

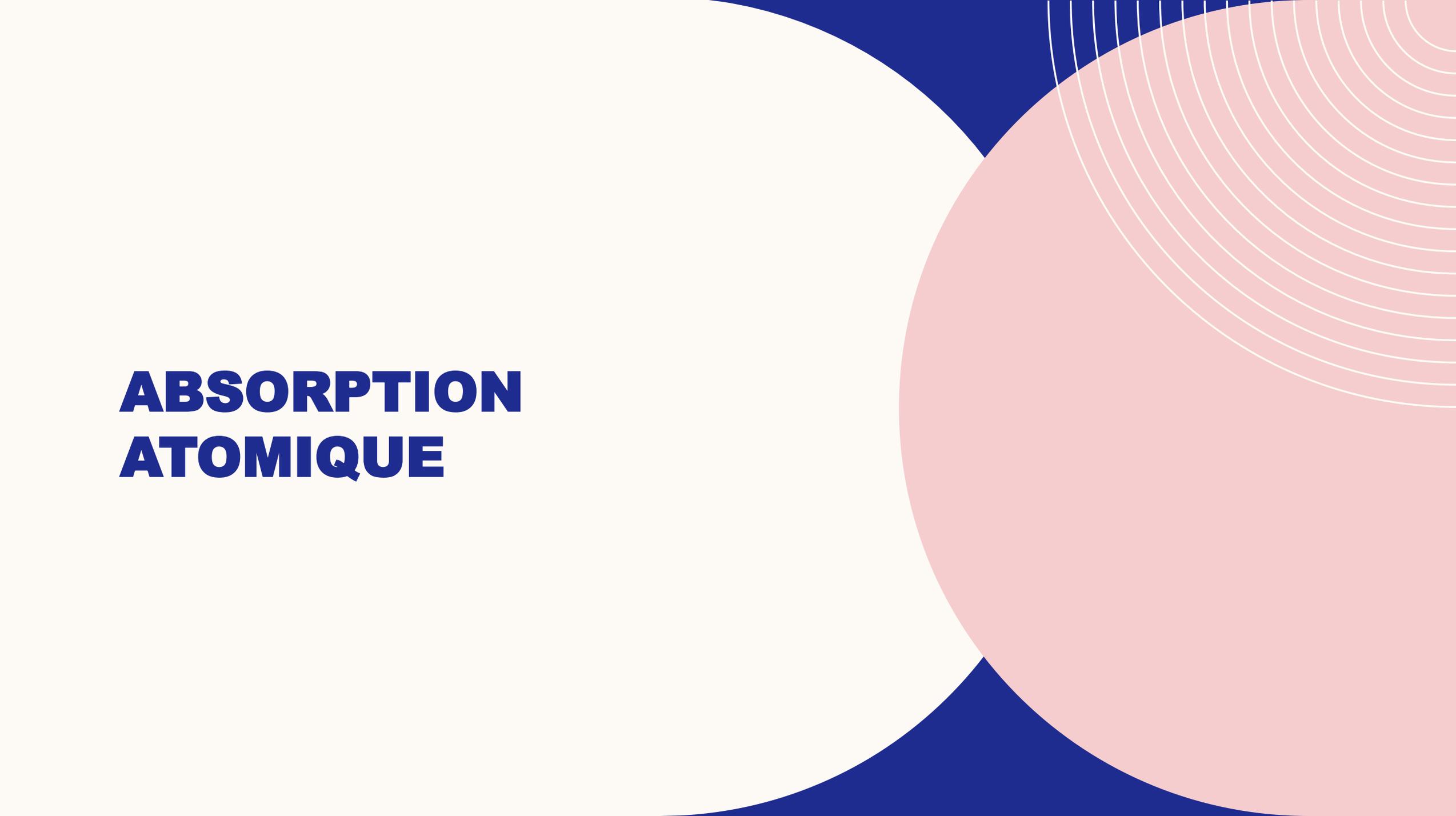
M2 Biotechnologie microbienne

**TECHNIQUES DE
CARACTÉRISATION
DES MOLÉCULES**

Chargé de cours : Dr. CASASNI

Année universitaire : 2024/2025

ABSORPTION ATOMIQUE



ABSORPTION ATOMIQUE

L'absorption atomique est une technique analytique utilisée pour déterminer la **concentration des éléments chimiques (métalliques ou non)** dans un échantillon en mesurant l'**absorption** de la **lumière** par des **atomes libres** dans l'**état gazeux**.

Cette méthode repose sur le principe que **chaque élément chimique absorbe une longueur d'onde spécifique de la lumière**, permettant une analyse précise et sensible des échantillons.

PRINCIPE

Le principe fondamental de l'absorption atomique repose sur l'idée que chaque élément chimique absorbe une lumière à une longueur d'onde spécifique. Lorsqu'un échantillon est introduit dans un spectromètre d'absorption atomique, il est d'abord transformé en atomes libres par un processus de **vaporisation**. La lumière est ensuite dirigée à travers ces atomes, et la réduction de l'intensité lumineuse, due à l'absorption par les atomes, est mesurée pour déterminer la concentration de l'élément présent dans l'échantillon.

- La **source lumineuse** : elle produit la longueur d'onde spécifique à l'élément analysé.
- Le **nébuliseur** : il vaporise l'échantillon pour libérer les atomes.
- Le **détecteur** : il mesure la lumière absorbée.

FONCTIONNEMENT DE LA MÉTHODE

Le fonctionnement de l'absorption atomique repose sur plusieurs étapes.

- **Préparation de l'échantillon** : L'échantillon est d'abord vaporisé pour libérer les atomes.
- **Transmission de lumière** : Une source lumineuse émet un faisceau de lumière à une **longueur d'onde spécifique** à l'élément ciblé.
- **Absorption** : Les atomes libres absorbent la lumière, réduisant ainsi son intensité.
- **Détection** : Cette réduction est mesurée par un détecteur, permettant de calculer la concentration de l'élément.

La relation entre la concentration de l'élément et l'absorption suit la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log_e \frac{I_0}{I} = Cl$$

où :

- I est l'intensité transmise,
- I_0 est l'intensité incidente.

FONCTIONNEMENT DE LA MÉTHODE

La spectrométrie d'absorption atomique peut suivre la loi de Beer-Lambert, où **l'absorbance est proportionnelle à la concentration des atomes** dans le chemin optique. Mathématiquement, cela est exprimé comme :

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

où :

- A est l'absorbance,
- ε est le coefficient d'absorption molaire,
- c est la concentration de l'élément en solution,
- l est la longueur du parcours optique.

Cette équation souligne l'importance d'une **calibration minutieuse** pour des résultats exacts. La difficulté réside dans le maintien d'une **homogénéité de l'échantillon** dans la source atomisante, qui peut introduire des variations dans les lectures.

FONCTIONNEMENT DE LA MÉTHODE

Le phénomène d'absorption atomique est intimement lié à la **structure électronique des atomes**. Chaque atome possède un ensemble de niveaux d'énergie, et l'absorption de lumière résulte du passage des électrons entre ces niveaux.

Par exemple, **l'absorption d'une longueur d'onde spécifique conduit à l'excitation d'un électron de l'état fondamental vers un état excité**. Ceci est **propre à chaque élément**, ce qui permet son identification unique par spectrométrie d'absorption atomique.

MÉTHODOLOGIES

L'analyse par absorption atomique peut être réalisée par différentes méthodologies en fonction des besoins analytiques et des limites de détection requises.

- **Spectrométrie par flamme** : Utilisée pour des analyses rapides et relativement simples. Elle convient pour détecter des éléments comme le calcium, le potassium et le sodium avec une bonne précision.
- **Spectrométrie sans flamme** : Implique l'utilisation d'un **four graphite** pour une sensibilité accrue, permettant la détection de traces d'éléments tels que le cadmium ou le plomb.

SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE PAR FLAMME (SAAF)

La spectrométrie d'absorption atomique **par flamme** est l'une des techniques les plus populaires. Elle utilise une flamme pour **atomiser** l'échantillon. Dans ce processus, l'échantillon est transformé en une **fine vapeur d'atomes libres** qui absorbent la lumière émise par une lampe **cathodique creuse**.

- Convient pour l'analyse de **métaux** comme le **calcium** et le **magnésium**.
- Utilise une flamme alimentée en **air-acétylène** ou **protoxyde d'azote-acétylène**.
- Nécessite un **réglage minutieux** des paramètres de la flamme pour des résultats précis.
- Plus **rapide** et moins **couteuse**.

SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE SANS FLAMME (SSG)

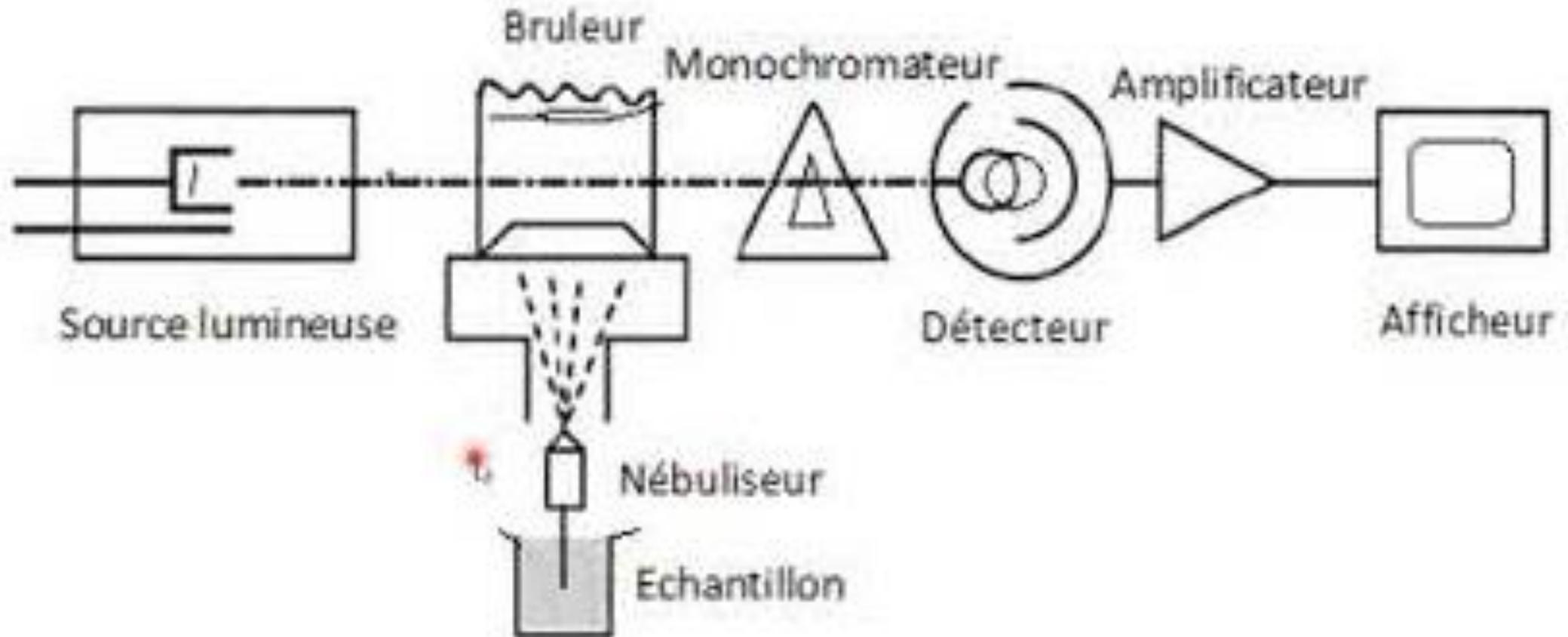
La spectrométrie d'absorption atomique **sans flamme**, aussi connue sous le nom de **four graphite**, est une méthode plus sensible où l'échantillon est chauffé dans un **tube de graphite** au lieu d'une flamme.

- Idéale pour des **concentrations inférieures à ppm**.
- Utilisation fréquente pour l'analyse des **éléments toxiques** comme le **cadmium** et le **mercure**.
- **Temps de prélèvement d'échantillon plus long** que la méthode par flamme.
- **Meilleure sensibilité**, mais nécessite un **entretien plus rigoureux** du four graphite pour des performances optimales.

APPAREILLAGE



APPAREILLAGE



APPAREILLAGE : LAMPE À CATHODE CREUSE

La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La lampe à cathode creuse émet le spectre lumineux spécifique à l'élément analysé. La cathode et l'anode de la lampe sont composées uniquement de l'élément dont le spectre lumineux doit être produit. Un **potentiel électrique** est appliqué entre l'anode et la cathode, ce qui a pour effet d'**ioniser** le gaz (**gaz rare : argon ou néon**) contenu dans la **lampe**. Les ions de gaz vont ensuite **entrer en collision** avec la cathode, ce qui **déloge** des **atomes métallique**. Ces atomes vont aussi entrer en collision avec les ions de gaz ce qui les fait passer à un **état d'excitation**. Ils retournent aussitôt à leur état de base ce qui **produit l'énergie lumineuse désirée**.



APPAREILLAGE : **NÉBULISEUR**

L'échantillon à analyser est en **solution**. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors **aspirée** dans le **capillaire** et à la sortie, elle est pulvérisée en un **aérosol** constitué de fines **gouttelettes**. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le **brûleur**.

APPAREILLAGE : FLAMME-ATOMISEUR

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la **flamme** (ou le **four graphite**). Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le **solvant** de la gouttelette est **éliminé**, il reste les **sels** ou particules **solides** qui sont alors fondus, vaporisés puis **atomisés**. La flamme **air acétylène** est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de **2500°C** environ.

APPAREILLAGE : MONOCHROMATEUR

La lumière qui quitte la source n'est pas monochromatique. On obtient un spectre de raies contenant :

- Les raies de l'**élément à doser** ;
- Les raies du **gaz de remplissage** dans la source ;
- Les raies **d'éventuelles impuretés** ;
- Les raies de l'**atomiseur** (flamme).

Le rôle du monochromateur consiste à **éliminer toute la lumière**, quelle que soit son origine, ayant une **longueur d'onde différente** de celle à laquelle on travaille.

APPAREILLAGE : DÉTECTEUR

Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur. Ce dernier 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.

APPLICATIONS

Les applications scientifiques de l'absorption atomique sont vastes, touchant à divers secteurs industriels et de recherche.

- **Environnement** : Surveillance des niveaux de métaux lourds dans l'eau potable et les sols.
- **Médecine** : Analyse des niveaux de minéraux dans le sang et les tissus biologiques.
- **Industrie manufacturière** : Contrôle de la qualité des matières premières et des produits finis.
- **Industrie alimentaire** : Contrôle de la qualité des produits.
- **Métallurgie** : Contrôle des alliages.

Chaque application peut requérir un ajustement spécifique des méthodologies d'absorption atomique pour répondre aux besoins analytiques spécifiques.

AVANTAGES

Les techniques d'absorption atomique présentent de nombreux avantages qui les rendent indispensables en analyse chimique.

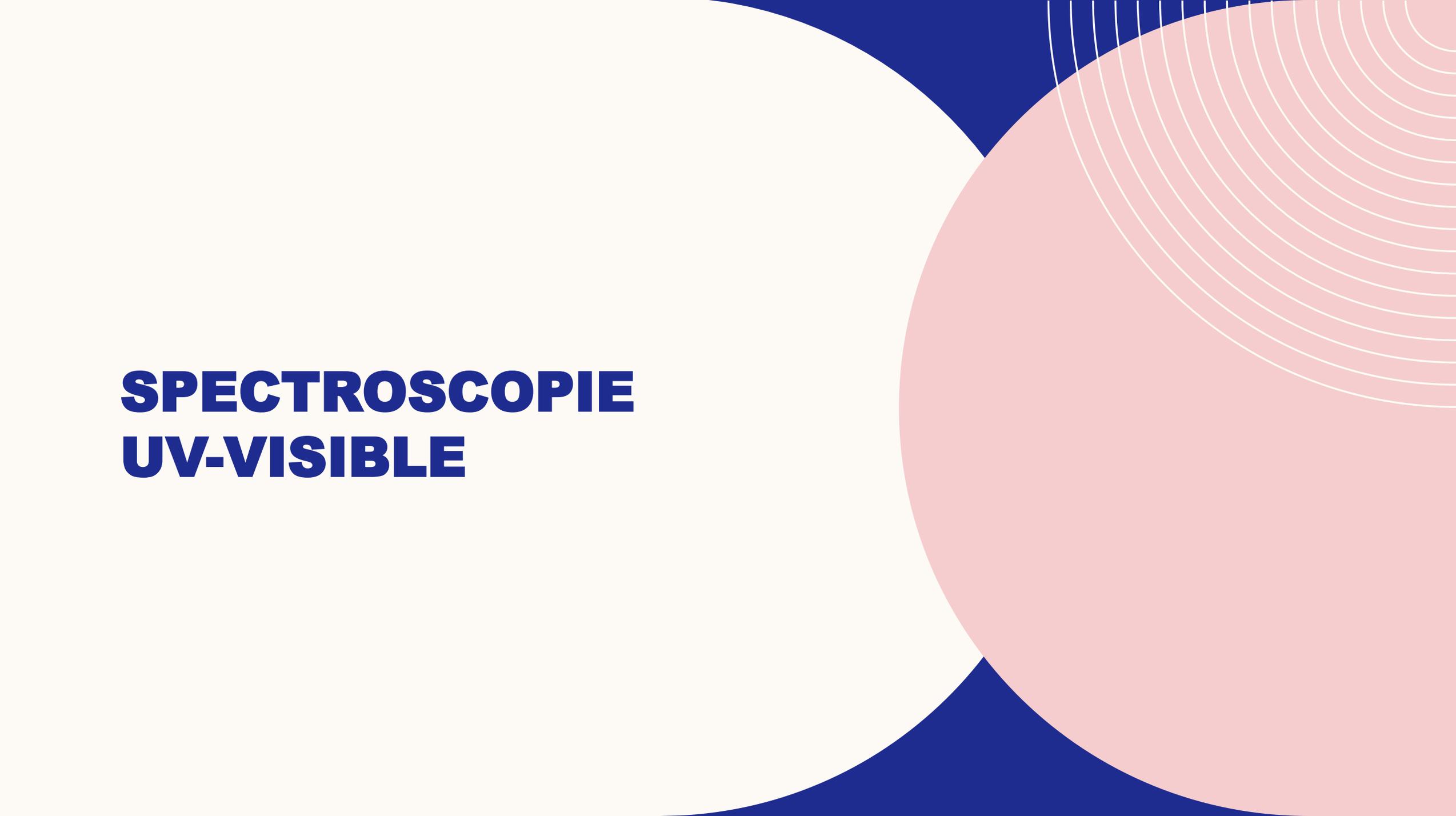
- **Sensibilité élevée** : Capacité à détecter des concentrations d'éléments à l'échelle du ppm et du ppb.
- **Spécificité élevée** : Possibilité de cibler des éléments spécifiques en fonction de leur longueur d'onde unique.
- **Rapidité** : Les mesures d'échantillons sont effectuées rapidement, augmentant l'efficacité des analyses de routine.

Ces caractéristiques permettent aux techniques d'absorption atomique de fournir des données fiables et précises cruciales pour de nombreuses applications.

LIMITATIONS

Bien que puissantes, les techniques d'absorption atomique présentent certaines limites, surtout lorsqu'elles sont appliquées à la **nanoscience**.

- **Sélectivité limitée** : Difficulté à distinguer des éléments qui partagent des longueurs d'onde d'absorption proches.
- **Préparation des échantillons** : Les échantillons doivent être transformés en atomes libres, une étape délicate pour les nano-matrices complexes.
- **Coût élevé** : Le matériel et la maintenance peuvent être prohibitifs pour certaines applications de petite échelle.



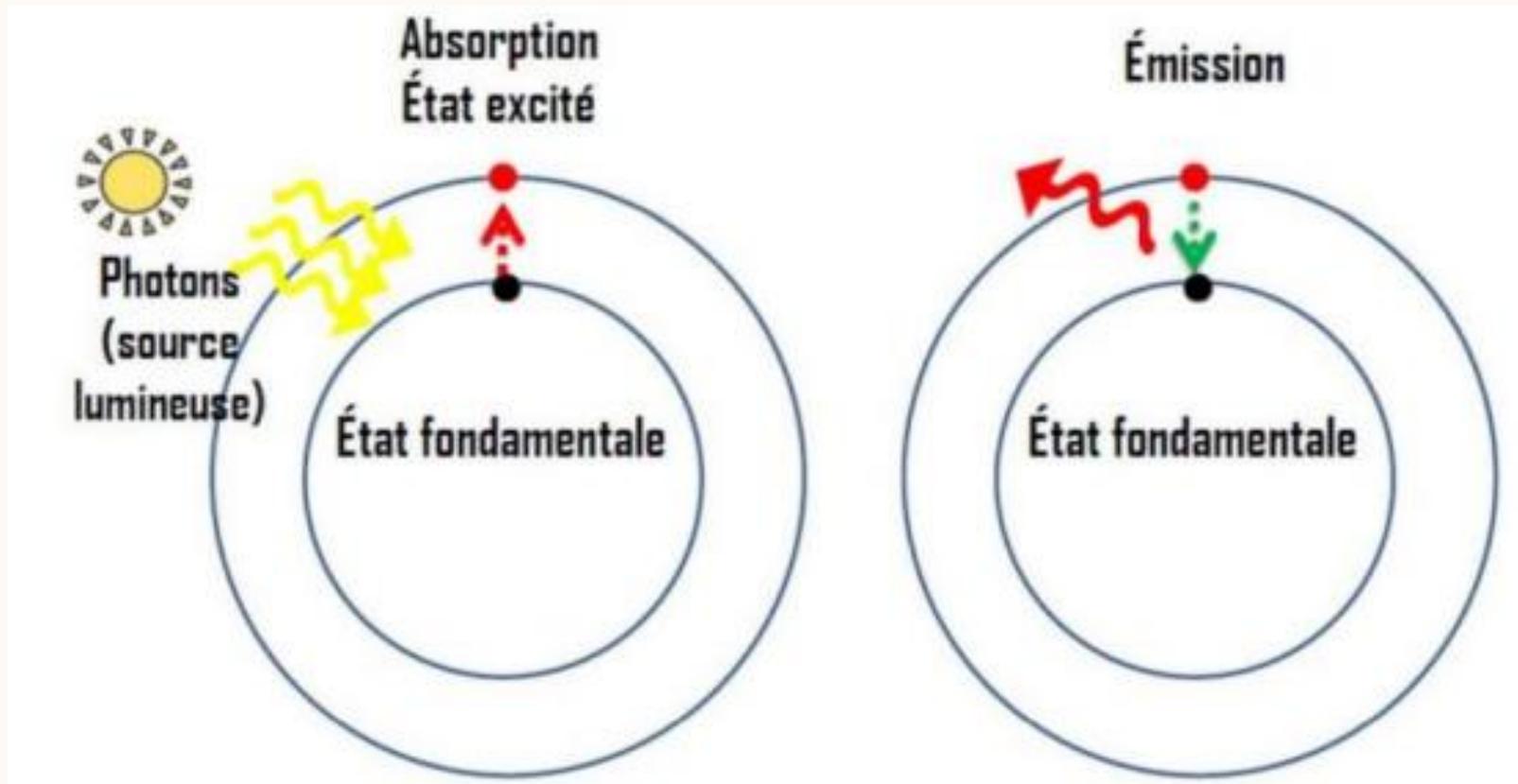
SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

DÉFINITION

La **spectroscopie UV-Visible** est une méthode d'analyse physico-chimique qui permet de déterminer aussi bien qualitativement que quantitativement des ions ou des molécules présents dans une solution, **sans la modifier ou l'altérer.**

DÉFINITION

Cette technique, utilise la propriété de ces ions ou molécules de pouvoir passer d'un état fondamental à un état excité par absorption d'un rayonnement de longueur d'onde adéquate.



PRINCIPE

La spectroscopie UV-Visible s'appuie sur l'absorption de la lumière ultraviolette et visible par les molécules lorsqu'elles subissent des **transitions électroniques**. Ce phénomène est exploité pour analyser la composition chimique des substances en étudiant leur spectre d'absorption. Le spectre obtenu montre quelles longueurs d'onde sont absorbées par un échantillon particulier, indiquant la présence et la concentration des composés.

Lorsqu'une lumière de longueur d'onde connue traverse un échantillon, l'intensité de la lumière transmise est mesurée. Cette mesure est convertie en absorbance (A), selon la formule :

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

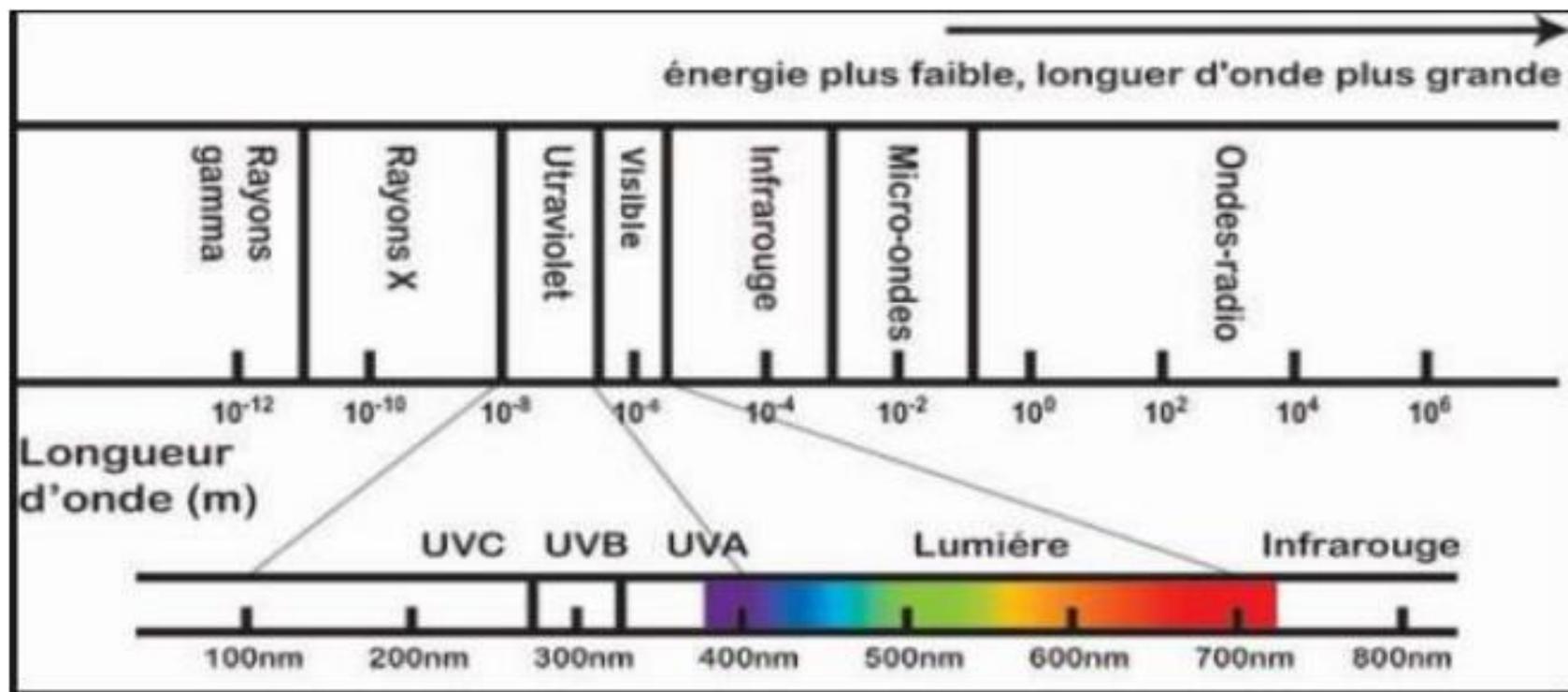
où :

- I est l'intensité transmise,
- I_0 est l'intensité incidente.

La loi de Beer-Lambert est appliquée pour lier l'absorbance à la concentration d'un soluté.

PRINCIPE

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800nm, ce qui correspond à l'**ultraviolet** (190-400 nm) et au **visible** (400-800 nm).



APPAREILLAGE

Le spectrophotomètre UV-visible est constitué des éléments suivants :

Source de lumière :

- Visible : Lampe à incandescence à Tungstène et iode.
- UV : Lampe à arc à Deutérium ou à Xenon , ou mercure.

Monochromateur (sélection de la longueur d'onde) :

Prisme ou Réseau : propriété de dévier et de décomposer la lumière (spectre)

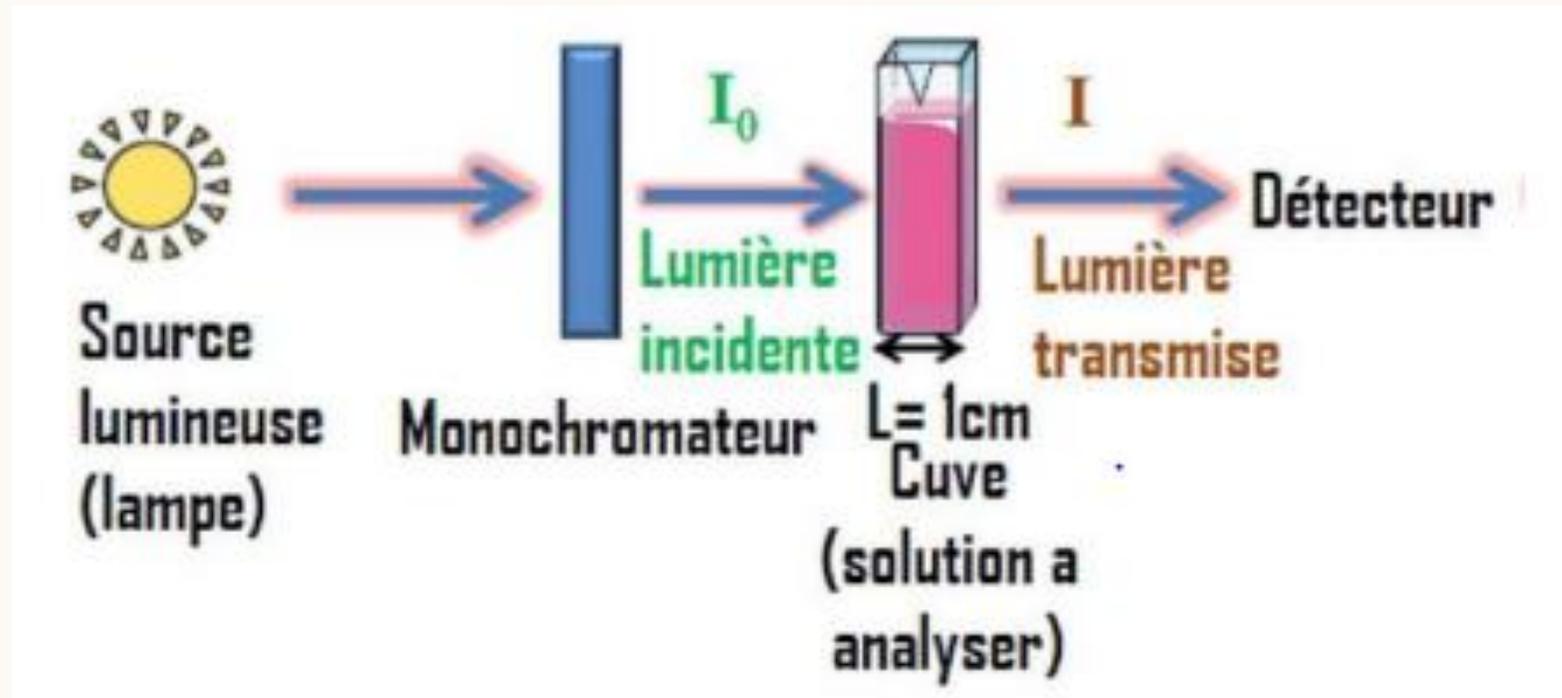
Cuve :

- Visible : Verre
- UV : Quartz

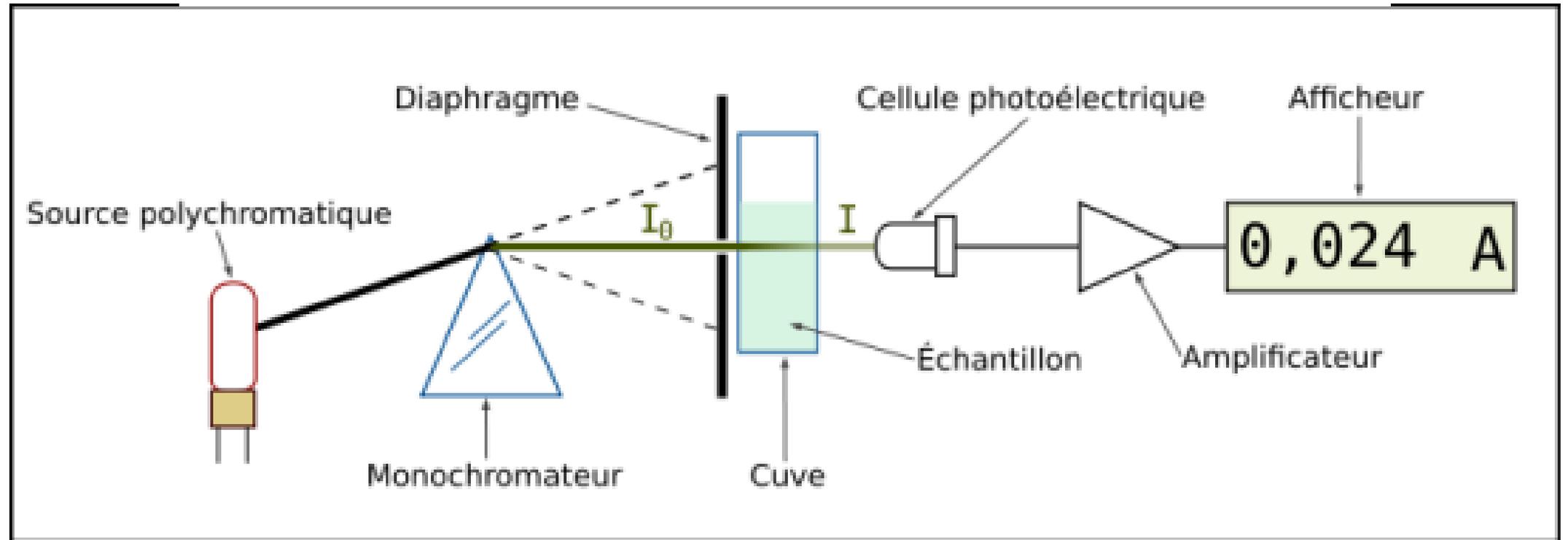
Détecteur : permet de mesurer l'intensité et la longueur d'onde de la radiation lumineuse à la sortie de la cuve.

APPAREILLAGE

Une source de **lumière blanche** traverse un **monochromateur** qui sélectionne une radiation de **longueur d'onde λ** . Le faisceau de lumière monochromatique **incident d'intensité I_0** traverse alors une cuve contenant une **solution colorée**. Un **photocapteur** convertit l'**intensité lumineuse transmise I** en un **signal électrique**. Enfin un analyseur traite le signal électrique et affiche la valeur de l'**absorbance**.



APPAREILLAGE



APPAREILLAGE

La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert : $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$

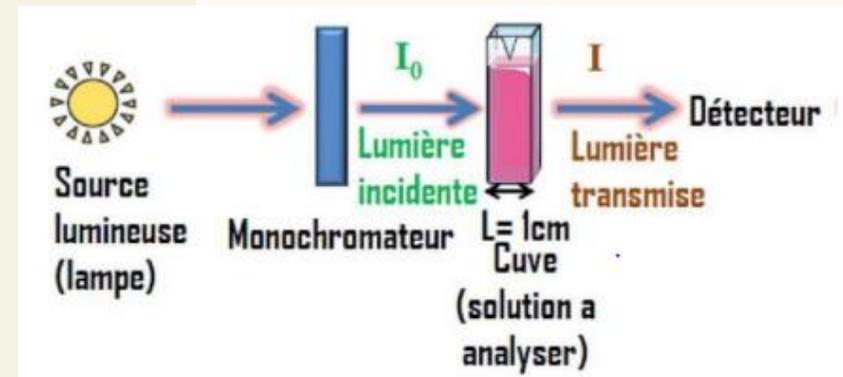
A : absorbance autrefois appelée densité optique (D.O.) (sans unité)

L'absorbance A est la capacité d'une espèce chimique à absorber une lumière

ϵ : est le coefficient d'extinction molaire (coefficient d'absorption molaire); c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. (ϵ est en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$). ϵ est le coefficient d'absorption spécifique si C en g/L (ϵ est en $L.g^{-1}.cm^{-1}$)

L : est la largeur (épaisseur) de cuve en cm

C : est la concentration de la solution ($mol.L^{-1}$)



APPAREILLAGE

Pour que la loi de Beer-Lambert fonctionne, elle doit obéir à quelques conditions :

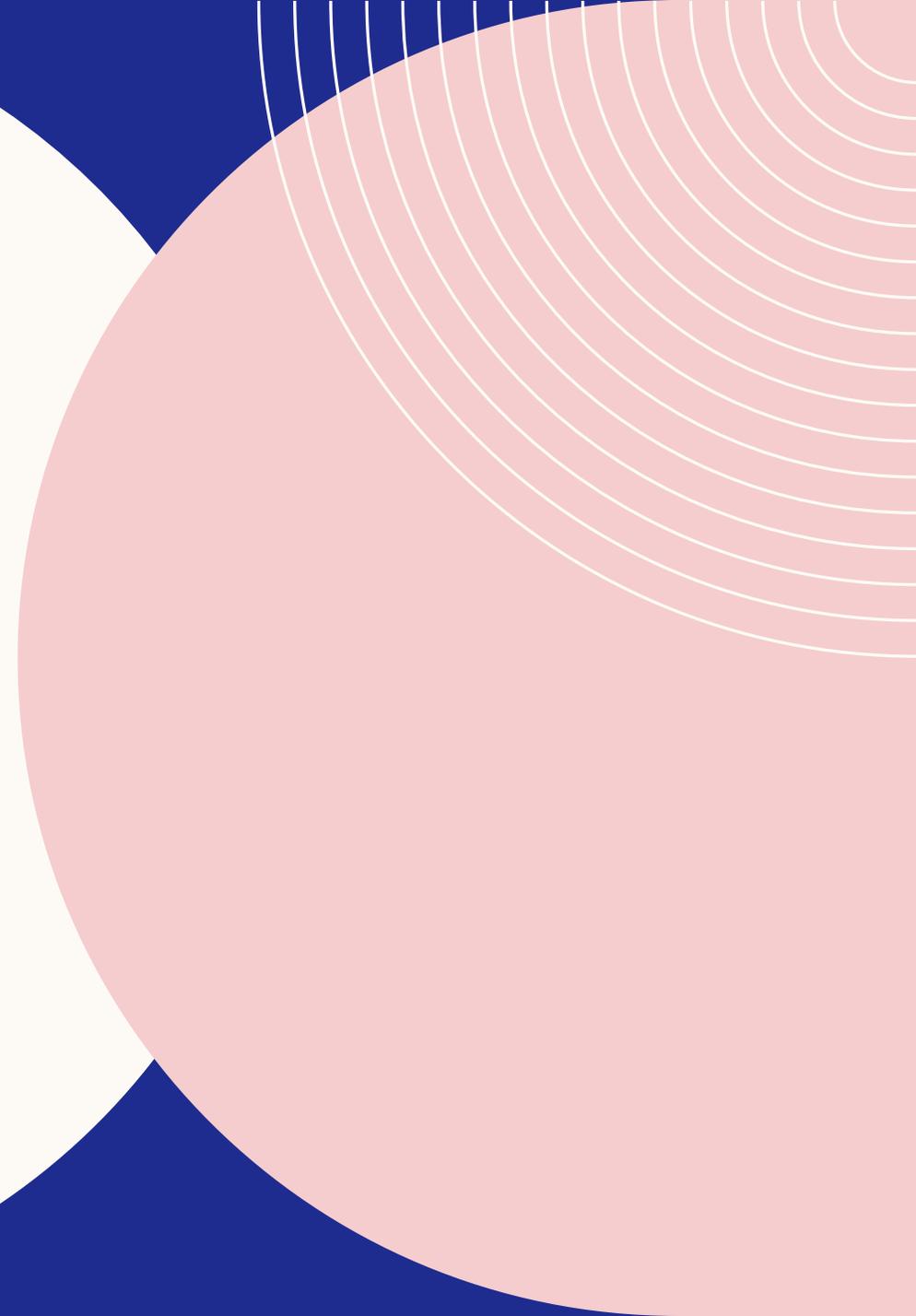
- La **lumière** utilisée doit être **monochromatique**
- La **solution ne doit pas être trop concentrée en sels incolores**
- La **solution ne doit pas être trouble**
- Il ne doit **pas y avoir de précipité**

APPLICATIONS

La **spectroscopie UV-Visible** est largement employée dans divers domaines tels que la **chimie analytique**, la **biochimie** et la **pharmaceutique** pour analyser la concentration des substances, identifier des composés chimiques ou encore étudier les interactions moléculaires.

La spectroscopie UV-Visible ne se limite pas seulement à l'étude des solutions. Elle est également essentielle pour analyser divers types de **matériaux solides** tels que les **films minces**, les **revêtements** et même les **métaux**. En mesurant les **spectres de réflexion**, la spectroscopie peut révéler des informations sur les couches superficielles et les interactions à l'interface des matériaux. De plus, elle permet d'étudier les **cinétiques des réactions** en temps réel en observant les changements de spectres au fil du temps.

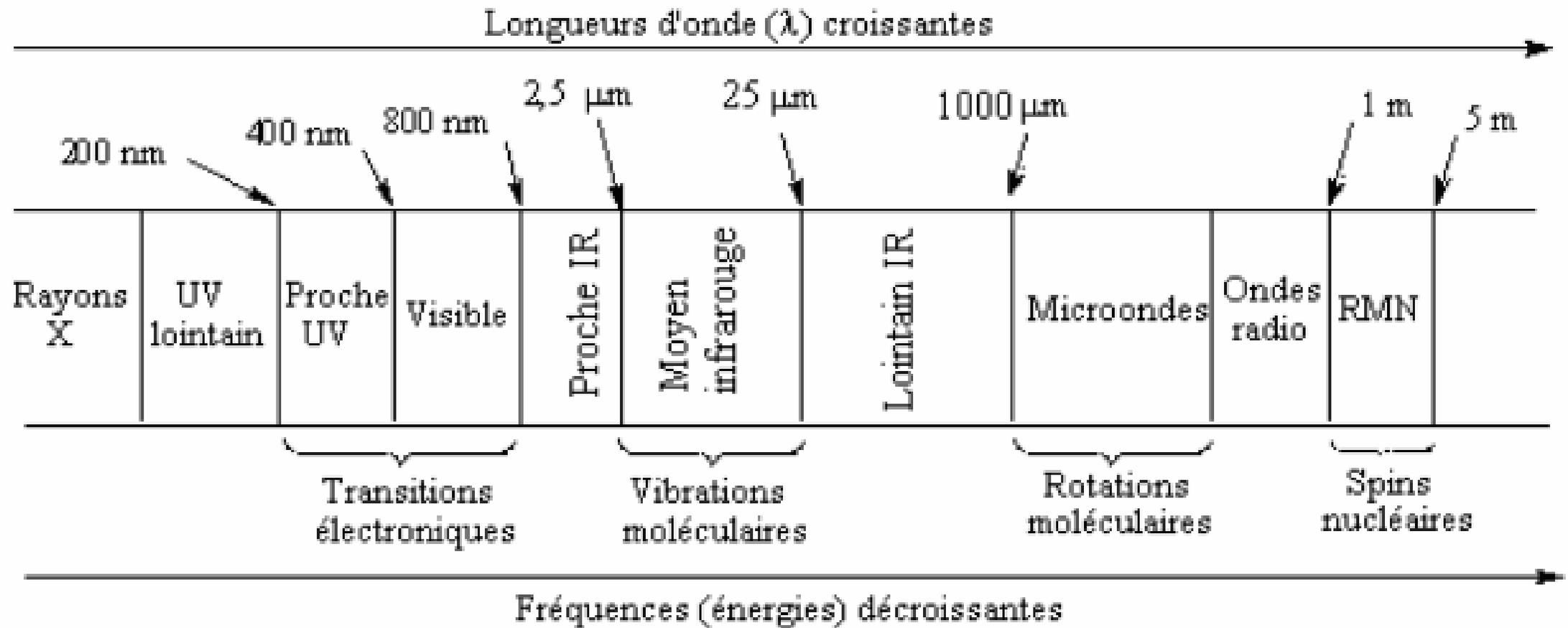
SPECTROSCOPIE INFRAROUGE



PRINCIPE

Le principe d'une **spectroscopie IR** est d'envoyer des **radiations IR** sur un échantillon à tester. **Certaines longueurs d'onde sont alors absorbées par les liaisons chimiques des molécules** se trouvant dans l'échantillon. On génère alors un **spectre IR**, qui permet de **déterminer ces liaisons chimiques**.

DOMAINES DE L'IR DANS LE SPECTRE ÉLECTROMAGNÉTIQUE



SPECTRE INFRAROUGE

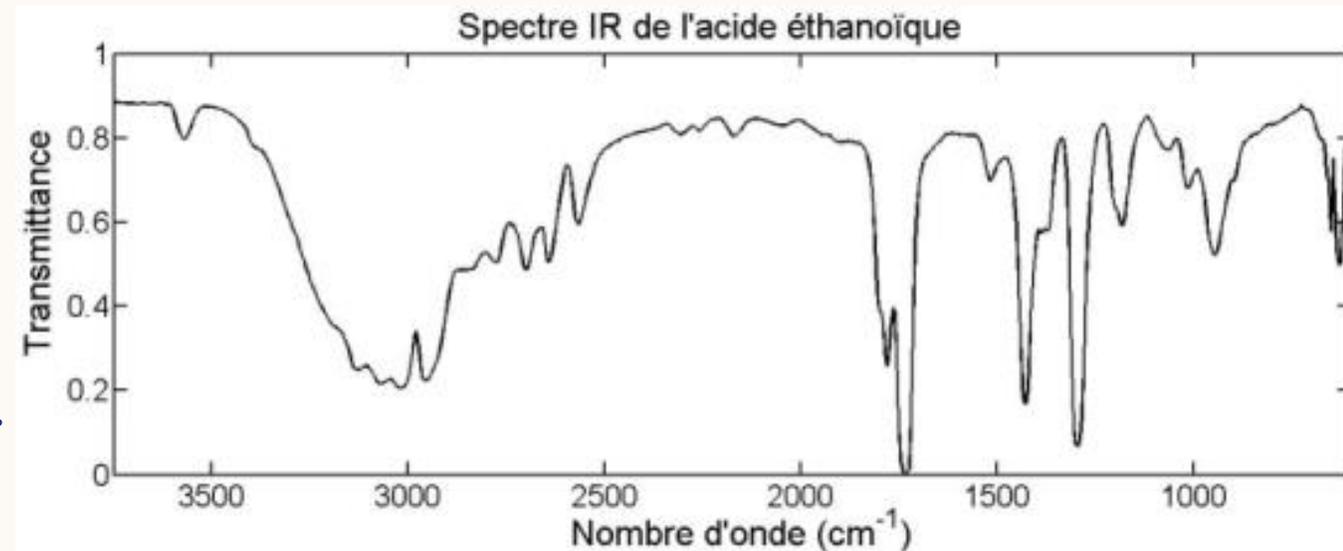
Pour chaque longueur d'onde, l'intensité transmise par l'échantillon est comparée à l'intensité incidente, afin d'en déduire la transmittance.

Pour établir le spectre, au lieu de la longueur d'onde, il est courant de manipuler le nombre d'onde, défini comme l'inverse de la longueur d'onde.

Le spectre IR représente la transmittance T fonction du nombre d'onde. L'axe des abscisses est fréquemment orienté à l'envers.

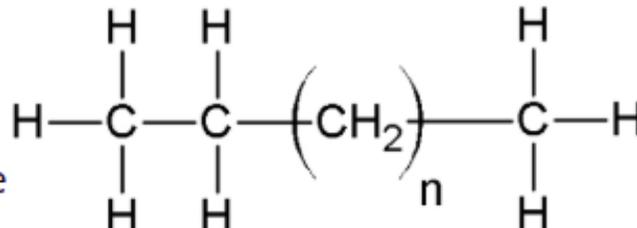
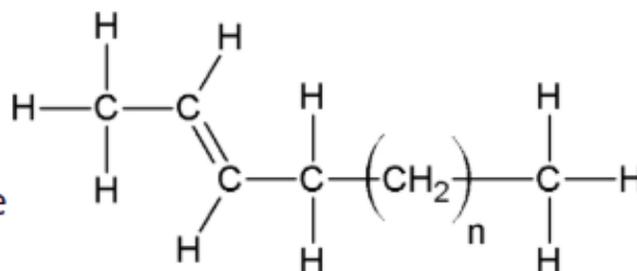
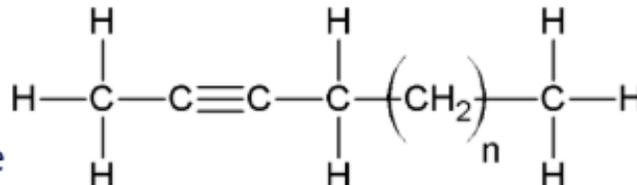
Les fortes baisses localisées de la transmittance, pour certains nombres d'onde, correspondent à l'absorption sélective des liaisons chimiques.

Ces baisses sont nommées bandes d'absorption.



EXPLOITER UN SPECTRE INFRAROUGE

La fréquence de résonance (et le nombre d'onde associé) d'une liaison chimique dépend du fait qu'elle soit une **liaison simple** ou une **liaison multiple**. D'autre part, il y a l'**influence des atomes participant à la liaison**, notamment via leur masse.

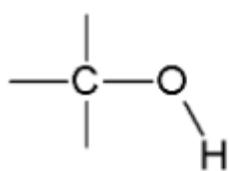
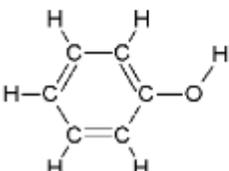
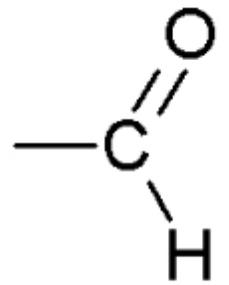
	Structure	Nombre d'onde d'absorption des liaisons
Alcane		$\sigma_{C-C} = 1100 \text{ cm}^{-1}$ (souvent invisible) $\sigma_{C-H} = 2850 - 2950 \text{ cm}^{-1}$
	uniquement des liaisons C-C	
Alcène		$\sigma_{C=C} = 1640 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{C-H} = 3050 - 3080 \text{ cm}^{-1}$ (H relié au C double liaison)
	une ou plusieurs liaisons C=C	
Alcyne		$\sigma_{C\equiv C} = 2100 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{C-H} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ (H relié au C triple liaison)
	une ou plusieurs triples liaisons	

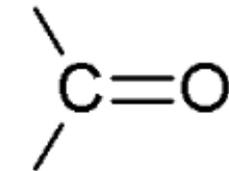
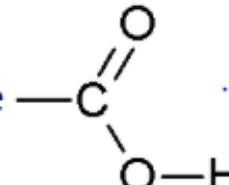
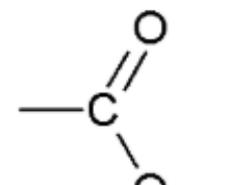
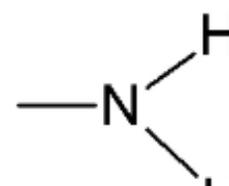
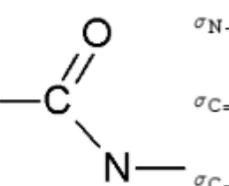
EXPLOITER UN SPECTRE INFRAROUGE

Une liaison chimique est également **influencée par son environnement** au sein de la molécule. Une **même liaison pourra présenter différents nombres d'onde d'absorption selon le groupement d'atomes dans lequel elle se trouve.**

Lors d'une spectroscopie IR, une liaison chimique impliquée dans un **groupement caractéristique** présente un **nombre d'onde d'absorption déterminé.** En conséquence, un spectre IR d'une molécule permet de déterminer ses liaisons chimiques, mais aussi d'**identifier les groupes caractéristiques.**

EXPLOITER UN SPECTRE INFRAROUGE

Groupe caractéristique	Fonction associée	Formule	Nombre d'onde d'absorption des liaisons
Hydroxyle	Alcool		$\sigma_{\text{O-H}} = 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1050 - 1250 \text{ cm}^{-1}$
Hydroxyle	Phénol		$\sigma_{\text{O-H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=C}} = 1450 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 3000 - 3100 \text{ cm}^{-1}$
Carbonyle	Aldéhyde		$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1710 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-H}} = 2650 - 2800 \text{ cm}^{-1}$
		(en fin de chaîne carbonée)	

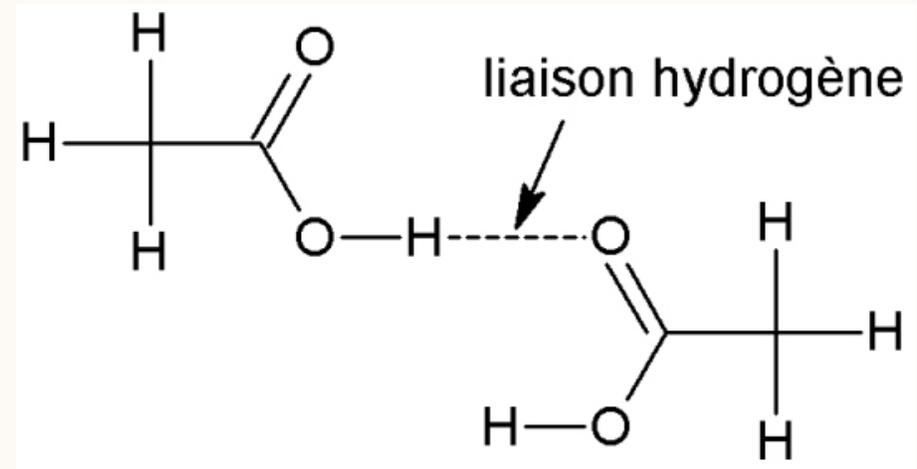
Carbonyle	Cétone		$\sigma_{\text{C=O}} = 1680 - 1690 \text{ cm}^{-1}$
Carboxyle	Acide carboxylique		$\sigma_{\text{C=O}} = 1700 - 1725 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{O-H}} = 2500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1210 - 1320 \text{ cm}^{-1}$
Ester	Ester		$\sigma_{\text{C=O}} = 1720 - 1775 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-O}} = 1200 \text{ cm}^{-1}$
Amine	Amine (primaire)		$\sigma_{\text{N-H}} = 3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-N}} = 1250 - 1350 \text{ cm}^{-1}$
Amide	Amide		$\sigma_{\text{N-H}} = 3350 - 3370 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C=O}} = 1630 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ $\sigma_{\text{C-N}} = 1040 - 1180 \text{ cm}^{-1}$

EXPLOITER UN SPECTRE INFRAROUGE

Les alcools et les acides carboxyliques, il y a possibilité de formation de **liaisons hydrogènes**, par exemple entre le H d'un groupement hydroxyle/carboxyle et un O d'une autre molécule.

La liaison hydrogène interfère sur la **liaison intramoléculaire**, ce qui conduit à une **diminution du nombre d'onde d'absorption**

de celle-ci, ainsi qu'un très fort **élargissement de la bande d'absorption** correspondante.

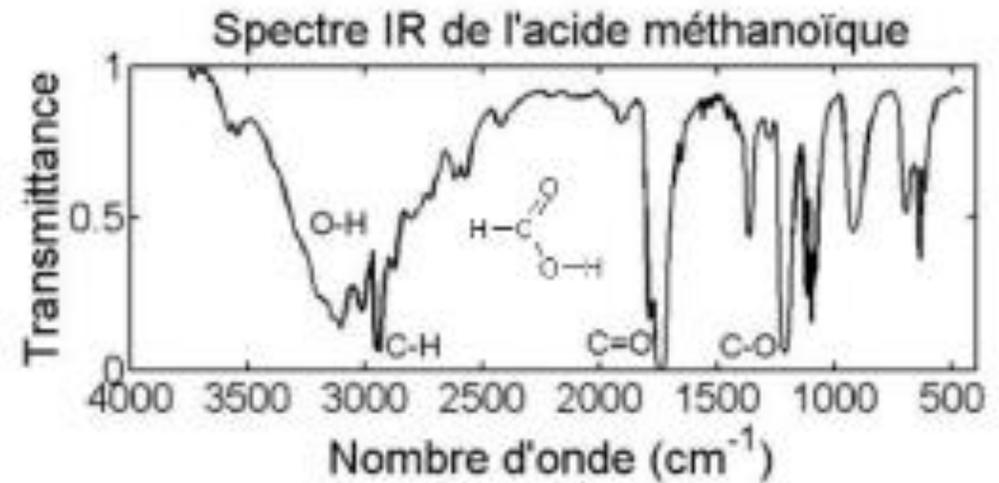
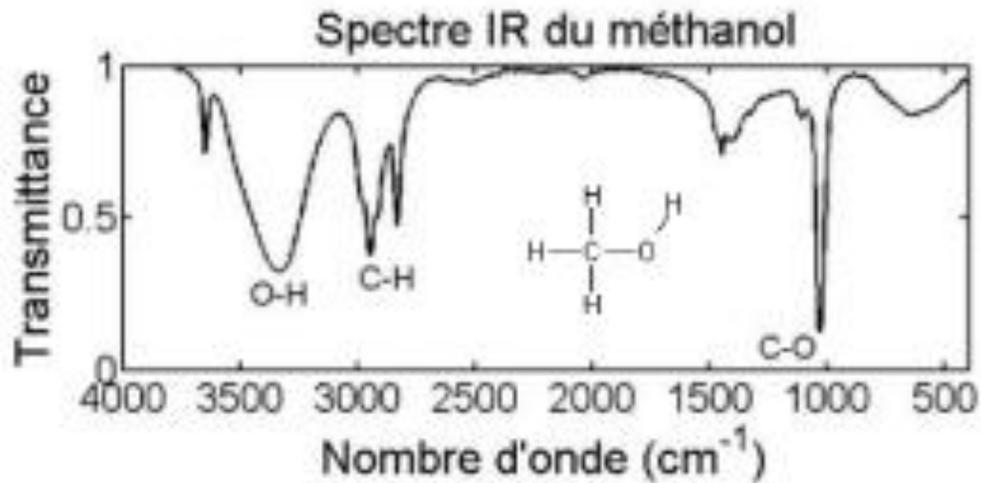
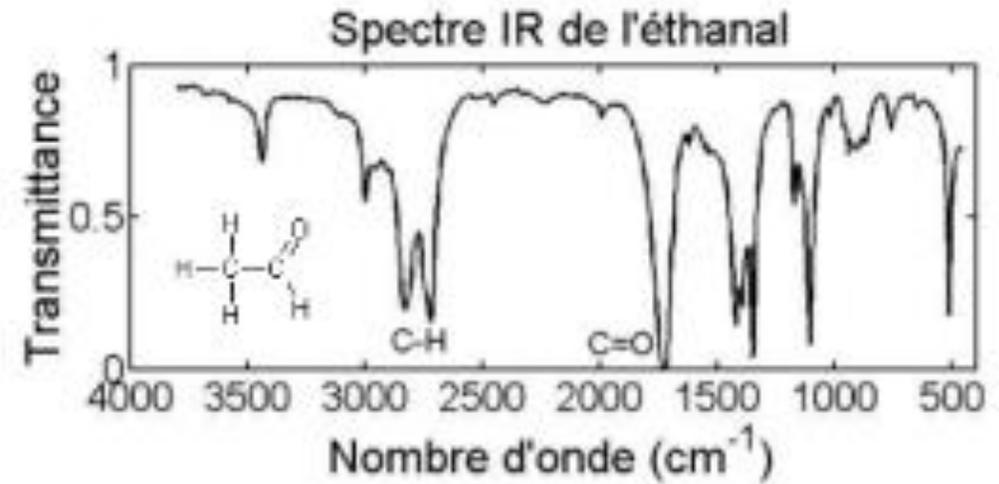
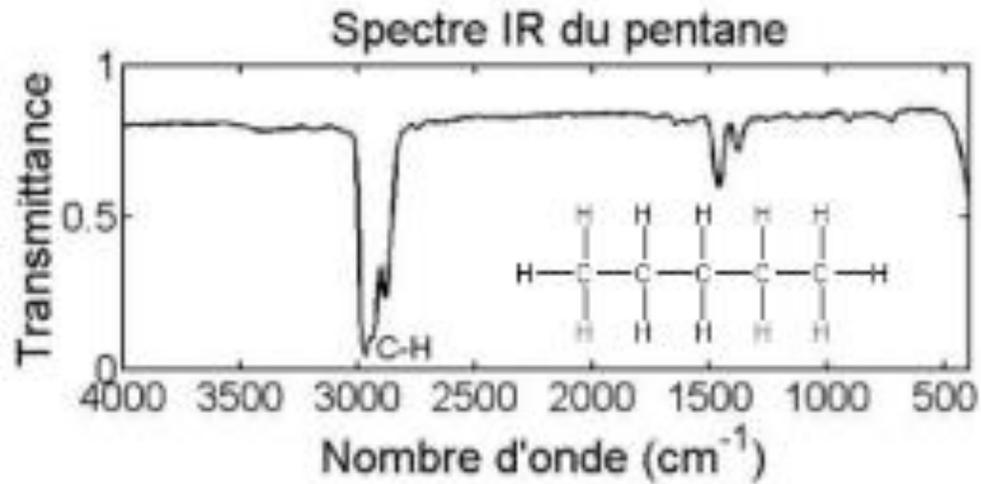


EXPLOITER UN SPECTRE INFRAROUGE

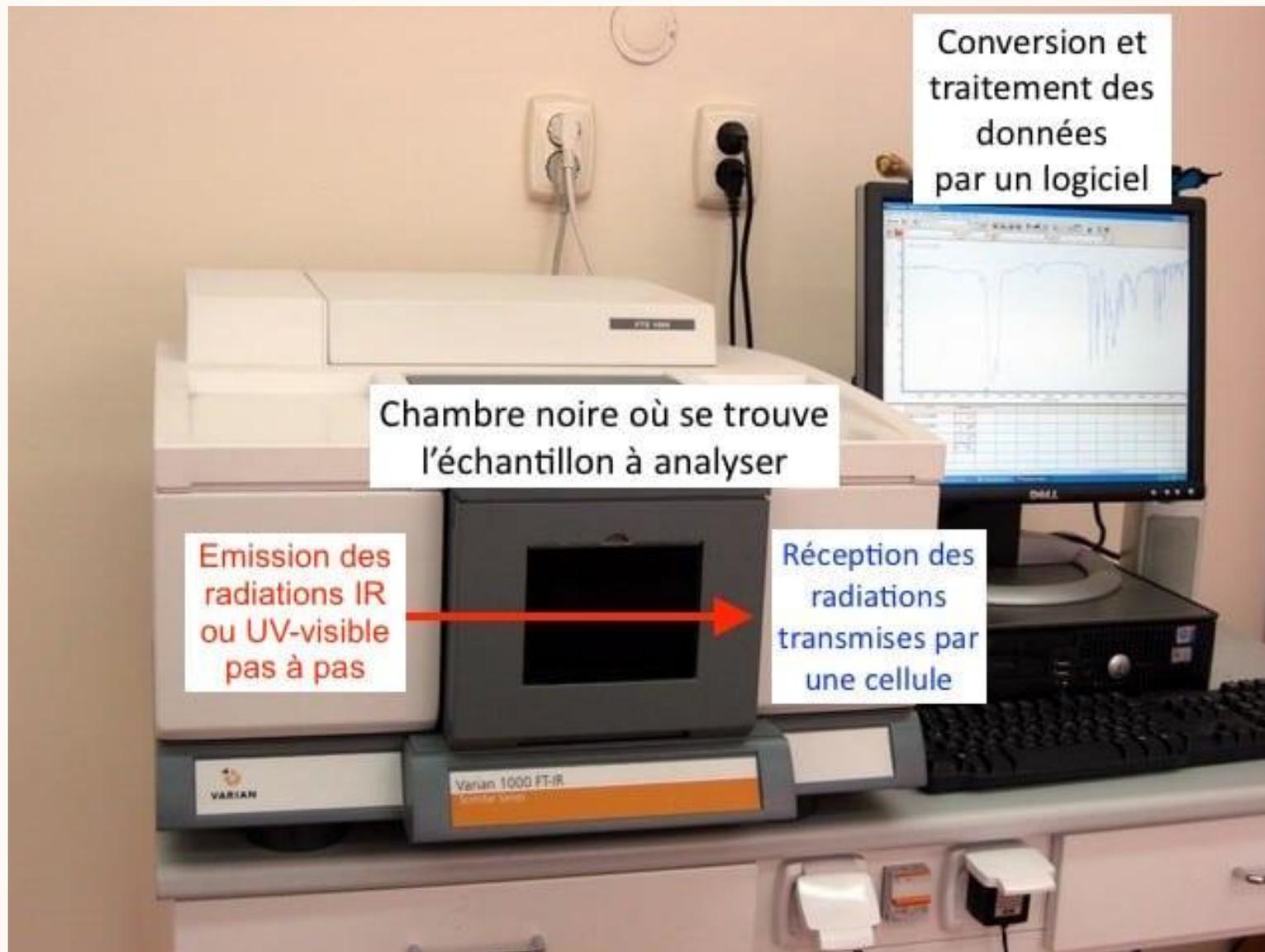
Vibrations	Domaine spectral (cm ⁻¹)	Intensité IR observée
ν (O-H)	3650–3000	v
ν (N-H)	3500–3300	m
ν (\equiv C-H)	3300	F
ν (=C-H)	3100–3000	m
ν (-C-H)	3000–2800	F
ν (C \equiv N)	2255–2220	F
ν (C \equiv C)	2250–2100	f
ν (C=O)	1820–1680	TF
ν (C=N)	1680–1610	m
ν (C=C)	1675–1600	m
δ (N-H)	1650–1500	F
ν (C=C) aromatique	1620–1450	v
ν (N=N) azo	1450–1400	f
δ (CH ₂), δ_a (CH ₃)	1480–1400	m
δ_s (CH ₃)	1380	F-m
ν (C-C)	1300–800	m-f
ν (C-Cl)	750–600	F
ν (C-Br)	650–500	F
ν (C-I)	600–450	F

TF : très forte, F : forte, v : variable, m : moyenne, f : faible

L'interprétation de ce spectre consiste à faire correspondre les **bandes d'absorption** avec les **liaisons chimiques** correspondantes, et par extension les **groupes caractéristiques** de la molécule.



APPAREILLAGE



PRÉPARATION D'UN ÉCHANTILLON INFRAROUGE

- Un **solide** sera **broyé** en présence de bromure de potassium (KBr, qui est transparent jusqu'à 400 cm^{-1}) puis **comprimé sous pression** réduite pour former une **fine pastille**. Une **autre technique** consiste à **dispenser** le **solide** dans une **paraffine** (le nujol) et à déposer la **suspension** sur une **pastille** de chlorure de sodium monocristallin (transparent jusqu'à 625 cm^{-1}).

PRÉPARATION D'UN ÉCHANTILLON INFRAROUGE



mortier



moule



presse à pastiller



pastille de KBr + échantillon

PRÉPARATION D'UN ÉCHANTILLON INFRAROUGE

- Un **liquide** sera déposé **entre deux pastilles** de chlorure de sodium monocristallin comprimées, de manière à obtenir **un film fin**, ou placé dans **une cuve** dont les fenêtres seront des monocristaux de chlorure de sodium ou de fluorure de calcium (qui a l'avantage de ne pas être altéré par l'eau). Dans le cas des **liquides purs**, l'épaisseur de la cuve est souvent trop importante pour obtenir un spectre de qualité satisfaisante.



PRÉPARATION D'UN ÉCHANTILLON INFRAROUGE

- Une autre technique, valable aussi bien pour les **liquides** que les **solides**, consiste à préparer une **solution diluée** du produit dans un **solvant**, puis à étudier cette solution dans les **cuves** précédemment décrites.

Il faut noter que **tous les solvants possèdent des bandes d'absorption en infrarouge** et qu'il est nécessaire de compenser ses bandes par une **référence**. La compensation n'étant pas toujours parfaite, les solvants utilisés pour **les solutions sont choisis pour ne pas présenter de bandes d'absorption** dans les zones particulièrement intéressante du spectre. Les plus couramment employés sont le **tétrachlorure de carbone**, le **chloroforme** et le **sulfure de carbone (CS₂)**.

PRÉPARATION D'UN ÉCHANTILLON INFRAROUGE

- une dernière technique (ATR, **Attenuated Total Reflection**), qui gagne de plus en plus en popularité, consiste à **utiliser les propriétés des ondes électromagnétiques à un dioptre formé d'un cristal de germanium ou de séléniure de zinc et du produit à analyser**, dans les conditions de réflexion totale. Dans ces conditions, il se crée dans la partie produit du dioptre une onde évanescente sur une faible épaisseur de peau, qui est absorbée en partie par le produit. Le spectre obtenu après calcul permet de conduire au spectre classique en transmittance.



TYPES DE SPECTROMÈTRE IR

- Les **différences** entre les divers types de spectromètres portent **sur la manière dont le spectre est extrait de l'expérience** proprement dite. Mais certains **éléments** sont **nécessaires** quelle que soit la technique utilisée : **la source de radiation et le détecteur de signal.**
- En infrarouge, il est nécessaire de distinguer **deux types de sources** en fonction de la **région spectrale étudiée** : pour **l'infrarouge proche**, un filament céramique dopé avec des oxydes de lanthanide (filament de Nernst) dont le comportement se rapproche de celui du corps noir est utilisé, ou, plus fréquemment, d'un Globar (carbure de silicium)

TYPES DE SPECTROMÈTRE IR

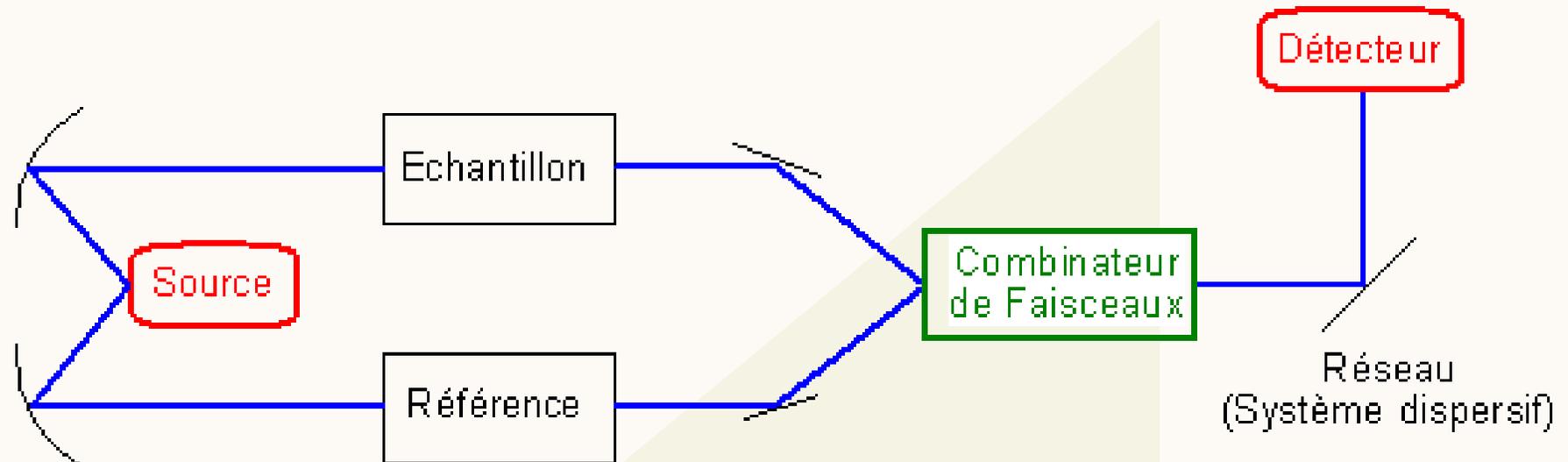
- Les **différences** entre les divers types de spectromètres portent **sur la manière dont le spectre est extrait de l'expérience** proprement dite. Mais certains **éléments** sont **nécessaires** quelle que soit la technique utilisée : **la source de radiation et le détecteur de signal.**

On distingue deux types de spectromètres :

- **Spectromètre à onde continue**
- **Spectromètre à transformée de Fourier**

SPECTROMÈTRE À ONDE CONTINUE

Cette technique, relativement ancienne, nécessite **un temps important** puisque **chaque longueur d'onde** doit être **traitée séparément**, la **résolution** étant d'autant **plus grande** que la **vitesse de balayage** est lente, si l'on ajoute la **perte d'énergie** associée et la **faible sensibilité**, on peut aisément comprendre que cette technique soit aujourd'hui de plus en plus **abandonnée** au bénéfice des appareils à transformée de Fourier.

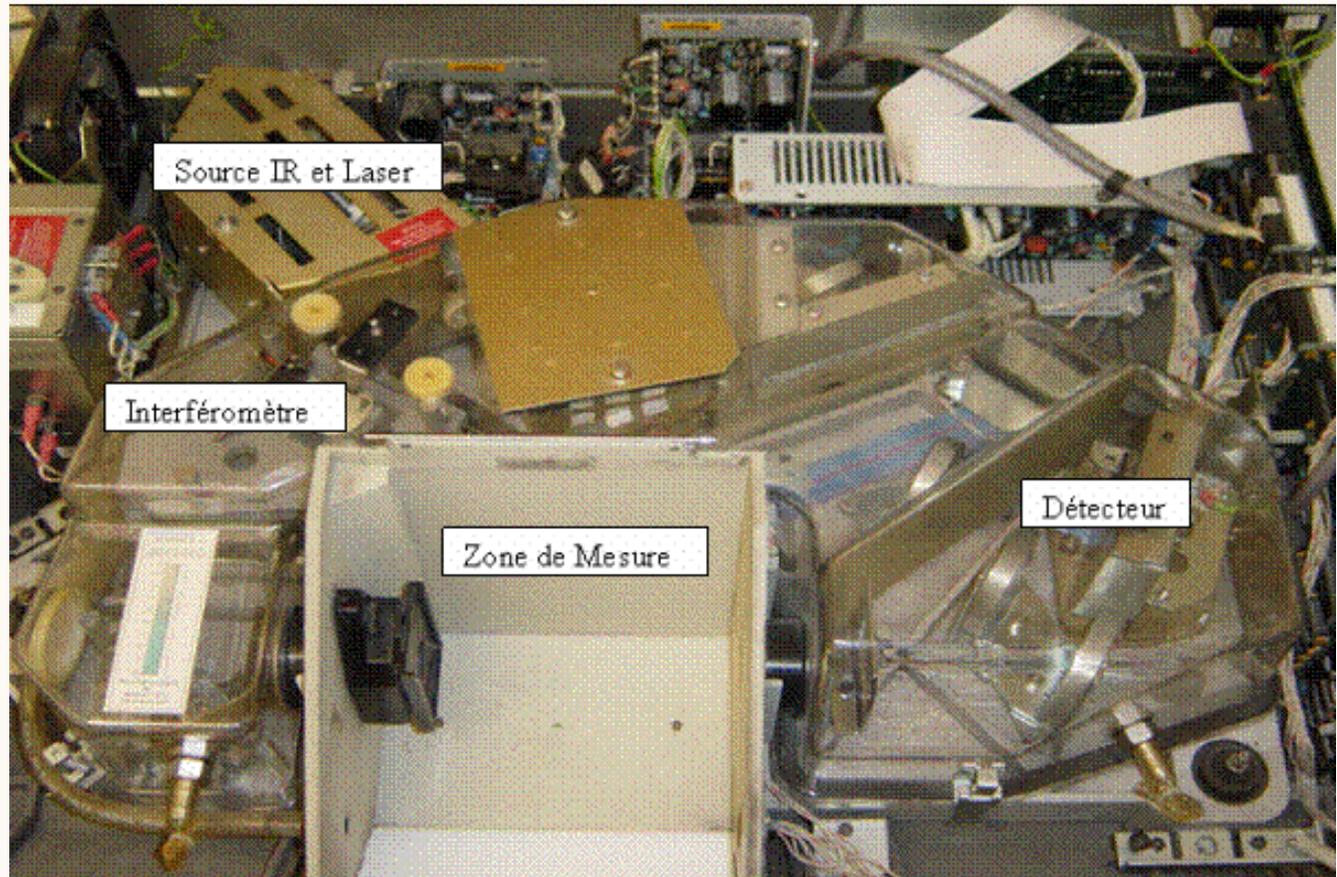


SPECTROMÈTRE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

Le spectromètre est conçu pour faire de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, souvent dénommée « spectroscopie FT-IR ». L'**interféromètre** est le cœur du dispositif. Il **collecte simultanément toutes les longueurs d'onde d'un spectre infrarouge**, ce qui réduit considérablement les temps d'acquisition.

SPECTROMÈTRE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

L'avantage de cette technique est que l'ensemble des longueurs d'onde est étudié **simultanément**, ce qui conduit à un **gain de temps important** et permet l'acquisition de **plusieurs spectres** augmentant le rapport signal/bruit de celui-ci. La **résolution** est aussi **meilleure**.

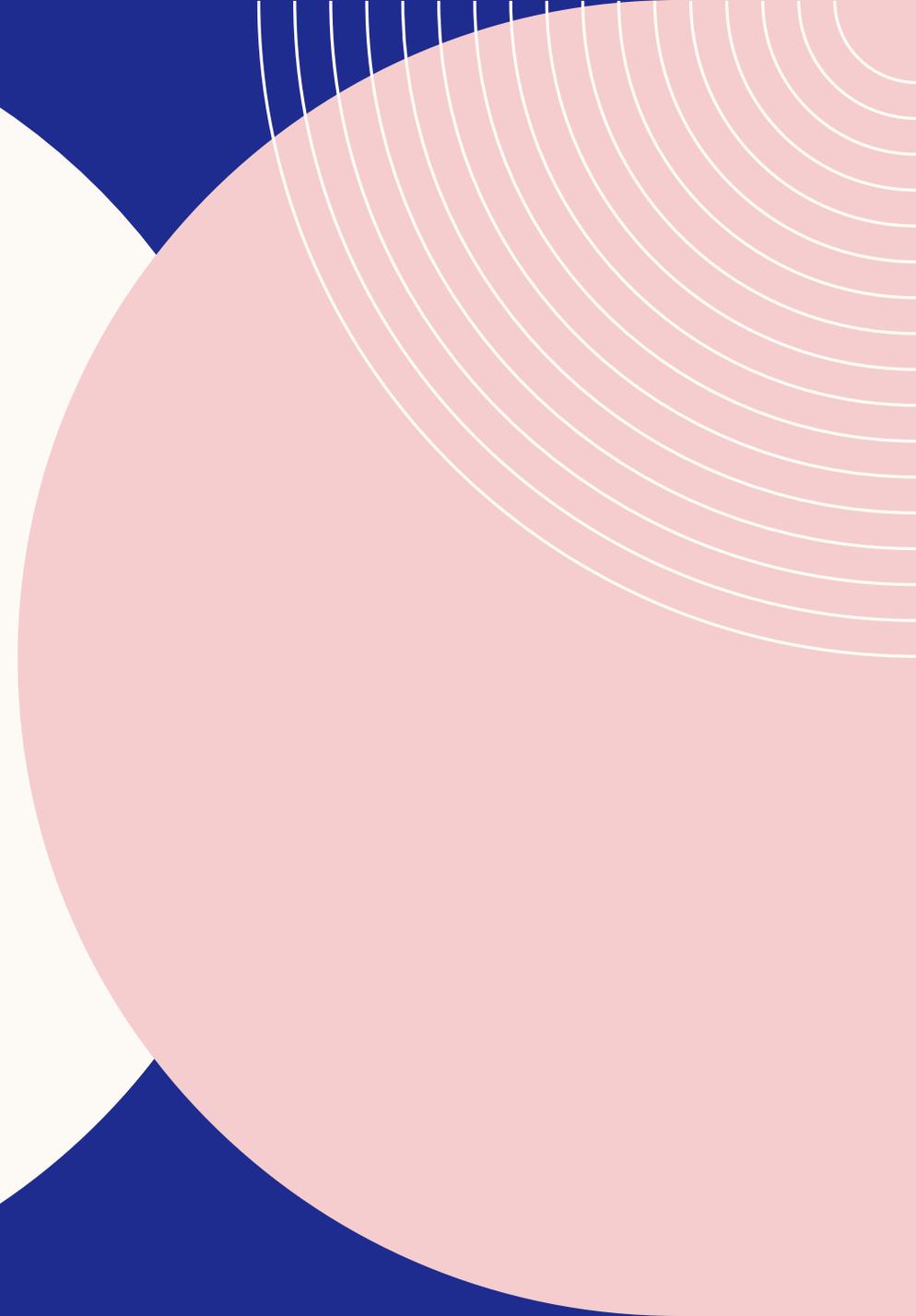


APPLICATIONS

- Identifier et caractériser une molécule inconnue, en référençant ses liaisons.
- Tester la présence ou l'absence d'une molécule dans un échantillon.
- Dans certains cas, procéder à un dosage d'une espèce chimique.

SPECTROSCOPIE

RMN



DÉFINITION

La spectroscopie RMN, abréviation de **spectroscopie par résonance magnétique nucléaire**, est une **technique d'analyse** principalement utilisée pour découvrir la **structure des molécules**. Elle est basée sur le **comportement de certains noyaux dans un champ magnétique externe**.

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire RMN fournit à l'utilisateur une **représentation visuelle des pics de résonance associés aux atomes ou aux groupes fonctionnels composant un composé**. Grâce à la spectroscopie RMN, les chercheurs peuvent déterminer la **composition d'une molécule**, ainsi que sa **structure potentielle**.

PRINCIPE

Il existe deux types **principaux** de **spectroscopie RMN**, utilisant des molécules basées de **^1H** et **^{13}C** .

Les molécules contenant ^1H et ^{13}C possèdent des **noyaux** avec des **moments magnétiques**. Lorsque ces composés sont exposés à un **champ magnétique**, les **noyaux** se mettent à tourner. La **fréquence** de cette rotation peut alors être utilisée pour produire une représentation visuelle du composé basée sur la **réponse** du composé au **champ magnétique**.

PRINCIPE

Lorsqu'il effectue une **spectroscopie RMN**, le scientifique doit d'abord déterminer s'il va travailler avec des éléments suivants ^1H et ^{13}C . Ensuite, le **spectromètre**, l'instrument utilisé pour effectuer l'analyse **RMN**, sera réglé sur la **fréquence** associée à l'un ou l'autre des composés suivants ^1H et ^{13}C .

La molécule sera ensuite dissoute dans un solvant **deutééré**. Les solvants **deutéérés** contiennent du **deutérium**, un **isotope lourd** de l'hydrogène. Les solvants **deutéérés** sont utilisés, car le **spectromètre** ne détecte pas la présence de **deutérium**, ce qui permet à la machine d'obtenir une lecture précise des molécules contenues dans la solution.

PRINCIPE

La cuvette contenant l'échantillon est ensuite placée entre les deux pôles d'un **aimant puissant**. On fait tourner l'échantillon pour répartir uniformément le **champ magnétique**. Ensuite, un **rayonnement de radiofréquence (rf)** est appliqué à l'échantillon ; les atomes qui absorbent l'**énergie rf** produisent un **signal de résonance**. Un récepteur spécial est passé au-dessus de l'échantillon pour acquérir ces lectures de **signaux de résonance** à partir du **spectromètre**.

À partir de ces relevés, une représentation visuelle des signaux est affichée dans un format graphique appelé **spectre RMN**.

PRINCIPE

Certains **noyaux d'atome** peuvent posséder un **spin nucléaire** (rotation d'une particule sur elle-même). Lorsqu'un tel noyau est plongé dans un **champ magnétique**, son **énergie** va évoluer selon la valeur du champ appliqué et selon son spin (orienté dans le sens du champ ou opposé au champ).

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est le fait que **l'énergie du proton** (noyau d'hydrogène) **change en absorbant une radiation électromagnétique**.

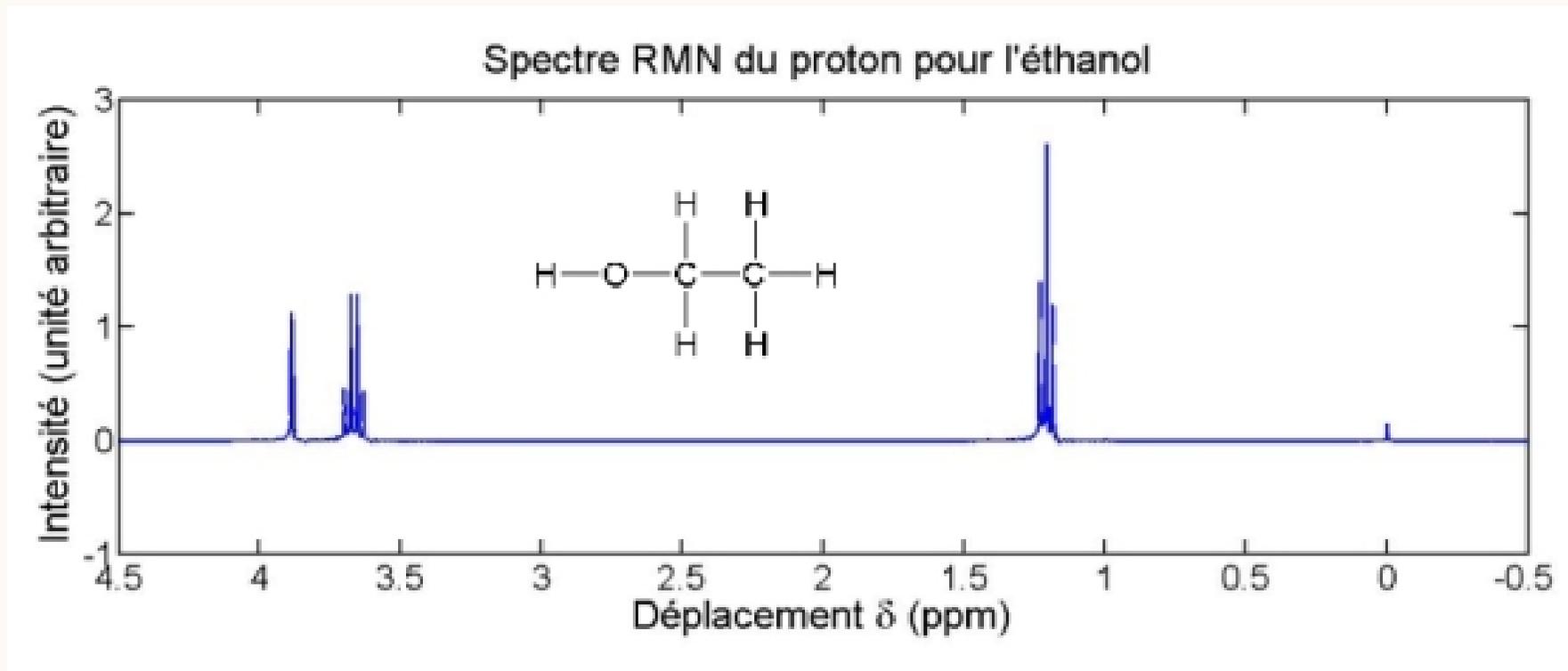
DÉPLACEMENT CHIMIQUE

Dans la pratique, le proton, en tant que noyau d'un atome d'hydrogène, est affecté par la présence des électrons de son proche environnement : le sien et ceux des atomes voisins. Cela se manifeste par une **légère modification de sa fréquence de résonance**. Ce phénomène est le **déplacement chimique**.

Un spectre RMN du proton fournit des **renseignements sur l'environnement des atomes d'hydrogène d'une molécule**, via la mesure des fréquences de résonance des protons correspondants. Il existe d'autres spectres RMN, comme celui du deutérium, du carbone 13, etc. Le carbone 12 n'a pas de spin nucléaire, donc ne peut pas servir en RMN.

DÉPLACEMENT CHIMIQUE

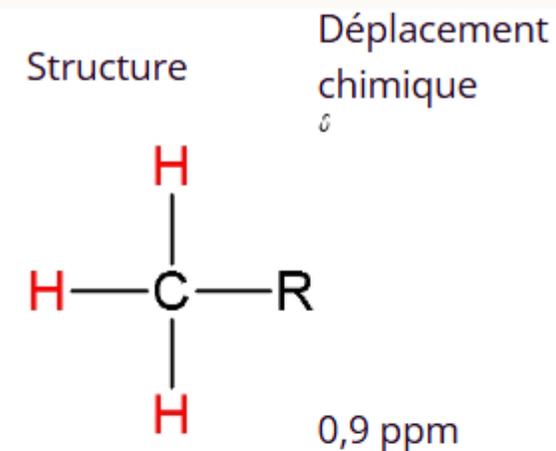
Un spectre RMN du proton représente les **pics de résonance des protons en fonction du déplacement chimique**. Un pic (ou un groupement très rapproché de pics) est désigné sous le terme de **signal** en RMN.



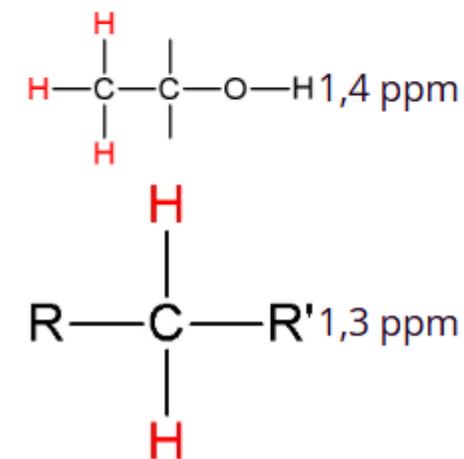
EXPLOITATION D'UN SPECTRE RMN DU PROTON

Des **tables** ont été établies afin de donner la correspondance entre le déplacement chimique et l'environnement des atomes d'hydrogène associés.

Dans la pratique, en cas d'ambigüité, le spectre RMN du proton est exploité en même temps que le **spectre IR** de la même molécule.



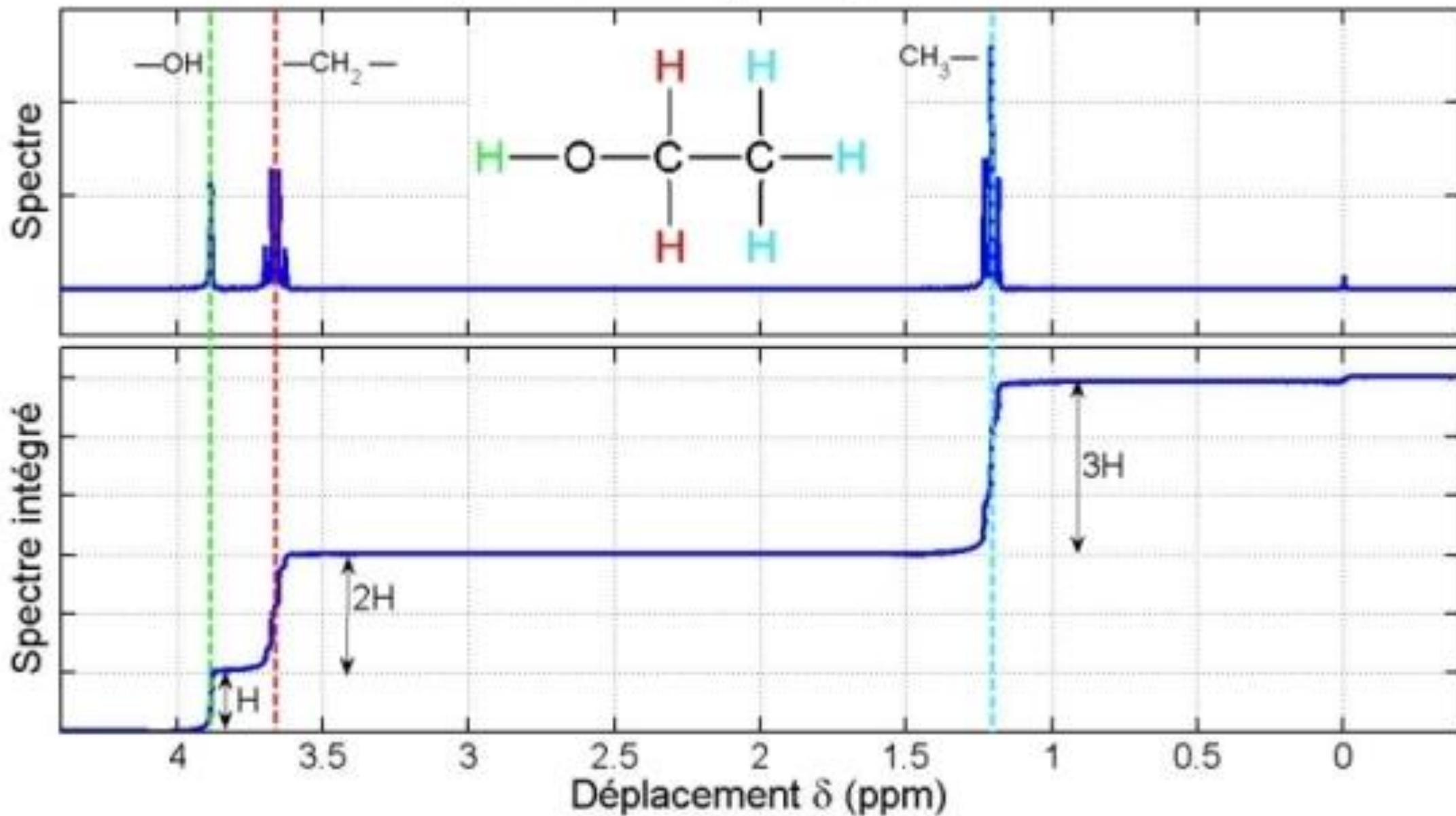
R est une chaîne carbonée linéaire sans liaison multiple





Spectre RMN du proton pour l'éthanol

L'ét
int
l'or
poi



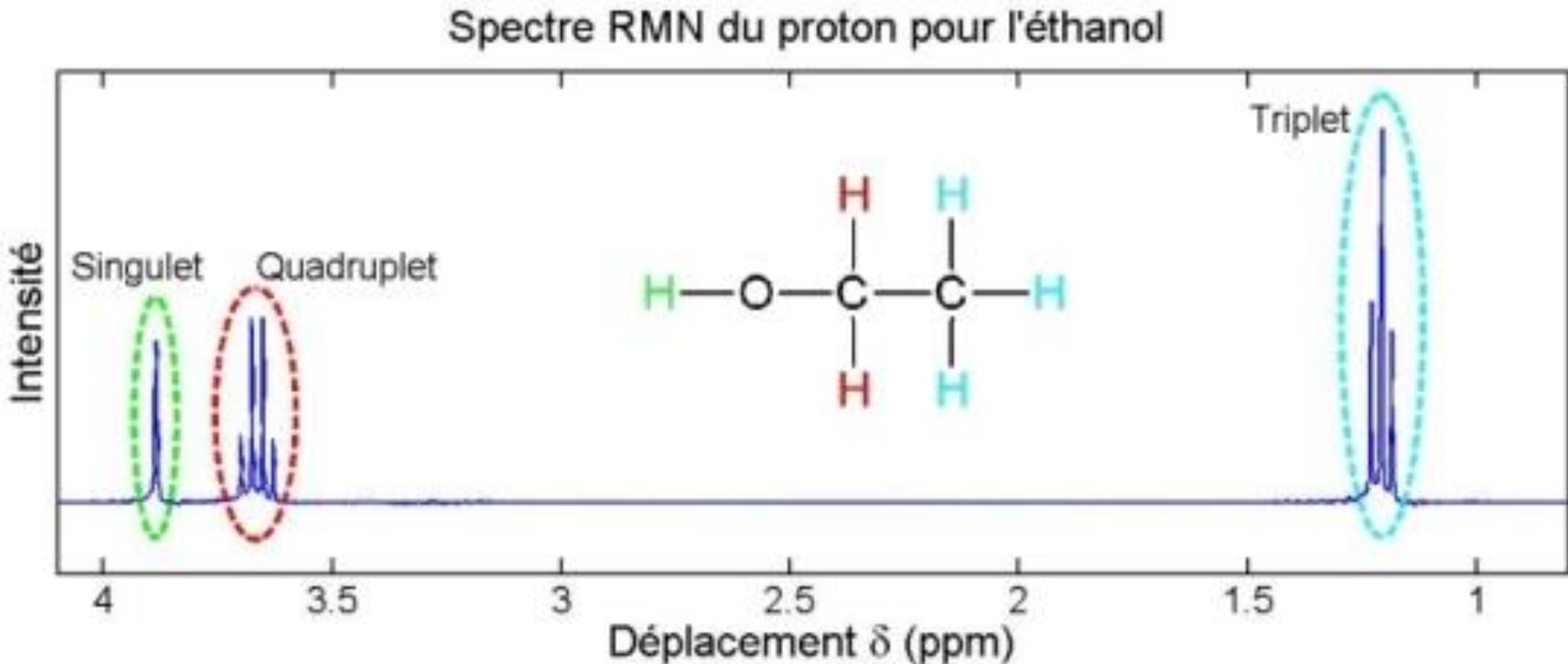
MULTIPLICITÉ D'UN SIGNAL

Sur le spectre de l'éthanol, il apparaît une démultiplication des certains signaux. On parle de **multiplets**. Ce phénomène apporte des renseignements supplémentaires sur l'environnement proche des protons. Considérons un groupe de protons équivalents A . Si A a pour voisin un autre groupe de protons équivalents B , de **fréquence de résonance différente**, B va perturber légèrement la résonance de A , d'où cette démultiplication. On dit qu'il y a **couplage** entre les deux groupes de protons A et B . En parallèle, **il n'y a pas couplage entre protons équivalents** (au sein de A par exemple).

MULTIPLICITÉ D'UN SIGNAL

La règle des $(n+1)$ -uplets explique que lorsque des protons équivalents ont dans leur

proc
don
la p
proc
dire



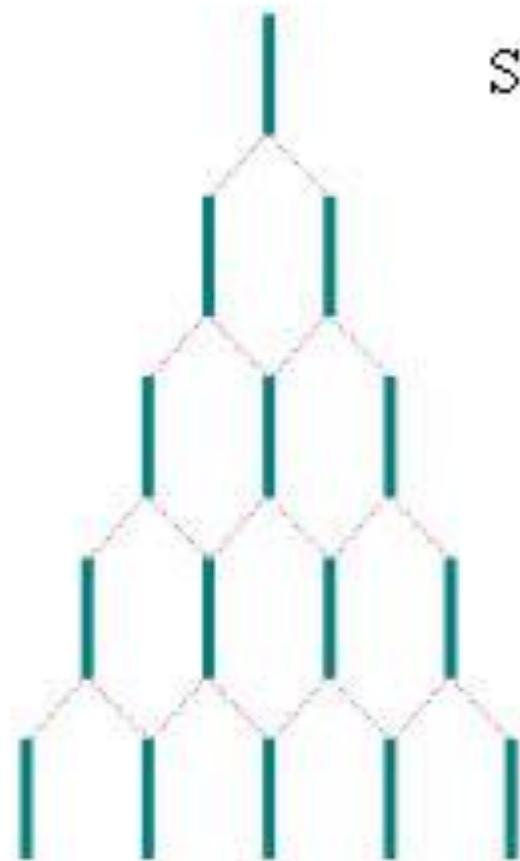
ela
uns
ons
iés

COUPLAGE SPIN-SPIN

Le **déplacement chimique** est la première information apportée par le spectre RMN sur la structure de la molécule. La seconde provient de la **structure fine des massifs** qui découle du **couplage spin-spin**. Ce couplage noté **J** s'effectue par le **biais des électrons de liaisons** et ne concerne donc que les **voisins proches** du noyau considéré.

Dans le cas où un proton a un seul voisin, l'influence de celui-ci entraînera un **dédoublé du pic**. L'espacement entre les deux pics est noté **J** et s'appelle la constante de couplage.

COUPLAGE SPIN-SPIN



Singulet - pas de couplage

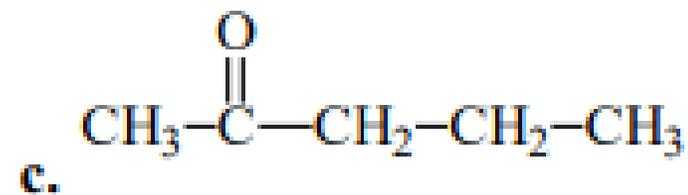
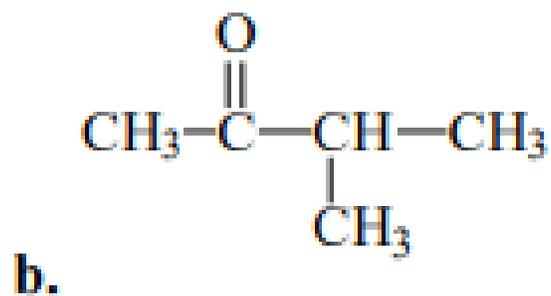
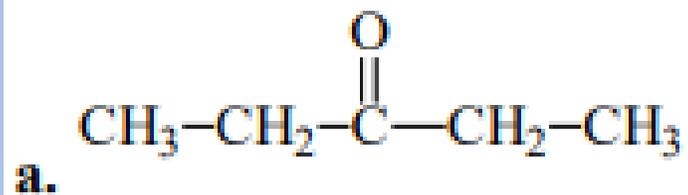
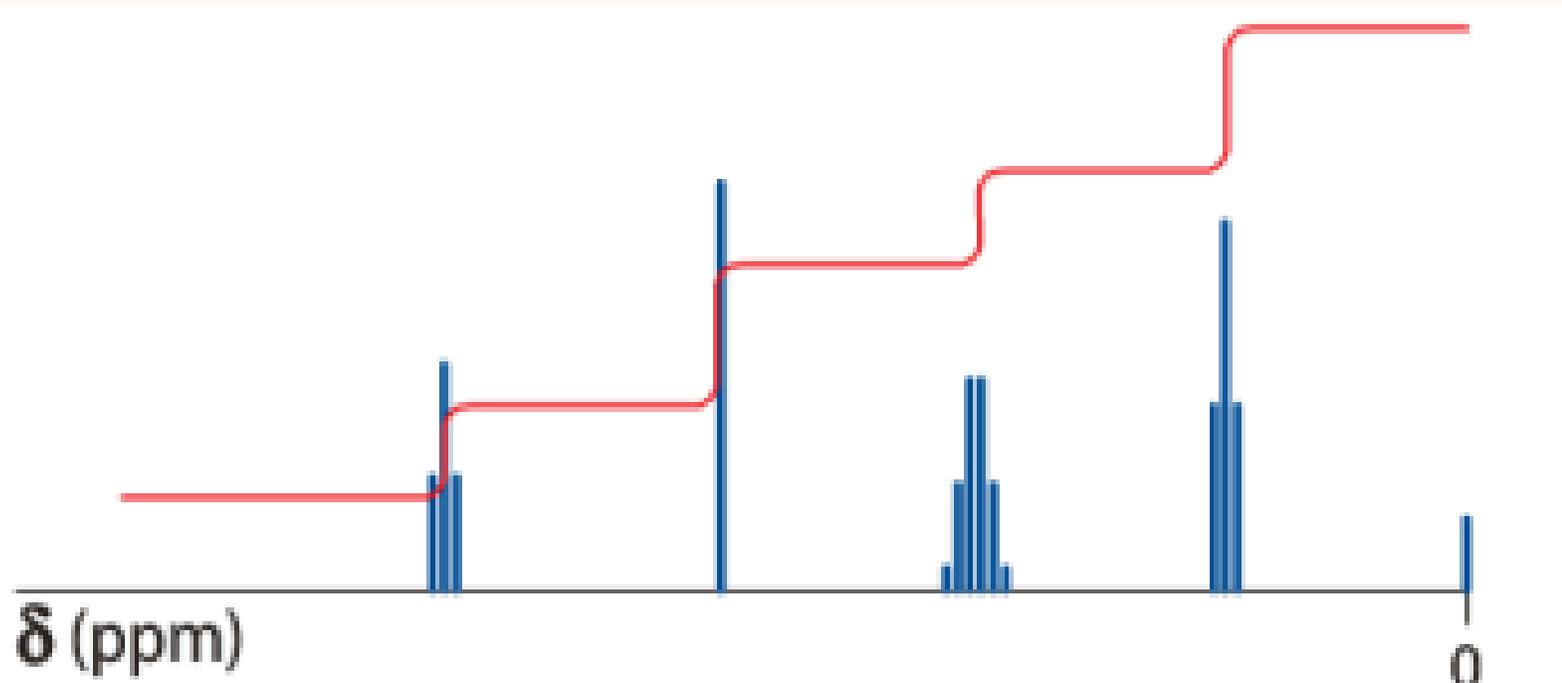
Doublet - 1 H voisin

Triplet - 2 H voisins

Quadruplet - 3 H voisins

Quintuplet - 4 H voisins

EXEMPLE DE SPECTRE RMN



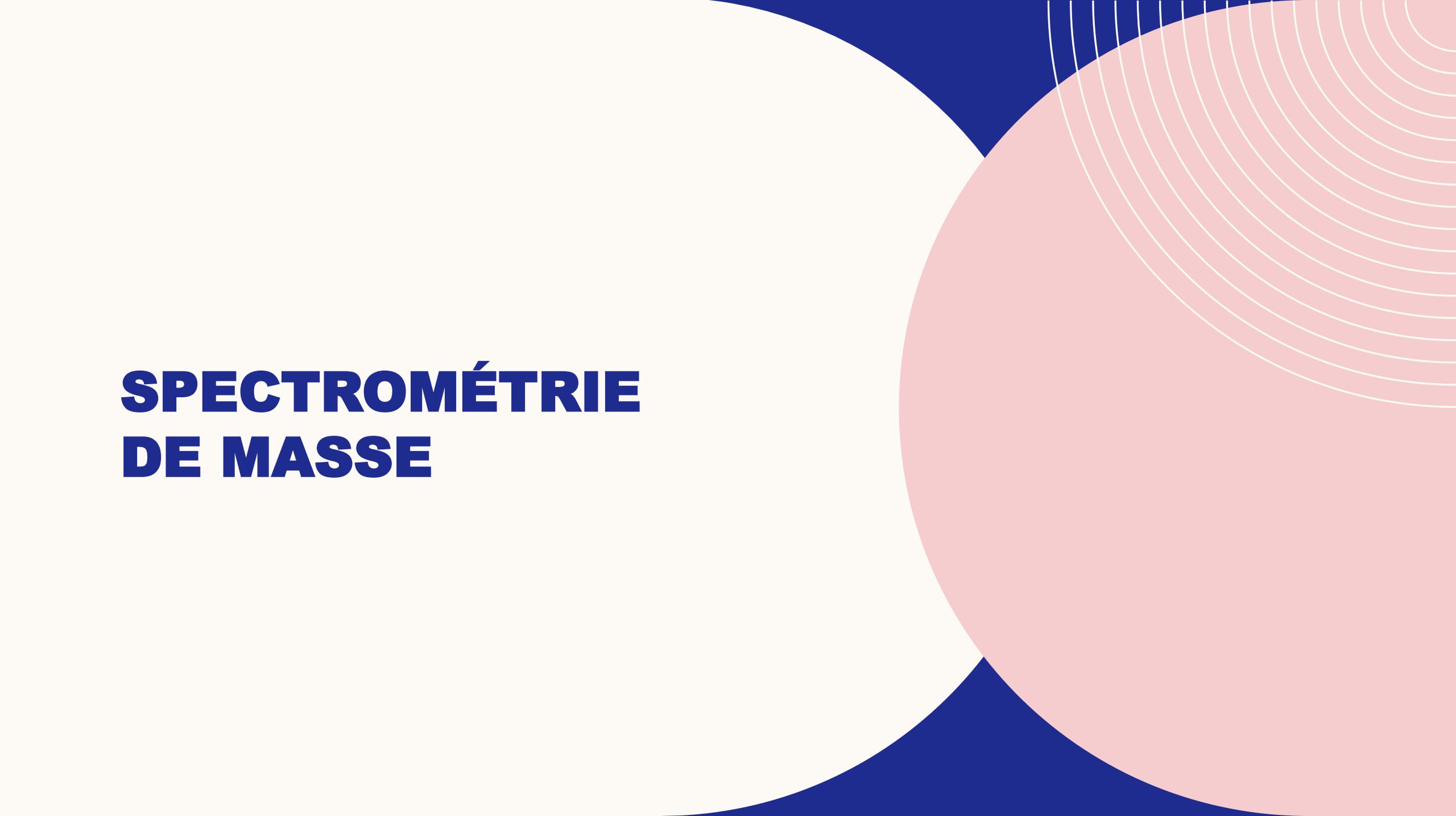
APPLICATIONS

La **spectroscopie RMN** a de nombreuses **applications** dans la science moderne.

Comme nous l'avons vu, sa fonction première est d'analyser la structure et la forme des molécules. Cependant, elle est également **utilisée** aux fins suivantes :

- Détermination du repliement des protéines.
- Criblage et conception de médicaments.
- Déterminer comment les molécules interagissent dans les réactions chimiques.
- Déterminer la proportion de solides et de liquides dans les lipides.

SPECTROMÉTRIE DE MASSE



DÉFINITION

La **spectrométrie de masse** (ou spectroscopie de masse) est une méthode utilisée pour déterminer la **masse atomique** des atomes/molécules d'un échantillon en **ionisant** une espèce chimique et en **triant** les ions en fonction de leur **rapport masse/charge**.

La plupart des **spectromètres de masse** utilisent une technique appelée **ionisation par impact électronique (EI)**. Cette technique utilise un faisceau d'électrons pour retirer un électron (ou des électrons) d'une **molécule**, formant ainsi un **cation radical**. Ce cation radical est également appelé **ion parent** ou **ion moléculaire**.

PRINCIPE

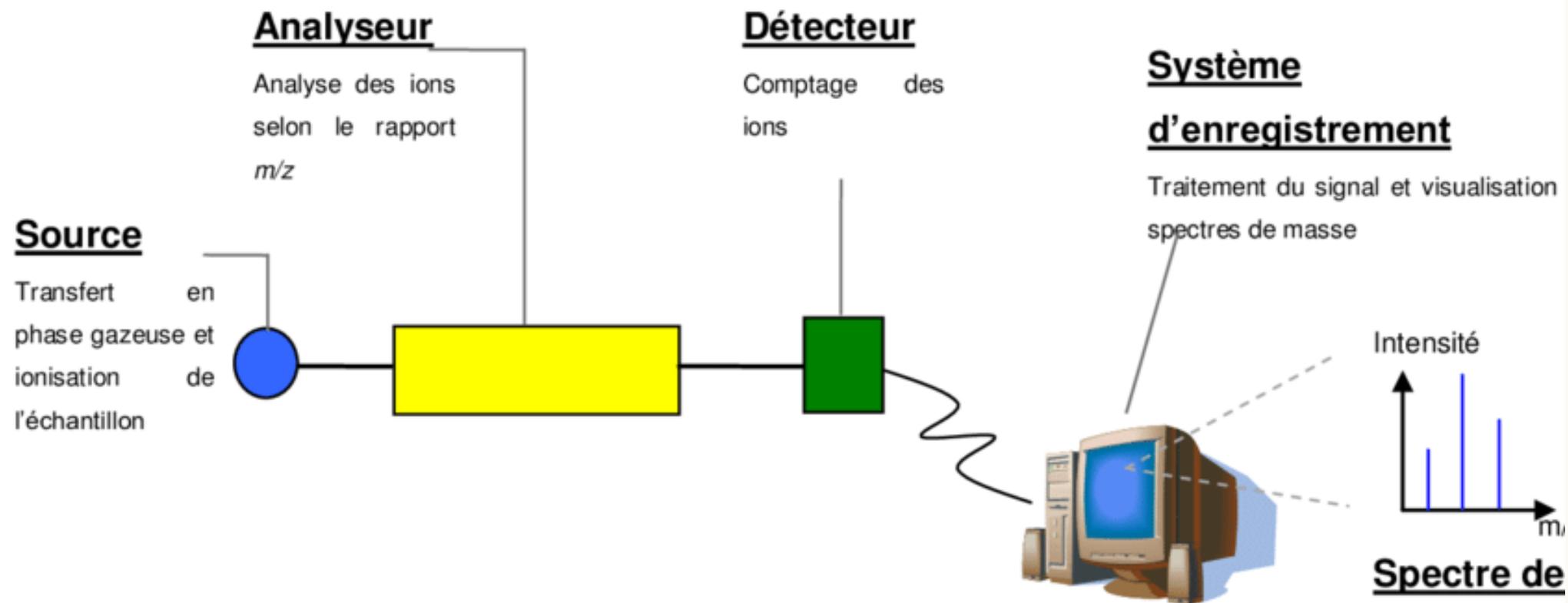
La spectroscopie de masse repose sur le principe de séparation des ions selon leur rapport masse/charge (m/z). Voici les étapes fondamentales :

- **Ionisation** : Transformation des molécules en ions chargés. Une méthode courante est l'**électrospray**, qui disperse les molécules en fines gouttelettes.
- **Séparation** : Les ions sont séparés par un analyseur en fonction de leur rapport m/z , souvent en utilisant un **champ magnétique** ou **électrique**.
- **Détection** : Les ions séparés sont détectés, et les informations sont converties en un **spectre de masse**, illustrant l'abondance des ions en fonction de leur rapport m/z .

Ces étapes permettent l'identification et la quantification des composés présents dans un échantillon.

PRINCIPE

LA SPECTROMETRIE DE MASSE

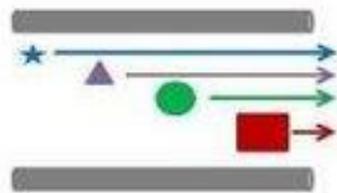


MS SIMPLE

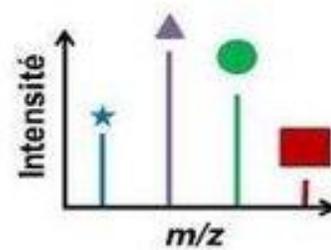
Source



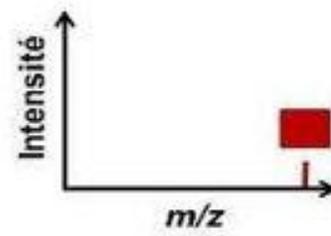
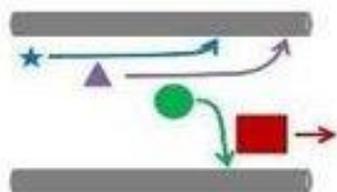
Analyseur



Décteur +
Traitement informatique

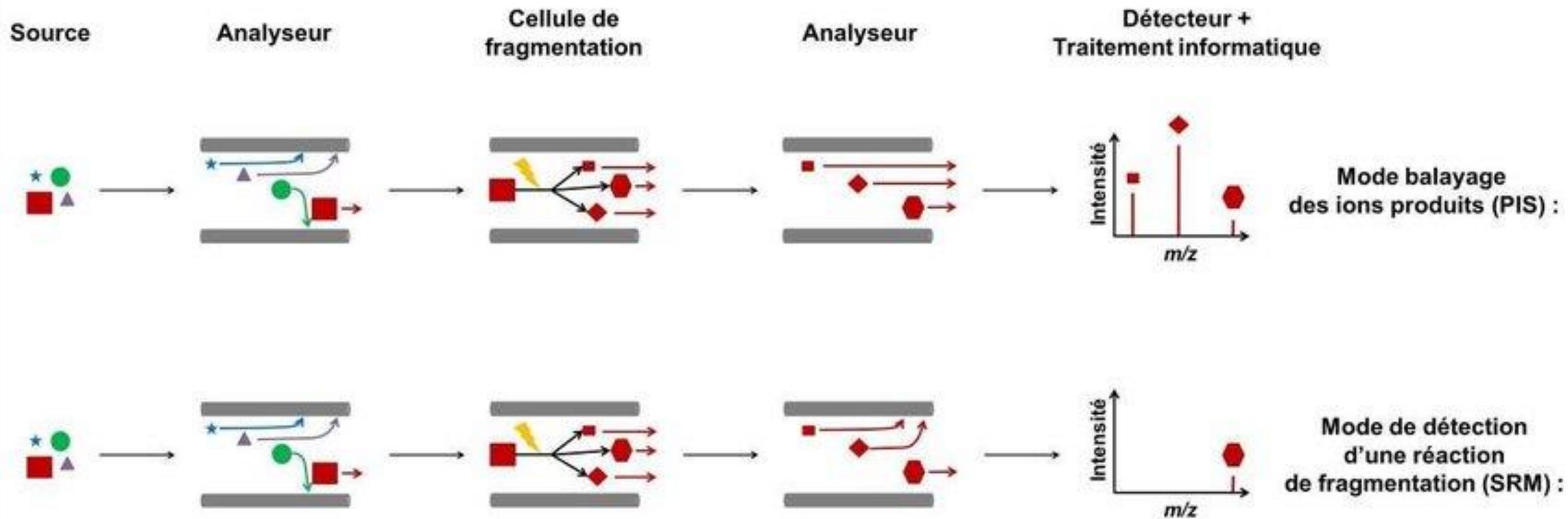


Mode
balayage (FS) :



Mode de détection
d'ion sélectionné (SIM) :

MS/MS (2 ANALYSEURS)



APPLICATION

La spectroscopie de masse est utilisée dans de nombreux domaines scientifiques et médicaux :

- **Chimie analytique** : Identification des substances chimiques.
- **Biologie moléculaire** : Étude des protéines et acides nucléiques.
- **Médecine légale** : Analyse des substances toxiques.
- **Pharmaceutique** : Analyse des médicaments.

Avec une large gamme d'applications, cette technique est essentielle pour les découvertes scientifiques modernes.

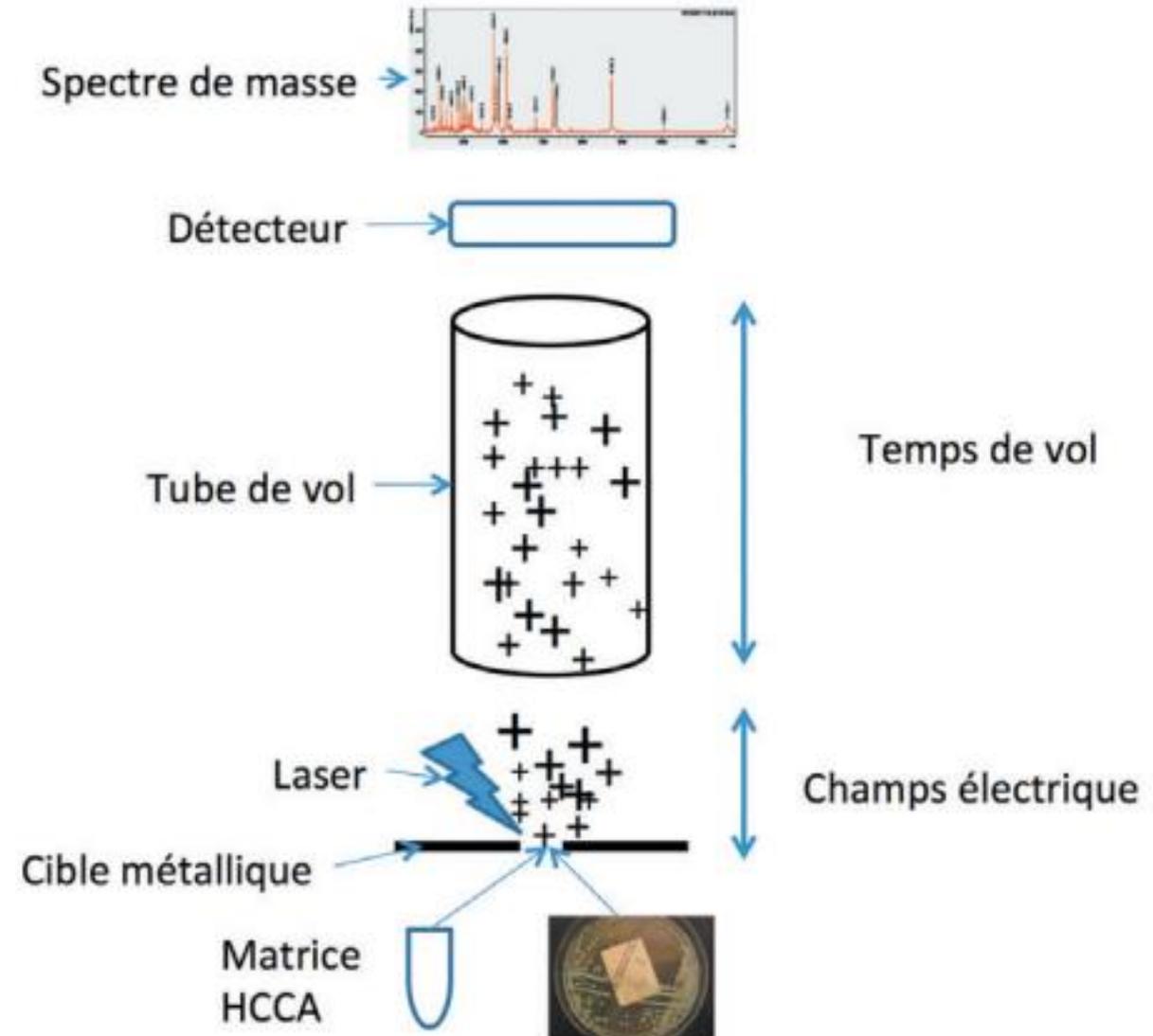
APPLICATION

Une utilisation fascinante de la spectroscopie de masse est l'**analyse isotopique** qui permet de **suivre les changements dans les isotopes naturels des échantillons**. Par exemple, en géochimie, cela aide à étudier l'âge des roches par la méthode de datation isotopique, qui se base sur la **transformation radioactive des isotopes**.

EXEMPLE D'APPLICATION

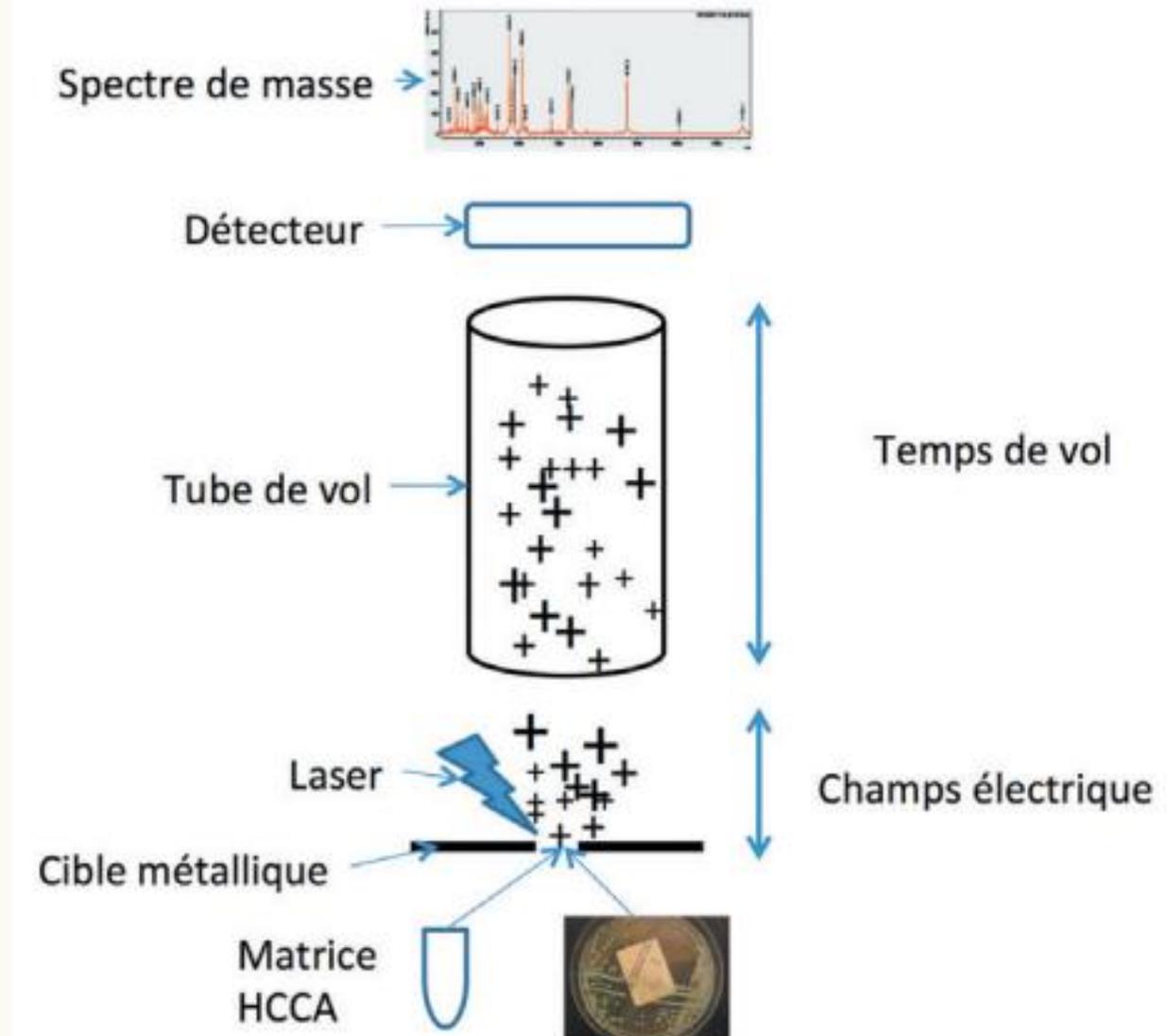
La spectrométrie de masse (SM) est une technique de détection et d'identification de microorganismes entiers par mesure de leur masse.

La SM à ionisation douce de type MALDI-TOF associe une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionisation) et un analyseur de temps de vol (TOF, time-of-flight).



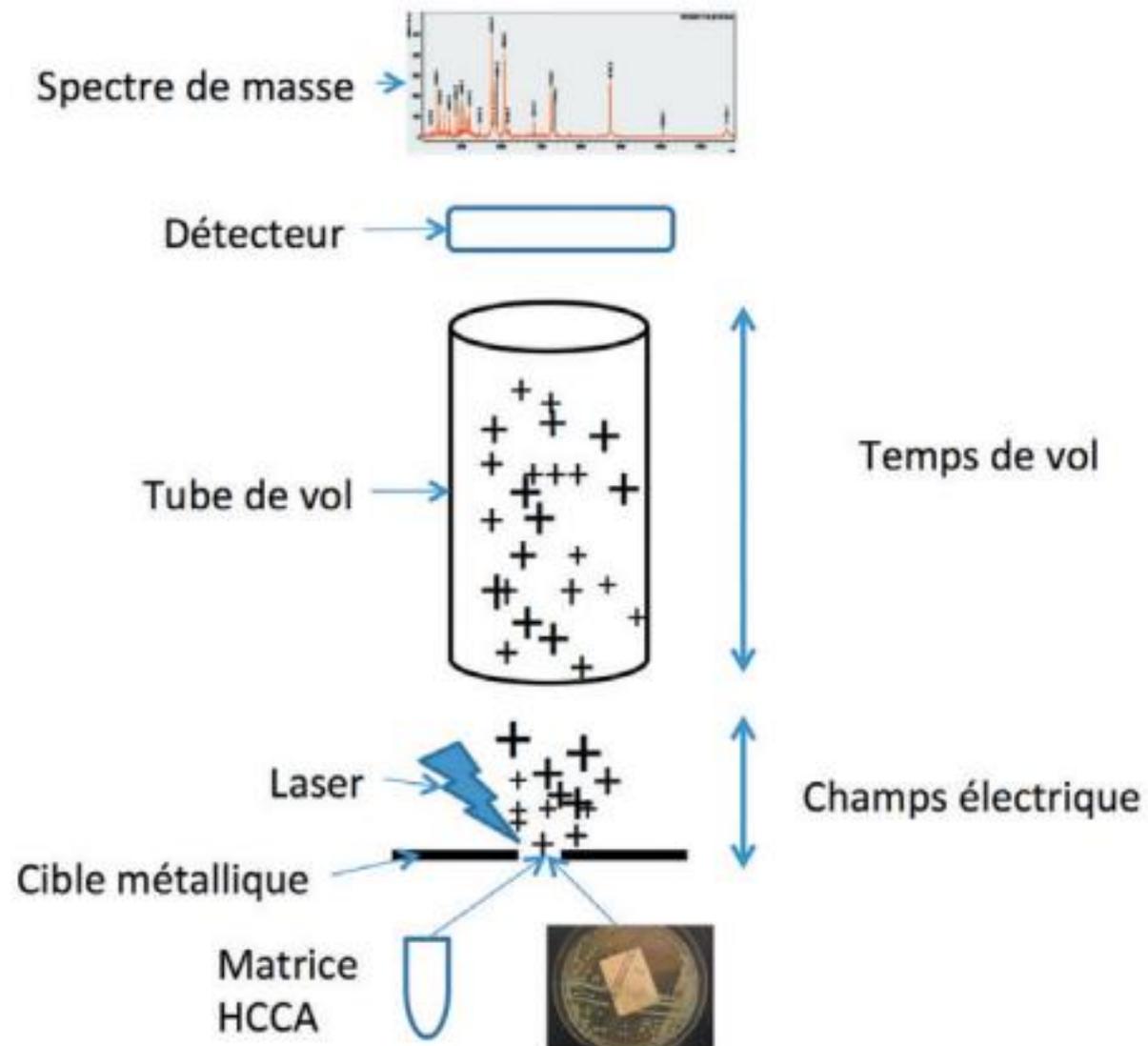
EXEMPLE D'APPLICATION

1. Une phase d'ionisation et de désorption de l'échantillon : l'échantillon et la matrice sont déposés sur un support métallique (cible) ou ils vont **co-cristalliser** après l'évaporation des solvants. L'ensemble est soumis au **tir d'un faisceau laser UV**. Le rôle de la matrice est **d'absorber l'énergie provenant du laser**, ce qui **provoque la vaporisation** (étape de désorption) de l'échantillon puis l'ionisation permettant ainsi la **formation d'ions de masses différentes**.



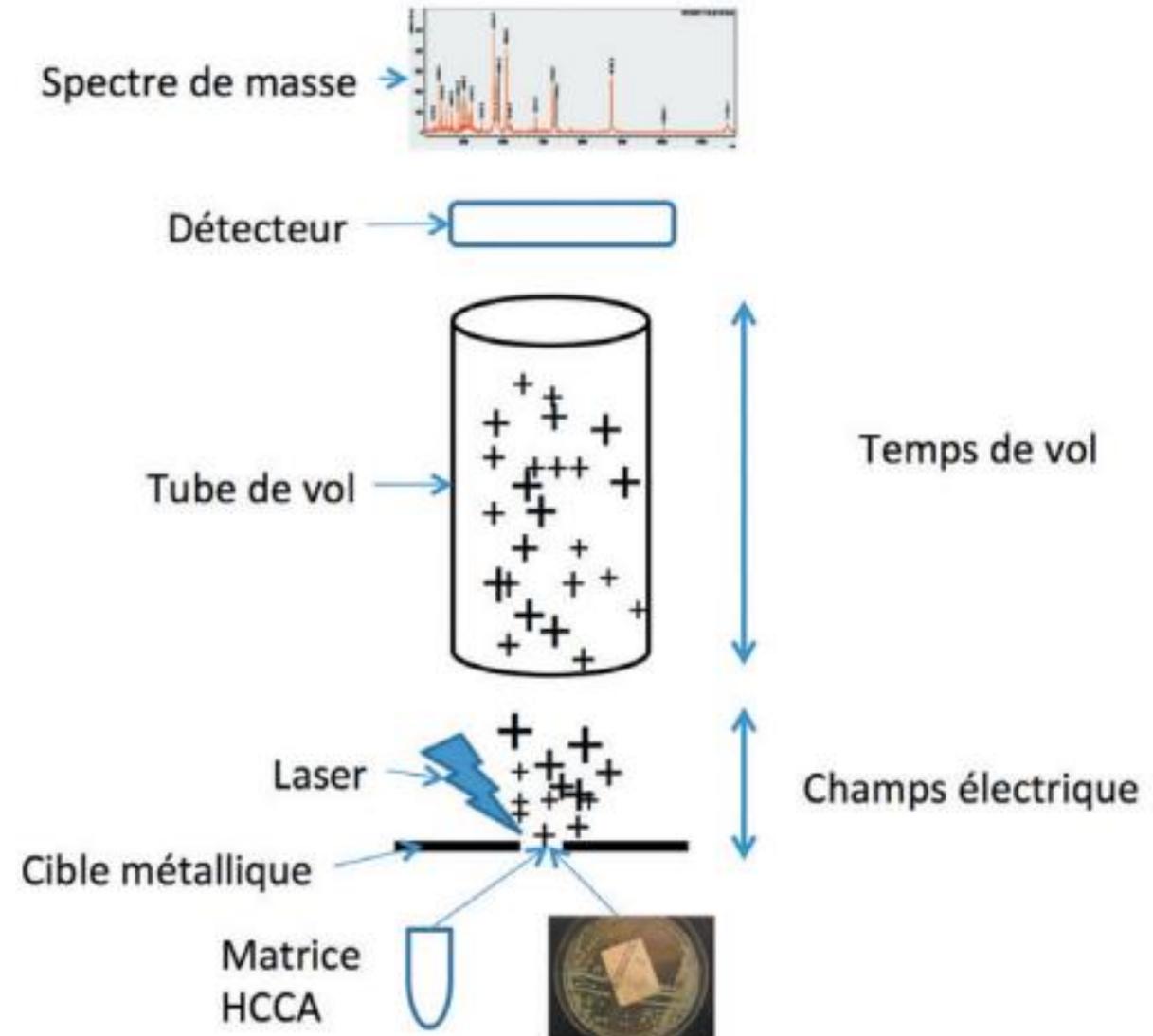
EXEMPLE D'APPLICATION

2. Une phase de « vol » : les molécules ionisées sont ensuite accélérées et séparées dans une **colonne de vide** – ou « tube de vol » – au sein de laquelle est appliqué un **champ électrique**. L'accélération des molécules est proportionnelle à leur charge (z) et inversement proportionnelle à leur masse (m). La phase de « vol » permet **d'individualiser les molécules de l'échantillon selon leur rapport m/z** .

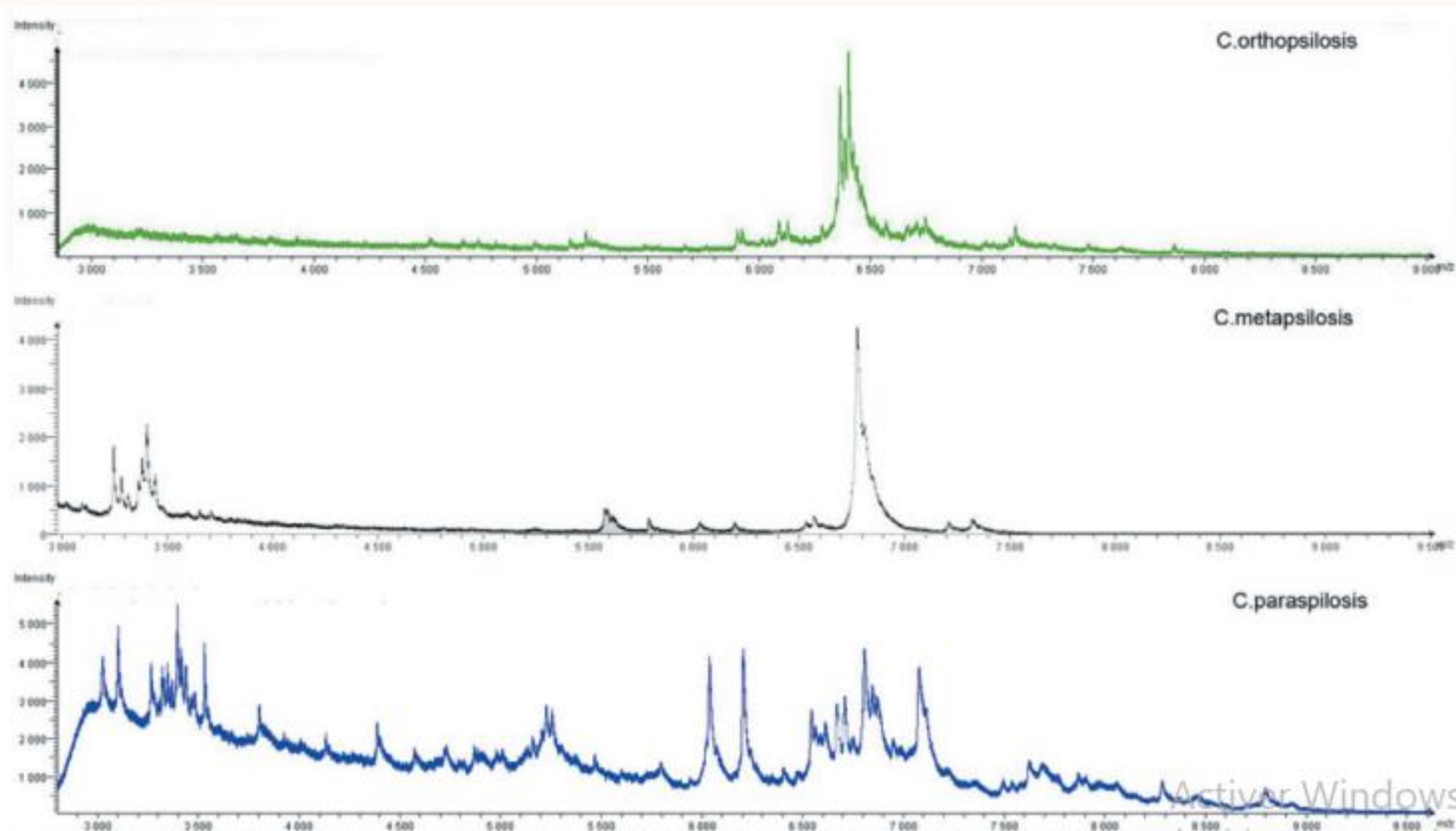


EXEMPLE D'APPLICATION

3. Une phase de détection : à l'extrémité de la colonne se situe un **détecteur** qui transforme l'**information électrique** (produite par les ions à la fin de leur vol) en un **courant électrique**. L'information est ensuite amplifiée puis numérisée selon le **temps de vol (TOF)**. Le résultat est un **spectre de masse** représenté sous la forme d'un graphique. Classiquement, l'axe des abscisses correspond au **rapport masse sur charge (m/z)** et l'axe des ordonnées à l'**intensité relative du signal**.



EXEMPLE D'APPLICATION



Active Windows
Accédez aux paramètres

AVANTAGES ET LIMITES

Les avantages de la spectroscopie de masse incluent :

- **Haute sensibilité** : Capacité à détecter de faibles concentrations.
- **Précision** : Identification précise des composés.
- **Polyvalence** : Utilisable pour une vaste gamme de composés.

Cependant, elle présente aussi des limites :

- **Coût élevé** : Les instruments peuvent être chers.
- **Complexité** : Les résultats nécessitent une interprétation experte.
- **Sensibilité aux interférences** : Peut être affectée par d'autres ions présents dans l'échantillon.