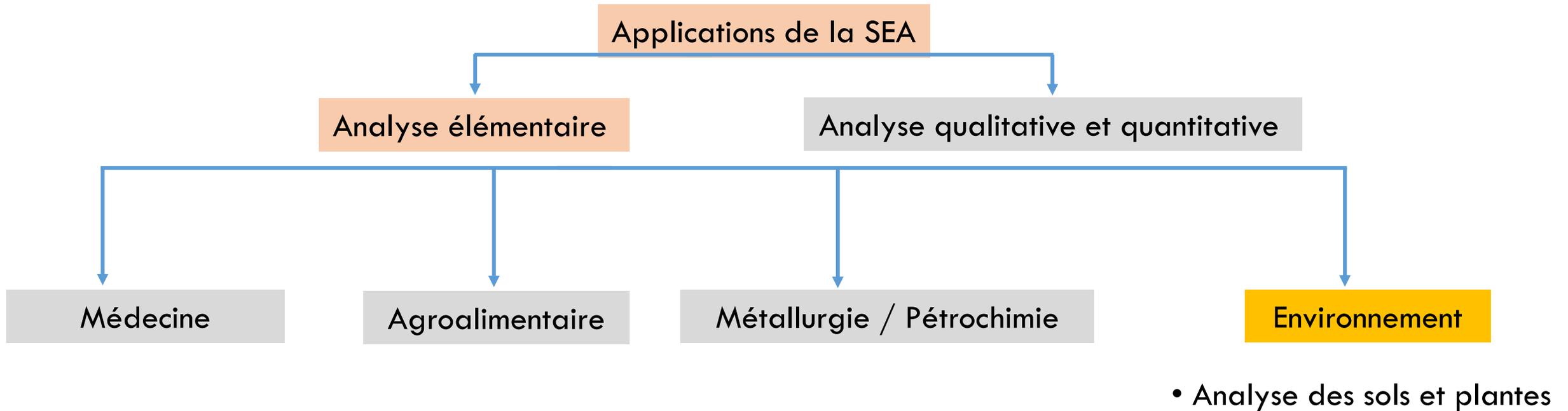


- Analyse de la céramique, le verre, les alliages, le pétrole

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

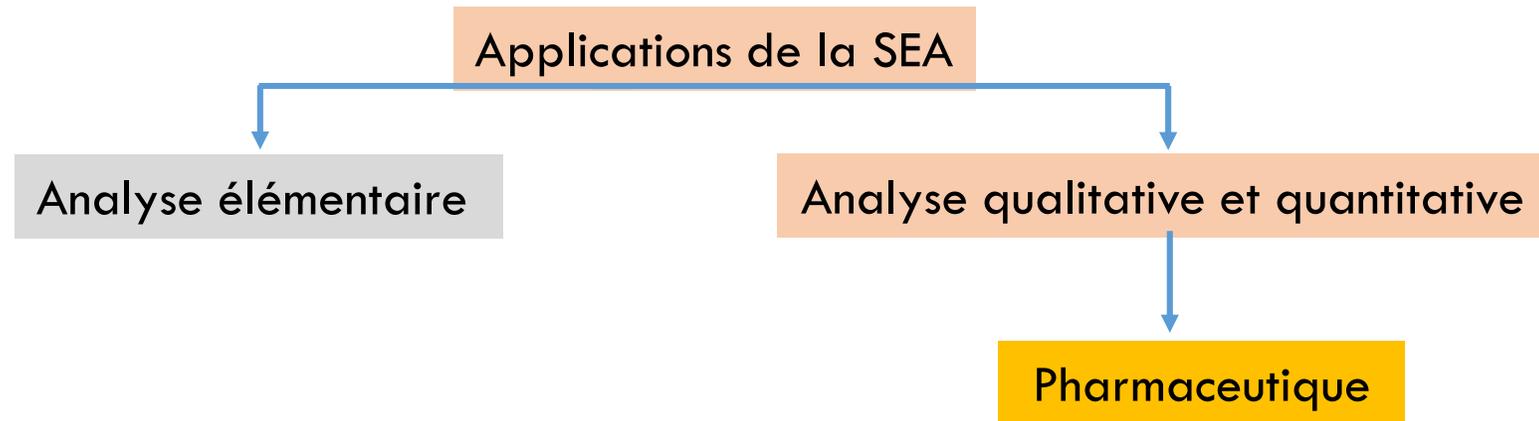
Application



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.3. Spectrométrie d'émission atomique (SEA)

Application



- Identification et dosage des PA lors du contrôle des matières premières ou des produits finis pharmaceutiques à base de minéraux (fortifiants, tonifiants, anti-stress ...)
- Contrôle des impuretés élémentaires et des métaux lourds qui ont pour origines :
 - Les catalyseurs et les réactifs métalliques utilisés dans la voie de synthèse des PA et excipients
 - Les lignes de production et de transfert
 - Le conditionnement du vrac
 - L'environnement
 - Les solvants utilisés pour le nettoyage

Chapitre I: méthodes spectrales

Introduction

1.1. Spectrométrie d'absorption moléculaire

1.2. Spectroscopie d'absorption atomique

1.3. Spectrométrie d'émission atomique

1.4. Fluorimétrie

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Définition

- La spectroscopie de fluorescence / fluorométrie / spectrofluorimétrie est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la **fluorescence** d'un échantillon
- la **fluorescence** est un phénomène de **luminescence**
- **Luminescence** est la propriété qu'ont certaines molécules d'émettre des photons de plus basse énergie lors de leur désexcitations depuis un état électronique excité (excitation est d'origine électromagnétique UV)



1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Définition

- La spectrofluorimétrie est une méthode sensible et spécifique qui est utilisée aussi bien dans le contrôle de qualité qu'en biochimie ou dans l'étude du métabolisme des médicaments
- Ce qui justifie son utilisation autant que **détecteur** pour les différents instruments analytiques
- Sensibilité : dosage d'ultra-traces (gamme du $\mu\text{g/L}$) l'excitation peut s'effectuer par Laser
- Spécificité : Sélection d'une longueur d'onde d'excitation et d'une longueur d'onde d'émission

Chapitre I: Méthodes spectrales

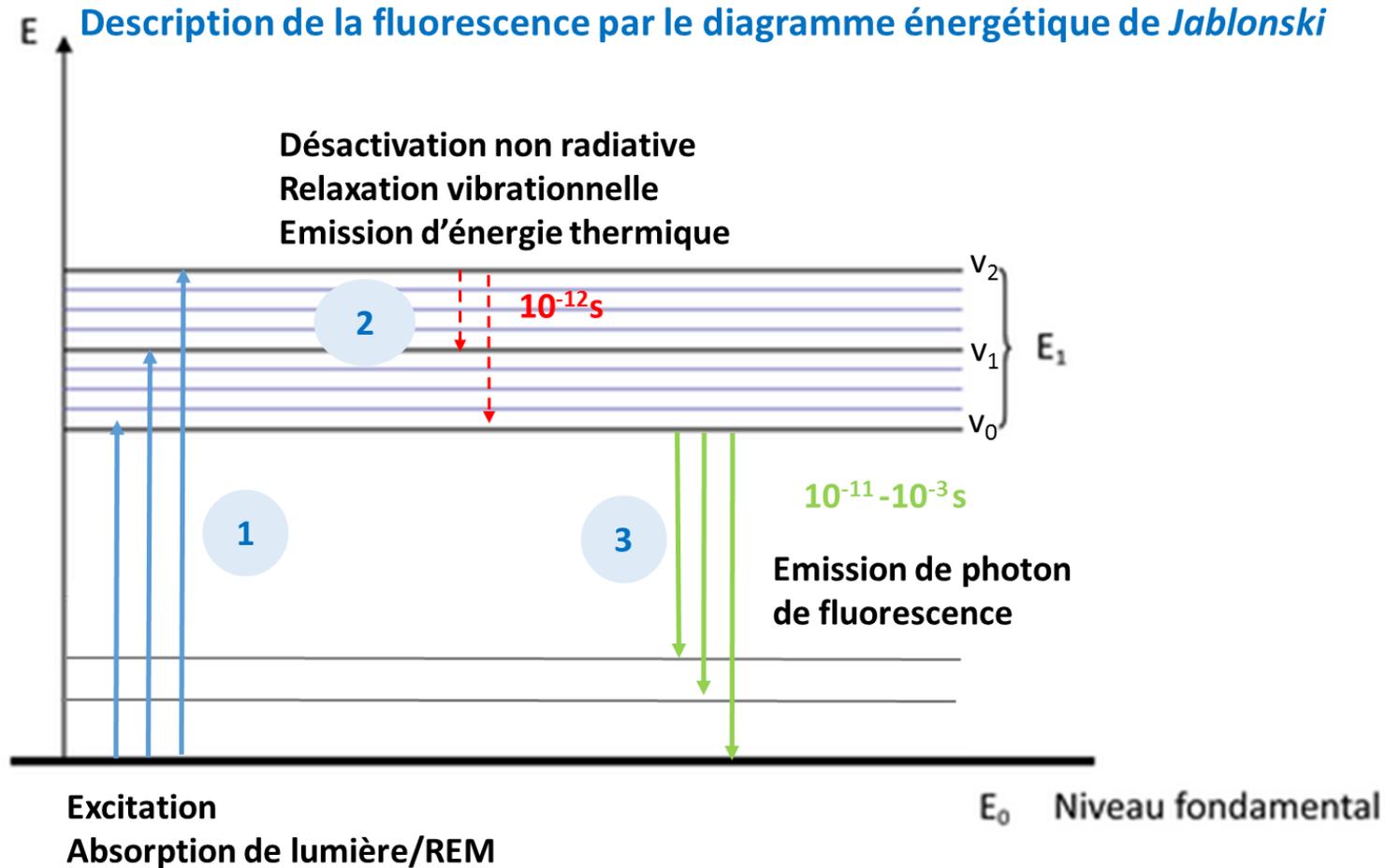
1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Principe

$$E_{\text{exci}} > E_{\text{émis}}$$

$$E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

$$\lambda_{\text{exci}} < \lambda_{\text{émis}}$$



1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

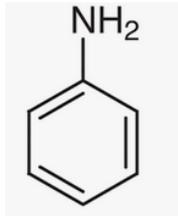
Composés fluorescents (fluorophores)

- Dans fluorescence
 - phénomènes de relaxation non radiative
 - phénomènes de relaxation radiative
- Les molécules dont les relaxations radiatives se produisent plus rapidement que les relaxations non radiatives seront **plus fluorescent**
- Parmi les composés organiques, les molécules cycliques, rigides et possédant des liaisons π sont celles qui produisent la fluorescence la plus intense

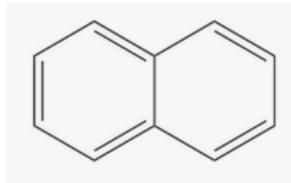
Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

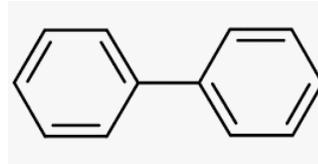
Composés fluorescents (fluorophores)



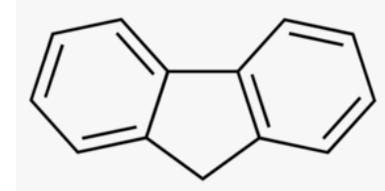
Aniline



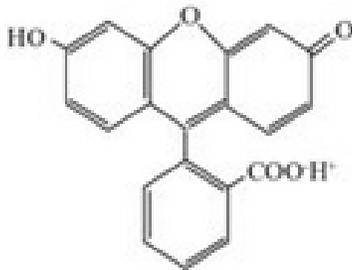
Naphtalène



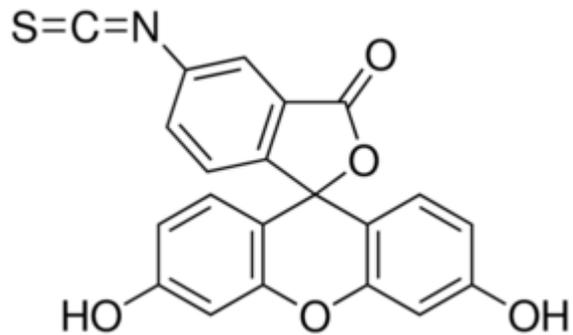
Biphényle



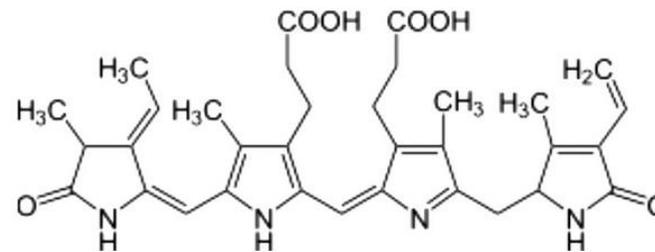
Fluorène



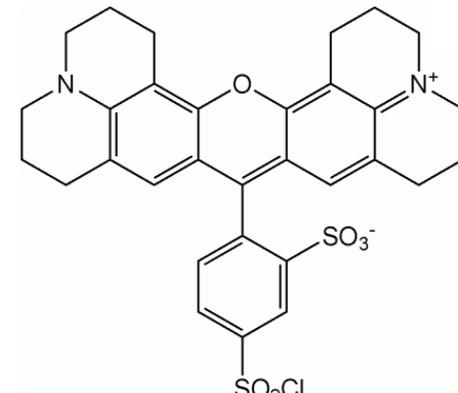
fluorescéine



Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)



Phycoérythrine
(PE)



Texas Red (TX Red)

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Composés fluorescents (fluorophores)

La fluorescence dépend de:

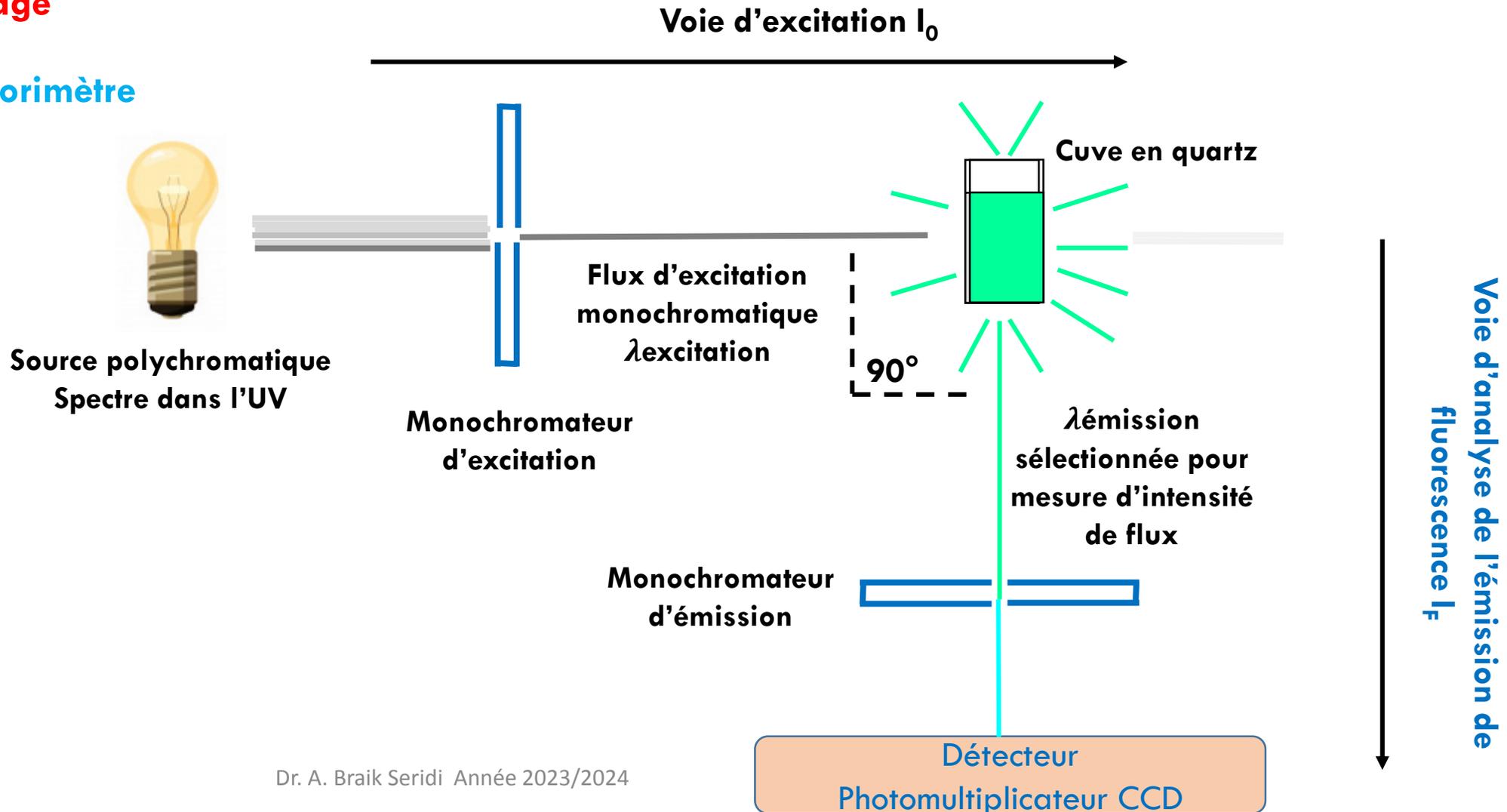
- **Nature du Fluorophore** : rigidité de la molécule $F \uparrow$
complexation $F \uparrow$
concentration augmente $F \downarrow$
- **Solvant**:
polarité diminue $F \uparrow$
viscosité diminue $F \downarrow$
- **pH**:
pH \uparrow $F \downarrow$
- **T°** :
T° \uparrow (favorisant la relaxation non radiative) $F \downarrow$

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Appareillage

Spectrofluorimètre



1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Appareillage

Spectrofluorimètre

Le schéma de principe du spectrofluorimètre comprend:

- une source lumineuse d'excitation (lampe à arc à xénon à haute pression, lampe à vapeur de mercure à basse pression, source Laser)
- un monochromateur qui permet de sélectionner une seule longueur d'onde d'excitation
- une cuve en quartz contenant la molécule à doser
- une fois excité par la lumière d'excitation, la molécule fluorescente fluoresce dans toutes les directions
- cette lumière émise passe au préalable dans un deuxième monochromateur avant d'être détectée et mesurée

Pour une mesure en spectrofluorimètre il faut régler l'appareil dans les longueurs d'onde excitation et démission

- La longueur d'onde d'excitation permet de régler ce monochromateur d'excitation
- La longueur d'onde démission permet de régler le monochromateur démission

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Appareillage

Spectrofluorimètre

Pour connaître les longueurs d'onde $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$, on réalise un **spectre de fluorescence/d'émission** de la molécule à doser qui est fait en deux étapes:

1- Détermination la $\lambda_{\text{émission}}$ en réalisant **spectre d'émission**

- Pour réaliser un **spectre d'émission** il faut $\lambda_{\text{excitation}}$ qu'on a pas encore
- On utilise $\lambda_{\text{absorption}}$ qui est proche de $\lambda_{\text{excitation}}$
→ donc on fixe la λ_{exc} et on fait un balayage de la $\lambda_{\text{émis}}$ (300-600nm)
- Au niveau du spectre d'émission, le max représente $\lambda_{\text{émis}}$

2- Détermination la $\lambda_{\text{excitation}}$ en réalisant un **spectre d'excitation**

- on fixe la $\lambda_{\text{émis}}$ et on fait un balayage de la λ_{exc} (250-600nm)
- Au niveau du spectre d'excitation, le max représente λ_{exc}

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Appareillage

Dosage par spectrofluorimètre

- Comme en spectrophotométrie, il existe une proportionnalité entre
- ***l'intensité de fluorescence mesurée*** et la ***concentration de soluté***

- l'intensité de fluorescence pour une $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$ donnés est proportionnelle à la concentration du fluorochrome tant que la concentration est faible

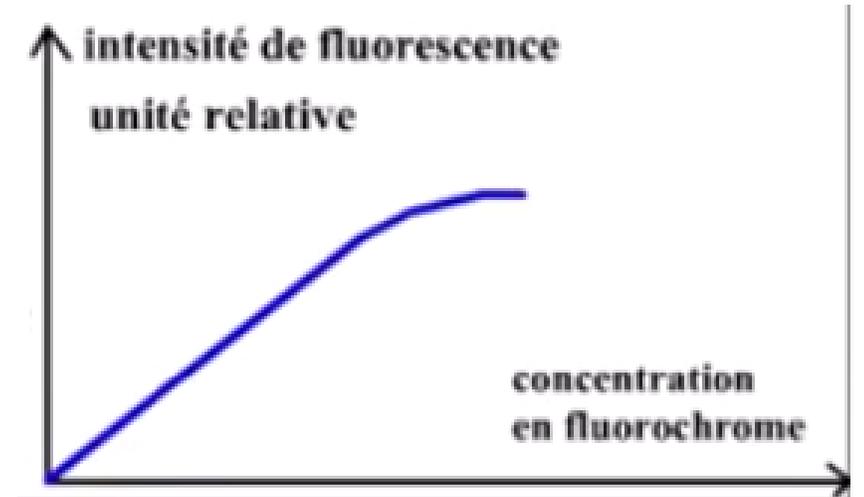
$$F = K \cdot I_0 \cdot C$$

F : fluorescence de la solution (unité arbitraire)

I₀ : Intensité du rayonnement incident

C : Concentration de l'espèce fluorescente

k : Constante



1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Appareillage

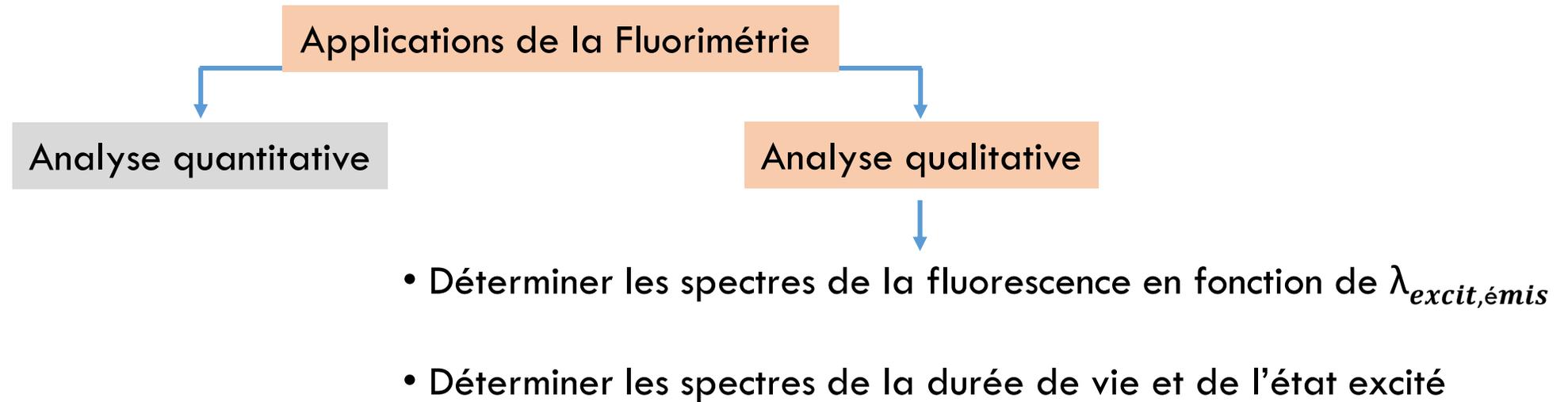
Dosage par spectrofluorimètre

Conditions de mesure

- l'intensité de fluorescence doit être constante tout long de la mesure
- il faut que la concentration de soluté fluorescent soit faible (bien plus faible en spectrophotométrie $1/100^{\text{ème}}$)
- il faut connaître les couples démission et d'excitation pour programmer le spectrofluorimètre
- il faut faire attention à la nature des solutions, en effet certaines molécules peuvent donner des phénomènes de **quenching**

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

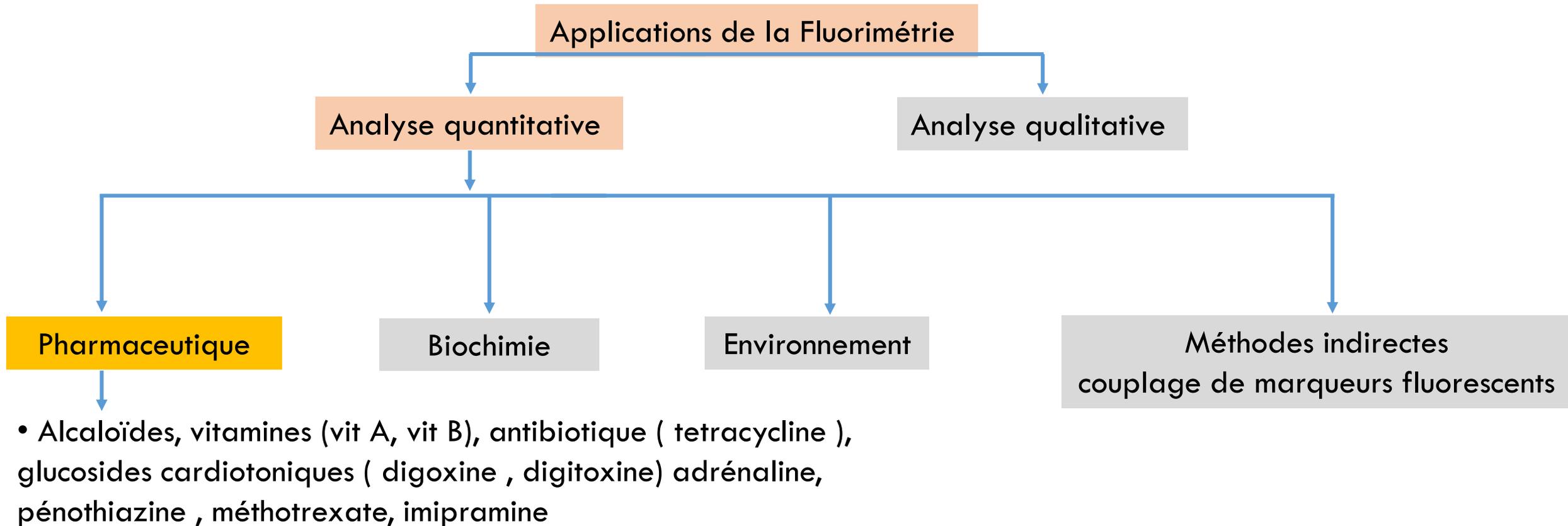
Application



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

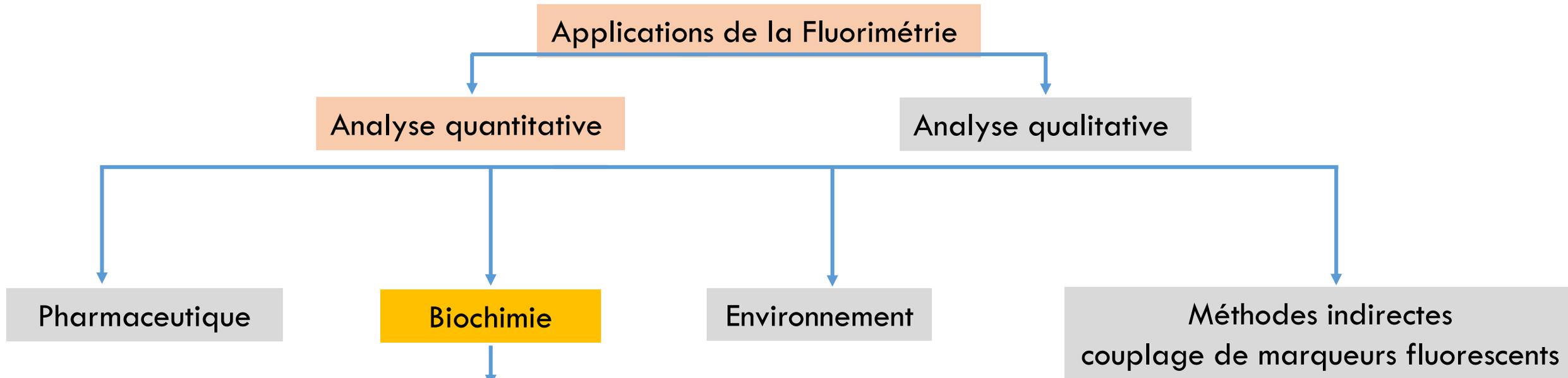
Applications



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Applications



- Détection des salicylates dans le sang

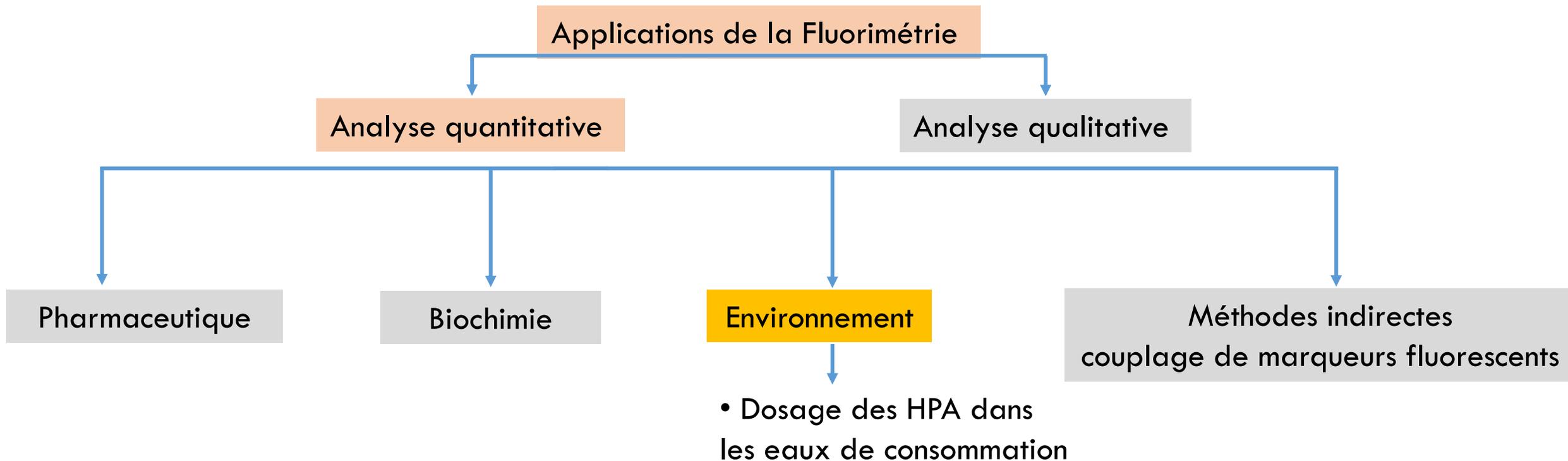
Ils produisent une fluorescence bleue (exc 370 nm emis 460 nm)

- Études des substances végétales : Chlorophylles , huiles

Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

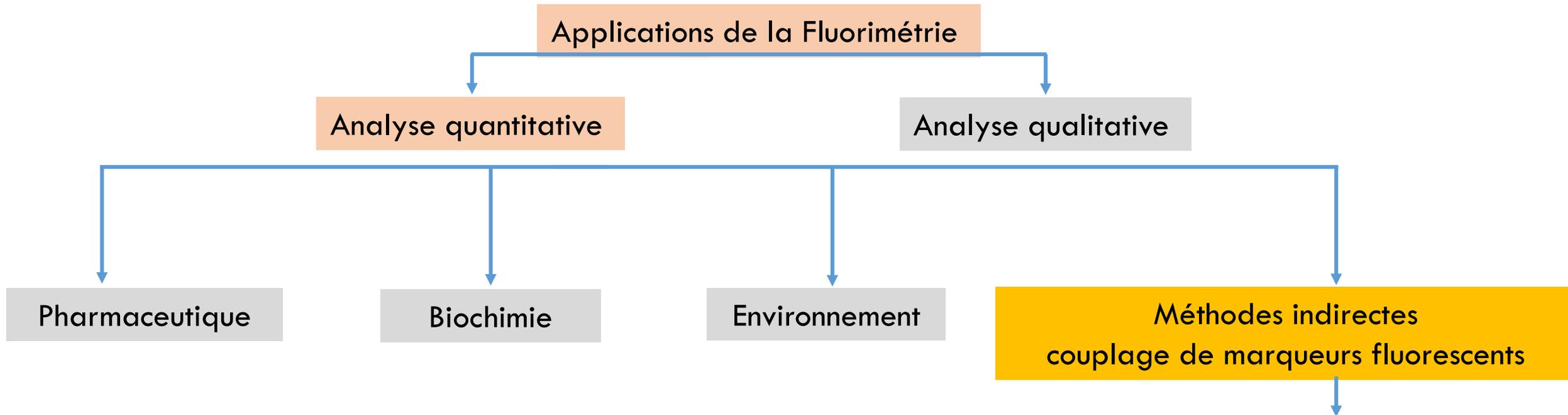
Applications



Chapitre I: Méthodes spectrales

1.4. Fluorimétrie / Spectroscopie de fluorescence

Applications



- **OPA (orthophtaldéhyde)** : Marqueur formant des complexes fluorescent avec

Médicaments: amikacine , nitrazepam

AA aromatiques (tryptophane, tyrosine ou phenylalanine)