

Généralités sur les analyses spectrophotométriques

La spectrophotométrie est l'étude des interactions entre le rayonnement et la matière [9]. Ces interactions se font par échange d'énergie à l'intermédiaire de photons. La plus simple de ces interactions est l'émission de la lumière par un corps chauffé ou par décharge électrique.

Une autre interaction importante est l'absorption des radiations électromagnétiques par certaines substances [10]. Cette dernière interaction constitue la base fondamentale de la SAM qui est une technique qui permet de déterminer la concentration d'une substance dans une solution traversée par une radiation de longueur d'onde connue. Selon la nature des espèces à doser et selon la précision et l'exactitude que l'on cherche à atteindre, différentes méthodes sont mises en œuvre.

Dans ce chapitre nous nous évertuerons à présenter une étude bibliographique succincte sur l'absorption de rayonnement dans les domaines de l'UV/Visible et de l'Infrarouge (IR) avant de passer en revue ses applications aux analyses spectrophotométriques.

I. Absorption de rayonnement

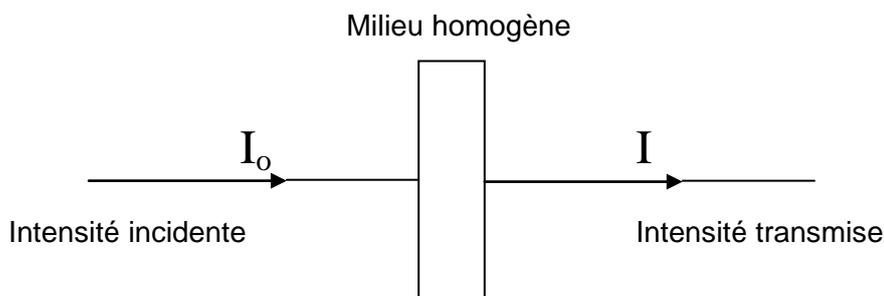


Figure 1 : Absorption partielle d'un rayonnement par un milieu homogène

Lorsqu'un faisceau lumineux pénètre dans un milieu homogène, trois éventualités peuvent se produire [24] :

- l'intensité transmise I est égale à l'intensité incidente I_0 ; il n'y a pas d'absorption : on dit que le milieu est transparent ;
- l'intensité transmise I est nulle ; il y a absorption totale : on dit le milieu est opaque ;

- l'intensité transmise I est non nulle mais inférieure à l'intensité incidente I_0 ; il y a absorption partielle : on dit que le milieu est partiellement absorbant ou semi-transparent.

Il y a donc absorption d'un faisceau quand ce dernier disparaît totalement ou est atténué au contact d'un milieu homogène. En langage spectrophotométrique, l'absorption est la transition d'un électron d'une orbitale à une autre plus énergétique.

L'analyse des radiations transmises a permis de déterminer le spectre d'absorption de la substance qui n'est rien d'autre que la représentation graphique traduisant la quantité de lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde [12].

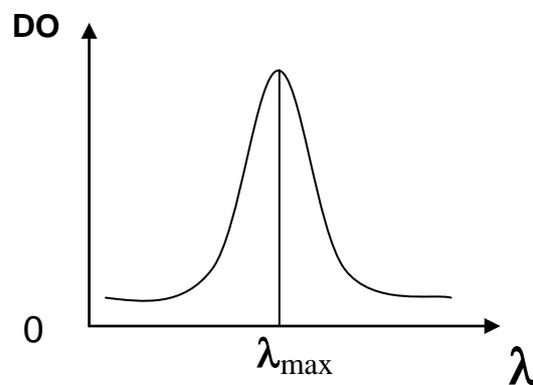


Figure 2 : Spectre d'absorption d'une substance

λ_{\max} est la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la substance.

I.1 Absorption dans le domaine de l'UV/Visible

Le domaine de l'UV/Visible comprend : UV (185-400 nanomètres) et le visible (400-800 nanomètres). L'absorption lumineuse dans ce domaine résulte de l'interaction entre les photons incidents de la radiation et les espèces de l'échantillon [27]. En fait, l'interaction entre ces particules va impliquer des transitions électroniques au sein des molécules de l'échantillon conduisant à un changement des états électroniques, vibrationnels et rotationnels entraînant ainsi une absorption [37, 38].

I.2 Absorption dans le domaine de l'infrarouge (IR)

Ce domaine comprend : le proche IR (1 à 2,5 μm), le moyen IR (2,5 à 50 μm) et l'IR lointain à partir de 50 μm . L'absorption de la lumière dans ce domaine a pour origine l'interaction entre les radiations lumineuses de la source et les liaisons

chimiques de l'échantillon [27]. Bien que le rayonnement IR ne soit généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, il peut induire des transitions entre les états vibrationnels et rotationnels associés à l'état électronique fondamental de la molécule.

L'absorption, en général, est étudiée quantitativement par une loi fondamentale appelée loi de Beer-Lambert.

I.3 Loi de Beer-Lambert : additivité et conditions de validité

I.3.1 Loi de Beer-Lambert

Cette loi est énoncée comme suit : si un faisceau monochromatique de photons d'intensité initiale I_0 traverse une cuve de longueur l (généralement 1cm) contenant une solution de concentration c (mol/l), dont le coefficient d'absorption molaire est ϵ , l'intensité I une fois la cuve traversée aura comme valeur : $I = I_0 e^{-\epsilon lc}$ [37, 38].

L'intensité lumineuse n'est pas toujours l'information la plus intéressante à traiter, c'est pourquoi on définit la transmission T , telle que, $T = \frac{I}{I_0}$ souvent exprimée en pourcentage.

La représentation graphique de $T = f(c)$ est une courbe complexe dont le tracé demande un grand nombre de points. L'utilisation de la fonction logarithmique permet de transformer ces courbes complexes en droites croissantes.

Ainsi, $\log \frac{1}{T}$ définit la densité optique (DO) ou absorbance (A) dont l'utilisation pratique est possible grâce au caractère linéaire de sa représentation graphique.

La loi de Beer-Lambert s'écrit donc $A = DO = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon lc$.

On dispose ainsi d'une grandeur physique appelée densité optique (DO) mesurable par SAM à l'aide d'un spectrophotomètre et qui est proportionnelle à la concentration que l'on veut déterminer.

	DO	ϵ	c	l
Unités	sans unité	$l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	cm

I.3.2 Additivité de la loi de Beer-Lambert

Lorsqu'un faisceau monochromatique traverse successivement deux solutions (1 et 2) différentes, la densité optique de l'ensemble (DO_T) est la somme des DO de chacune des solutions 1 et 2.

$$DO_T = DO_1 + DO_2$$

Cette propriété, généralisée pour plusieurs solutions, est très importante. Elle est à la base de la plupart des déterminations spectrophotométriques. Elle permet en particulier le dosage de corps absorbants les uns en présence des autres.

I.3.3 Conditions de validité

Pour appliquer la loi de Beer-Lambert un certain nombre de conditions est à respecter [24, 37, 38] :

- la lumière doit être monochromatique ;
- la concentration ne doit pas être élevée ;
- il ne doit pas avoir de réflexion ;
- il ne doit pas avoir de fluorescence ni d'hétérogénéité (fluorescence et diffusion négligeables) ;
- la substance ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant ;
- la relation entre la densité optique et la concentration doit être linéaire.

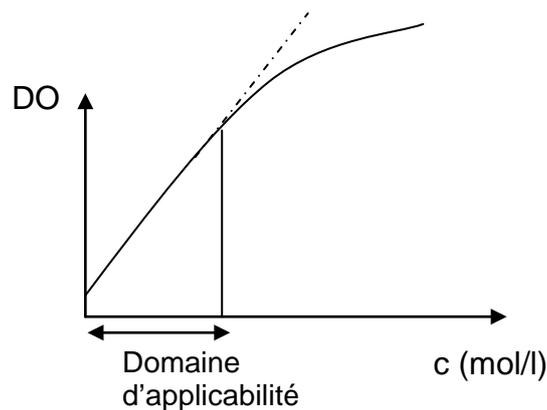


Figure 3 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration

La loi de Beer-Lambert a donné naissance à une technique d'analyse spectrophotométrique appelée spectrophotométrie d'absorption moléculaire et qui est fondée sur l'étude du changement d'absorption de la lumière par un milieu, en fonction de la variation de la concentration d'un constituant [37, 38].

II. Applications aux analyses spectrophotométriques

Lorsque l'absorption a lieu dans le visible, la substance est colorée. Ce phénomène a connu beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs des concentrations, par application à la loi de Beer-Lambert, constituent la base de la méthode connue sous le terme général de colorimétrie.

Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent de manière directe à une espèce dérivée permettant une mesure de la densité optique [27].

II.1 Applications dans le domaine de l'UV/Visible

C'est dans le domaine UV/Visible que la loi de Beer-Lambert est plus utilisée. Les bandes d'absorption étant relativement larges, il est aisé de se placer à une longueur d'onde correspondant à une grande absorption et de mesurer la DO. Selon le paramètre mesuré, on distingue différentes méthodes [20]. Cependant quelle que soit la méthode utilisée, la coloration peut être évaluée de deux manières :

- soit en fin de réaction, ou, après un temps de réaction donnée, suffisamment long pour que la réaction soit pratiquement terminée : on parle alors de **mesure en point final** ;
- soit au cours du développement de la réaction : on mesure l'évolution de la coloration en fonction du temps et l'on parle de **mesure cinétique**.

II.1.1 Dosage en point final

Deux cas sont possibles :

- La substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique dans le visible (substance colorée) ou dans l'UV, on fait alors un **dosage direct** : c'est l'exemple des protéines sériques qui absorbent les rayons électromagnétiques à 278 nanomètres ;
- La substance à doser ne possède pas de pic d'absorption caractéristique, il faut alors effectuer une réaction colorée ; on fait alors un **dosage indirect** : c'est l'exemple du dosage du glucose [37, 38].

II.1.1.1 Méthode directe

Elle consiste à mesurer la DO et à calculer la concentration par l'expression suivante :

$$C = \frac{DO}{\epsilon l}$$

Elle nécessite de connaître le coefficient d'absorption molaire ϵ à la longueur d'onde choisie, et de bien caler le monochromateur, car ϵ varie beaucoup avec la longueur d'onde. Cette méthode est rarement utilisée car elle nécessite beaucoup de précaution.

II.1.1.2 Méthodes indirectes

Elles ne nécessitent pas de connaître le coefficient d'absorption molaire ϵ .

- **Méthode par comparaison avec un étalon unique**

Elle consiste à mesurer dans les mêmes conditions la densité optique de la solution à doser ($DO_{\text{éch}}$) et celle d'une solution étalon ou standard ($DO_{\text{ét}}$) de concentration connue $c_{\text{ét}}$, puis à calculer la concentration ($c_{\text{éch}}$) de la solution à doser :

$$C_{\text{éch}} = \frac{DO_{\text{éch}}}{DO_{\text{ét}}} C_{\text{ét}}$$

Cependant il faut tenir compte de la coloration considérée comme parasite, due aux réactifs eux-mêmes. Pour cela on lit dans les mêmes conditions la densité optique du blanc-réactif (DO_{bl}).

La concentration de l'échantillon sera donc :

$$C_{\text{éch}} = \frac{DO_{\text{éch}} - DO_{\text{bl}}}{DO_{\text{ét}} - DO_{\text{bl}}} C_{\text{ét}}$$

- **Méthode avec une gamme d'étalonnage**

Elle consiste à préparer une gamme de dilutions d'une solution étalon «mère», à mesurer la DO de chacune de ces solutions étalons «filles», puis à tracer la courbe d'étalonnage $DO = f(c)$. La DO de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur l'axe des DO ; on fait ainsi une détermination graphique de la concentration de la solution à doser. La gamme doit encadrer la valeur probable de la solution à doser. Cette méthode permet de vérifier la linéarité, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation (tracé d'une droite statistique).

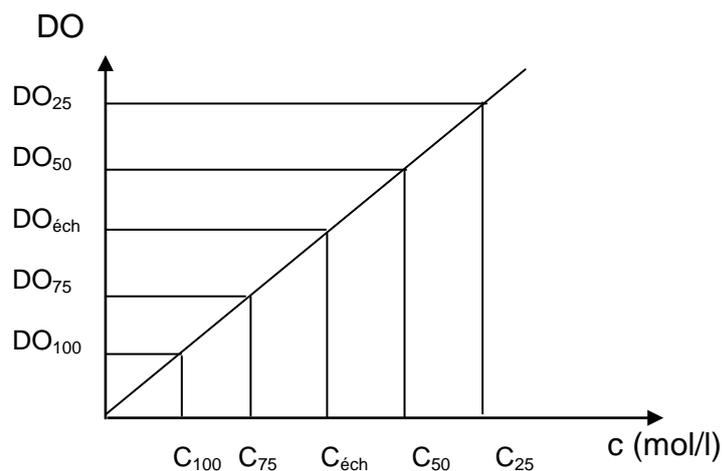


Figure 4 : Courbe d'étalonnage

- **Méthode volumétrique**

La mesure de la variation de la densité optique d'une solution au cours d'un dosage volumétrique permet de déterminer le point équivalent du dosage et d'en déduire la concentration de la solution. On trace la courbe $DO = f(V)$, V étant le volume de réactif versé. Pour une dilution négligeable, on a des segments de droites : on peut doser les ions Ca^{2+} par l'EDTA à l'aide de cette méthode.

Ce dosage est beaucoup plus précis que le titrage volumétrique par complexométrie, car il ne nécessite pas une appréciation visuelle d'un changement de couleur [10].

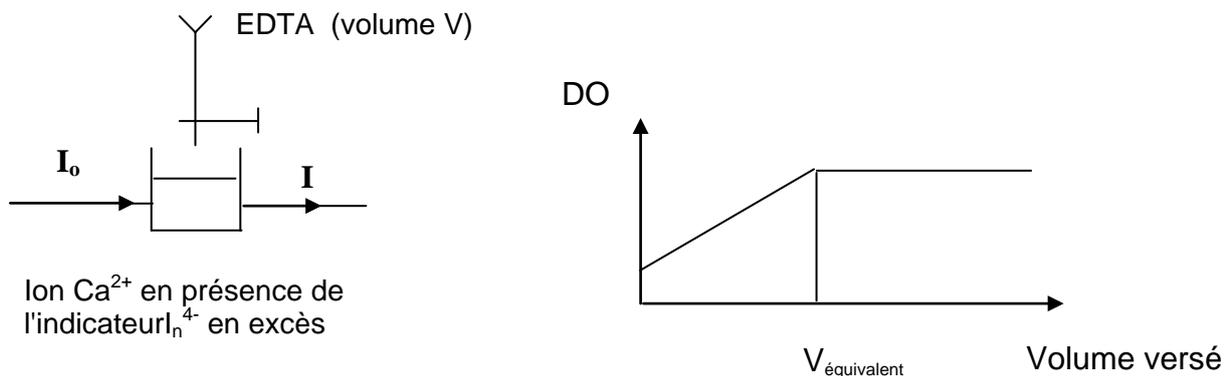


Figure 5: Variation de la densité optique en fonction du volume versé au cours du dosage

Les méthodes indirectes sont plus utilisées que celles directes en analyse spectrophotométrique car elles sont plus efficaces et amoindrissent les erreurs.

II.1.2 Dosages cinétiques

Dans les méthodes cinétiques de mesure de la concentration d'une substance, le paramètre mesuré est la vitesse de réaction. Ces méthodes sont généralement moins sensibles aux interférences que celles en point final. Il est possible d'éviter la réalisation du blanc réactif. On distingue deux types de dosages cinétiques : le dosage du substrat et le dosage enzymatique.

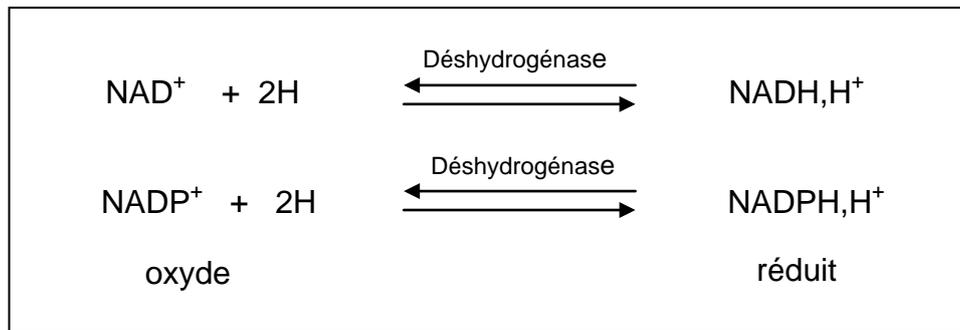
II.1.2.1 Dosages de substrats

Dans ces dosages, on détermine la concentration de la substance en mesurant la vitesse de la réaction. Les DO de l'échantillon et de l'étalon sont mesurées dans les mêmes conditions à des périodes initiales courtes. Par exemple on mesure les DO toutes les minutes et on en déduit la concentration :

$$C_{\text{éch}} = \frac{DO_2(\text{éch}) - DO_1(\text{éch})}{DO_2(\text{ét}) - DO_1(\text{ét})} C_{\text{ét}}$$

II.1.2.2 Dosages enzymatiques

Les techniques spectrophotométriques de détermination des activités enzymatiques reposent sur le principe du test optique développé par Bergmeyer [11]. L'activité catalytique des enzymes est mesurée, dans les conditions optimales définies (pH, température, concentration en substrats,...), par la détermination de la vitesse d'oxydation ou de réduction d'une coenzyme à nucléotide pyridinique.



Ces deux coenzymes à l'état réduit, offrent la propriété essentielle d'absorber dans le proche ultraviolet, à 340 nanomètres, propriété qui disparaît à l'état oxydé. Il est donc possible de suivre quantitativement la réaction catalysée par une déshydrogénase et de mesurer la vitesse de cette réaction à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 340 nanomètres ou à une longueur d'onde voisine. On mesure la DO toutes les minutes pendant un certain temps. Les variations successives de la DO par minute ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) doivent être égales ou très proches indiquant que la réaction est linéaire (figure 6). Etant donné que ϵ_{NADH} à 340nm est égal à $6,22 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}$, le calcul de la variation moyenne de la DO par minute ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) permet de déterminer le nombre de micromoles de NADH transformé par minute, ce qui permet d'exprimer l'activité A en U/l.

$$A = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times V_T}{6,22 \times \text{PE}} \times 10^3 \text{ U/l}$$

V_T = volume du milieu réactionnel en cm^3

PE = prise d'essai en cm^3

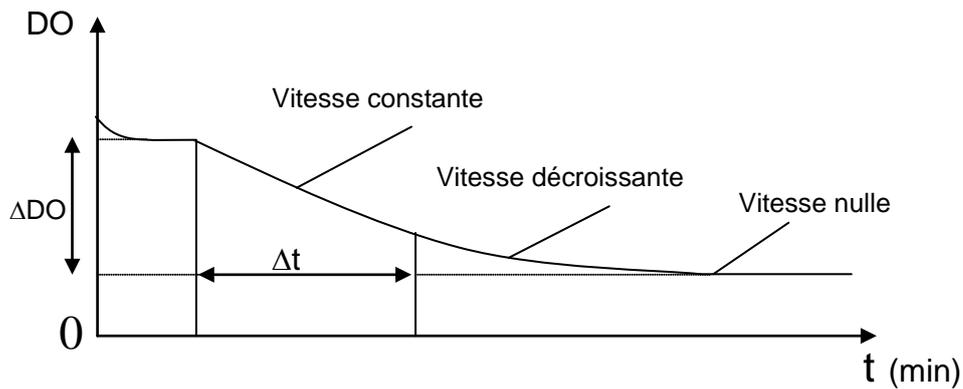


Figure 6 : Mesure de l'activité enzymatique [10]

II.2 Applications dans le domaine l'Infrarouge (IR)

Ce domaine est essentiellement réservé aux déterminations des structures des composés organiques [20, 27]. Cependant il offre la possibilité de doser un certain nombre de substances car presque toutes les espèces moléculaires absorbent dans cette région. Il est particulièrement mis à profit pour le dosage de mélange de composés organiques présentant une grande similitude. Dans le secteur agro-alimentaire les produits comme les protéines, les huiles dans les graisses, les viandes peuvent être analysés dans ce domaine [27].

Le domaine UV/Visible est le plus utilisé en spectrophotométrie [20, 27]. La plupart des espèces biochimiques absorbent le rayonnement UV/Visible et peuvent donc faire l'objet d'une analyse quantitative. Les limites de détection sont généralement comprises entre 10^{-4} et 10^{-5} molaire [27].