

SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE

Introduction :

Le spectrophotomètre est un instrument utilisé systématiquement en recherche scientifique. La spectrophotométrie 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.

Definition : La spectroscopie est l'analyse du rayonnement électromagnétique émis, absorbé ou diffusé par les atomes ou les molécules. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules du fait de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière.

DOMAINES D'APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE

Dans les laboratoires, elle permet :

- l'identification des molécules
- la détermination des structures
- l'étude des cinétiques de réaction
- la détermination des mécanismes réactionnels
- les dosages

Effet d'une radiation électromagnétique sur la matière

Longueur d'onde / Energie	Interaction onde/molécules
■ 10^9 nm / 0.01 cm ⁻¹ / 1.24×10^{-6} eV	Radio Fréquence Retournement de spin
■ 10^6 nm / 10 cm ⁻¹ / 1.24×10^{-3} eV	Micro-onde Rotation des molécules
■ 10^4 nm / 1000 cm ⁻¹ / 0.124 eV	Infra rouge Vibrations des liaisons
■ 500 nm / 20000 cm ⁻¹ / 2.48 eV	Visible Excitation électronique
■ 200 nm / 50000 cm ⁻¹ / 6.16 eV	Ultraviolet Excitation électronique
■ 10 nm / 1×10^{-6} cm ⁻¹ / 124 eV	Rayons X Ionisation moléculaire

1/Spectroscopie d'absorption dans l'UV-Visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

1.1/ Domaine UV-Visible

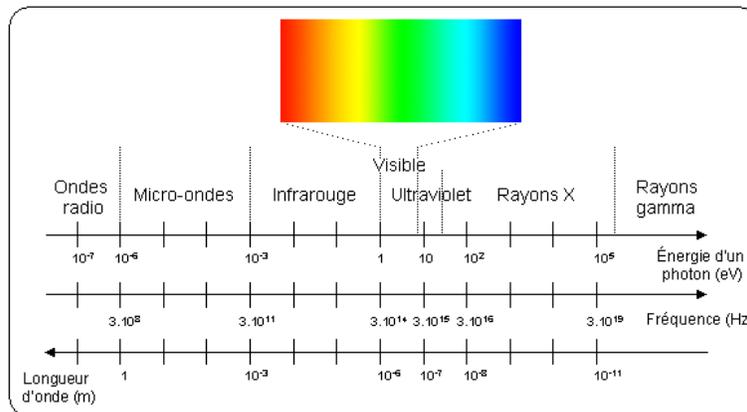
Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet et du visible.

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.

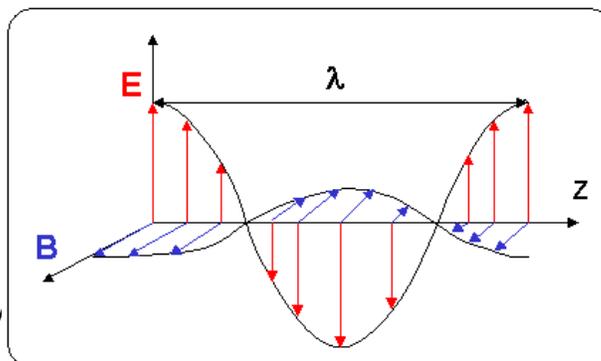


1.2/ Rappel :

INTERACTION RAYONNEMENT-MATIÈRE

Rayonnement

- **Nature ondulatoire** : Un rayonnement électromagnétique (ou radiation électromagnétique) est une onde constituée par deux champs oscillants : un champ électrique E et un champ magnétique H à la fois perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation.



On caractérise un ray

nce, sa

longueur d'onde ou son nombre d'onde

$$\lambda = C \cdot T$$

λ : Longueur d'onde en : m, μm , nm.

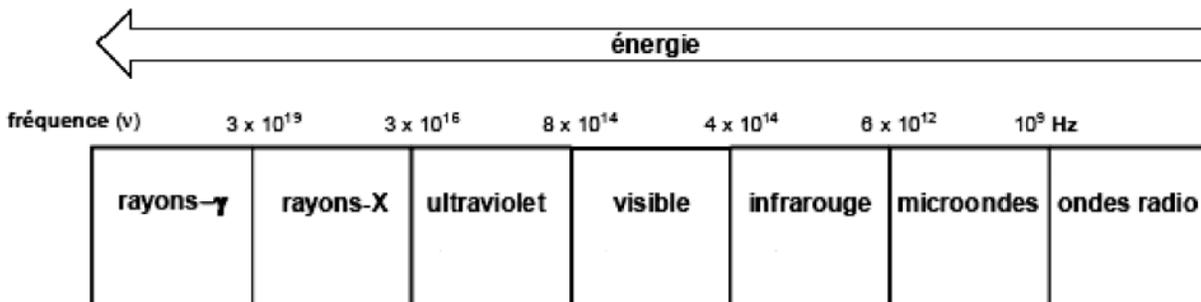
C: Célérité de la lumière dans le vide soit 3×10^8 m/s

T: Période; temps au bout duquel le phénomène se reproduit identique à lui même

$$\nu = 1/T = C/\lambda$$

ν : fréquence (s⁻¹ ou Hertz « Hz »)

L'ensemble des radiations constitue le spectre électromagnétique.



Nature corpusculaire : La nature ondulatoire de la lumière ne permet pas à elle seule d'interpréter les phénomènes d'interaction entre lumière et matière. Planck puis Einstein proposèrent la théorie des quanta :

La lumière est composée de grains d'énergie : les photons.

Le photon est une particule qui se propage à la vitesse de la lumière et possède un quantum d'énergie :

$$E = h \nu = h C/\lambda$$

E : Energie du photon en Joules (J)

h : constante de Planck = $6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s

Une onde électromagnétique réelle est généralement constituée d'une superposition d'ondes de fréquences différentes. La répartition quantitative de la puissance propagée selon la fréquence est appelée le « spectre » de l'onde.

Une transition UV-visible correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante. La matière absorbe

alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le niveau excité.

D'autre part l'intensité d'un faisceau de radiations monochromatiques est défini par (I)

I : Paramètre lié au nombre de photons de même énergie, arrivant dans une direction donnée. « ne pas confondre avec énergie d'un photon »

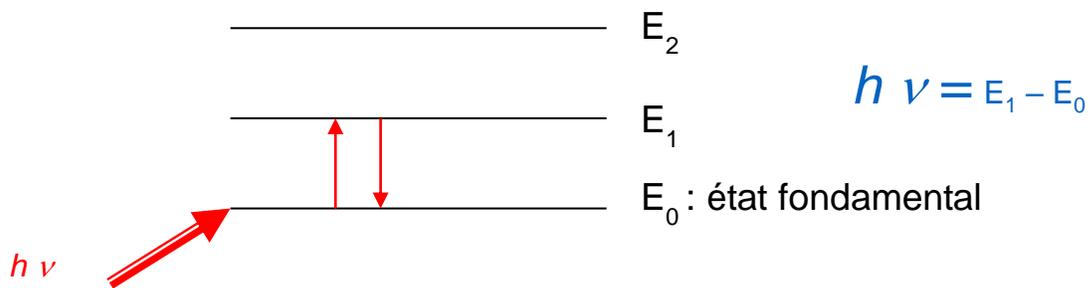
- En mécanique classique, l'énergie est continue

$$W = F \times L$$

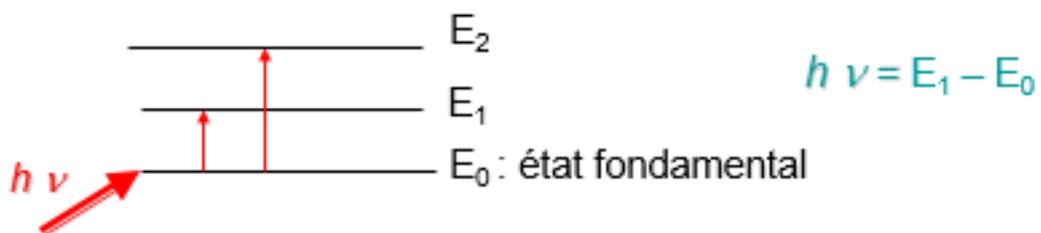
W est défini pour n'importe quelle valeur de F et de L; il n'y a donc pas de restriction.

- En mécanique quantique, l'énergie électronique n'est pas continue. Elle ne peut prendre que certaines valeurs :

E_0, E_1, E_2, \dots . On dit alors que l'énergie est discontinue ou quantifiée.



Loi de l'absorption : Mécanique quantique



1.3/ Lois :

LOI D'ABSORPTION DE LA LUMIERE - LOI DE BEER-LAMBERT

Lorsque la lumière arrive sur un milieu homogène de longueur l (trajet optique), une partie de cette lumière incidente notée I_0 est absorbée par le milieu et le reste, noté I , est transmis. 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 :

loi de Beer Lambert

L'absorbance d'une solution colorée $A(\lambda)$ est égale à :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot L \cdot C = \log(I_0/I)$$

$\varepsilon(\lambda)$: **coefficient d'absorption molaire** qui dépend du solvant de la température et de la longueur d'onde

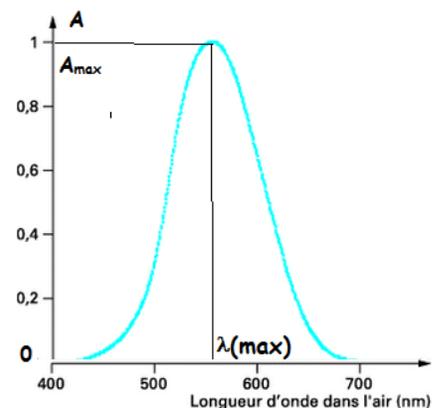
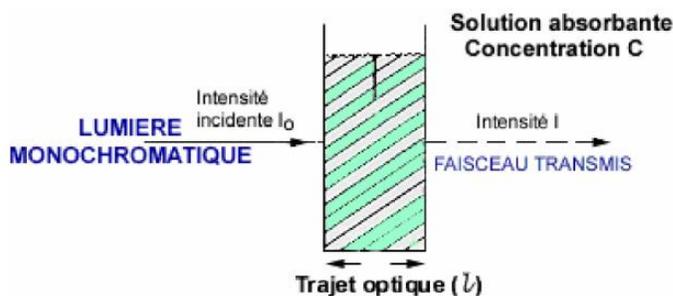
Unité légale: $\text{m}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$

$L(\text{m})$: épaisseur de solution traversée

$C (\text{mol} \cdot \text{m}^{-3})$: concentration de la solution.

A est sans unité.

$\varepsilon(\lambda)$: coefficient d'extinction. C'est une grandeur caractéristique du composé. Si la concentration est exprimée en g/l , $\varepsilon(\lambda)$ est appelé coefficient d'extinction spécifique. Si la concentration est exprimée en mole / l, $\varepsilon(\lambda)$ est appelé coefficient d'extinction molaire.



Remarque :

Si la concentration est trop grande l'absorbance est trop élevée, cette loi n'est plus valable il faut diluer la solution.

On définit également la transmission T comme le rapport de l'intensité transmise à l'intensité incidente : $T = I/I_0$ $\log(1/T) = A$

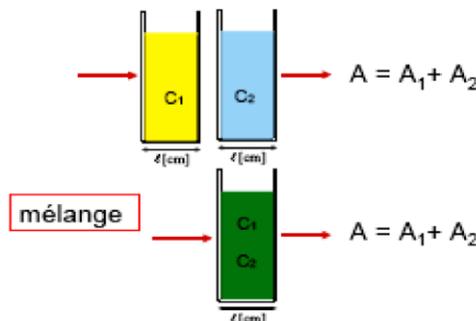
Le pourcentage de la transmission (% T) est la transmittance.

Validité de la loi de Beer-Lambert

- Lumière monochromatique
- Faibles concentrations.
- La solution ne doit être ni fluorescente, ni hétérogène (bulles, précipité...)
- La solution n'est pas le siège d'une réaction photochimique

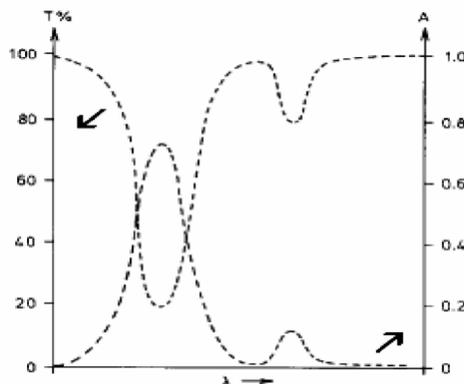
Additivité des absorbances

Dans le cas où la solution à étudier contient plusieurs espèces absorbantes, l'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée est la somme des absorbances des espèces prises séparément, à condition que ces dernières n'interagissent pas l'une sur l'autre.



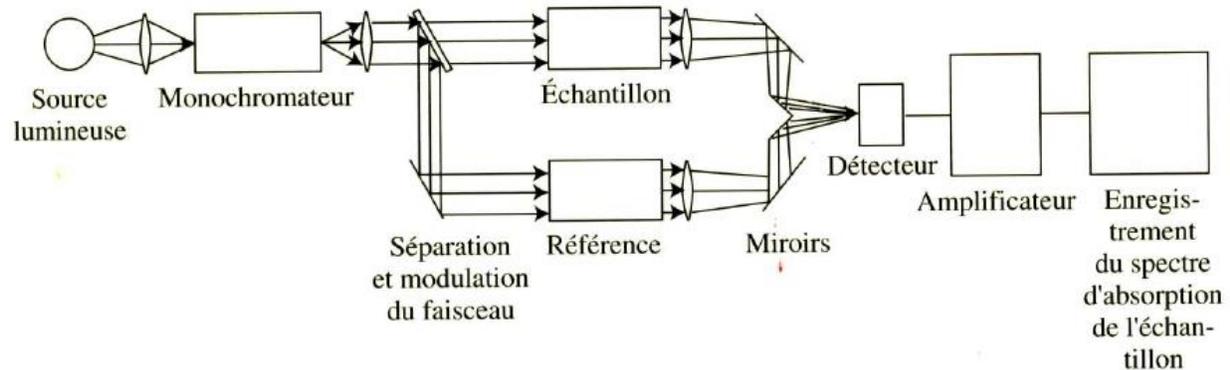
1.4/ SPECTRE D'ABSORPTION

L'enregistrement graphique - réalisé par un appareil appelé spectrophotomètre - de la quantité de lumière absorbée ou transmise par une substance en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou du nombre d'onde donne le spectre d'absorption de la substance. Selon une représentation en absorbance ou en transmittance, on a les allures suivantes :



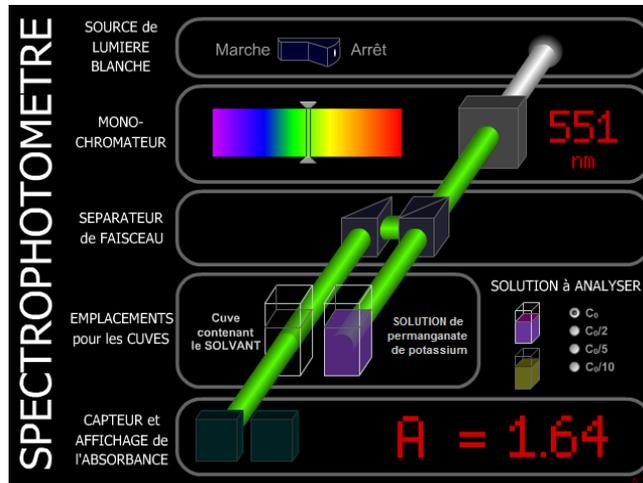
La position du maximum d'absorption d'une bande correspond à la longueur d'onde de la radiation qui a provoqué la transition.

Appareillage :



Un spectrophotomètre UV-visible est constitué de:

- une source de lumière blanche
- **un monochromateur** permettant de sélectionner une radiation monochromatique de longueur d'onde précise (sur le schéma la longueur d'onde vaut 551 nm)
- **un séparateur de faisceau**. En sortie du séparateur, un faisceau traverse la cuve contenant le solvant (généralement de l'eau distillée), un second faisceau traverse la solution à analyser.
- la comparaison des 2 faisceaux d'intensités respectives I (la solution) et I_0 (le solvant) permet de calculer **l'absorbance A de l'échantillon**.
- la courbe $A = f(\lambda)$ qui représente l'absorbance en fonction de la longueur d'onde est appelée le **spectre de l'échantillon**.

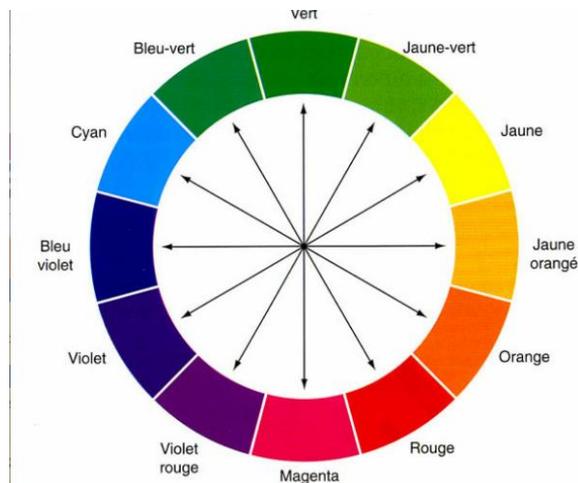


1.5/ couleur et absorbance d'une solution colorée

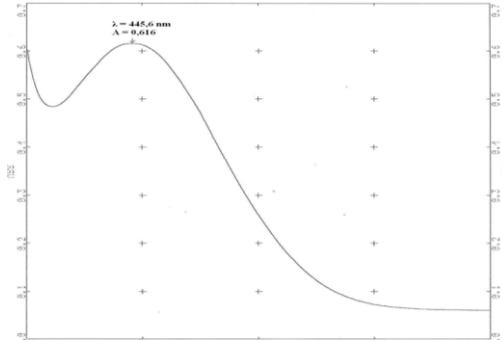
Une substance incolore, comme l'eau, n'absorbe aucune radiation visible: son absorbance est nulle quelque soit λ .

La couleur d'une espèce est la somme des couleurs complémentaires des radiations qu'elle absorbe.

Le cercle chromatique représente quelques couleurs ainsi que leur couleur complémentaire (au bout de la flèche !)



Exemple: le spectre d'absorption du dichromate de potassium (compris entre 400 et 600 nm) est le suivant:



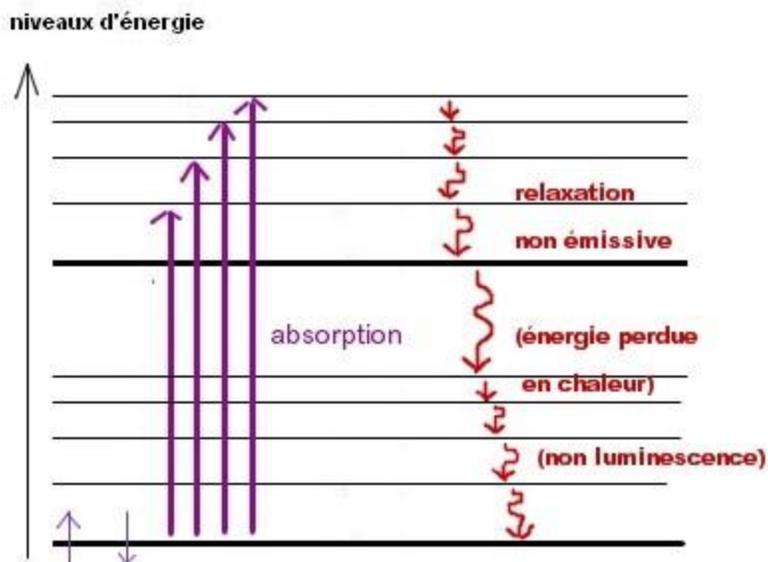
Il absorbe les radiations violettes, bleues et une partie des radiations vertes. Sa couleur est donc la somme des couleurs complémentaires qui sont (d'après le cercle chromatique) le jaune orangé, l'orange et le rouge. La solution a en effet une couleur orangée. Solution de dichromate de potassium ($2\text{K}^+, \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$):



1.6 Que devient l'énergie absorbée ?

En absence de phénomène de luminescence (c'est à dire en absence de fluorescence et phosphorescence), l'énergie absorbée sera rendue au système sous forme de chaleur :

- d'abord retour à l'état de plus basse énergie de l'état excité par émission de chaleur : c'est la relaxation vibrationnelle (10^{-12} s).
- puis retour vers un niveau élevé de l'état électronique fondamental et relaxation vibrationnelle vers l'état de plus basse énergie de l'état fondamental par émission de chaleur : c'est la relaxation par conversion interne (10^{-8} s). Ce phénomène sera quasi le seul si les niveaux vibrationnels les plus élevés de S_0 atteignent ou recouvrent les niveaux bas de S_1 .



Qui absorbe ?

L'absorbance provient de groupements chimiques appelés **chromophores**.

Les chromophores sont des molécules chimiques contenant dans leur structure des doubles liaisons conjuguées.

Les systèmes conjugués sont définis par une alternance de liaisons simples et de liaisons doubles ou par un système constitué d'une liaison double suivi d'une liaison simple lié à un atome portant un doublet d'électrons non lié.

Les électrons des doubles liaisons sont délocalisés à l'ensemble du chromophore et ils peuvent se déplacer le long de la molécule. La conséquence directe de cet effet est que le chromophore peut absorber des photons de certaines longueurs d'onde. Plus le nombre de doubles liaisons conjuguées est grand, plus la longueur d'onde d'absorption est décalée vers les grandes longueurs d'onde (vers le domaine de visible).

Les auxochromes

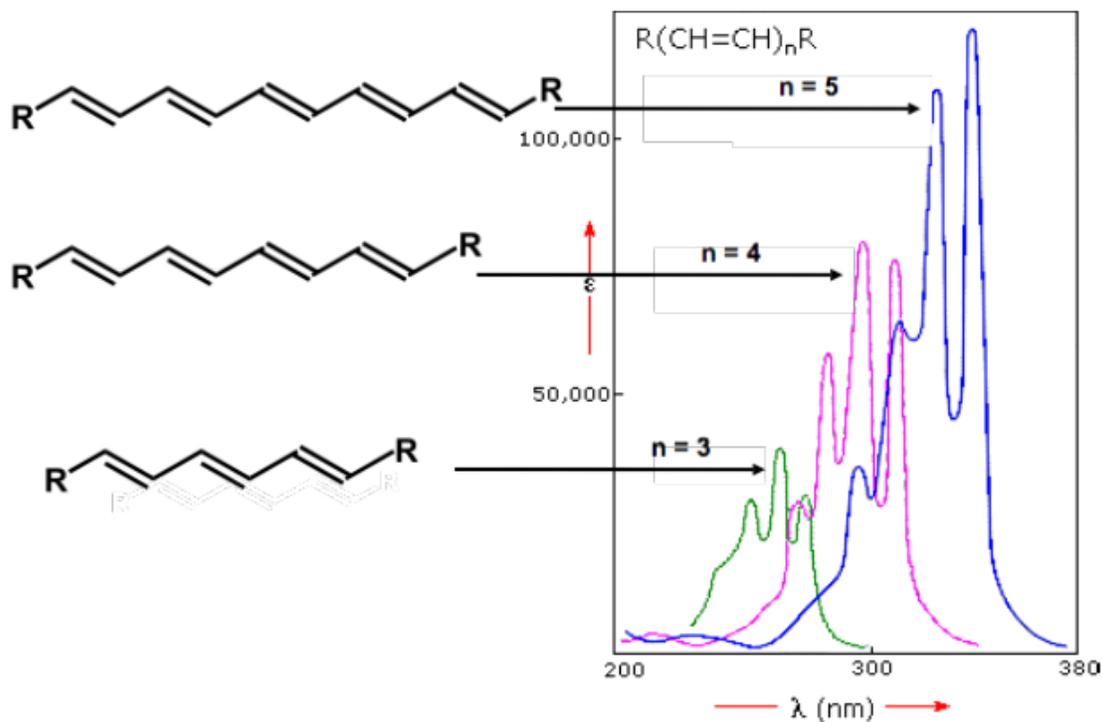
Un auxochrome est constitué d'un groupement d'atomes situés au voisinage direct du chromophore, et qui intervient alors sur la délocalisation électronique de celui-ci.

Les auxochromes sont capables de modifier la longueur d'onde λ_{\max} absorbée par le chromophore, ainsi que la valeur de l'absorbance correspondante.

On peut citer plusieurs effets :

- **Effet bathochrome** : Augmentation de λ_{\max}
- **Effet hypsochrome** : Diminution de λ_{\max}
- **Effet hyperchrome** : Augmentation de l'absorbance.
- **Effet hypochrome** : Diminution de l'absorbance.

Spectres UV de polyènes conjugués



Règles de Woodward-Fieser

Les règles de Woodward-Fieser permettent de prédire théoriquement la longueur d'onde d'absorption λ_{\max} en prenant en compte le chromophore et l'influence des éventuels auxochromes.

Exemple, pour un diène, on a un λ_{\max} de départ de 215 nm.

Puis, à chaque fois que l'on rajoute un groupement au chromophore, on ajoute un incrément à la longueur d'onde λ_{\max} .

La valeur de cet incrément est donnée par la liste ci-après (quelques exemples):

- Ajout d'une double liaison conjuguée : **+ 30 nm**
- Groupement alkyle (ex $-\text{CH}_3$) : **+ 5 nm**
- Ether : **+ 6 nm**
- Amine : **+ 60 nm**

SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (IR)

I. THÉORIE ET PRINCIPE

Chaque liaison chimique présente une fréquence d'oscillation propre à elle, appelée fréquence de résonance ou fréquence propre (les liaisons se comportent comme un ressort).

Lors de l'interaction avec une onde électromagnétique ayant la même fréquence que la liaison, cette dernière vibre. Ce qui est traduit par une absorption de la radiation. Pour les liaisons dites chimiques (C-C, C-H, C-O, N-H.), leurs fréquences se situent dans le domaine de l'infrarouge.

Les vibrations de liaison peuvent être de deux natures différentes :

- Vibration d'élongation ou de valence : les atomes vibrent suivant l'axe de la liaison chimique qui les relie.
- Vibration de déformation : les atomes vibrent perpendiculairement à l'axe de la liaison chimique qui les relie.

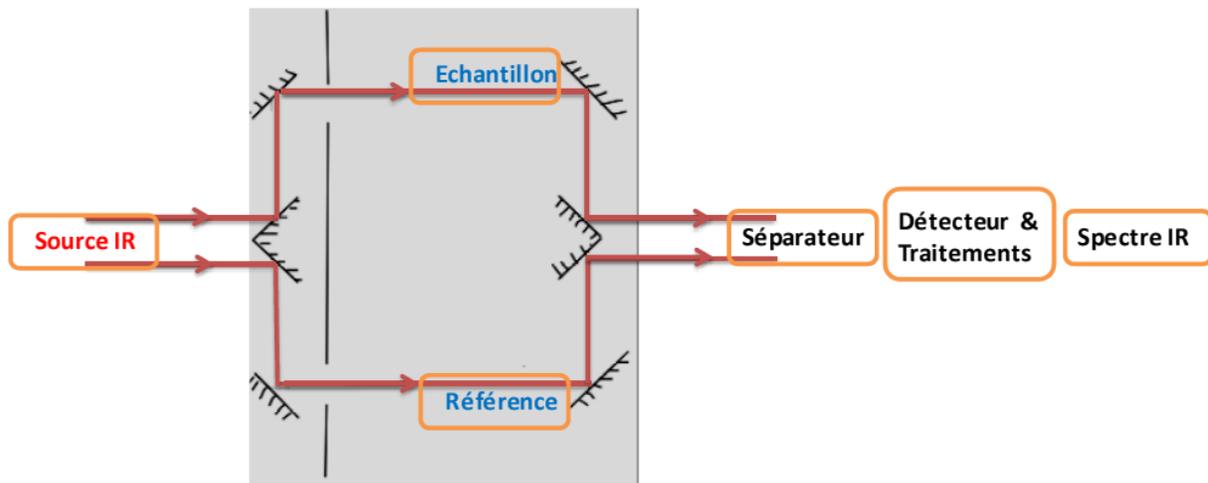
La spectroscopie IR consiste donc à envoyer des radiations IR sur un échantillon à analyser. Ainsi, certaines longueurs d'onde vont être absorbées par les liaisons chimiques de l'échantillon (par les liaisons chimiques des molécules y présentes). Ce qui génère ensuite un spectre IR présentant les différentes liaisons chimiques.

L'intérêt qualitatif de l'IR se situe dans l'identification et la caractérisation des molécules inconnues en se basant sur les liaisons chimiques identifiées. Elle peut également nous aider à tester la présence ou l'absence d'une espèce chimique dans une matière donnée.

L'IR peut être également une technique quantitative de dosage dans certaines conditions.

II. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL CLASSIQUE (SPECTROMÈTRE À DOUBLE FAISCEAUX)

Un schéma simplifié d'un spectromètre IR à double faisceaux est représenté ci-dessous :



Le fonctionnement propre du spectromètre est relativement simple. Un faisceau de lumière infrarouge ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) est séparé en deux faisceaux afin de passer aussi bien dans la solution à tester que dans une référence, ce qui va minimiser les erreurs. Puis, les deux faisceaux vont être dirigés vers un détecteur juste après un séparateur qui va couper rapidement les longueurs d'ondes, et nous aurons la trace d'un spectre, propre à chaque espèce chimique.

Pour chaque longueur d'onde, l'intensité I transmise par l'échantillon est comparée à l'intensité incidente I_0 du référence, permettant ainsi d'en déduire la transmittance T , tel que :

$$T = I/I_0$$

Par contre, concernant le spectre IR, les longueurs d'onde sont remplacées par le nombre d'onde en abscisse, notés σ , exprimé en cm^{-1} .

Ce nombre d'onde est défini comme l'inverse de la longueur d'onde λ :

$$\sigma = 1/\lambda$$

Egalement, le nombre d'onde σ d'une radiation est proportionnel à sa fréquence f :

$$\sigma = f/c$$

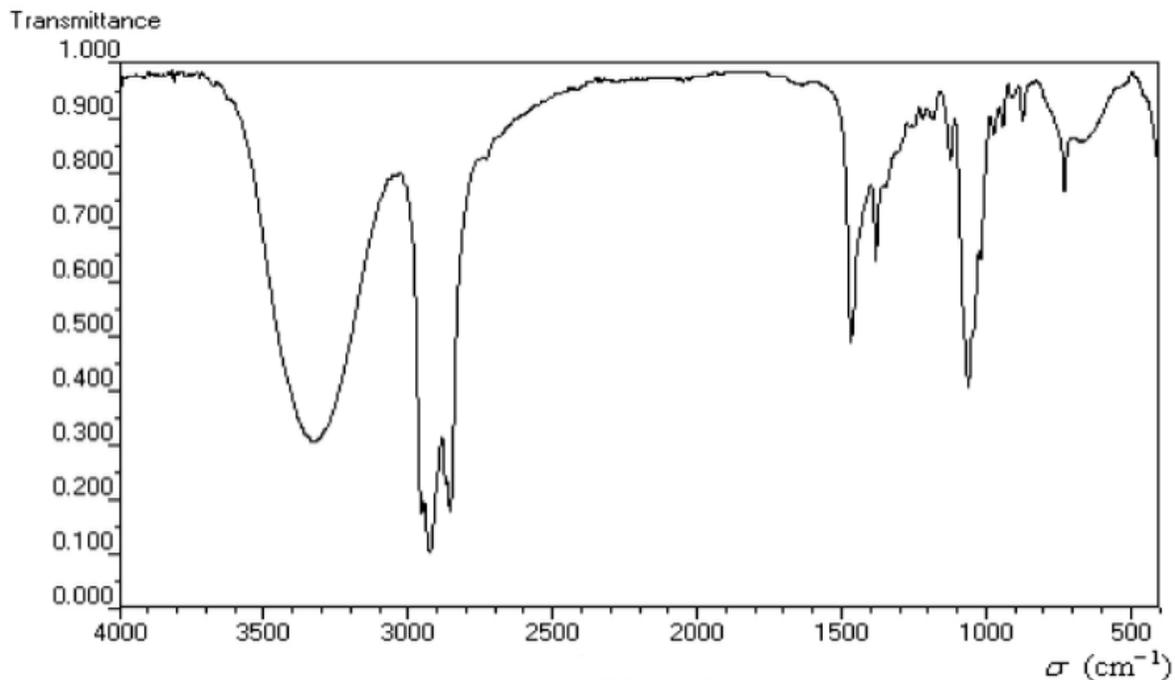
Avec, c en m/s est la célérité de la radiation lumineuse et f est la fréquence en Hz.

III. INTERPRÉTATION D'UN SPECTRE IR :

Le spectre IR est constitué de creux appelés pics ou bandes d'absorption (plus ou moins larges) correspondant à la vibration des différentes liaisons chimiques présentes dans la molécule analysée.

Donc, pour interpréter un spectre IR, il suffit de sélectionner les pics ou les bandes les plus identifiables sur ce spectre et puis comparer leurs nombres d'ondes à ceux de tables de valeurs connues dans la littérature. Ce qui permettra ainsi d'avoir des informations sur les liaisons chimiques susceptibles de constituer la molécule en question.

Exemple : le spectre IR de l'Hexan-1-ol est le suivant.



Pour identifier les liaisons correspondantes, on dispose habituellement d'un tableau de correspondance entre le nombre d'onde d'un pic sélectionné sur le spectre et le type de liaison caractéristique de ce nombre d'onde σ .

Liaison	Groupe d'atomes caractéristique	Fonction ou famille	Nombre d'onde (cm^{-1})	Intensité
O – H (libre)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 580 – 3 670	Forte
O – H (liée par liaison H)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 200 – 3 400	Forte
	Carboxyle -COOH	Acide carboxylique	3 200 – 3 400	Forte
N – H	C – NH –	Amine, amide	3 100 – 3 500	Moyenne
C – H	Cycle benzénique - C ₆ H ₅	Composés aromatiques	3 030 – 3 080	Moyenne
		Alcane	2 810 – 3 000	Forte
		Alcène	3 000 – 3 100	Moyenne
C = O	Carbonyle	Aldéhyde, cétone	1 650 – 1 730	Forte
	Carboxyle	Acide	1 680 – 1 710	Forte
	CO-O-C	Ester	1 700 – 1 740	Forte
	CO-N	Amide	1 650 – 1 700	Forte
C = C		Alcène	1 625 – 1 680	Moyenne
C – O		Alcool, acide, ester	1 050 – 1 450	Forte
C – C		Alcane	1 000 – 1 250	Forte
C – Cl		Chloroalcane	700 – 800	Forte
C – Br		Bromoalcane	600 – 750	Forte
C – I		Iodoalcane	500 – 600	Forte

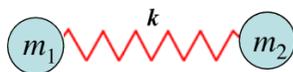
Donc, concernant l'exemple de l'Haxan-1-ol, on constate principalement deux bandes fortes ($2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ et $3200 - 3500 \text{ cm}^{-1}$). Par comparaison avec le tableau, la première bande correspond aux liaisons C-H d'un alcane et la deuxième correspond à la liaison O-H d'un alcool.

Pour les composés organiques oxygénés usuels, les pics les plus intéressants à observer sont :

- Les bandes vers 1700 cm^{-1} correspondants aux liaisons C = O
- Les bandes vers 3500 cm^{-1} dues aux liaisons O – H

VI. Théorie

VI.1. Modèle de l'oscillateur harmonique



Loi de Hooke :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

K : constante de force de la liaison

μ : masse réduite

La grandeur pratique en spectroscopie vibrationnelle est le nombre d'onde (cm^{-1}).

Spectrofluorimétrie

Introduction :

La fluorescence ou luminescence est l'émission d'énergie radiative sous l'effet d'une excitation externe. A ce phénomène s'associe toute une terminologie caractérisant l'émission (fluorescence, phosphorescence) ou l'excitation (radioluminescence, cathodoluminescence, photoluminescence, thermoluminescence, chimiluminescence, bioluminescence).

Les fluorochromes ou fluorophores sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Les fluorophores solides minéraux sont appelés luminophores.

La luminescence peut prendre naissance dans toutes les formes de la matière: condensée ou non, organique ou inorganique, cristalline ou amorphe.

Definition

La fluorescence est définie comme l'émission de lumière par des molécules sans dégagement de chaleur.

- Selon la source d'apport d'énergie, on distingue :
 - ✓ La chimiluminescence → Energie fournie par une réaction chimique
 - ✓ Bioluminescence → Energie fournie par une réaction enzymatique
 - ✓ Fluorescence → Energie fournie directement par absorption photonique / lumière
- La grande sensibilité et la sélectivité de cette technique ont permis de développer de nombreuses applications, notamment dans le domaine de l'analyse des médicaments, des substances naturelles et de leurs métabolites dans les milieux biologiques.

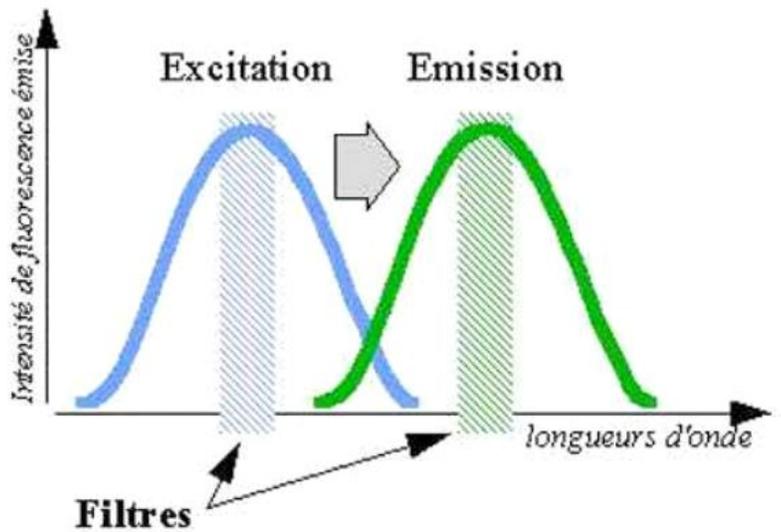
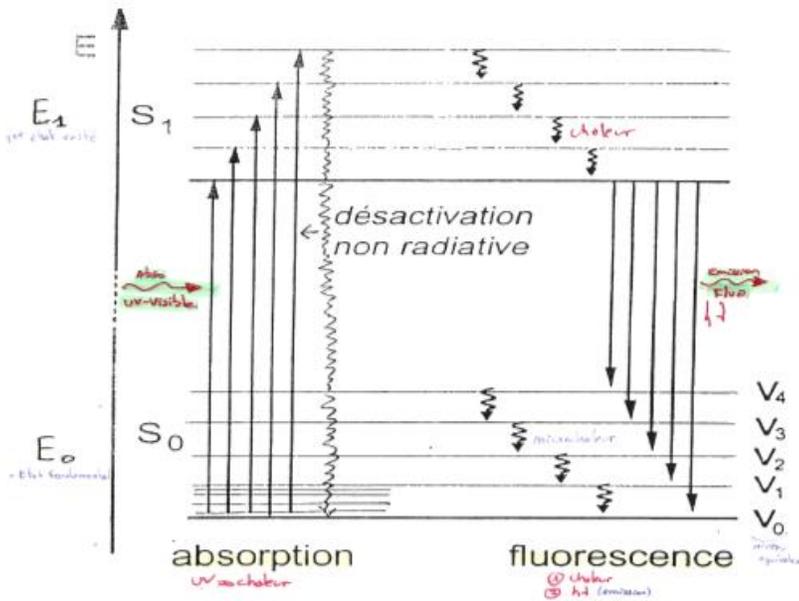
Principe de l'absorption-émission de fluorescence :

- ✚ La fluorimétrie étudie l'EMISSION de lumière par des molécules, en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou du proche ultraviolet.
- ✚ Lorsque qu'une molécule fluorescente absorbe un photon d'énergie, les électrons vont passer de l'état fondamental E_0 à l'état excité E_1 (instable). Il vont

ensuite revenir à l'état vibrationnel le plus bas de E1 par perte de microchaleur →
C'est la relaxation

- ✚ Ils vont finalement retourner à l'état fondamental E0 avec émission d'un photon de fluorescence = énergie
- ✚ Seule les transitions $\pi - \pi$ et $n - \pi$ donnent lieu à une fluorescence.
- ✚ L'énergie ainsi émise, est inférieure à l'énergie d'excitation (inverse pour la λ).

Diagramme de Jablonski et spectre de fluorescence



2 Aspect quantitatif

2.1 Rendement quantitatif de fluorescence

□ Rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés :

Rendement quantique $\Phi = I_f / I_a$ (sans unités)

Φ est compris entre 0 (absence de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale).

✚ Φ dépend:

- ✓ de la molécule
- ✓ du solvant, du pH
- ✓ de la T° (Φ diminue lorsque la T° augmente)

✚ Φ ne dépend pas :

- ✓ de l'intensité de la source lumineuse
- ✓ de la longueur d'onde d'excitation (seuls les photons absorbés sont pris en compte)

2.2 Intensité de fluorescence +++

□ L'intensité de fluorescence, à longueur d'onde λ , est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence.

$$I_F = \Phi \times I_A = \Phi \times (I - I_0)$$

Avec : I_F = intensité de fluorescence, I_A = intensité absorbée ($I - I_0$)

□ L'intensité absorbée, I_A , est donnée par la loi de Beer-Lambert, l'intensité de fluorescence devient alors :

$$I_F = \Phi \times I_0 \times (2,3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c) \quad \text{Avec } I_0 = \text{intensité incidente}$$

□ L'intensité est exprimé en Einstein par secondes (1 einstein = 6.10^{23} photons)

□ **L'intensité dépend de :**

- ✓ La T° (si T° augmente \rightarrow fluo baisse)
- ✓ de la source (contrairement à l'UV-visible)
- ✓ De la concentration en solution fluorescente
- ✓ De l'appareillage (contrairement à l'UV-visible)
- ✓ La λ d'excitation
- ✓ La nature du solvant et du pH

2.3 Expression des spectres

- ✓ **Le spectre d'excitation** d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence EMISE à une longueur d'onde fixe et en laissant varier la longueur d'onde d'**EXCITATION**.
- ✓ **Le spectre d'émission** d'une substance est obtenue en mesurant la fluorescence EMISE aux différentes longueurs d'onde d'émission, en **EXCITANT** avec une longueur d'onde fixe.

