

SPECTROPHOTOMETRIE ATOMIQUE D'ABSORPTION-EMISSION

Introduction

1 Principe

1.1 Excitation des atomes

1.2 Retour à l'état fondamental

2 Spectrométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF)

3 Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE)

4 Spectrométrie d'émission atomique en flamme (photométrie de flamme = PF)

5 Spectrométrie d'émission atomique en plasma couplé induit haute fréquence

Définitions

- **Spectroscopie** = Terme général qui est utilisé pour décrire des méthodes d'analyse basée sur l'absorption, l'émission ou la fluorescence de certaines molécules. (Rc = Œil)
- **Spectrométrie** → Méthodes qui met en œuvre un élément dispersif. (Rc n'est pas l'œil)
- **Méthodes spectroscopiques** = méthodes basées sur l'interaction des radiations électromagnétiques avec la matière
- **Spectre** = graphique qui représente l'absorption, l'émission ou la fluorescence en fct de la longueur (ou du nombre d'onde pour l'IR)
 - *Spectre continu* → bande continue de longueur d'onde (soleil)
 - *Spectre discontinu* :
 - **spectre de raies** / atomes
 - **spectres de bandes** / molécules

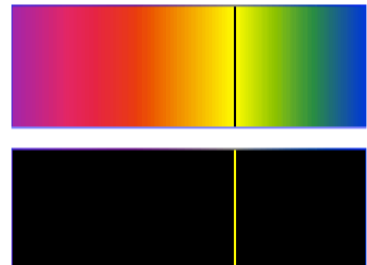
Introduction

- Méthodes d'analyse qui permet la **détection** et la **quantification** de la grande majorité des **éléments** de la classification périodique.
- Met en jeu des **atomes libres à l'état de vapeur** (ne faisant plus partie d'une molécule)
- *L'appareillage va donc :*
 - produire une **vapeur atomique** à partir de l'échantillon.
 - Induire la **destruction de la molécule** à analyser → pas d'information sur la nature des molécules initiales (sauf couplage)
- Possibilité de **doser simultanément** toutes les formes d'un même élément

1 Principe général

- L'absorption et l'émission atomique sont 2 facettes d'une même propriété des atomes énoncé par Kirchhoff : « **un corps, soumis à certaines conditions d'excitation, ne peut émettre que des radiations qu'il est susceptible d'absorber dans les mêmes conditions** » .
- Ainsi, si on introduit du sodium dans une flamme et que l'on étudie le spectre de la lumière émise, on met en évidence une **raie brillante** caractéristique du sodium à 589nm.
- Si on étudie le spectre d'une source continue (lampe à incandescence) traversant la flamme précédente en présence de sodium, on observe une **raie noire** à l'emplacement de la raie brillante précédente.

- Raie d'absorption de l'atome → **Spectrométrie d'ABSORPTION atomique**
 - Photométrie de flamme
 - Torche à plasma
- Raie d'émission de l'atome → **Spectrométrie d'EMISSION atomique**
 - SAAF
 - SAAE



1.1 Excitation des atomes

- A la différence de la spectro moléculaire, ici la source d'excitation peut être :
 - Chaleur (/ spectro d'émission)
 - Lumière (/ spectro d'absorption)
 - Choc

- Lorsque qu'un atome à l'état fondamental va recevoir un apport d'énergie correspondant à ces transitions électroniques, l'électron périphérique peut passer sur une orbitale plus externe (en fct de l'énergie) → EXCITATION
- Absorption ou émission à une longueur d'onde précise → Haute spécificité, même si milieu complexe.

NB : le nombre d'atomes à l'état excité est très inférieur au nb d'atomes à l'état fondamental. La formule de Boltzmann permet de calculer le rapport entre le nb d'atomes dans ces 2 états :

$$\frac{N_e}{N_0} = g.e^{-\frac{11600 \Delta E}{T}}$$

- Ce rapport va donc varier pour chaque atome en fct de la T° d'excitation :

Tableau I ■ Rapport atomes excités/atomes à l'état fondamental pour quelques éléments en fonction de la température

Élément	Énergie d'excitation eV	Longueur d'onde nm	N _e /N _f		
			2 000 K	3 000 K	4 000 K
Zn	5,80	213,9	7,29 10 ⁻¹⁵	5,58 10 ⁻¹⁰	1,48 10 ⁻⁷
Ca	2,93	422,7	1,21 10 ⁻⁷	3,69 10 ⁻⁵	6,03 10 ⁻⁴
Na	2,11	589,0	0,86 10 ⁻⁴	5,88 10 ⁻⁴	4,44 10 ⁻³
Cs	1,46	852,1	4,44 10 ⁻⁴	7,24 10 ⁻³	2,98 10 ⁻²

- On peut s'apercevoir que pour les non-alcalinoterreux, la quantité d'atome excité à ces températures n'est pas suffisantes pour les étudier en photométrie de flamme (émission).
- Néanmoins, si la T° est nettement plus élevée (torche à plasma), tous les éléments sont alors analysable.

1.2 Retour à l'état fondamental

- L'atome ne reste à l'état excité que 10-9 secondes
- Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une libération d'énergie égale à la différence entre 2 niveaux électroniques.
- Elle peut se faire de manière non radiative (si excitation = choc), ou radiative → EMISSION d'un rayonnement de longueur d'onde caractéristique

2 Spectrométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF)

2.1 Principe

- Un échantillon liquide est introduit sous forme d'aérosol dans une **flamme**
- Lors de la traversée de la flamme, les atomes à l'état fondamental vont **absorber le rayonnement** spécifique émis par une **source lumineuse**.
- La mesure de cette absorption (rapport des intensités incidentes et transmises), est proportionnelle à la quantité d'atomes de l'élément à doser et permet donc **de déterminer la concentration** de l'élément dans la solution par rapport à une gamme de calibration.
- L'intensité de l'absorption dépend directement du b de particules absorbant la lumière selon la loi de **BEER-LAMBERT** $\rightarrow A = \epsilon \cdot c \cdot l$

2.2 Appareillage

- **Système d'introduction de l'échantillon :**
 - **Nébuliseur pneumatique** $\rightarrow$ aspire l'échantillon et le fragmente en fines gouttelettes
 - L'aérosol formé arrive dans une **chambre de nébulisation** qui élimine les gouttelettes les plus grosses
- **Atomiseur :**
 - Constitué par un **bruleur à fente**
 - Alimenté par un **mélange air/acétylène** ou **air/protoxyde d'azote** (N_2O)
 - Production d'une flamme laminaire
 - En modifiant les débits de gazs, il est possible d'obtenir une flamme réductrice ou oxydante selon les besoins d'analyses.
- **Une source de rayonnement spécifique de l'élément à doser :**
 - **Lampe à cathode creuse :**
 - Remplie d'**argon** sous faible pression et comporte 2 électrodes.
 - La **cathode est constituée de l'élément à doser** ou d'un alliage (utilisable pour pls éléments)
 - Mise sous tension de la lampe $\rightarrow$ **ionisation des atomes d'argon** qui vont venir percuter la cathode provoquant l'excitation des atomes de celle-ci
 - Ces derniers vont alors **émettent un rayonnement** intense dirigé vers la flamme qu'il traverse longitudinalement $\rightarrow$ **EXCITATION** des atomes de l'échantillon.
 - **Lampes EDL :**
 - Ampoule en quartz contenant un sel métallique
 - Soumise à un champ électromagnétique induit par une bobine d'induction
 - Permet de diminuer la largeur des raies et augmente l'intensité
 - Surtout utilisée pour les métalloïdes tels que l'As ou le Se.
- **Un système optique :**
 - Permet de **focaliser le faisceau** et de sélectionner les longueurs d'onde grâce à un **réseau**.
 - Un **photomultiplicateur** permet de transformer l'énergie lumineuse en courant électrique.

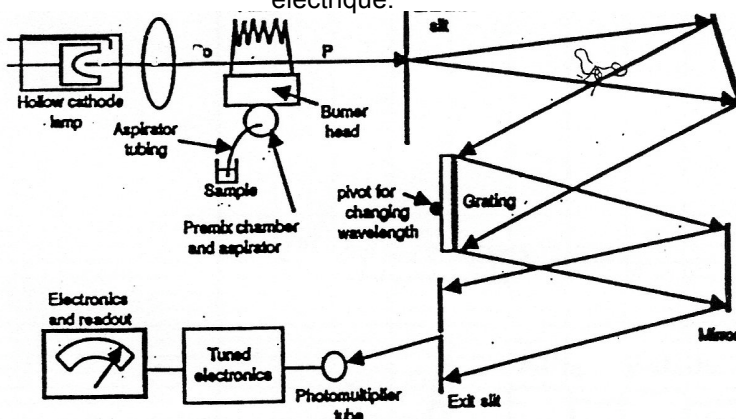
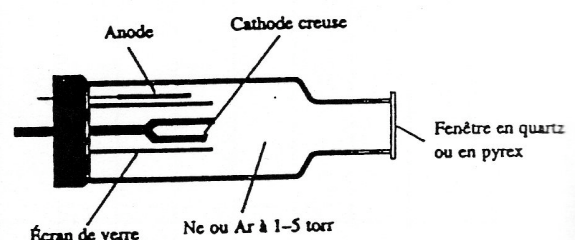


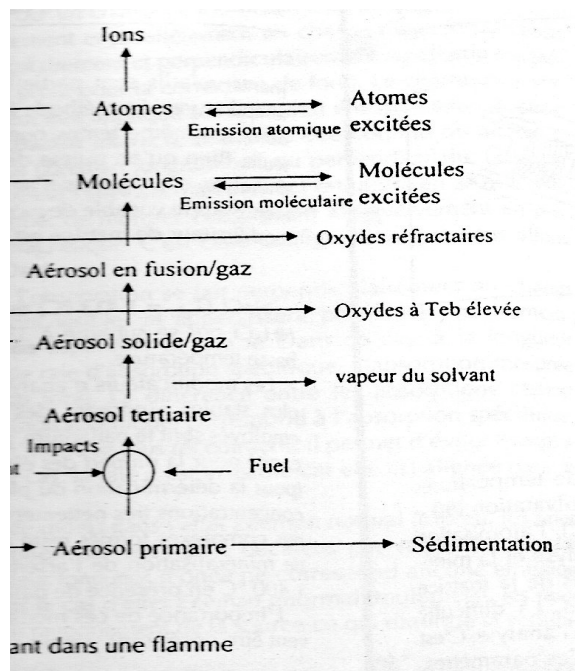
Figure 9-1. Single-beam atomic absorption spectrophotometer.



Lampe à cathode creuse

2.3 Phénomène intervenant dans la flamme

- Lors de la traversée de la flamme, l'échantillon va subir une **succession de transformations** :
 - Evaporation du solvant
 - Fusions des sels
 - Dissociation des molécules
 - Production d'atomes libres
 - Excitation
 - Ionisation
- Ces 2 derniers phénomènes sont **défavorables** car ils diminuent le nb d'atomes à l'état fondamental et donc les possibilités d'absorption.
- **L'ionisation** obéit à la loi d'action de masse → elle diminue donc avec la concentration en électrons, mais augmente quand l'énergie d'ionisation diminue ou quand le T° augmente.
- Lorsque l'on dose des éléments facilement ionisable, il est intéressant d'ajouter à l'échantillon un élément plus facilement ionisable (Césium par ex.) qui déplacera l'équilibre précédent → C'est ce que l'on appelle un **tampon d'ionisation**.



2.4 Interférences

- **Interférences spectrales = recouvrement des raies atomiques** :
 - Absorption par des molécules (halogénures) → Correction par une **lampe à deutérium**
 - Diffusion de la lumière par des particules solides → idem
 - Emission de lumière par la flamme elle-même → Correction par un **système dispersif**.
- **Interférences dues au transport de l'échantillon** :
 - **Viscosité** d l'échantillon → Utilisation d'une **pompe péristaltique**
 - **Tension de surface** (modifie la taille des gouttelletes)
- **Interférence en phase vapeur** :
 - Liées à la production d'**atomes excitée** ou d'**ions**.

2.5 Application / Avantages

- La plus ancienne des techniques, mais parfaitement approuvée et rependue (mais svt remplacée par la SAAE voir le plasma).
- **Avantage :**
 - Grande simplicité d'utilisation et rapidité d'utilisation
 - Prix relativement modeste
- **Inconvénients :**
 - Mais peu sensible (seuil de détection = 0,1 à 10 mg/L – CV < 1%)
 - Ne permet de doser que qq éléments dans les milieux biologiques :
 - Ca, Fe, Mg, Li, Cu, Zn
 - Consomme un grand volume d'échantillon (jusqu'à 1mL)
 - Technique mono-élémentaire (mais peu gênant en biologie)

3 Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE)

3.1 Principe

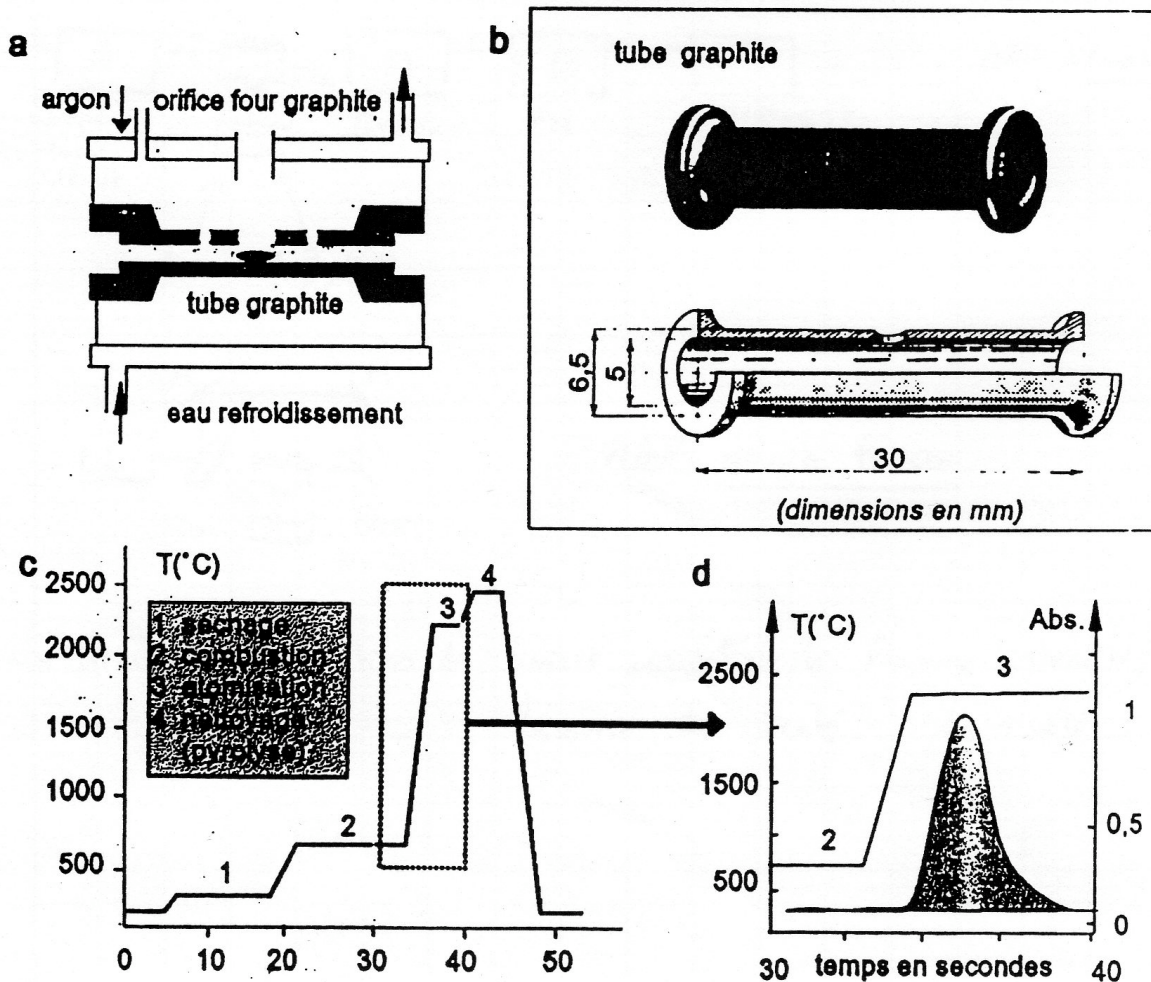
- Idem SAAF, mais le bruleur est ici remplacé par un dispositif de chauffage électrothermique constitué d'un four à graphite chauffée par effet joule.
- L'analyse est ici discontinue contrairement à la SAAF
- Toutes les étapes depuis l'introduction de l'échantillon jusqu'à l'atomisation (pdt laquelle se fait la lecture) vont ici être contrôlées au niveau de la température grâce à la programmation thermique d'étapes successives.

3.2 Appareillage

- **Introduction de l'échantillon :**
 - Echantillon = 5 à 20 µL
 - Introduction en une ou pls fois dans le four grâce à un capillaire
 - Certains dispositifs permettent l'analyse d'échantillons sous forme de suspension (poudres) ou solides.
 - L'échantillonneur automatisé permet le dépôt simultané ou séquentiel de diluant, d'étalons ou de ractifs tels les modificateurs de matrice.
- **Atomiseur :**
 - Le four est un cylindre creux en graphite de 2 à 3 cm de long et de 0,5 cm de diamètre, muni d'un orifice sur le dessus pour l'introduction de l'échantillon.
 - Tous les fours sont revêtus d'une couche de carbone pyrolytique dont la structure cristalline rend le four moins poreux et plus résistant à l'usure.
 - Certains fours comportent en plus une plate-forme dans le four, pour recevoir l'échantillon (sinon l'échantillon est directement déposé sur les paroi du four).
 - Le four est placé entre 2 électrodes de graphite qui assure le chauffage par effet joule → gradient de T° (le centre est + chaud) (= inconvénients, car l'échantillon n'est vaporisé homogènement)
 - Le four est constamment balayé par un courant d'argon (sinon air ou oxygène qui le protège de l'action de l'air aux T° élevées).

3.3 Programme thermique et phénomène intervenant dans le four

- **Désolvatation (90-200°C)**
- **Pyrolyse (300-700°C) et minéralisation (500-1300°C) :**
 - Elimination des composés de la matrice qui entraîneraient des absorptions non spécifiques lors de l'atomisation (!! pertes en analyte)
- **Atomisation (1000-2900°C) :**
 - Etape où a lieu l'absorption atomique
 - Le programme comprend une durée et une T° adaptée à chaque élément et à chaque milieu analysé (volatilité variable).
 - NB : la nature de la matrice influe énormément sur les processus de minéralisation et d'atomisation
- **Nettoyage du four (2700-2900°C) :**



3.4 Interférences et modificateurs de matrice

➤ **Liées à la matrice :**

- **Correction = Modificateurs de matrice :**
 - Forment un complexe avec les composés de la matrice qui va décomposer à une température plus basse → Devient éliminable
 - Ils sont introduits en même temps que l'échantillon
 - Ex : NH_4OH → Élimination de NaCl de la matrice
 - L'excès de modificateurs de matrice est aisément décomposé à basse température.
- **Correction = Modificateurs d'analyte :**
 - Forment des complexes thermiquement plus stables avec les composés de la matrice, autorisant des T° et minéralisation plus élevées.
 - Ex : palladium^{+++} , Ni , Cu , (PO_3Al) pour le Pb et le cadmium).
 - Ces composés sont efficaces à des concentrations très nettement supérieures à celles de l'élément à doser

NB : les modificateurs de matrice sont indispensables en SAAE !

➤ **Liées au four :**

- Si chauffage brutal p.d.t la phase d'atomisation → passage en vapeur d'atomes libres, de molécules non dissociées, de fumées et de particules → absorption non spécifique
- Correction :
 - Importance du **pré-traitement de l'échantillon** (séparation sur colonne, chélation, précipitation...)
 - Optimiser les **étapes de minéralisation** (élimination de NaCl)

➤ **Correction du bruit de fond → Mesures de l'absorption non-spécifique :**

- Lampes à deutérium (faisceau aligné à celui de la cathode creuse)
- **Correction par effet ZEEMAN** (champ magnétique) +++

3.5 Applications / Avantages

- Sensibilité >>> SAAF (seuil de détection : $0,1$ à $100 \mu\text{g/L}$ – $\text{CV} = 1,5\%$)
- Spécificité
- Faibles volumes d'échantillon
- Coût raisonnable
- Emploi aisé
- Analyse de la quasi-totalité des éléments d'intérêt clinique + les éléments présents dans le sang à des concentrations $< 20 \text{ nmol/L}$ (Cr , Co , Ni , Mo , V , Mn).
- Technique mono-élémentaire (certains appareils récents permettent l'analyse simultanée de 4 éléments).

→ Technique très répandue en raison du coût élevé de la torche à plasma.

4 Spectrométrie d'émission atomique en flamme (photométrie de flamme = PF)

4.1 Principe

- Un échantillon liquide est introduit sous forme d'aérosol dans une flamme qui va atomiser l'échantillon et exciter les atomes pour les faire passer à l'état excité.
- L'intensité de la lumière émise lors du retour à l'état fondamental est proportionnelle à la concentration de l'élément dans la solution.

4.2 Appareillage

- Similaire à la SAAF
- Une pompe péristaltique permet de d'aspirer simultanément l'échantillon, un diluant et un standard interne
- La flamme est le plus souvent produite par un mélange air/propane (#1900°C).

SPECTROPHOTOMETRE D'AA SIMPLE FAISCEAU

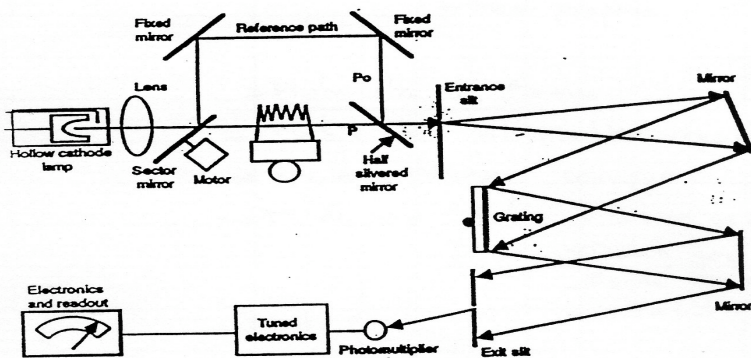
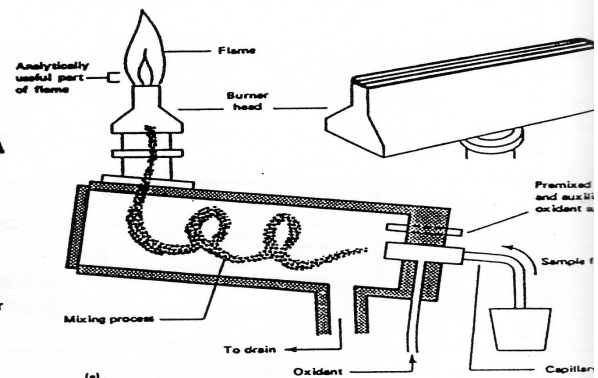


Figure 9-4. Double-beam atomic absorption spectrophotometer.

SPECTROPHOTOMETRE D'AA DOUBLE FAISCEAU

SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE



Brûleur-nébuliseur

4.3 Phénomène intervenant dans la flamme

- Idem SAAF

4.4 interférences

- La température relativement basse de la flamme limite l'émission due aux autres éléments → Un système de filtres est donc suffisant pour sélectionner les longueurs d'onde.
- L'ionisation est un phénomène parasite mais reste mineur à cette T° (<2% des atomes)
- Utilisation d'un standard interne pour palier aux fluctuations de la pompe et de la flamme (ex : Utilisation du Li pour le dosage du Na et du K...) (le Cesium peut être utilisé pour ces 3 éléments).

4.5 Application / Avantages

- La faible proportion d'atomes à l'état excité limite l'étude de l'émission atomique de la PF aux alcalin voire aux alcalinoterreux :
 - Na, Li, K (seuil de détection = 0,1 – 10 mg/L), aussi Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ mais moins performant.
- Dosage dans le sang ou dans les urines

→ Technique en retrait depuis l'apparition d'électrodes spécifiques du Na⁺ et du K⁺

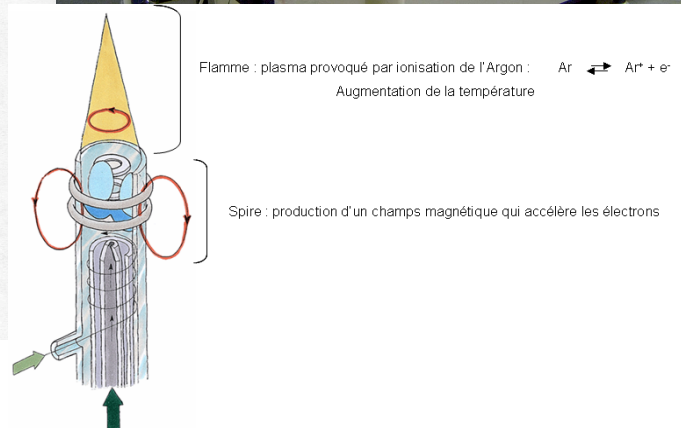
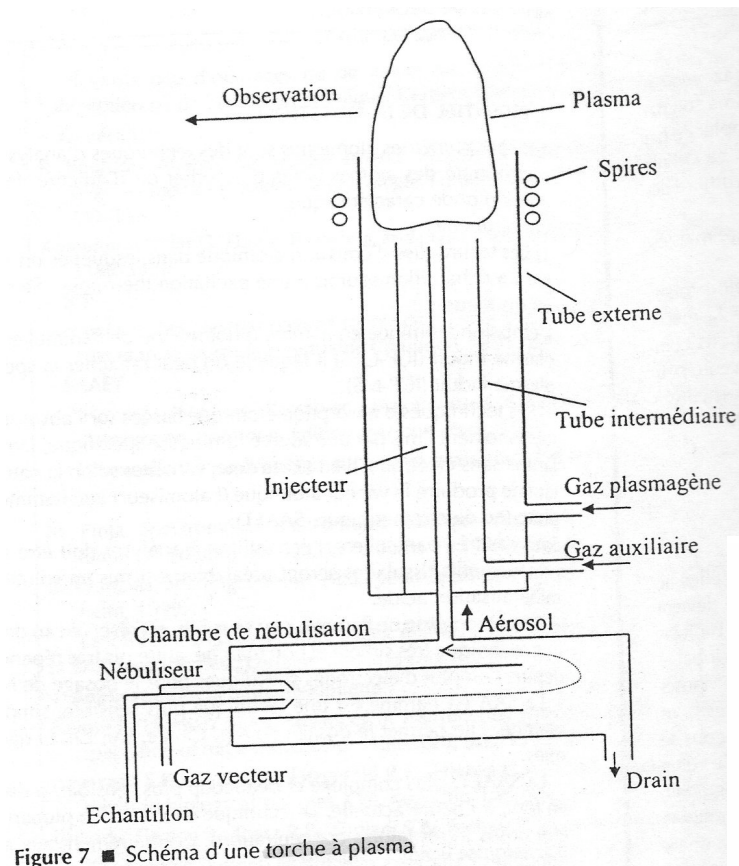
5 Spectrométrie d'émission atomique en plasma couplé induit haute fréquence (ICP-OES)

5.1 Principe

- Identique à la PF mais ici, la source thermique est remplacée par du plasma d'argon (bc plus énergétique !!!)
- Plasma = gaz totalement ionisé, électriquement neutre
- Le plasma est créé par un champ électromagnétique à haute fréquence produit par une bobine d'induction alimentée par un générateur haute fréquence.
- Un flux d'argon qui traverse ce champ est partiellement ionisé et forme le plasma.
- L'énergie du générateur va accélérer les atomes et les électrons qui subissent de nombreuses collisions provoquant l'échauffement du plasma, dont la T° varie de 3000 à 10 000 K !
- Dans de telles conditions de T° , les phénomènes d'excitation de la plupart des éléments sont consernés → Analyse de tous les éléments possible.

5.2 Appareillage

- **Nébuliseur :**
 - L'échantillon liquide est introduit dans le plasma sous forme d'aérosol grâce au nébuliseur coupé à une chambre de nébulisation
 - Choix du type de nébuliseur en fct de la nature de l'échantillon, le volume, et la sensibilité recherchée.
 - Nébulisateurs pneumatiques
 - Nébulisateurs ultrasoniques (quartz piezo-electrique)
- **Torche à plasma :**
 - Permet de créer le plasma à partir de l'argon
 - Constituée de 3 tubes concentriques :
 - Injecteur central → véhicule l'aérosol jusqu'à la base du plasma
 - Tube intermédiaire →
 - Tube externe
 - Le flux d'argon plasmagène circule dans le tube intermédiaire+externe à un débit de 12L/mn
 - Il crée le plasma et refroidit le tube externe en l'isolant du plasma.
 - L'extrémité supérieure de la torche est placée à l'intérieur des spires de la bobine d'induction → C'est à ce niveau que se forme le plasma.
- **Optique et détecteur :**
 - Une partie du rayonnement émis par le plasma est focalisé grâce à une lentille dans le système optique
 - Le faisceau arrive sur un réseau qui permet de séparer les différentes λ .
 - La lumière est ensuite captée par un détecteur, qui peut être :
 - Un photomultiplicateur (1 lecture à la fois)
 - Un capteur CCD (Coupled Charge Device) (analyse de l'ensemble du spectre)



5.3 Applications / avantages

- De nbs éléments sont accessibles à cette méthode, (tous en biologie !)
- Très grande linéarité (intéressant si les concentrations étudiées sont très variables)
- Bc moins sensible aux effets de matrice que la SAAE
- Sa **sensibilité** se situe entre la SAAF et la SAAE.
- Très onéreuse
- Cependant, la limite de détection de nb éléments est encore trop élevée pour permettre leur dosage aux concentrations physiologique (Se, Co, Cr, Mn, Ni...)

→ C'est pourquoi cette méthode reste peu répandue dans les labo de biologie clinique.

Conclusion

- Toutes techniques ne fournissent aucune indication sur la forme chimique des éléments dosés (Ex : Cr III et Cr VI / toxicité)
- Interet de la chromatographie et des couplages.

→ Choix de la méthode

	Nature de l'élément	Sensibilité	Précision	Interférences (spécificité)	Vitesse de l'analyse	Coût	Nombre ou type d'échantillons
Photométrie de flamme	Alcalins (Li, Na, K)					--	
SAA-flamme	Métaux de transition (Fe, Cu, Mn, Co...)		+++			-	Analyses ponctuelles ou répétées sur un élément
SAA-four	Mg, Al, Si Métaux de transition Métaux lourds	++++	+/-		La + longue	+	Faibles volumes Cas difficiles Faible teneur en élément dosé
SEA-flamme	Alcalins Li, Na, K, Rb, Cs					-	Analyses ponctuelles ou répétées sur un élément
SEA-ICP	Calcium (forme facilement des oxydes) Tous les éléments du tableau périodique		++	++++ Car atomisation de tout ce qui est dans la torche		++	Routine ou multiélémentaire