

Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

## TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

[www.facebook.com/DomaineSNV](http://www.facebook.com/DomaineSNV)

Présenté par Mme: HAMID OUDJANA

# 1-Généralités :

[www.facebook.com/DomaineSNV](https://www.facebook.com/DomaineSNV)

La spectrophotométrie est l'étude des interactions entre la matière et les radiations électromagnétiques.

Page facebook ; Domaine SNV : Biologie,Agronomie,Science Alimentaire,Ecologie

Une radiation électromagnétique est caractérisée par leur fréquence  $\nu$  (en hertz Hz,  $s^{-1}$ ) qui définit l'énergie transportée par les photons :

$$E = h \cdot \nu$$

$h$  : est la constante de Planck  $h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ j.s}$  .

$\lambda$  : la longueur d'onde qui présente la distance parcourue par l'onde pendant une période  $T$ .

$$\lambda = c \cdot T = c / \nu$$

$T$  : la période est l'inverse de la fréquence exprimée en seconde ( $\nu = 1 / T$ ).

$c$  : représente la célérité de la lumière dans le vide ( $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ )

## **1-1-Excitation de la matière :**

On peut augmenter l'énergie de la matière (excitation) par différents processus thermiques, électriques ou électromagnétiques l'état obtenu est instable et le système excité tend à revenir sur un niveau d'énergie inférieure.

## **1-2 Principe d'absorption moléculaire :**

Lorsqu'un faisceau monochromatique pénètre dans un milieu solide ou liquide les molécules constituant ce milieu peuvent absorber une partie du rayonnement à condition que l'énergie des photons  $E = h \cdot \nu$  soit égale à la différence d'énergie correspondant à une transition possible entre deux niveaux de la molécule.

## 2- Spectrophotométrie d'absorption UV-Vis

### 2-1-Origine d'absorption UV-Vis

Les électrons les plus excitable dans un composé sont les électrons  $\pi$  doubles liaisons et les électrons n doublets non liants sur la couche périphérique des hétéroatomes (N,S,O,.....), se sont donc les groupements fonctionnels dans un composé qui sont responsables de l'absorbance lumineuse par le composé.

**Remarque:** La molécule la plus stable demande plus d'énergie pour qu'elle soit excitée :

$$\nwarrow E = h \cdot \nu = (h \cdot c) / \lambda \searrow$$

La molécule qui possède plusieurs sites d'excitation (double liaison,...) est plus facile à exciter donc demande moins d'énergie pour qu'elle soit excitée :

$$\swarrow E = h \cdot \nu = (h \cdot c) / \lambda \nearrow$$

- Les composés qui ne contiennent que des groupements fonctionnels simples absorbent la lumière ultraviolette.

**Exp:**

>C=C< ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 180nm)

>C=O ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 280nm)

- Les composés qui contiennent plusieurs groupements fonctionnels conjugués absorbent la lumière visible.

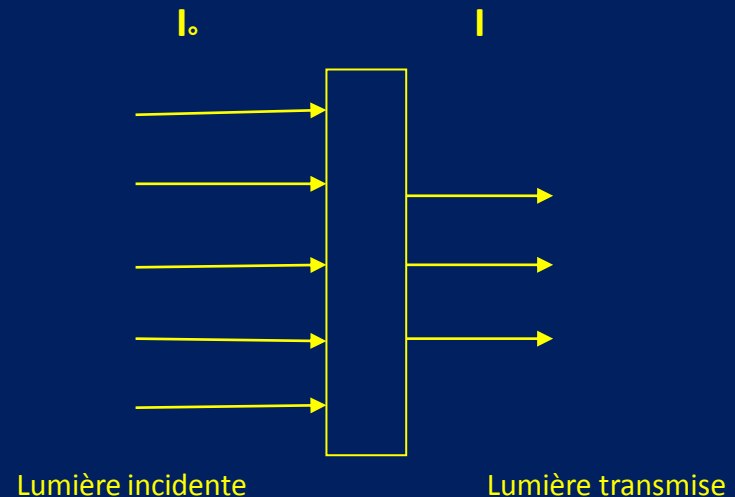
**Exp:**

le carotène contient 9 doubles liaisons conjuguées ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 496nm)

La chlorophylle verte comprend un système porphyrine hautement conjugué ( $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 700nm)

## 2-2 Loi de Beer- Lambert :

Lorsqu'un faisceau lumineux traverse une cuvette contenant un composé en solution, l'intensité de la lumière incidente  $I_0$  est diminuée, si le composé absorbe une certaine quantité de la lumière  $I$ .





La transmission  $T = I/I^{\circ} = e^{-k.c.l}$

K : coefficient d'absorption, qui dépend de la substance absorbante, la température et la longueur d'onde  $\lambda$

C : la concentration de la solution en substance absorbante ( $\text{mole.l}^{-1}$ )

l : la longueur traversée (cm)

la densité optique  $D_o$  ou l'absorbance est la valeur du logarithme d'écimal de l'inverse de la transmission

$$D_o = \log 1/T = \log I^{\circ}/I = (1/2,3) \ln I^{\circ}/I$$

$$\text{Donc : } D_o = (K/2,3) \times l \times c$$

$$D_o = \epsilon.l.c$$

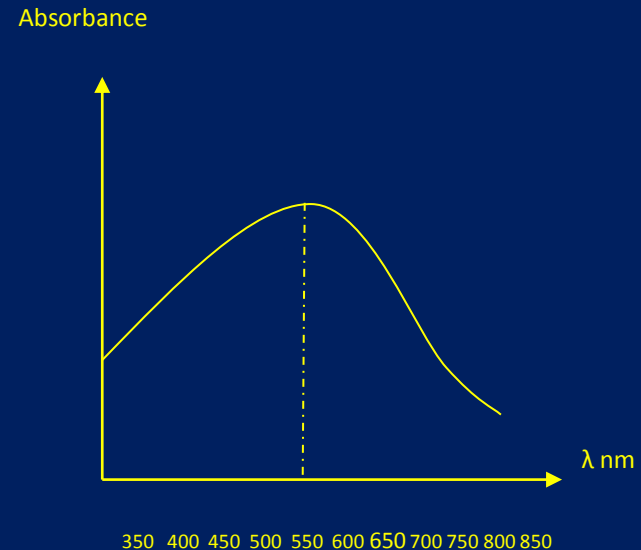
$\epsilon$  : est appelé coefficient d'extinction molaire ( $\text{mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

## 2-3 Conditions de validité de la Loi de Beer-Lambert :

- La lumière doit être monochromatique ( $\lambda = \text{Cts}$ ).
- Le coefficient d'extinction  $\varepsilon$  est fonction de l'indice de réfraction  $n$  qui dépend de la concentration donc seules les solutions très diluées suivent la loi de beer-lambert d'où la nécessité de faire une courbe d'étalonnage pour le dosage d'un composé.
- Le milieu de passage de faisceau lumineux ne doit pas être trouble (risque de diffusion de l'énergie lumineux) ou un milieu fluorescent (lumière réémise dans toutes les directions).

## 2-4- Spectre d'absorption ultraviolet ou visible:

Le spectre d'absorption uv ou vis d'un composé est obtenu en mesurant l'absorbance d'une solution du composé à différentes longueurs d'onde dans la région ultraviolette ou visible, on choisit la longueur d'onde d'absorption maximale  $\lambda_{\text{max}}$  pour faire le dosage du composé.



Le spectre concerné s'étend de proche UV jusqu'au proche IR

## 2-5 Limites de l'absorption UV-Vis:

La spectrophotométrie d'absorption UV-Vis apporte peu d'information structurale, elle indique la présence d'insaturation dans la molécule, son application est très importante dans l'analyse quantitative.

## 2-6 Analyse quantitative

L'analyse quantitative consiste à doser, ou déterminer la concentration d'un composé dans un mélange. Quelques substances peuvent êtres dosées directement, mais la majorité d'entres elles le sont par dosage indirect.

## 2-6-1 Dosage direct:

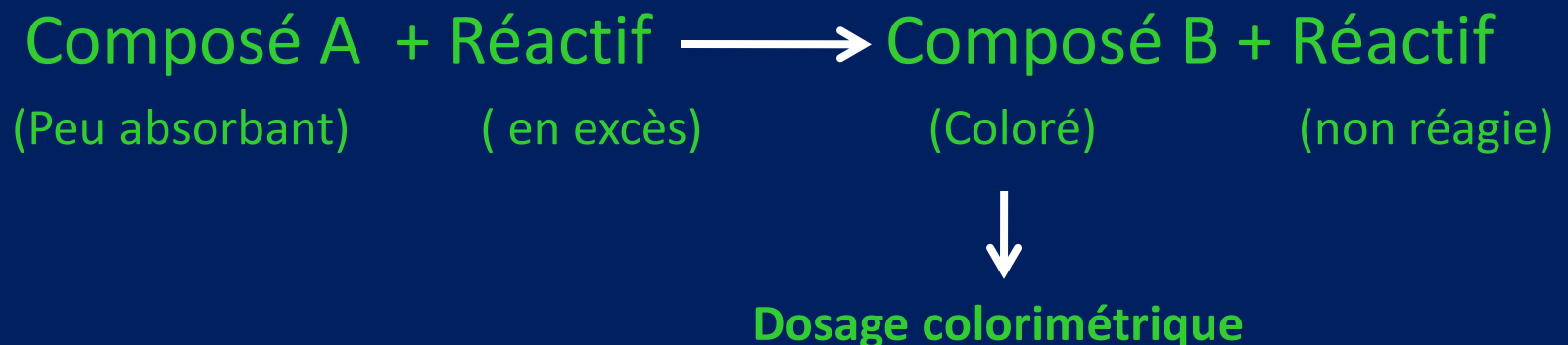
Le dosage direct consiste à mesurer l'absorbance d'un composé qui absorbe de façon importante la lumière dans la région ultraviolette ou visible. En d'autres mots, le composé doit posséder une forte bande d'absorption à une longueur d'onde dans la région ultraviolette ou visible, causée par une excitation électronique du composé. Très peu de constituants alimentaires sont dosés directement par spectroscopie d'absorption ultraviolette ou visible. Exemple de **benzoate de sodium** qui absorbe dans l'ultraviolet et **les colorants alimentaires** synthétiques qui absorbent dans le visible.

Exp : le **NADH H<sup>+</sup>** est un indicateur qui absorbe la lumière à une longueur d'onde égale à 340nm, sa formation au cours d'une réaction permettant de la suivre



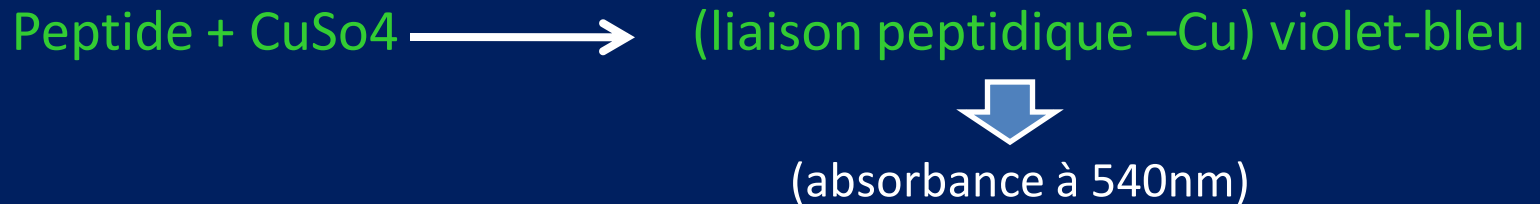
## 2-6-2 Dosage indirect

Le dosage indirect consiste à transformer, par une réaction chimique spécifique, un composé peu absorbant en un autre composé qui absorbe fortement la lumière dans la région du spectre visible. Donc le produit de la réaction est coloré. Comme la concentration du composé coloré est proportionnelle à celle du composé de départ, on dose donc indirectement ce dernier en mesurant l'absorbance du composé coloré. Le schéma général d'un dosage indirect apparaît ci-dessous :

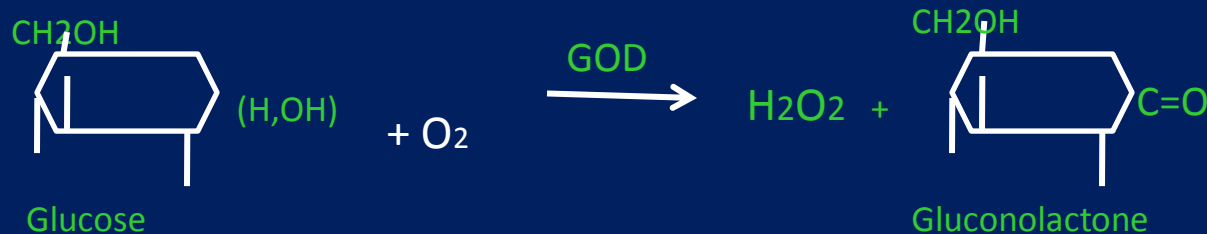


## Exp1 : (Réaction de biuret)

En milieux alcalin les peptides contenant au moins deux liaisons peptidiques forment avec les ions cuivriques  $\text{Cu}^{+2}$  un complexe bleu violet, la coloration est proportionnelle à la concentration et donne un maximum d'absorption à 540nm



## Exp2 : Détermination de la glycémie par la méthode de glucose oxydase (GOD)





## 2-7- Techniques de dosage:

### 2-7-1-Application directe de la loi de Beer-Lambert:

On utilise directement la relation  $D_o = \xi \cdot L \cdot C$ , dans ce cas il faut:

- Connaitre le coefficient d'extinction de la substance  $\xi$ .
- Respecter les conditions physico-chimiques au moment de la manipulation.
- Assurer que la dose inconnue est dans la zone de concentration où la loi de Beer-Lambert est valable (la partie droite de la courbe d'étalonnage).

### 2-7-2-Comparaison avec un étalon:

On compare la densité optique de la solution à doser avec celle d'une solution étalon, dans les mêmes conditions opératoires.

### 2-7-3-Dosage avec une gamme d'étalonnage:-

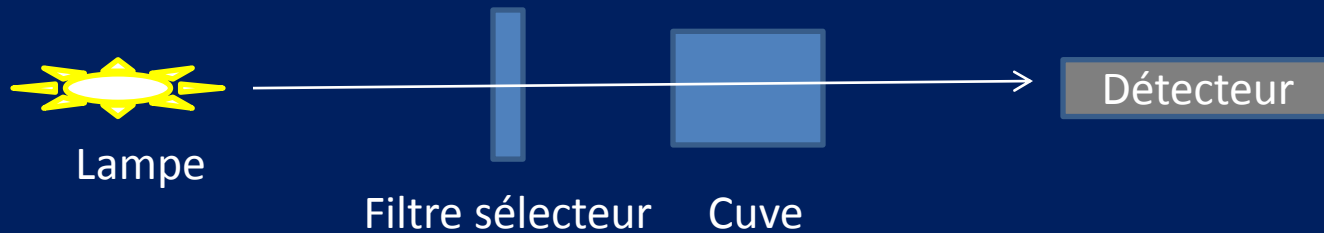
Pour préparer une gamme d'étalonnage, il faut respecter les conditions suivantes:

- La gamme doit être préparée dans les mêmes conditions expérimentales des essais.
- Le volume total des solutions dans chaque tube de la gamme doit être constant.
- Les concentrations des tubes de la gamme doivent être régulièrement réparties.
- La concentration des essais doit être centrée sur la gamme.
- La concentration des essais doit permettre l'application de la loi de Beer-Lambert.

## 2-8-Appareillage:

### 2-5-1-Colorimètre:

Ce type d'appareil travaille dans la région du spectre visible, il est muni d'un filtre sélecteur de longueur d'onde polychromatique et la lampe utilisée est une lampe a filament de tungstène.

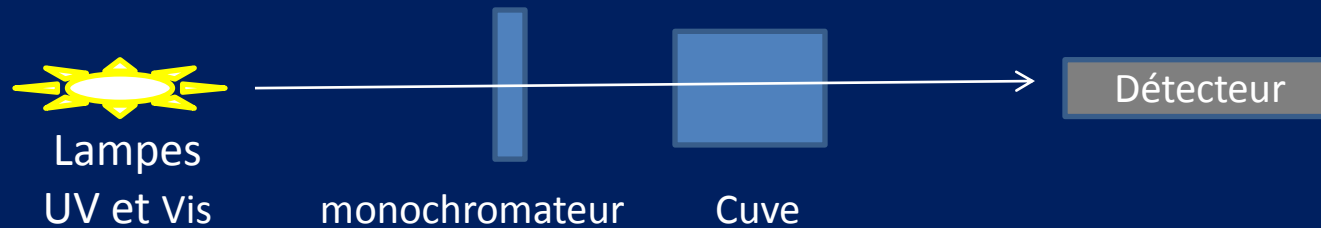


### 2-5-2-Spectrophotomètre:

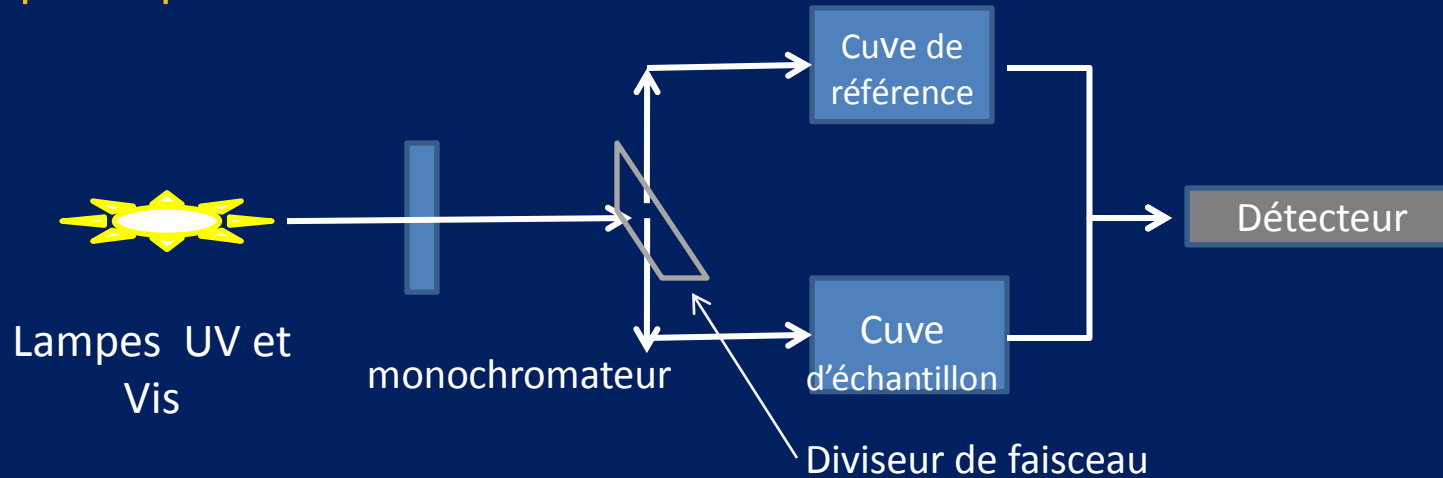
Les lampes utilisées sont en deutérium dans le domaine de UV et en tungstène dans le domaine de Vis, l'appareil peut être muni d'un simple faisceau ou d'un double faisceau.

- a) Simple faisceau:
- b) Double faisceau:

- Spectrophotomètre à simple faisceau:



- Spectrophotomètre à double faisceau:



# 3- Spectroscopie infrarouge

- **3.1.-Généralités**

La spectroscopie infrarouge fournit de bons renseignements sur les fonctions de la molécule et sur la présence éventuelle de doubles ou triples liaisons, l'absorption d'une radiation infrarouge ( ou absorption d'énergie :  $E=h/\lambda$ ), à l'intérieure d'une molécule, provoque des vibrations d'élongation de ses liaisons ou de déformation de ses angles de liaison, selon les liaisons concernées (C=O, O-H, C-H, C=C....), les vibrations apparaissent à des longueurs d'onde différentes et affichent des bandes d'absorption de forme et d'intensité différentes. Une seule fonction peut parfois donner plusieurs signaux (cas de la fonction acide qui a deux bandes, une pour -OH et une autre pour C=O)

## 3.2.-Vibration d'élongation et de déformation

Les bandes d'absorption dans le domaine de l'infrarouge sont en rapport avec deux types de vibrations :

a)-Vibration d'élongation ou de valence (aux environs de  $3000\text{cm}^{-1}$ ), résulte des mouvements d'oscillations de deux atomes liés, dans l'axe de leur liaison, produisant une variation périodique de leur distance.

Ces mouvements peuvent être soit symétrique ( les deux atomes se déplacent ensemble vers l'extérieur ou l'intérieur de la molécule.

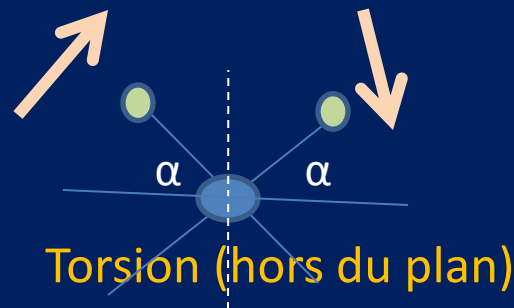
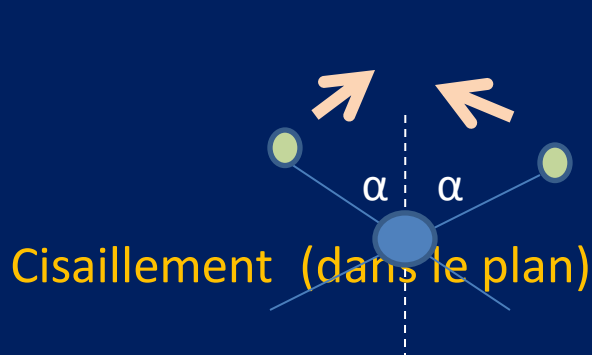


Ou asymétrique :- quand un des atomes se déplace vers le centre, et l'autre vers l'extérieur et vice versa.

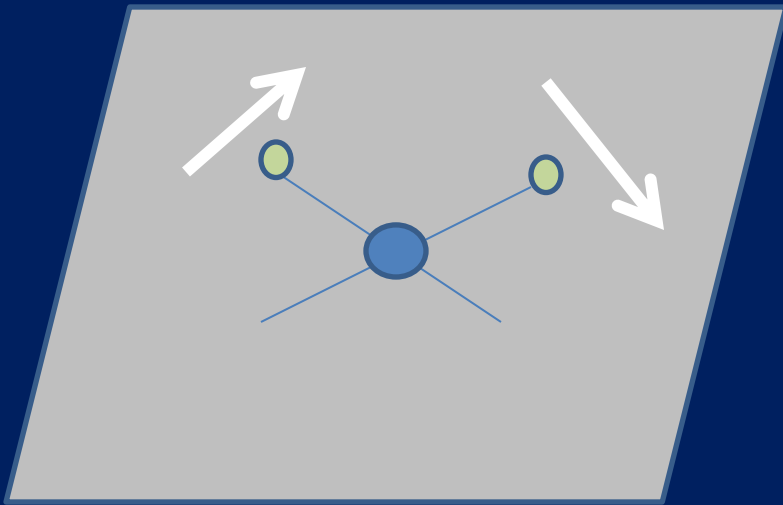


**b)- Vibration de déformation angulaire:** due à quatre types de mouvements différents. C'est une oscillation entre deux atomes liés à un troisième produisant une variation périodique de l'angle des deux liaisons.

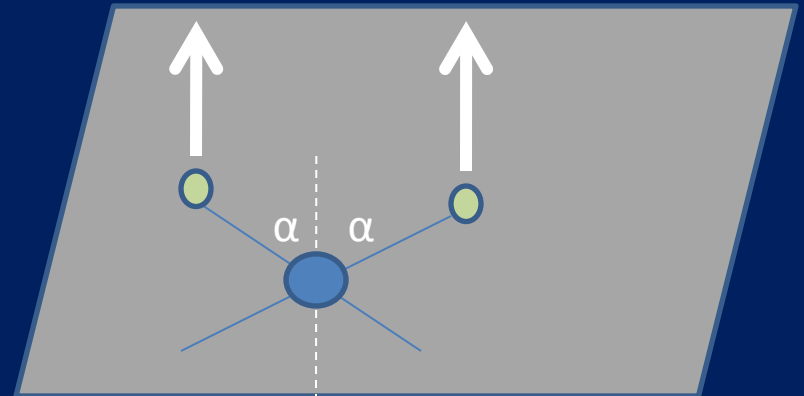
Cette vibration de déformation peut être soit symétrique dans le plan et hors du plan.



Ou asymétrique dans le plan et hors du plan:



Rotation (dans le plan)



Balancement (hors du plan)



## 3.3.-Spectre infrarouge

Sur un spectre IR on porte en abscisse le nombre d'onde  $\sigma = 1/\lambda$  (exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ ) et en ordonnée la transmittance  $T = I_s/I$ .

Lors de l'étude d'un spectre IR il faut distinguer :

- La zone d'empreinte digitale, correspondant à  $625\text{cm}^{-1} < \sigma < 1500\text{cm}^{-1}$  : une région complexe et difficile à interpréter.
- La zone qui correspond à  $1500\text{cm}^{-1} < \sigma$  ou apparaissent les bandes de vibration d'élongation et de déformation angulaire.

La relation entre le nombre d'onde  $\sigma$  de la radiation absorbée et la constante de force  $\kappa$  de la liaison, est donnée par la loi de hooke :

$$\sigma = \frac{1}{2\pi C} \sqrt{\kappa/\mu}$$

$\kappa$ : la constante de force de l'oscillateur en newton ( $N=Kg.m/S^2$ )

$\mu$ : est la masse réduite en Kg entre deux atomes  $m_1.m_2/m_1+m_2$ .

$C$ : la célérité ( $3.10^8 m/S^{-1}$ ).

## 3.4.-Interprétation des spectres infrarouges

On peut distinguer quatre groupes de pics d'absorption :

Position	groupement
Entre 2700 et 3700cm <sup>-1</sup>	Liaison A-H (A: O,N,.....)
Entre 2000 et 2500cm <sup>-1</sup>	Liaisons triples: -C≡C-, ou -C≡N Doubles liaisons conjuguées >C=C<
Entre 1600 et 1800cm <sup>-1</sup>	>C=C< , >C=O, >C=N-
Inférieur à 1500 cm <sup>-1</sup>	Difficile à interpréter en générale: >C=CH <sub>2</sub> vers 890cm <sup>-1</sup> -CH=CH <sub>2</sub> vers 910 cm <sup>-1</sup> -CH=CH- vers 965 cm <sup>-1</sup> -CH=CH vers 690 cm <sup>-1</sup> >C=CH- vers 840 cm <sup>-1</sup>

## 3.5.-Appareillages:

### 3.5.1.-Préparation de l'échantillon:

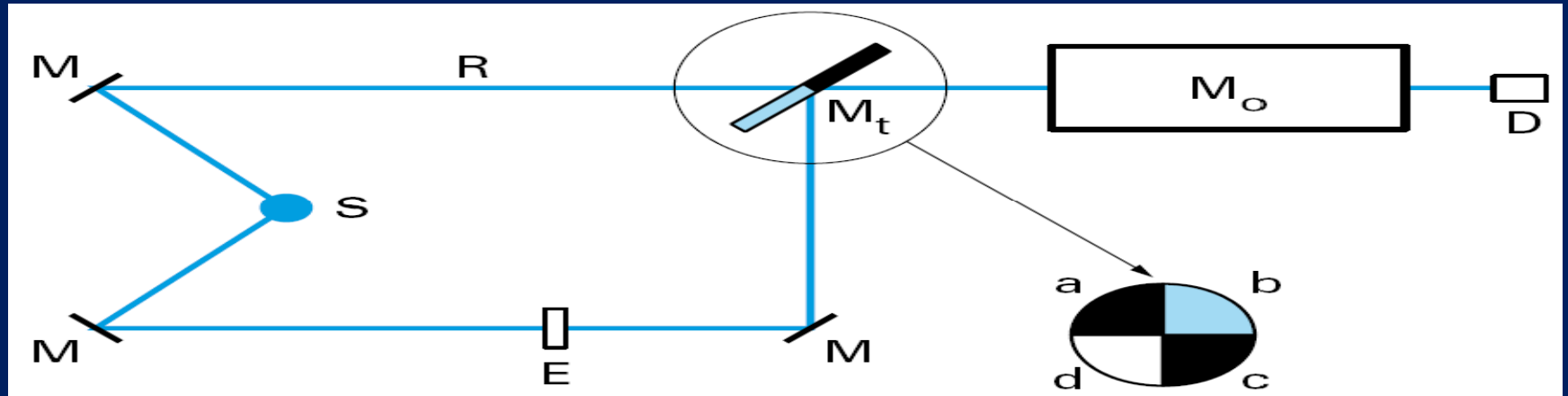
L'échantillon peut être sous forme solide, dans ce cas il est placé dans des pastilles à 1p100 dans le bromure de potassium KBr, les produits liquides sont utilisés soit purs soit en solution dans le tétrachlorure de carbone, dans des cuves de chlorure de sodium et enfin les produits gazeux sont emprisonnés dans une cuve de chlorure de potassium.

## 3.5.2 Spectromètres dispersifs

On utilise généralement le montage double faisceau, la source de lumière est à base d'un filament de tungstène (pour le proche infrarouge, jusqu'à  $3\mu\text{m}$ , et une lampe à filament de Nernst.

Le rayonnement de la source est dédoublé par un jeu de miroirs. Pour chaque intervalle de longueur d'onde, défini par le monochromateur, le flux ayant suivi alternativement chacune des deux voies, par effet d'un miroir tournant au rythme d'une dizaine de fois par seconde, arrive sur le détecteur.

La comparaison des deux signaux obtenus est directement convertie en transmittance.



$S$	source	$M_o$	monochromateur
$E$	échantillon	$D$	détecteur
$R$	référence	$M$	miroir

$M_t$  miroir tournant

## 3.6.-Application:

L'analyse quantitative d'un échantillon est difficile du fait que la température augmente au cours des mesures ce qui peut varier le coefficient de distinction et par conséquence modifie les conditions de validité de la loi de beer-lamber , cependant la principale application des spectres infrarouges est l'analyse qualitative, dont la recherche des différents groupements constituant une molécule.