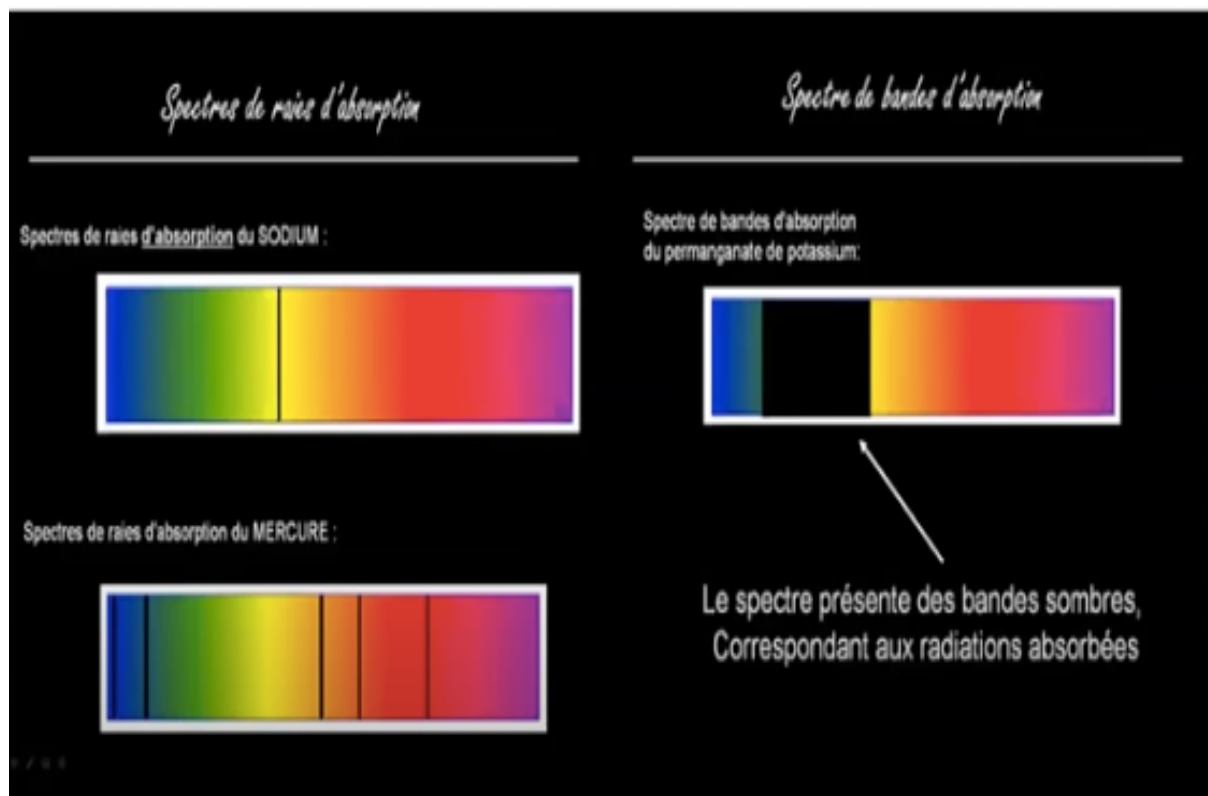


## SPECTROMETRIES D'ABSORPTION ET D'EMISSION ATOMIQUES

Les méthodes spectrales regroupent des méthodes moléculaires et atomiques. Les méthodes moléculaires sont représentées par des spectres de bandes et incluent la spectroscopie UV-Visible et la spectroscopie infra-Rouge. Quand aux méthodes atomiques, elles sont représentées par des spectres de raies, et incluent la spectroscopie d'émission atomique et la spectroscopie d'absorption atomique. Dans la figure ci-dessous, une illustration montrant la différence entre un spectre de raie d'absorption du Sodium et du Mercure, et un spectre de bande d'absorption du Permanganate de Potassium.



## PHÉNOMÈNES D'ABSORPTION ET D'ÉMISSION ATOMIQUES

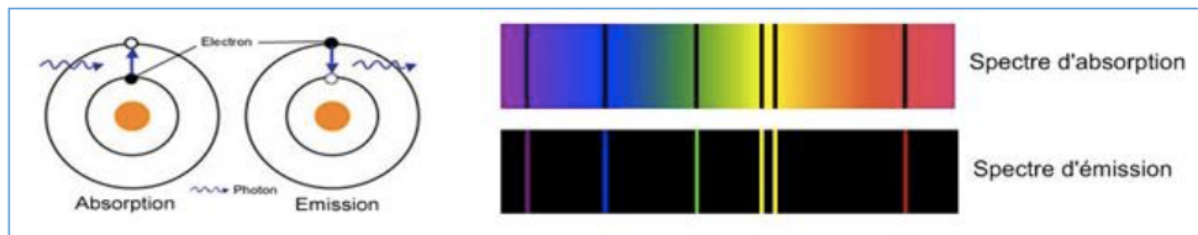
La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et la spectrométrie d'émission atomique (SEA) sont deux techniques largement utilisées pour l'analyse de plus de 70 éléments parfois à l'état de traces.

### ✚ Absorption atomique

L'absorption atomique est le phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Il en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (Spectre d'absorption).

### ✚ Émission atomique

L'émission atomique est le phénomène observé lorsqu'un rayonnement électromagnétique est émis par des atomes ou des ions excités qui retournent à l'état fondamental. Il en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (Spectre d'émission).



- ✚ Les deux techniques mettent en jeu des atomes libres à l'état de vapeur. L'appareillage va donc produire une vapeur atomique à partir de l'échantillon ce qui induit la destruction de la molécule à analyser, il est ainsi possible de doser simultanément toutes les formes d'un même élément.

## SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

### 1. DÉFINITION

La spectrométrie d'absorption atomique étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. C'est une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques (métaux et non-métaux). La spectrométrie d'absorption atomique

en flamme permet le dosage mono-élémentaire des cations majeurs de l'ordre du mg/L dans des échantillons liquides.

Chaque élément a un nombre spécifique d'électrons associés à son noyau. La configuration orbitale normale et la plus stable des électrons est appelée état de base. Lorsque qu'une énergie est fournie à un atome, ce dernier l'absorbe et adopte une configuration électronique appelée état d'excitation. Cet état est instable et l'atome retourne immédiatement à son état de base libérant ainsi une énergie lumineuse.

## 2. PRINCIPE

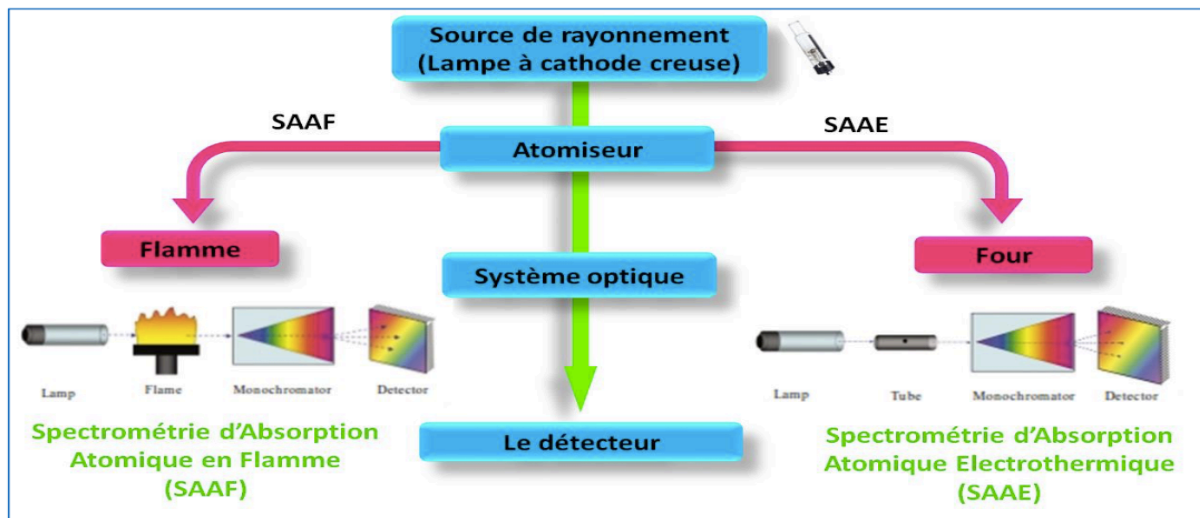
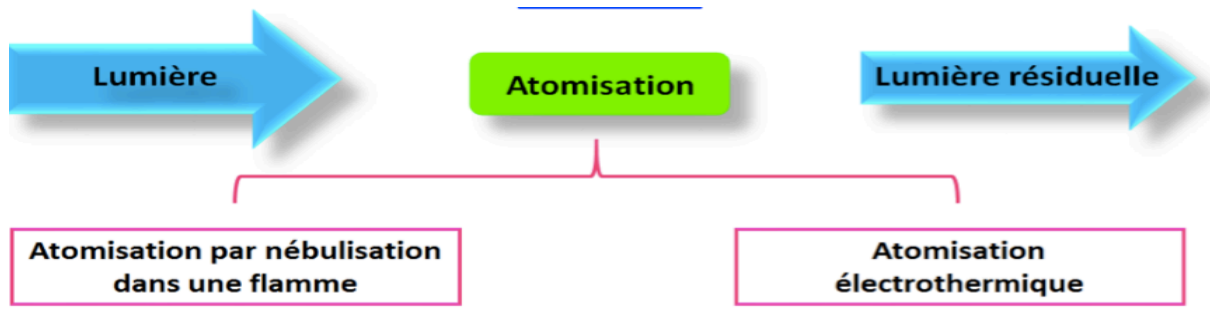
L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.

Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser. L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer-Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

- ✓ L'échantillon est réduit en vapeur atomique.
- ✓ Les atomes à l'état fondamental absorbent le rayonnement spécifique.
- ✓ **L'absorbance est proportionnelle à la quantité d'atomes de l'élément à doser.**

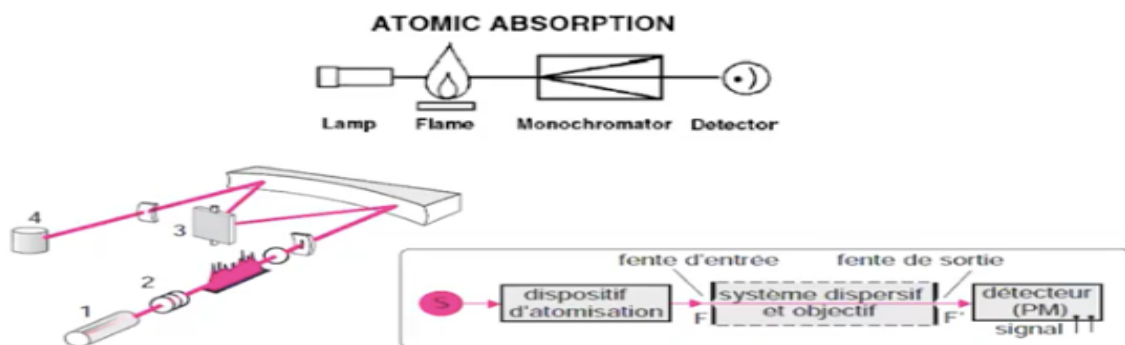
En SAA, on obtient les vapeurs atomiques par :

- ✓ Atomisation par nébulisation dans une flamme
- ✓ Atomisation électrothermique



### 3. APPAREILLAGE

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, la lampe à cathode creuse, d'un brûleur et un nébuliseur, d'un monochromateur et d'un détecteur relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.



Le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la flamme (2) dans laquelle l'élément se trouve porté à l'état atomique, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4).

Lors du procédé d'absorption atomique, l'énergie fournie à l'atome provient d'une source lumineuse appelée **lampe à cathode creuse**. L'atome dans son état de base absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde spécifique et passe à un état d'excitation. Un détecteur mesure la quantité de lumière absorbée et un signal électronique est produit en fonction de l'intensité lumineuse. Ce signal est traité et la quantité d'analyte dans l'échantillon est déterminée en fonction de l'absorbance mesurée.

Il en existe près d'une centaine de lampes à cathode creuse, différentes, chacune est propre à un élément à doser. La lampe à cathode creuse est une lampe à décharge conçue pour une utilisation comme **source de raie spectrale** avec les spectromètres d'absorption atomique (AA). Une lampe à cathode creuse **monoélément** ou **multiélément** est requise pour déterminer chaque élément à l'aide de la technique d'absorption atomique. Une lampe à cathode creuse doit impérativement **générer une raie d'émission étroite pour l'élément à déterminer**.

- ❖ Dans la SAAF, l'atomiseur est une flamme fournie par un brûleur à fente laminaire.
- ❖ Dans la SAAE, l'atomiseur est un four graphite.

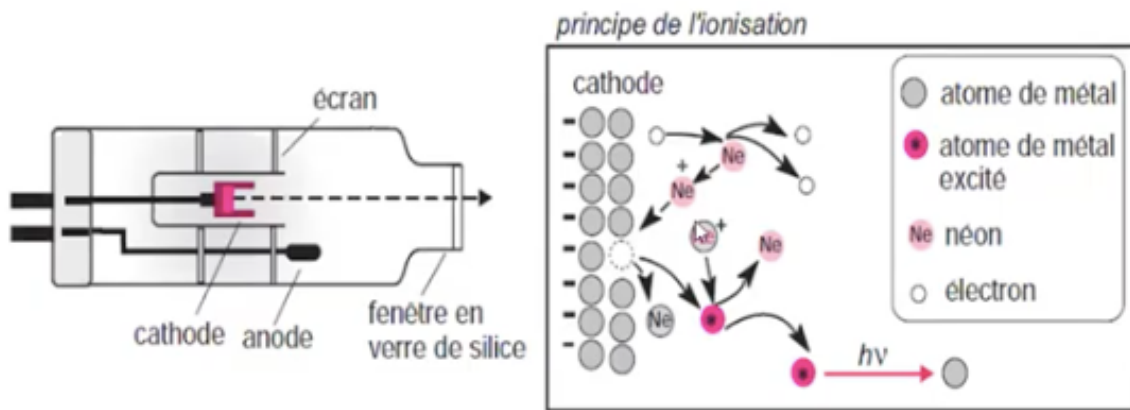
Le contact entre les atomes et la source lumineuse est assuré par la cellule d'absorption. La cellule d'absorption est en fait une flamme générée par la combustion d'un mélange air/acétylène (2500°C) ou un mélange protoxyde d'azote/acétylène (3100°C) pour les éléments réfractaires (exemples : Al, Mo, Sr...).

L'échantillon à analyser est aspiré par l'appareil et transformé en aérosol. La flamme atomise ensuite les éléments contenus dans l'aérosol qui passent à travers le faisceau de la lampe à cathode creuse.

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 contenu dans la lampe**.

Les ions de gaz vont ensuite entrer **en collision avec la cathode**, ce qui **déloge des atomes métalliques**. 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.

**Exemples de limite de quantification : Al 3 mg/L, Cu 0.12 mg/L, Zn 0.02mg/L.**



### Principe de fonctionnement de la lampe à cathode creuse

#### 4. APPLICATIONS

La SAA permet l'analyse de presque tous les métaux et métalloïdes (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc....) dans les échantillons biologiques. Elle couvre donc un vaste éventail d'applications.

Dans le domaine pharmaceutique on peut citer :

- Dosage du cobalt dans la Vit B12.
- Dosage de Mg dans les suppléments nutritionnels.
- Dosage du Ca dans les préparations à base de Ca.
- Analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques.
- Dosage du Ca, Sr, Zn dans les os.

## SPECTROMETRIE D'EMISSION ATOMIQUE

### 1. DÉFINITION

C'est une méthode de dosage de certains éléments métalliques. Cette méthode utilise la capacité qu'ont certains atomes excités à se désexciter en émettant des photons d'énergie déterminée (donc de longueur d'onde déterminée).

La photométrie d'émission atomique mesure l'émission d'un rayonnement électromagnétique UV ou visible due à la désexcitation d'atomes qui ont été excités par l'énergie apportée par le transfert à une température très élevée (introduction de l'échantillon dans une flamme ou un plasma). La mesure quantitative de l'émission permet des dosages.

Les flammes utilisées dans les appareils de mesure à flamme atteignent 2000 à 3000 °C et permettent l'émission par les atomes des séries des alcalins (Na, K, Li), de quelques alcalino-terreux (Ba) et de quelques autres métaux. Les appareils à plasma qui atteignent plus de 7000 °C permettent d'élargir la gamme des atomes mesurables.

### 2. PRINCIPE

Par la flamme où le plasma, dont la température est très élevée, l'objectif est de casser les édifices moléculaires et de faire passer l'élément à doser (au moins partiellement) sous forme de vapeur atomique. Sous l'effet des températures élevées, certains des atomes seront excités et verront leurs électrons passer à des niveaux d'énergie supérieurs. **Les niveaux excités sont instables et le retour au niveau fondamental d'énergie minimale conduira à une libération d'énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde caractéristique de l'atome qui se désexcite. C'est la mesure de cette émission** à une longueur d'onde caractéristique de l'atome à mesurer qui fonde la photométrie d'émission atomique.

- ✓ L'échantillon est introduit au niveau de l'atomiseur, ce dernier joue un double rôle :
  - Production de vapeurs atomiques.
  - Excitation des atomes.

✓ **Après excitation, le retour à l'état fondamental est accompagné d'émission de rayonnements spécifiques de l'élément à doser (ou des éléments à doser).**

✓ **L'intensité du rayonnement émis est proportionnelle à la concentration de l'analyte considéré.**

En SEA, il existe deux types d'atomiseurs :

✓ La flamme (**Photométrie d'émission de flamme**).

✓ La torche à plasma (**Spectrométrie d'émission optique à plasma par couplage inductif = Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry ICP-OES**). Le plasma est le quatrième état de la matière. Il s'agit d'un gaz ionisé où les électrons sont arrachés de leurs orbitales atomiques. Le plasma est constitué d'atomes isolés à l'état d'équilibre entre leur forme neutre et forme ionisée.



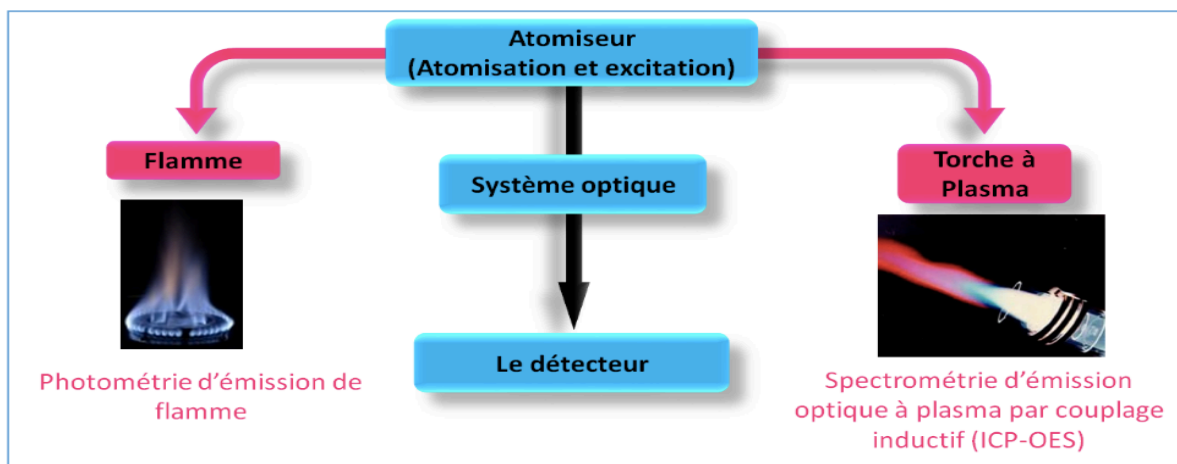
**NB :**

- La SEA permet une analyse **élémentaire qualitative de composition**, c'est-à-dire, qu'il est possible d'identifier les éléments d'un échantillon de composition inconnue contrairement à la SAA, où on ne dose que l'élément pour lequel le spectromètre a été préparé par le choix de la lampe de l'élément à analyser.

- Après excitation, pour chaque atome, il existe **une centaine de possibilités de retour à l'état fondamental** et pour chacune **un rayonnement de longueur d'onde spécifique est émis**. Ainsi, le spectre de l'émission atomique présente plusieurs raies d'émission, qui constituent une empreinte de l'élément à doser, tandis qu'en SAA, les mesures se font sur une longueur d'onde, sélectionnée par la bande passante (le spectre présente une seule bande d'absorption).



### 3. APPAREILLAGE



### 4. APPLICATIONS

Cette méthode d'analyse incontournable a reçu également diverses applications dans plusieurs domaines (industriel, environnement, métallurgique, médico-légal, pharmaceutique...etc.). Les métaux alcalins donnant des flammes colorées, sont facilement dosés en émission. On peut donc utiliser l'émission de flamme en analyse minérale et en biologie pour doser le lithium, le sodium et le potassium (ionogramme) et également certains alcalino-terreux (Ba). On peut faire ces analyses dans le visible ou en ultraviolet. En bromatologie, on peut l'utiliser en contrôle (ex. doser le sodium et le calcium dans le lait).

**Tableau comparatif entre les différentes techniques spectrométriques atomiques d'absorption et d'émission**

	Nature de l'élément	Sensibilité	Vitesse de l'analyse	Coût
<b>SAA-flamme</b>	Métaux de transition (Fe, Cu, Mn, Co...)		La plus longue	+
<b>SAA-four</b>	Mg, Al, Si Métaux de transition et métaux lourds	++		++
<b>SEA-flamme</b>	Alcalins Li, Na, K, Rb, Cs			-
<b>SEA-ICP</b>	Tout les éléments du tableau périodique sauf les non métaux.	++ ++		++++

## **SPECTROMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE**

### **1. DEFINITION**

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire est utilisée pour l'identification et le dosage de molécules biochimiques. C'est la mesure quantitative de lumière qu'une substance chimique absorbe en faisant passer un faisceau lumineux à travers l'échantillon dans un spectrophotomètre. Spectrophotométrie veut dire « mesure des photons en fonction du spectre ». En physique, les notions de photon et de spectre sont en effet liées à la nature corpusculaire de toute onde électromagnétique et à la décomposition de la lumière blanche par un milieu dispersif.

Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet et du visible.

Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm.

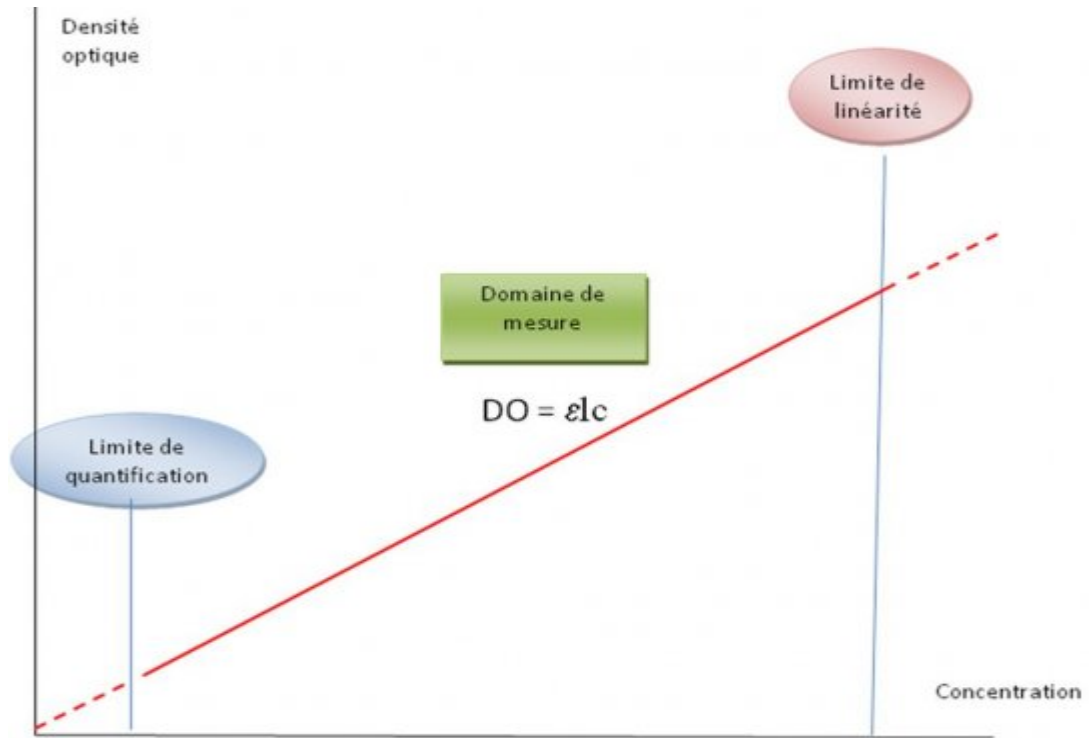
- Visible : 400 nm (indigo) -800 nm (rouge).
- Proche-UV : 200 nm -400 nm
- UV-lointain : 10 nm- 200 nm .

Le domaine du spectre ultraviolet utilisable en analyse s'étend environ de 190 à 400 nm. Le domaine du spectre visible s'étend environ de 400 à 800 nm.

### **2. PRINCIPE**

Lorsque l'on fait passer de la lumière à travers une solution colorée, celle-ci absorbe de la couleur complémentaire. Si on utilise un rayon monochrome correspondant à cette couleur, il sera absorbé au moins en partie. On utilise les photomètres si seules certaines longueurs d'onde sont utilisables et les spectrophotomètres si toutes sont disponibles.

La densité optique étant proportionnelle à la concentration d'une solution. On peut doser cette dernière en lisant sa densité optique dans un appareil étalonné avec la même substance à différentes concentrations connues (utilisation d'un étalon).



**Représentation graphique de la relation DO / concentration**

On voit que la DO est proportionnelle à la concentration, et que la relation entre la DO et la concentration est linéaire, jusqu' à une concentration qui est la limite de linéarité.

### **3. APPAREILLAGE**

Un spectrophotomètre est un appareil dans lequel circule un rayon lumineux.

⇒ La source lumineuse émet une lumière polychromatique (lumière blanche) :

- Lampe à filament de tungstène ou tungstène halogène : visible et proche UV
- Lampe au deutérium : UV

⇒ Un dispositif appelé monochromateur permet de sélectionner 1 longueur d'onde :

- Le monochromateur peut être un prisme ou un réseau
- Il peut être remplacé par des filtres interchangeables permettant de sélectionner une longueur d'onde en arrêtant toutes les autres.

⇒ Les autres longueurs d'onde sont dispersées par un jeu de fentes et miroirs. Le rayon lumineux devient monochromatique

⇒ Le rayon monochromatique traverse une cuve de lecture dans laquelle se trouve la solution contenant le composé à doser :

- UV : cuve en quartz

- Visible et proche UV : cuve en verre
  - Matières plastiques de qualité variable
- ⇒ Une partie du rayon est absorbée par la solution. Le reste continue son chemin jusqu'à un photodétecteur relié à un système électronique permettant de l'amplifier (photomultiplicateur) et de le quantifier.

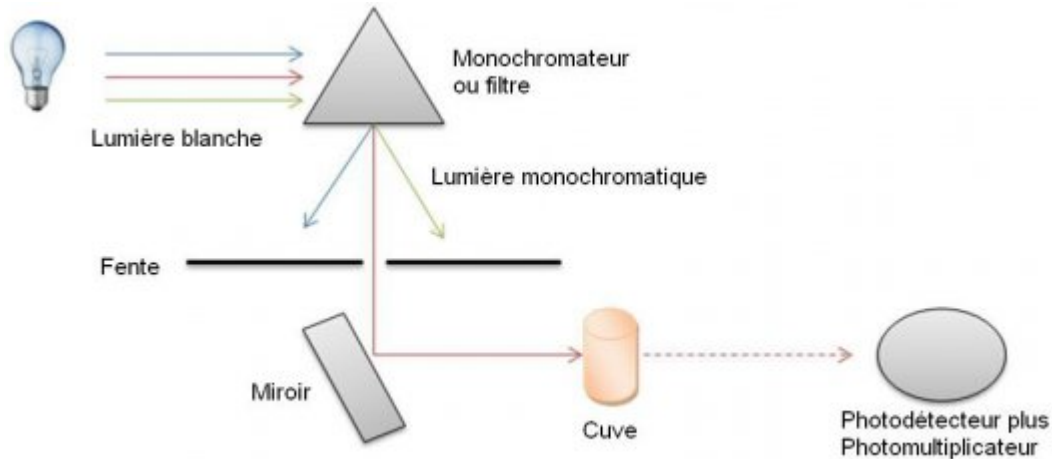


Schéma d'un spectrophotomètre

- Réalisation d'un dosage biochimique photométrique : Exemple du dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase (Méthode de Trinder)

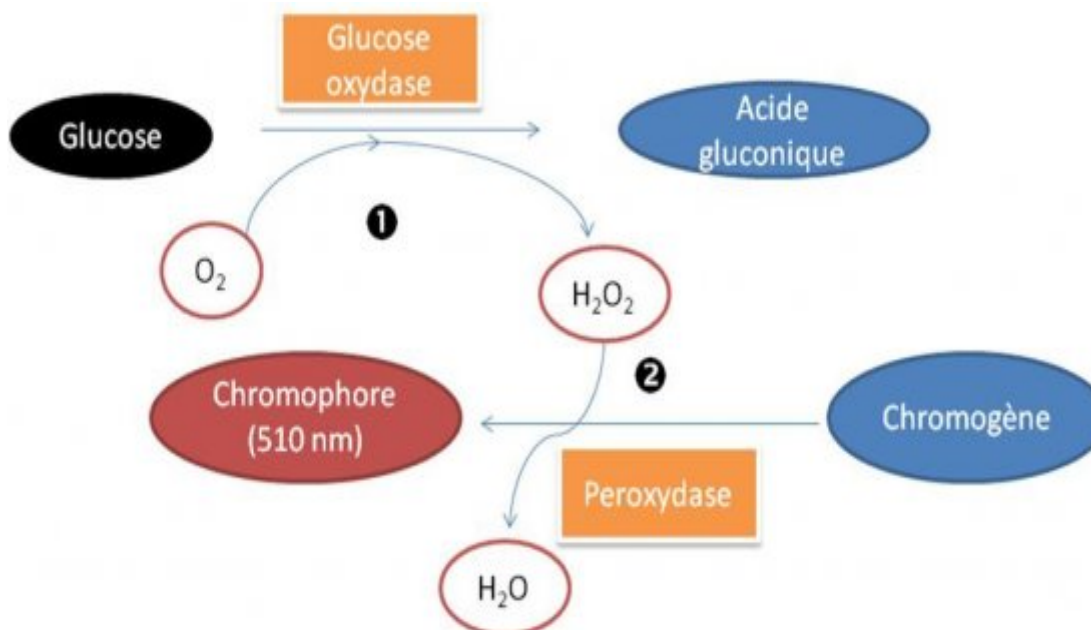


Schéma des réactions mises en jeu lors du dosage du glucose par la glucose oxydase

- Le glucose est transformé en acide gluconique grâce à la glucose oxydase. Cette réaction consomme de l'oxygène ( $O_2$ ) et produit de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ )
- L'  $H_2O_2$  permet à une peroxydase de transformer une substance chromogène pour la rendre chromophore. Cette substance chromophore absorbe à une longueur d'onde de 510 nm.
- C'est la mesure de cette absorption qui permet le dosage du glucose. On désigne communément l'absorption par le terme « densité optique » ou DO.
- La longueur d'onde choisie dépend donc du spectre d'absorption du chromophore utilisé, et correspond en général à un de ses maxima d'absorption.

#### - Mesure en point final et en cinétique

**Détermination en point final :** On attend la fin de la réaction, le « plateau », pour faire la mesure de DO. Plus la concentration est importante, plus la DO est élevée.

**Détermination en cinétique :** On effectue plusieurs mesures dans la phase de croissance de la DO. On détermine une pente ou  $\Delta DO$ . Plus la concentration est importante, plus la pente est élevée.

Les activités enzymatiques (transaminases, phosphatases alcalines,...) sont généralement mesurées en cinétique. Les substrats comme la créatinine peuvent être mesurés par les 2 méthodes.

- ▶ En technique manuelle, la méthode en point final donne de bons résultats
- ▶ En technique automatisée, la méthode en cinétique permet de résoudre certains problèmes d'interférence et permet de diminuer le temps d'analyse.