

D Spectroscopie et spectrométrie

Les méthodes spectrométriques se décomposent globalement en deux grandes catégories, la spectrométrie des rayonnements – qui elle-même regroupe la spectrométrie d'absorption, la spectrométrie d'émission, la spectrométrie de diffusion Raman et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire – et la spectrométrie de masse.

La **spectroscopie** et la **spectrométrie**⁽¹⁾ **des rayonnements** regroupent un ensemble de méthodes d'analyse permettant d'accéder à la composition et à la structure de la matière fondées sur l'étude des spectres fournis par l'interaction des **atomes** et des **molécules** avec divers **rayonnements électromagnétiques** qu'ils émettent, **absorbent** ou **diffusent**.

Selon leur énergie, les **photons** interagissent sélectivement avec les différents niveaux électroniques qui composent la structure électronique atomique ou moléculaire. Ce sont les **électrons de cœur** (proches du noyau atomique) pour les rayons X⁽²⁾, les **électrons périphériques** (éloignés des noyaux et impliqués dans les liaisons chimiques) pour la lumière absorbée ou émise dans le **proche ultraviolet** et dans le **visible**. Dans le domaine des rayonnements **infrarouge**, c'est le saut entre niveaux de **vibration moléculaire** qui intervient, le saut entre niveau de **rotation** des molécules pour les micro-ondes et le **spin** du **noyau atomique** pour la RMN.

Spectrométrie d'absorption

Celles des méthodes de spectroscopie qui sont fondées sur l'**absorption** utilisent la loi de Beer-Lambert, indiquant la proportionnalité entre l'intensité lumineuse absorbée et la quantité de matière absorbante :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

où A est l'**absorbance** du milieu traversé par le rayonnement, I_0 l'intensité lumineuse incidente, I l'intensité lumineuse transmise, ϵ le coefficient d'extinction **moléculaire** caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l l'épaisseur traversée en cm et C la concentration en mole par litre.

(1) Le terme de spectrométrie, initialement réservé à l'enregistrement et à la mesure, tend à devenir synonyme de spectroscopie, l'œil étant remplacé dans l'observation par d'autres récepteurs et instruments, et le domaine visible ne constituant qu'un domaine particulier d'analyse.

(2) À noter par ailleurs que la cristallographie à rayons X n'est pas considérée comme une méthode spectroscopique à proprement parler.

En mesurant l'absorbance du milieu à une longueur d'onde donnée, il est donc possible de déterminer la concentration d'une substance dans un échantillon.

Dans un **spectre d'absorption** enregistré au moyen d'un **spectromètre**, les **pics d'absorption** correspondent aux longueurs d'onde que le milieu peut absorber. De même que le spectre de la lumière solaire est obtenu en la faisant passer par un prisme qui la décompose, les spectromètres analysent la répartition spectrale de l'ensemble des rayonnements électromagnétiques en les séparant par longueur d'onde au moyen d'un réseau de diffraction par réflexion. Les spectres font apparaître des pics correspondant chacun à une longueur d'onde particulière.

Selon le type d'échantillon à analyser et le niveau de performances recherché, on utilise en laboratoire la **spectrométrie d'absorption** soit sur molécules en phase liquide ou gazeuse, soit sur vapeur atomique obtenue en décomposant thermiquement les échantillons liquides ou solides.

La spectroscopie d'absorption moléculaire dans le domaine UV-visible est simple d'emploi mais ne s'applique qu'à des échantillons peu complexes car, du fait de la largeur des **bandes d'absorption moléculaires**, les spectres d'absorption ne permettent généralement pas de distinguer spécifiquement tous les composants d'un mélange complexe.

En **spectrométrie infrarouge (IR)**, l'absorption résulte des phénomènes de vibration et rotation des molécules. Les spectres d'absorption infrarouge permettent donc de déterminer la nature des liaisons chimiques composant une molécule en accédant à la constante de rappel (comme un ressort remonte un poids) de la liaison et donc de confirmer des hypothèses structurales.

Lorsque le nombre d'atomes croît, le spectre devient rapidement complexe et l'interprétation devient très délicate, en particulier, pour les composés organiques.

La spectrométrie d'**absorption atomique** est de ce point de vue plus performante car les atomes absorbent avec des **raies d'absorption** très fines. Des mesures précises sont donc réalisables même lorsque l'échantillon est constitué d'un assemblage complexe d'éléments chimiques. L'absorption atomique est une technique de référence pour l'analyse des éléments à l'état de traces dans une très grande variété d'échantillons, notamment biologiques.

Spectrométrie d'émission

Les atomes ou molécules portés dans un état excité peuvent se désexciter en émettant un rayonnement appelé **rayonnement d'émission**. Lorsque l'excitation résulte de l'absorption sélective, par les atomes ou les molécules à analyser, d'un rayonnement électromagnétique, il s'agit d'émission de **fluorescence** (ou de phosphorescence selon l'état d'excitation électronique mis en jeu).

Comme pour l'absorption, la fluorescence peut être appliquée dans le domaine des rayonnements UV-visible aux molécules ou aux atomes. La **spectrométrie de fluorescence X** désigne quant à elle le **rayonnement X** émis par les atomes, excités par absorption d'un rayonnement X. Les techniques de fluorescence sont plus complexes à mettre en œuvre que les techniques d'absorption car elles nécessitent que la particule à analyser soit excitée sélectivement par un rayonnement monochromatique. En revanche, comme le rayonnement émis est également spécifique de la particule, la spectrométrie de fluorescence présente une double sélectivité qui lui confère un très faible bruit de fond et la rend ainsi particulièrement bien adaptée à la mesure des très faibles concentrations.

L'émission de rayonnement peut également apparaître lorsque des atomes sont excités thermiquement dans un milieu porté à haute température. La **spectroscopie d'émission** est fondée sur le fait que les atomes ou les molécules excités à de hauts niveaux d'énergie se désexcitent vers des niveaux plus bas en émettant des radiations (émission ou luminescence). Elle se distingue de la spectrométrie de fluorescence par le fait que l'excitation n'est pas apportée de manière sélective, mais au contraire concerne indistinctement toutes les particules qui composent le milieu. Les **raies d'émission** correspondent donc à des rayonnements émis directement par un corps porté à haute température et le **spectre d'émission** permet de déceler et de quantifier tous les atomes ou les molécules présents dans la source d'émission.

Spectrométrie de diffusion Raman

Les interactions entre la matière et les radiations électromagnétiques conduisent également à des phénomènes de diffusion comme la **diffusion élastique** et la **diffusion inélastique**. La diffusion peut avoir lieu à la rencontre d'une interface entre deux milieux ou à la traversée d'un milieu.

D (suite)

Ce processus est le plus souvent "élastique", c'est-à-dire qu'il a lieu sans changement de fréquence des rayonnements composant le faisceau. La diffusion élastique du rayonnement solaire par l'atmosphère est, par exemple, responsable de la couleur bleue du ciel qui apparaît lorsque le regard n'est pas dirigé vers le soleil (*effet Tyndall*). L'intensité diffusée est, en effet, d'autant plus forte que la longueur d'onde du rayonnement est courte ce qui, dans le spectre solaire, correspond au bleu.

En spectrométrie, la principale utilisation de la diffusion concerne la *spectrométrie Raman*. Il s'agit de la diffusion inélastique d'un rayonnement incident par les molécules qui composent l'échantillon. L'écart entre la fréquence du rayonnement diffusé et la fréquence du rayonnement incident permet d'identifier les liaisons chimiques mises en jeu. La spectrométrie Raman est une technique très utilisée pour l'analyse structurale en complément de la spectrométrie infrarouge et de la spectrométrie de masse.

Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Le principe de la **résonance magnétique nucléaire (RMN)** est basé sur le fait qu'un atome possède un *moment magnétique*, comme une charge qui tourne et agit comme un petit aimant, gouverné par la mécanique quantique, qui s'aligne dans un champ magnétique comme une boussole dans le champ terrestre. Le principe de la RMN consiste à induire et détecter la transition entre le moment magnétique nucléaire du niveau de plus basse énergie à celui de plus grande énergie par absorption d'un rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde se situe dans le domaine des radiofréquences : lorsque l'énergie du photon correspond exactement à la différence d'énergie entre les deux niveaux, il y a absorption. Les noyaux dont le nombre de **neutrons** et de **protons** sont tous les deux pairs possèdent un spin nul. Les atomes de carbone 12 et d'oxygène 16 qui sont très répandus dans la nature ont ainsi un spin nucléaire nul. Par contre, l'hydrogène ne possède qu'un seul proton et son moment magnétique nucléaire est égal à 1/2 : il a donc deux états énergétiques possibles correspondant aux deux orientations possibles du spin par rapport au champ magnétique. La mesure de la fréquence de résonance du champ électromagnétique qui permet le passage de l'un à l'autre des états d'énergie permet de faire l'analyse des molécules.



Spectromètre de masse d'ions secondaires utilisé au CEA pour réaliser des mesures isotopiques rapides sur un échantillon par exemple prélevé sur une installation aux activités nucléaires suspectes.

Cette fréquence est fixe mais les différents noyaux d'une molécule ne résonnent pas tous à la même fréquence car leur environnement magnétique est modifié par leur environnement chimique (électronique). De nombreux spectres contiennent plus de pics que la molécule ne contient de protons en raison des interactions de ceux-ci avec leurs voisins. Deux noyaux peuvent interagir au travers de la molécule, éloignés de plusieurs liaisons chimiques, c'est ce qu'on appelle le couplage entre atomes. Cette interaction donne une structure fine au spectre RMN.

Spectrométrie de masse

La **spectrométrie de masse** est une technique de *détection* et d'*identification* extrêmement sensible qui permet de déterminer les structures moléculaires et donc la composition de l'échantillon. Il ne s'agit pas d'une spectroscopie *stricto sensu*, car elle ne fait pas appel à des niveaux d'énergie discrets. Son principe ? Un composé introduit dans l'appareil est vaporisé puis **ionisé** par une *source* de bombardement électronique (à 70 eV). L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Des ruptures des liaisons chimiques peuvent y former des ions fragments caractéristiques. Ceux-ci sont ensuite triés en fonction de leur rapport masse/charge dans un *analyseur* par

l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un *détecteur* qui amplifie le signal associé aux ions qui arrivent en des temps différents. Un système de traitement des données transforme les informations du détecteur en un **spectre de masse** dont la lecture, par comparaison avec des spectres références, permet d'établir la carte d'identité de la molécule. En utilisant un spectromètre de masse haute résolution, il est possible de déterminer la masse exacte du composé et les pourcentages isotopiques de chaque atome.

Le choix de la méthode d'ionisation est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyse. Si la spectrométrie de masse s'est progressivement adaptée aux exigences croissantes des chimistes et des biologistes (séparation de mélanges de plus en plus complexes et de forte polarité et détermination de masses moléculaires de plus en plus élevées sur des échantillons de plus en plus limités), c'est essentiellement grâce aux progrès des *techniques d'ionisation* dont l'émission ionique secondaire sur surface (SIMS), l'ionisation chimique, le thermospray et la source à bombardement d'atomes rapides (FAB), jusqu'à, dans les années 80, la désorption laser assistée par matrice (MALDI, pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) et l'électrospray (ESI, pour *ElectroSpray Ionisation*), ainsi qu'à ceux des *techniques de détection*, de la mesure du temps de vol (TOF) à la "trappe ionique" (IT) en passant par les quadripôles (MS ou Q). En protéomique, par exemple, seules la MALDI, l'ESI et la SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation*) sont utilisées.

La **spectrométrie de mobilité ionique IMS** (*ion mobility spectrometry*) est une technique d'analyse chimique en phase gazeuse qui consiste à soumettre un gaz à un champ électrique. Les molécules ionisées acquièrent une vitesse caractéristique de l'ion car dépendant de la masse et de la charge. L'arrivée des ions sur une des plaques produisant le champ provoque un courant qui est enregistré. Il est possible de relier le temps au bout duquel un pic se produit avec la nature de l'ion l'ayant provoqué.

Les scientifiques font souvent appel au couplage d'appareils appartenant aux deux grandes familles de techniques d'analyse (encadré E, **Qu'est-ce que la chromatographie ?**), par exemple, d'un chromatographe et d'un spectromètre de masse (ou d'un détecteur à capture d'électrons ECD), notamment pour étudier des mélanges complexes à l'état de traces.