

3e PARTIE: PROPRIÉTÉS OPTIQUES DES SOLUTIONS MICROMOLÉCULAIRES.

Analyse quantitative, qualitative des solutions.

1. Généralités.

Les propriétés optiques des solutions sont l'expression des structures atomiques et moléculaires. Elles constituent un moyen indispensable pour préciser la nature et la quantité d'un corps dissous.

1.1 Spectre électromagnétique.

Ensemble continu des ondes électromagnétiques connues, classées dans l'ordre de leur longueur d'ondes, de leur fréquence, de leur énergie:

Spectre total des ondes électromagnétiques:

Cf spectre en physique.

Rq: Micro-ondes > ondes TV > ondes radios.

1.2 Absorption.

lumière: ondes électromagnétiques et photons.

$$E = h\nu = h.(c/\lambda).$$

Avec h la constante de Planck, ν la fréquence et λ la longueur d'onde.

Cette loi s'applique à tous les photons, mais nous allons en étudier qu'un domaine limité.

Intensité d'un faisceau: nombre de photons/ unité de temps.

Absorption:

Schéma 1

I et I_0 ont même ν et λ .

Le devenir de l'énergie transmise au milieu absorbant:

Transformation en énergie mécanique:

Echauffement du milieu, dégradation de l'énergie, intervient toujours.

Energie chimique:

Activation des molécules par modification des liaisons IM $\Rightarrow$ réactions chimiques.

Photochimique:

Réactions chimiques sous l'action des radiations. Photosensibilisation- transfert indirect. L'énergie reçue par les molécules absorbantes est transférée à d'autres molécules aptes à se transformer.

Photosynthèse:

Réaction chimique d'addition. Assimilation chlorophyllienne.

Energie lumineuse:

Le milieu absorbant restitue l'énergie reçue sous forme d'énergie lumineuse.

La lumière réémise a généralement une longueur d'onde plus grande, une énergie plus faible.

Deux processus: la fluorescence et la phosphorescence.

Schéma 2

La lumière blanche est polychromatique (comporte toutes les couleurs de l'arc-en-ciel). Chaque couleur λ (nm). Si cette lumière traverse la solution d'un colorant, l'interaction avec les molécules du colorant est différente suivant la couleur du rayon incident: certaines couleurs seront fortement absorbées, d'autres passeront tout droit à travers la solution sans subir d'altération. Le résultat est un cocktail de couleurs, différent de la lumière blanche incidente, mélange appelé la "couleur" de la solution.

Schéma 3

1.3 Emission.

Une substance convenablement excitée émet un spectre caractéristique:

→ Spectrométrie de flamme.

1.4 Polarisation.

Modification du plan de polarisation de la lumière polarisée (ondes polarisables: ondes qui se propagent sur une corde. Les mouvements peuvent se faire dans un plan vertical comme dans un plan horizontal).

2. Absorption de la lumière.

2.1 Loi de Beer-Lambert.

On éclaire une cuve par un rayonnement monochromatique.

Schéma 4

I_x est l'intensité transmise à l'abscisse x , et dI est l'intensité absorbée.

$$dI = -K \cdot I_x \cdot dx$$

K = cst qui dépend de λ et de la substance.

Si C est en mol/L, ϵ en L.mol/cm.

Le signe "-" signifie qu'une partie de l'énergie lumineuse a été absorbée.

Par intégration:

$$\int dI / I_x = \int -K dx$$

$$\ln I_x = -Kx + A \text{ (ou Log).}$$

$$I_x = A e^{-Kx}$$

$$A. ? \text{ Pour } x=0, I_x = I_0.$$

$$\Rightarrow A = I_0.$$

$$I_x = I_0 \cdot e^{-Kx}$$

Loi de Lambert: Pour une longueur d'onde donnée, l'intensité absorbée est une fonction exponentielle de l'épaisseur traversée.

Densité optique (d_o) ou extinction:

$$d_o = \log I_0 / I_t.$$

Logarithme (10) du rapport de l'intensité incidente sur l'intensité transmise.

Si a est l'épaisseur traversée:

$$\log \frac{I_0}{I_a} = (1/2,3).K.a = d_o.$$

Si $a = 1\text{cm}$.

$$d_o = K/2,3 = K'$$

K' est le coefficient d'extinction de la substance.

$$K' = \varepsilon.m$$

ε est le coefficient d'extinction moléculaire.

m est la molarité.

$$d_o = \varepsilon.m.x$$

La densité optique est proportionnelle à la molarité.

Rq: Additivité de la loi de Beer-Lambert.

Schéma 5

$$d_o T = \log \frac{I_0}{I_3} = d_{o1} + d_{o2} + d_{o3}.$$

$$d_o(\text{inconnue}) = d_o T - d_o(\text{blanc}).$$

$$d_o(\text{blanc}) = d_o(\text{paroi du verre}) + d_o(\text{solvant}).$$

$$d_o(\text{solvant}) = d_o(\text{tous les autres réactifs})$$

ou d_o du solvant (pour solution pure).

$d_o(\text{blanc})$ = mesuré préalablement; c'est le zéro de l'appareil.

$\varepsilon = ? \Rightarrow$ courbe d'étalonnage (solution de concentration connue, même conditions).

Détermination de la concentration d'une solution par utilisation directe de la loi de Beer-Lambert, c'est la photo-calorimétrie.

Il s'agit d'une détermination quantitative.

2.2 Spectre d'absorption.

Quantité de lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde.

K : coefficient d'extinction = $f(\lambda)$.

Origine:

Les atomes ont des états énergétiques quantifiés:

Fondamental: énergie la plus basse.

Excité: sous l'effet de radiations, de même pour les molécules, mais les niveaux sont nombreux.

$$E = E_e + E_v + E_r$$

Transition entre le niveau de rotation, de vibration et les niveaux électroniques.

La probabilité d'absorption d'un photon est d'autant plus grande que son énergie correspond à la variation d'énergie entre deux niveaux énergétiques ΔE .

Les interactions entre la matière et les radiations ne sont possibles que lorsque:

$$\Delta E = h\nu = E_1 - E_2$$

Processus inverse de l'émission.

$$E_r(\text{IR lointains}) < E_v(\text{IR}) < E_e(\text{visible-UV})$$

correspondance entre énergie et fréquence.

Rq: Spectre d'émission $\leftrightarrow$ spectre d'absorption.

Molécule: pas de raies, mais des bandes (en solution, collision entre les molécules).

Nombreuses transitions proches.

2.3 Appareillages.

Spectrophotométrie (cas général).

Schéma 6

mc: mono-chromateur (prismes, réseaux,...)

détecteur: cellules photoélectriques.

PM: photomultiplicateur.

Schéma 7

Coefficient de multiplication: 10^6 ; c'est à dire qu'un photon émis est multiplié en 10^6 photons.

Schéma 8

Mesure du blanc (1/4 d'onde).

3. Spectre d'absorption et d'émission.

3.1 Spectrométrie d'absorption atomique.

1. Atomisation.

2. Absorption à une longueur correspondant à une transition pour l'atome considéré.

Schéma 9

Une source émettant une intense raie de résonance de l'élément étudié.

La flamme dans laquelle est la solution étudiée produit une vapeur atomique de l'atome.

Le mc ou sélecteur servent à isoler la raie de résonance absorbée et mesure l'affaiblissement de l'intensité de la raie incidente.

Schéma 10

Source monochromatique.

Lampe à cathode creuse.

$h\nu$ spécifique du métal de la cathode creuse.

Lampe à Na,...

3.2 Spectre d'émission.

Retour à l'état fondamental après excitation $\rightarrow$ spectre de raies.

dosage sélectif.

Choix de la longueur d'onde en fonction de la substance à doser.

Intensité émise proportionnelle au nombre d'atomes excités, proportionnel au nombre d'atomes présents.

Spectrométrie de flamme:

Schéma 11

Spectrophotométrie d'émission de flamme.

Na^+ , K^+ , Li^+

Spectromètre d'absorption atomique (mc externe).

Mg^+ , Ca^{2+} , Pb^+ , Cu^{2+}

Se, zinc, fer, cobalt, nickel.

Oligoéléments.

4. Photoluminescence.

Lors de la désexcitation, l'énergie est transformée en énergie lumineuse.

Fluorescence-phosphorescence.

Schéma 12

Atome isolé.

Directement, en émettant un photon d'énergie égale à celle du photon absorbé.

Il s'agit du phénomène de résonance (1).

Indirectement, pour des niveaux intermédiaires en émettant plusieurs photons $h\nu_1$ et $h\nu_2$ (2) ou en passant par un état métastable (M) à la suite d'une collision interatomique (peu probable) (3).

Ceci (les atomes isolés) est valable pour les molécules isolées mais les lois sont plus compliquées à cause des vibrations et des rotations moléculaires qui introduisent des niveaux d'énergie supplémentaires.

L'onde est électromagnétique et les orbitales moléculaires d'une molécule parcourue par des électrons (un champ magnétique et champ électrique). Règles pour que l'interaction se produise (mécanique quantique):

Moment dipolaire électrique non nul et quanta d'énergie correspond exactement à la différence d'énergie entre les deux niveaux concernés.

Schéma 13

Diagramme de Jablonski: création de niveaux électroniques excités et émission de fluorescence.

Étape 1: un photon d'énergie $h\nu_{EX}$ (pour extérieur), source lumineuse (laser, lampe, UV,...) absorbé par le fluorochrome → passage à un état excité S_1' .

Étape 2: état excité → temps de l'ordre de la nano-seconde. L'énergie de S_1' est partiellement dissipée soit sous forme de chaleur ou bien par transfert d'énergie entre les fluorochromes (changement conformationnels, interactions avec son environnement). L'énergie interne (S_1) plus faible que l'énergie (S_1') initiale.

Étape 3: un photon $h\nu_{EM}$ (pour émis) est réémis, retour à l'état basal. L'énergie du photon réémis est plus basse et donc la longueur d'onde est plus grande. La différence d'énergie ($h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$) représente le "shift" de Stokes.

Principe:

Sur une orbite électronique, on peut trouver 2 électrons de spin différent ($-1/2$ et $1/2$).

Lorsqu'un électron change d'orbite, il peut ou non changer son spin si l'orbite est vide.

Sans changement de spin → état singulet excité.

Avec changement de spin → état triplet. (dont l'état énergétique est plus faible).

Schéma 14

Diagramme de Jablonski.

Avec A l'absorption de photon, F la fluorescence (émission), P la phosphorescence, S l'état singulet, T l'état triplet, Ci la conversion interne et PIS le passage inter système.

Mécanismes de désactivation.

Différentes voies de désactivation de l'état excité. La plus importante est la conversion interne, qui ramène la molécule dans l'état fondamental par perte d'Ev ou Er (hausse de la température).

La conversion interne (Ci): Le plus probable. L'énergie absorbée est dissipée à l'environnement par saut d'Er ou Ev. Cette désactivation est d'autant plus facile que la température est grande.

Collision: Un autre processus peut désactiver l'état excité, c'est la collision entre molécules. En effet, les chocs entre les deux molécules permet de transmettre ou de dissiper l'énergie.

Le passage inter système: Ce chemin est un peu particulier, car il nécessite un changement de spin de l'électron. L'état excité a été nommé S1.

Cette notation fait référence à l'état singulet de la molécule. La promotion de l'électron est tellement rapide que l'électron ne peut pas changer de spin. Une fois l'état excité atteint, la molécule peut passer d'un état singulet à un état triplet nommé T1.

C'est à partir de cet état que le phénomène de phosphorescence prendra naissance, quand l'état triplet T1 émettra un photon.

La réaction chimique: Configuration électronique différente. Réactivité changée → réactions nouvelles.

Les divers précurseurs sont les radicaux libres ou les ions avec éjection d'un électron.

Le transfert d'énergie: Énergie transmise à une molécule, les molécules absorbantes sont des photosensibilisateurs (et des donneurs par opposition aux

accepteurs). Ces photosensibilisateurs: rôle de capter et stocker provisoirement l'énergie avant de la restituer au produit que l'on veut faire réagir. L'intérêt d'un photosensibilisateur est qu'il permet de provoquer des réactions chimiques faisant intervenir des états triplets. Les réactions qui peuvent se produire sont des réactions photo-induites.

Dans l'état triplet, l'électron ne peut revenir sur son orbite initiale sans changer de spin (principe d'exclusion de Pauli).

Le changement de spin nécessite de l'énergie. Cela explique l'augmentation de la durée de vie de l'état triplet.

Importance du phénomène: Peu de substances fluorescentes à température ordinaire. Le plus souvent, il y a dégradation de l'énergie par collision. (ex: fluorescéine).

Application biomédicales de la fluorescence: méthode de dosage très sensible (100 fois plus que l'absorption).

Mesure directe de la fluorescence de la substance à doser.

Mesure indirecte par adjonction d'un marqueur fluorescent.

Schéma 15

5. Photochimie.

Apport énergétique par une onde électromagnétique visible/UV induisant une réaction chimique.

Les exemples sont nombreux.

5.1 Mécanismes photochimiques de la vision.

Les cellules rétiniennes assurent la transduction du signal lumineux en signal électrique.

Deux étapes: étape photochimique (rhodopsine) et étape électro-physiologique.

5.2 Vitamine D.

Précurseurs + UV $\xrightarrow{\text{ISOMÉRISEMENT}}$ vitamine D

5.3 Erythème-bronzage.

UV $\rightarrow$ Stimulation de la sécrétion de mélanine.

$\rightarrow$ transfert vers la surface.

Phénomène complexe.

UV $\rightarrow$ bronzage, brûler (notion de spectre).

5.4 Photosynthèse.

Microscopie de fluorescence.

Schéma 16

Permet de détecter des corps fluorescents par eux-même ou après marquage par des colorants fluorescents.

6. Polarimétrie.

Les ondes électromagnétiques présentent une composante électrique et une composante magnétique (vibrent perpendiculairement).

Si le champ électrique oscille toujours dans la même direction → on dit que l'onde est polarisée.

La radiation émise par un atome est polarisée.

Le champ électrique pointe la direction de polarisation.

Schéma 17

L'onde créée sur une corde sera "verticale", elle restera dans un plan vertical.

Schéma 18

L'onde créée est horizontale. Cette propriété ne se retrouve pas du tout dans les ondes sonores, ou dans les vagues à la surface de l'eau. Il n'y a pas de son "vertical" ou "horizontal".

6.2 Polarisation de la lumière.

Les polariseurs.

Schéma 19

On agite la corde horizontalement, les plaques ne laissent rien passer. La fente qu'elles laissent est en effet verticale.

Schéma 20

La fente étant horizontale, elle laisse passer les ondes sur la corde.

Avec la lumière, la même chose existe. Il existe des matériaux qui savent laisser passer la lumière que dans un seul sens.

Principes utilisés: absorption, réflexion, diffusion.

Filtre Polaroid (un morceau de plastique rigide fixe, transparent, mais un peu teinté).

Prisme de Nicol (taillé pour ne laisser passer que dans un axe).

Où utilise-t-on la polarisation de la lumière?

Les écrans à cristaux liquides (montres, calculatrices,...). Les écrans à cristaux liquides sont constitués de trois couches; les cristaux liquides sont coincés entre deux polariseurs. Les deux polariseurs laissent passer (par exemple) la composante verticale de la lumière.

Si de la lumière polarisée quelconque arrive sur l'écran, elle traverse le premier polariseur en perdant un peu de son intensité (car une partie de l'onde seulement passe). Après le premier polariseur, elle n'a plus qu'une composante verticale.

Elle traverse les cristaux liquides et elle traverse sans problème et sans perte le second polariseur, puisqu'elle a la bonne direction. Donc la lumière peut traverser l'écran; il est transparent.

Le cinéma 3D:

Un type de cinéma 3D: lunettes spéciales avec des polariseurs.

Le verre droit des lunettes est un polariseur vertical, alors que le verre gauche est horizontal.

On projette sur l'écran une image en lumière polarisée verticalement, et une autre polarisée horizontalement.

Si vous regardez sans lunettes, vous allez voir les deux images, puisque votre oeil n'est pas sensible à la polarisation de la lumière. Mais si vous chaussez vos lunettes, alors l'image polarisée verticalement ne sera vue que par votre oeil droit tandis que l'autre ne sera vue que par votre oeil gauche.

6.3 Pouvoir rotatoire.

Ex: Quand les cristaux liquides sont soumis à un champ électrique. Ils acquièrent un pouvoir rotatoire. Ils font tourner la direction de vibration de la lumière, de verticale elle devient horizontale en traversant les cristaux.

Si de la lumière arrive sur l'écran, elle traverse le premier polariseur et la vibration est alors verticale. Elle traverse les cristaux liquides et sa polarisation devient horizontale. Elle arrive alors sur le deuxième polariseur, qui ne laisse passer que les ondes horizontales.

Certaines substances, entraînent une rotation de la direction de la lumière polarisée.

Loi de Biot:

$$\alpha = [\alpha] \times C$$

Avec $[\alpha]$ le pouvoir rotatoire spécifique $f(T, \lambda)$, x l'épaisseur traversée et C la concentration de la substance en solution.

Rotation dans le sens des aiguilles d'une montre: dextrogyre.

Sens inverse: lévogyre.

7.1 Sédimentation-ultracentrifugation.

Tout corps plongé dans un liquide subit l'action de deux forces:

-Le poids, dirigé vers le bas.

-La poussée d'Archimède, dirigée vers le haut.

La force résultante dirigée vers le bas ou vers le haut (densité $>$ ou $<$ à celle du milieu); Le corps descendra ou remontera.

Ce phénomène est la sédimentation.

Les globules rouges tombent au fond du tube, les globules blancs, moins dense forment une fine couche au dessus.

Le choix de la densité du milieu permet de purifier une molécule.

Ce phénomène est lent, il prend prêt d'une heure dans le cas du sang, et pourtant, il s'agit de cellules, donc de quelque chose d'assez gros.
 La plupart des molécules biologiques sont beaucoup plus petites et la sédimentation naturelle prend plus de temps: semaines, années, siècles,...
Sur Terre, pour la sédimentation, on reste à 1G (accélération de la pesanteur), il faut utiliser une autre accélération → la centrifugation.

Centrifugation différentielle:

Schéma 21

Sédimentation:

La vitesse de chute v d'une particule de rayon r et dans un milieu de viscosité η correspond à une résistance R :

$$R = 6\pi\eta rv$$

La force agissante est la pesanteur:

$$F = mg = R$$

Et:

$$v = mg / 6\pi\eta r$$

Poids apparent = poids réel - poussée d'Archimède.

Prenons un corps:

Si $P > 0$, la flottabilité est négative, le corps va couler.

Si $P = 0$, équilibre entre poids réel et poussée d'Archimède, le corps est en équilibre de flottaison.

Si $P < 0$, il remonte car la flottabilité est positive.

Macromolécule de volume V et de masse volumique ρ .

Sa masse apparente est:

$$m_A = V(\rho - \rho_0)$$

Avec ρ la densité du soluté et ρ_0 la densité du solvant.

Elle subit l'action de la pesanteur et est soumise à une force motrice:

$$F_m = V(\rho - \rho_0)g$$

La vitesse limite est atteinte en raison du frottement (molécules du solvant).

$$F_r = f v$$

Avec v la vitesse limite et f le coefficient de friction.

La vitesse limite est atteinte quand:

$$F_r = F_m$$

Le coefficient de friction (loi de Stokes):

$$f = 6\pi\eta r$$

Équation des dimension: M/T .

Si M est la masse molaire du volume:

$$V = M / \rho_N$$

D'où:

$$(M/N) \cdot (1 - (\rho_0/\rho))g = f v$$

Hémoglobine: $v = 0,3 \mu\text{m}/24\text{h}$.

Pour augmenter la sédimentation, il faut augmenter le champ de force gravitationnel car l'agitation thermique s'oppose à la sédimentation.

Ceci est réalisé grâce à une ultra-centrifugation.

Ultra-centrifugation:

Schéma 22

Soit une particule de masse m à une distance x de l'axe de rotation. Elle est soumise à une force centrifuge F_x avec une vitesse de N tours par seconde.

Accélération:

$$\gamma = (2\pi N)^2 x$$

Avec:

$$\omega = 2\pi N$$

$$m_A = V(\rho - \rho_0)$$

V le volume de la particule.

$$V = M/\rho N$$

$$m_A = (\rho - \rho_0) \cdot (M/\rho N) = (1 - (\rho_0/\rho)) \cdot (M/N)$$

$$\text{Rq: } m_A = V\rho - V\rho_0 = m - V\rho_0 = m(1 - (V/m)\rho_0)$$

$$V/M = \bar{V}$$

Volume par unité de masse de la macromolécule.

$$m_A = m(1 - \bar{V}\rho_0)$$

À l'équilibre:

Force centrifuge = force de frottement.

$$F_x = f v$$

Avec f le coefficient de friction et v la vitesse.

$$F_x = f v = v/(\omega^2 x) = m(1 - \bar{V}\rho_0)/f = S$$

Le rapport $v/(\omega^2 x)$ (vitesse de sédimentation pour un champ gravitationnel $\omega^2 x$) s'appelle constante de sédimentation.

$$S = (M/Vf)x(1 - (\rho_0/\rho))$$

1. Constante de sédimentation.

S dépend du couple solvant soluté de la molécule: M, f, ρ_0, ρ .

S homogène à un temps (seconde).

$$v/(\omega^2 x) = [m][s]^{-1} [m]^{-1} [s]^2$$

$(\omega^2 x)$ = accélération.

Unité de la constante de sédimentation:

$$\text{Svedberg} = 10^{-13} \text{ s.}$$

Détermination de S :

$$v/(\omega^2 x) = S$$

$$\frac{dx}{dt} = x \omega^2 S$$

$$S = (dx/dt) / (\omega^2 x)$$

$$\frac{dx}{x} = S \omega^2 dt$$

$$\int_{x1}^{x2} \frac{dt}{x} = S \omega^2 \int dt$$

$$(\ln x = S \omega^2 t + \text{cst})$$

$$S = (\ln x2 - \ln x1) / (\omega^2 (t2 - t1))$$

Schéma 23

Ultra-centrifugation et masse molaire

$$M = \frac{SNf}{(1 - (\rho_0/\rho))}$$

Il faut connaître f.

Par exemple:

$$D = Kt/f = RT/Nf$$

$$M = \frac{RTS}{D(1 - (\rho_0/\rho))}$$

Résultats:

hémoglobine: $S = 4,3$

Sérum albumine: $S = 4,7$

Méthodes particulières.

Méthode dite d'équilibre de sédimentation.

La centrifugation accroît la concentration au fond.

La force centrifuge équilibre les forces de diffusion qui tendent à repousser les particules vers les faibles concentrations.

$$RT \ln C2/C1 = M(\omega^2/2)(1 - (\rho_0/\rho))(x^2_2 - x^2_1)$$

Travail osmotique = travail de la force d'inertie.

Méthode à solvant de densité croissante.

La densité de la macromolécule = celle du solvant.

Lorsque $\rho_0 = \rho$

Il n'y a plus de migration.

Permet de séparer avec une grande finesse des composés de densités différentes mais voisines.

La densité du solvant croît régulièrement en fonction de x.