

Cours : TECHNIQUES INSTRUMENTALES D'ANALYSE

Chapitre 4 : Spectrophotométrie Moléculaire et Atomique : Principes et Applications

Nombre d'heures : 6h (4h théorique, 2h TD) Enseignant : [A. Allouche]

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Fondements Physiques de l'Interaction Matière-Lumière	2
1.1. La nature de la lumière : onde et photon	2
1.2. Transitions énergétiques dans la matière	3
1.2.1. Transitions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles (Molécules)	3
1.2.2. Transitions électroniques des atomes libres	4
Partie 2 : La Spectrophotométrie Moléculaire (UV-Visible)	5
2.1. Principe et Loi de Beer-Lambert	5
2.2. Dispositif expérimental et méthodologie	6
2.2.1. Composants d'un spectrophotomètre	6
2.2.2. Protocole de mesure et considérations pratiques	7
Partie 3 : La Spectrophotométrie Atomique	8
3.1. Principe général : la nécessité de l'atomisation	8
3.2. Techniques d'atomisation et dispositifs	9
3.2.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) avec flamme	9
3.2.2. Autres techniques (SAA four graphite, ICP-OES)	10
Partie 4 : Applications en Biochimie Alimentaire et Physiologie Végétale	11
4.1. Applications de la spectrophotométrie moléculaire	11
4.1.1. Dosages spectrophotométriques en biochimie alimentaire (Protéines, ACL)	11
4.1.2. Études cinétiques enzymatiques en physiologie végétale	12
4.2. Applications de la spectrophotométrie atomique	13
4.2.1. Dosage des minéraux et éléments traces dans les aliments	13
4.2.2. Analyse des oligo-éléments dans les tissus végétaux	13
Conclusion et Perspectives	14
Annexes (Schémas)	15
Références Bibliographiques	17

Synthèse du Document

Introduction

La spectrophotométrie est une technique analytique fondamentale qui mesure l'interaction entre la lumière et la matière. Elle permet de quantifier la concentration d'une espèce chimique (molécule ou atome) dans un échantillon, ou d'étudier sa structure. Ce cours se concentre sur deux branches principales : la spectrophotométrie moléculaire (UV-Visible) pour l'analyse des molécules en solution, et la spectrophotométrie atomique pour le dosage élémentaire. Nous en aborderons les principes physiques, l'instrumentation, la méthodologie et les applications spécifiques en biochimie alimentaire et physiologie végétale.

Partie 1 : Fondements Physiques de l'Interaction Matière-Lumière

1.1. La nature de la lumière : onde et photon

La lumière présente une dualité onde-particule.

- Onde : Caractérisée par sa longueur d'onde (λ , en nm), sa fréquence (ν , en Hz) et son amplitude. Elles sont liées par la relation : $c = \lambda \nu$ (c = vitesse de la lumière).
- Particule (Photon) : Quantum d'énergie transporté par l'onde. L'énergie d'un photon est donnée par : $E = h\nu = hc / \lambda$ (h = constante de Planck). Cette équation est centrale : plus la longueur d'onde est courte, plus l'énergie du photon est élevée.

Schéma 1 (Annexe p.15) : Le spectre électromagnétique.

- Illustration présentant les différentes régions spectrales (UV, Visible, IR) avec leurs longueurs d'onde et énergies associées.

1.2. Transitions énergétiques dans la matière

1.2.1. Transitions moléculaires L'absorption d'un photon par une molécule provoque une transition vers un état excité. L'énergie du photon doit correspondre exactement à la différence d'énergie entre deux niveaux.

- Transitions électroniques : Absorption dans l'UV-Visible ($\lambda = 200 - 800$ nm). Excitent un électron vers une orbitale de plus haute énergie. Les groupements responsables sont les chromophores ($C=O$, $C=C$, $NO_2...$).
- Transitions vibrationnelles et rotationnelles : Absorption dans l'Infrarouge (IR). Modifient l'état de vibration et de rotation de la molécule.

Schéma 2 (Annexe p.15) : Diagramme des niveaux d'énergie moléculaires.

- Représentation des niveaux électroniques (S_0 , S_1), vibrationnels ($v=0,1,2...$) et rotationnels, montrant comment l'absorption d'un photon induit une transition.

1.2.2. Transitions atomiques Pour un atome libre (gazeux), les niveaux d'énergie sont discrets et uniquement électroniques. L'absorption d'un photon de très haute énergie (UV-Visible spécifique) provoque une transition électronique bien définie et extrêmement spécifique à un élément. C'est la base de la spectrophotométrie atomique.

Partie 2 : La Spectrophotométrie Moléculaire (UV-Visible)

2.1. Principe et Loi de Beer-Lambert

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique traverse une solution, une partie de l'énergie lumineuse est absorbée par l'analyte. La loi de Beer-Lambert établit une relation quantitative entre l'absorbance (A) et la concentration (C) : $A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$ Où :

· A = Absorbance (sans unité) · I_0 = Intensité lumineuse incidente · I = Intensité lumineuse transmise · ϵ = Coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) → constante pour une molécule donnée à un λ donnée · l = Longueur du trajet optique (épaisseur de la cuve, en cm) · C = Concentration molaire ($mol \cdot L^{-1}$)

Cette loi est le fondement du dosage quantitatif.

2.2. Dispositif expérimental et méthodologie

2.2.1. Composants d'un spectrophotomètre Schéma 3 (Annexe p.16) : Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV-Vis.

· Représentation des composants dans l'ordre : Source (lampe tungstène/hydrogène) → Monochromateur (fente, réseau) → Cuve contenant l'échantillon → Détecteur (photomultiplicateur) → Affichage (Absorbance).

1. Source lumineuse : Émet un rayonnement polychromatique large (Lampe à deutérium pour l'UV, lampe à filament de tungstène pour le Visible).
2. Monochromateur : (Réseau de diffraction) Isole une bande très étroite de longueurs d'onde pour obtenir une lumière quasi-monochromatique.
3. Cuvette : Contient l'échantillon. En verre pour le Visible, en quartz pour l'UV (le verre absorbe les UV).
4. Détecteur : (Photodiode ou photomultiplicateur) Convertit le signal lumineux transmis (I) en signal électrique.
5. Système de traitement et d'affichage : Calcule et affiche l'absorbance.

2.2.2. Protocole de mesure

1. Préparation de l'échantillon et des blancs.
2. Zéro optique (blanc) avec le solvant seul pour régler $A=0$ (100% de transmission).
3. Mesure de l'absorbance de l'échantillon.
4. Construction d'une courbe d'étalonnage (A vs C) avec des standards de concentration connue.

Partie 3 : La Spectrophotométrie Atomique

3.1. Principe général : la nécessité de l'atomisation

Contrairement aux molécules, les atomes doivent être libres (non liés) et à l'état gazeux pour absorber la lumière à leur longueur d'onde caractéristique. L'étape cruciale est donc l'atomisation : destruction de la matrice et dissociation des molécules pour obtenir des atomes dans leur état fondamental.

3.2. Techniques d'atomisation et dispositifs

3.2.1. Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) avec flamme Schéma 4 (Annexe p.16) : Schéma de principe d'un spectrophotomètre SAA à flamme.

· Représentation des composants spécifiques : Source (Lampe cathodique creuse, HCL) → Système de nébulisation → Flamme (atomiseur) → Monochromateur → Détecteur. · Source : Une lampe cathodique creuse (HCL) spécifique à l'élément à doser. Elle émet la longueur d'onde exacte que l'élément peut absorber. · Nébuliseur : Transforme l'échantillon liquide en un brouillard fin (aérosol). · Flamme (Air/Acétylène ou N_2O /Acétylène) : L'aérosol est injecté dans la flamme où se produisent la désolvation, la vaporisation et l'atomisation. · Le reste du dispositif (monochromateur, détecteur) est similaire à un UV-Vis.

3.2.2. Autres techniques

· SAA Four à graphite : L'atomisation se fait dans un four en graphite chauffé électriquement. Sensibilité bien supérieure à la flamme. · Spectrométrie d'émission optique avec plasma à couplage inductif (ICP-OES) : Un plasma (gaz ionisé à très haute température) excite les atomes, qui émettent ensuite de la lumière à leur longueur d'onde caractéristique. Permet le dosage multi-élémentaire.

Partie 4 : Applications

4.1. Applications de la spectrophotométrie moléculaire

· Dosage des protéines par la méthode de Bradford : Formation d'un complexe coloré protéine-Bleu de Coomassie ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$). · Dosage de l'acide linoléique conjugué (ALC) dans les huiles alimentaires par mesure d'absorbance dans l'UV. · Dosage des pigments photosynthétiques (Chlorophylle a et b, caroténoïdes) par extraction et mesure aux λ spécifiques. · Études cinétiques enzymatiques : Mesure en continu de l'apparition/disparition d'un produit/substrat absorbant (ex : NADH à 340 nm).

4.2. Applications de la spectrophotométrie atomique

· Dosage des métaux lourds (Pb, Cd, Hg) dans les denrées alimentaires pour le contrôle qualité et la sécurité sanitaire. · Analyse de la composition minérale des sols et des tissus végétaux (Fe, Cu, Zn, Mn, Ca, Mg, K, Na) pour étudier la nutrition et la carence des plantes. · Contrôle de l'eau d'irrigation (teneur en éléments comme le Bore, toxique à haute concentration).

Conclusion et Perspectives

La spectrophotométrie, qu'elle soit moléculaire ou atomique, reste une pierre angulaire de l'analyse quantitative en biochimie. Sa force réside dans sa spécificité, sa sensibilité et sa relative simplicité de mise en œuvre. Les développements actuels tendent vers la miniaturisation (spectrophotomètres portables), l'automatisation (systèmes à haut débit) et le couplage avec d'autres techniques (ex : chromatographie couplée à la spectrophotométrie).

Annexes : Schémas

Page 15 Schéma 1 : Le spectre électromagnétique

· Diagramme montrant les différentes régions spectrales (Gamma, X, UV, Visible, IR, Micro-ondes, Radio) avec un zoom sur l'UV-Visible (200-800 nm) et les couleurs associées. Légende : "Énergie et longueur d'onde des différentes régions du spectre électromagnétique."

Schéma 2 : Transitions énergétiques moléculaires

· Diagramme énergétique simplifié montrant les états électroniques S_0 (fondamental) et S_1 (excité), chacun avec ses sous-niveaux vibrationnels. Une flèche verticale représente l'absorption d'un photon induisant une transition électronique et vibrationnelle. Légende : "Schéma des niveaux d'énergie montrant une transition électronique."

Page 16 Schéma 3 : Spectrophotomètre UV-Visible

· Schéma annoté en couleurs montrant le cheminement de la lumière : · Source → Faisceau incident (I_0) · Monochromateur · Faisceau monochromatique traversant la cuve · Faisceau transmis (I) vers le détecteur Légende : "Principe optique d'un spectrophotomètre à simple faisceau."

Schéma 4 : Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA)

· Schéma annoté mettant en évidence les différences clés avec l'UV-Vis : · Source : Lampe cathodique creuse (HCL) · Nébuliseur/Brûleur : Chambre de mélange et flamme · Le monochromateur et le détecteur sont après la flamme. Légende : "Schéma de principe d'un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme."

Références Bibliographiques

1. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). Fundamentals of Analytical Chemistry (9th ed.). Cengage Learning.
2. Harris, D. C. (2010). Quantitative Chemical Analysis (8th ed.). W.H. Freeman.
3. Rouessac, F., & Rouessac, A. (2019). Analyse Chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes (8th ed.). Dunod.

4. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level (5th ed.). Wiley. (Pour les dosages biochimiques)