

H - R.
OLIVIER
TRAITÉ
DE
BIOLOGIE APPLIQUÉE

TOME I

MÉTHODES ET TECHNIQUES GÉNÉRALES D'ANALYSE
INSTRUMENTATION ET APPAREILLAGES

H. R. OLIVIER

Ex Professeur de Clinique Médicale de Dijon
Ex Chargé de Cours de Biologie à la Faculté de Médecine de Paris

TRAITÉ
DE
BIOLOGIE APPLIQUÉE

TOME I

MÉTHODES ET TECHNIQUES GÉNÉRALES D'ANALYSES
INSTRUMENTATION ET APPAREILLAGES

Préface du Professeur G. CHARLOT

311 figures

LIBRAIRIE MALOINE

Société anonyme d'éditions médicales et scientifiques

27, rue de l'École-de-Médecine

PARIS - VI^e

1961

PRÉFACE

La chimie analytique a fait au cours de ces vingt dernières années des progrès spectaculaires, non seulement parce que, grâce à la chimie physique, les espèces chimiques sont mieux connues, particulièrement en solution, mais encore grâce aux méthodes nouvelles de mesures. Aujourd'hui des appareils faciles à manipuler nous permettent d'effectuer de nombreuses déterminations, autrefois réputées difficiles.

Il en est résulté que les méthodes anciennes de dosage, la gravimétrie et la volumétrie, ont été en partie remplacées, même en analyse chimique courante, par des méthodes de dosage plus rapides, plus précises ou plus sensibles. Ces méthodes sont en même temps des méthodes générales d'analyse des phénomènes : spectrophotométrie, potentiométrie et ampérométrie sous toutes leurs formes, polarographie, radiométrie, etc...

Des réactifs en grand nombre, la formation de complexes, l'utilisation de solvants variés ont multiplié à l'infini le nombre de réactions de caractérisation ou de dosages que l'on peut mettre en jeu avant la mesure.

Les séparations, qui autrefois nécessitaient la formation de précipités, sont aujourd'hui souvent effectuées par extraction ou par la chromatographie sous des formes variées.

Ainsi la chimie analytique moderne, grâce à ces moyens, est devenue un auxiliaire indispensable dans tous les domaines de la science.

Il faut cependant reconnaître que toutes ces possibilités sont rarement utilisées. Il est en effet difficile de se tenir au courant à la fois des progrès de sa spécialité et de ceux de la chimie analytique.

Le Dr OLIVIER a eu le grand mérite d'introduire, dans le domaine difficile de la biologie, les méthodes générales et les modes de raisonnement de la chimie analytique moderne.

J'ai personnellement suivi avec beaucoup d'intérêt la description des méthodes dont l'exposé est souvent original comme les méthodes optiques qui sont particulièrement importantes pour le sujet traité.

Les méthodes les plus récentes, comme l'utilisation des radioisotopes ou la spectrophotométrie de flamme, ne sont pas non plus négligées.

La plupart des ouvrages de chimie analytique minérale évitent en général la description des appareils et leur réglage, et ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des chimistes ont une pratique courante du laboratoire. C'est souvent une lacune qui est ici heureusement comblée.

Je crois que c'est avec ce même plaisir, que j'ai ressenti moi-même, que les analystes liraient le présent ouvrage, pour ne parler que du domaine qui m'est familier.

Il n'y a aucun doute que ce traité aura un succès mérité, dans un domaine où nous ne connaissons aucun ouvrage équivalent.

G. CHARLOT,

*Professeur de Chimie analytique
à la Faculté des Sciences de Paris.*

1^{re} PARTIE

MÉTHODES OPTIQUES D'ANALYSE

En biologie clinique, les méthodes optiques d'analyse sont basées sur l'étude des propriétés optiques des solutions ou des suspensions.

1^o La lumière peut être absorbée par le milieu qu'elle traverse et l'énergie perdue être utilisée par les molécules absorbantes ; parfois, elle donne naissance à un nouveau rayonnement, c'est la photoluminescence.

L'étude de la lumière transmise ou réémise caractérise les techniques suivantes :

Colorimétrie, néphélogétrie, fluorométrie, spectrométrie.

2^o En passant d'un milieu dans un autre, un faisceau lumineux est réfracté suivant le rapport des indices de réfraction de ces milieux. Si l'un de ceux-ci est une solution, la connaissance de son indice de réfraction renseigne sur sa constitution. Sur ces phénomènes reposent les techniques de la *réfractométrie* et de l'*interférométrie*.

3^o Enfin, la structure asymétrique des milieux biologiques leur confère la propriété de modifier le plan de polarisation de la lumière suivant la nature du corps dissous et sa concentration. L'étude de cette propriété constitue la *polarimétrie*.

CHAPITRE I

ABSORPTIOMÉTRIE

RAPPEL DES NOTIONS FONDAMENTALES

I. LES RADIATIONS LUMINEUSES

A. — RADIATION SIMPLE OU MONOCHROMATIQUE

Toute radiation électro-magnétique est considérée, en particulier en optique géométrique, comme une vibration sinusoïdale transversale, qui se propage dans le vide à une vitesse $c \simeq 3 \cdot 10^{10}$ cm/sec⁻¹.

La notion cm/sec⁻¹ signifie centimètre par seconde et implique que, dans le calcul destiné à trouver le nombre, le temps est au dénominateur. Cette notation est surtout utilisée pour caractériser les nombres purs.

Une radiation est caractérisée par les notions suivantes :

fréquence : ν : nombre d'oscillations par seconde,

période : T : durée, en seconde, d'une oscillation,

$$T = \frac{1}{\nu},$$

longueur d'onde : λ : distance parcourue dans le vide ou dans l'air, ce qui est à peu près identique, par la radiation, pendant une période

$$\lambda = c \cdot T.$$

On l'exprime en microns $\mu = 10^{-3}$ mm, ou en millimicrons $m\mu = 10^{-6}$ mm, ou en angströms $\text{Å} = 10^{-7}$ mm ;

nombre d'onde. — En lumière infra-rouge, on caractérise souvent une radiation monochromatique, à côté de sa longueur d'onde, par son nombre d'onde $\bar{\nu}$; $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda_{\text{cm}}}$

C'est l'inverse de la longueur d'onde exprimée en centimètres ; $\bar{\nu}$ est exprimée en cm⁻¹ ;

vitesse de propagation. — Dans le vide ou dans l'air, une radiation lumineuse se propage

à la vitesse c , commune à tous les rayonnements électro-magnétiques ; dans un milieu transparent d'indice n : $v = \frac{c}{n}$.

B. — RAYONNEMENT COMPLEXE

Les rayonnements complexes sont constitués de radiations simples ou monochromatiques juxtaposées.

Pour analyser un rayonnement complexe, c'est-à-dire en séparer les radiations composantes, on utilise un appareil dispersif : prisme ou réseau.

La déviation, que cet appareil impose aux radiations, est fonction de leur longueur d'onde propre. Les radiations composantes sont ainsi dispersées, séparées et ordonnées en fonction de leurs longueurs d'onde, selon un *spectre*.

On appelle donc *spectre* le résultat de la décomposition expérimentale d'un flux complexe de radiations en ses constituants primaires. Ceux-ci apparaissent alors isolés, les uns à côté des autres et rangés par ordre de fréquences ou des longueurs d'onde.

Il existe deux sortes de spectres : les spectres continus et les spectres discontinus.

1) Spectres discontinus ou spectres de raies. —

Les spectres de raies proviennent d'un rayonnement complexe, composé par un nombre fini de radiations simples ou monochromatiques.

Ils sont représentés par des lignes lumineuses bien définies, appelées *raies*, espacées les unes des autres, d'une façon, en apparence, irrégulière et dispersées tout le long du domaine spectral. Parfois, les raies se rapprochent de plus en plus près les unes des autres pour se confondre en une bande.

2) Spectres continus. — Les spectres continus sont caractérisés par l'absence de bandes

ou de raies bien définies ; ils représentent une infinité de radiations juxtaposées en un ensemble continu.

La lumière blanche comporte une infinité de radiations simples dont les longueurs d'onde couvrent sans discontinuités tout le domaine de la sensibilité spectrale de l'œil.

On distingue qualitativement 7 couleurs :

- Violet de 4.000 à 4.300 Å.
- Indigo de 4.300 à 4.500 Å.
- Bleu de 4.500 à 4.900 Å.
- Vert de 4.900 à 5.700 Å.
- Jaune de 5.700 à 6.000 Å.
- Orangé de 6.000 à 6.300 Å.
- Rouge de 6.300 à 8.000 Å.

On appelle *ultra violet* l'ensemble des radiations lumineuses dont la longueur d'onde est inférieure à 4.000 Å et, *infra-rouge* l'ensemble de radiations lumineuses dont la longueur d'onde est supérieure à 8.000 Å.

L'œil n'est sensible qu'aux radiations dont les longueurs d'onde sont comprises entre 4.000 et 7.000 Å. Cet ensemble de radiations est appelé « spectre visible ».

C. — INTENSITÉ D'UN RAYONNEMENT

Toute radiation lumineuse transporte avec elle une certaine quantité d'énergie, sous forme de grains d'énergie ou photons, de grandeur variable avec la fréquence de la radiation

$$E = h \nu$$

- E : énergie en ergs,
- ν : fréquence en cycles par seconde,
- h : constante de PLANCK = 6,624 · 10⁻²⁷ ergs-seconde.

On définit l'intensité d'une radiation, la quantité d'énergie transportée par cette radiation dans l'unité de temps. Elle est liée à l'effet produit sur un récepteur sensible tel que l'œil, une cellule photo-électrique ou un thermo-couple.

II. LES PHÉNOMÈNES D'ABSORPTION

Lorsqu'un faisceau lumineux incident d'intensité I₀ pénètre dans un milieu matériel, trois éventualités sont possibles :

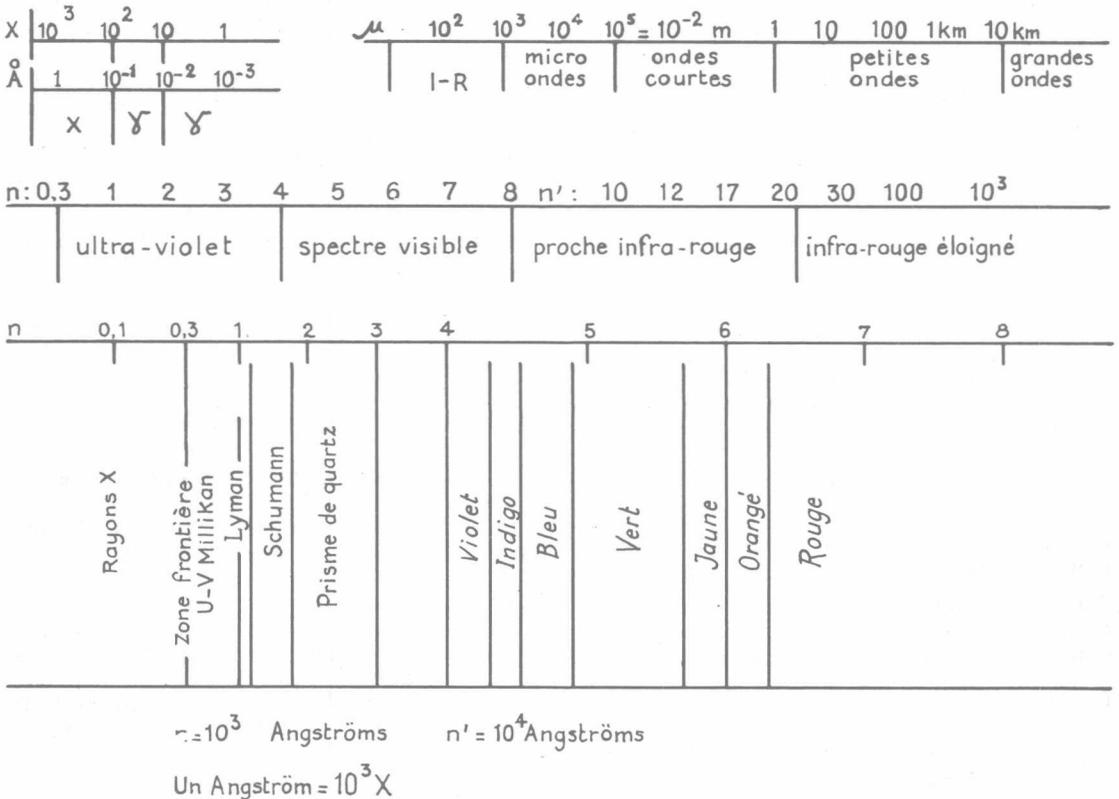


TABLEAU I

1° Il traverse ce milieu sans être modifié ; l'intensité émergente I est égale à celle du faisceau incident $I_0 = I$. Le milieu est dit *transparent* pour le rayonnement étudié.

2° Il est retenu, son énergie peut être, par exemple, entièrement transformée en chaleur. C'est le cas des corps *parfaitement absorbants* : noir de fumée .

3° Le plus souvent, le faisceau incident ne cède au milieu qu'il traverse, qu'une partie de son énergie : $I_0 > I$.

Il y a *absorption partielle*.

Absorption partielle. — Ces phénomènes intéressent surtout l'analyste. Parmi eux il faut distinguer deux groupes de faits :

a. — Dans le premier groupe, l'affaiblissement ou la perte d'intensité porte également sur toutes les composantes du faisceau lumineux, sans exception. C'est le cas d'un grillage opaque à mailles fines ou d'une plaque photographique uniformément voilée, pour le visible ou le proche ultra violet. Le milieu absorbant filtre la lumière sans préférence, sans sélectivité. Il est dit *neutre*.

b. — Dans le deuxième groupe de faits, le milieu absorbant exerce un choix préférentiel sur les diverses radiations, en fonction de leurs longueurs d'onde. Le phénomène est ici *sélectif*. Certaines radiations de longueurs d'onde bien déterminées conservent leur intensité initiale, incidente ; pour elles, le milieu est transparent ; d'autres, au contraire, perdent par exemple 90 % de leur énergie ; le milieu est, pour elles, absorbant. Le reste des radiations subit des affaiblissements intermédiaires ; pour elles, le milieu est à la fois transparent et absorbant.

Remarque. — Dans le domaine spectral du visible, l'œil humain étant sensible aux variations d'intensité des rayonnements lumineux, ces phénomènes sont évidents et d'observation courante. Les notions d'opacité et de transparence n'offrent aucune difficulté de représentation. Il n'en est pas de même dans le domaine des infra-rouges et de l'ultra violet, où il est nécessaire d'utiliser, pour définir la transparence ou l'opacité d'un milieu matériel, des détecteurs particuliers.

A. ABSORPTION EN LUMIÈRE MONOCHROMATIQUE LOIS FONDAMENTALES

La mesure quantitative de l'absorption de la lumière repose sur deux lois fondamentales

qui régissent les relations entre l'intensité du faisceau incident, qui frappe un milieu absorbant et celle du faisceau qui en émerge.

1° Loi de Lambert. — La proportion de radiations absorbées par une substance est indépendante de l'intensité de la radiation incidente. Chaque couche successive du milieu absorbe une égale fraction de l'intensité du rayonnement qui la traverse, sous condition que la qualité du rayonnement reste inchangée lors de la traversée, ce qui implique qu'il doit s'agir d'une *radiation monochromatique*.

Prenons dans un milieu absorbant homogène d'épaisseur l , une couche idéalement mince Δl , soit I , l'intensité qui la frappe, la quantité absorbée est ΔI , la proportion absorbée est $\frac{\Delta I}{I}$ (fig. 1).

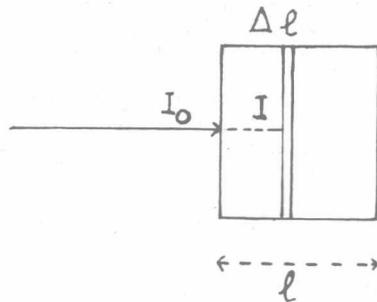


FIG. 1. — Loi de LAMBERT

Si on appelle μ le coefficient d'absorption du milieu pour une radiation de longueur d'onde λ

$$\frac{\Delta I}{I} = \mu \Delta l \text{ et } \Delta I = \mu I \cdot \Delta l$$

Lorsque Δl tend vers 0, à la limite on a :

$$dI = \mu I dl \text{ et } \int_0^l I = e^{-\mu \cdot k}$$

Pour $l = 0$, $I_0 = k$ donc $I = I_0 e^{-\mu l}$ et

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu l} \tag{1}$$

Ceci nous indique que la fraction absorbée de l'énergie incidente est une fonction exponentielle de l'épaisseur. C'est la loi générale qui s'applique à tous les rayonnements quelle que soit leur nature. C'est la loi statistique des probabilités de rencontre des photons et d'une molécule ou atome activables.

Si l'on prend le Logarithme népérien Log_e de chaque membre de l'égalité (1) on obtient :

$$\text{Log}_e \frac{I}{I_0} = -\mu l$$

en passant aux logarithmes vulgaires on a :

$\log \frac{I}{I_0} = -\mu l \cdot \log e$; $\mu \log e = 0,4343 \mu$. Cette quantité $K = 0,4343 \mu$ est appelée *coefficient d'extinction* ;

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-Kl}$$

Si $l = \frac{I}{K}$, $\frac{I}{I_0} = \frac{I}{10}$.

On voit donc que $\frac{I}{K}$ est l'épaisseur du milieu, exprimée en centimètres, susceptible de réduire au dixième de sa valeur l'intensité incidente.

Pour $l = \frac{I}{K}$, $I = 0,1 I_0$.

2° Loi de Beer. — La loi de BEER est une loi expérimentale qui exprime que dans une solution l'absorption lumineuse ne dépend que du nombre des molécules absorbantes que traverse la radiation.

Si le solvant est transparent pour la radiation envisagée, les coefficients d'absorption ou d'extinction sont proportionnels à la concentration c de la solution

$$I = I_0 \alpha^{-cl}$$

l étant exprimée en centimètres, α est une constante du milieu absorbant.

Si $c = 1$ et $l = 1$, $\alpha = \frac{I}{I_0}$ est donc le rapport des intensités incidente et émergente, pour l'unité d'épaisseur et de concentration.

LES NOTATIONS

Transmittance = $T_s = \frac{I}{I_0}$

Opacité = $O = \frac{I_0}{I}$

Densité optique = $d = \log \frac{I_0}{I}$ et $I = I_0 10^{-d}$

Coefficient d'extinction :

K ou $\epsilon = \frac{d}{l}$ ou $I = I_0 10^{-Kl}$.

On l'exprime aussi en disant que le coefficient d'extinction est la densité optique du milieu pour l'unité d'épaisseur c'est-à-dire

$$\frac{1}{l} \log \frac{I_0}{I}$$

Coefficient spécifique d'extinction K_{sp} ou ϵ_{sp} ou $E_{1cm}^{1\%}$.

C'est le coefficient d'extinction d'une solution de concentration égale à l'unité, c'est-à-dire un pour mille en poids : 1‰ (poids).

$$K_{sp} = \frac{1}{c \cdot l} \log \frac{I_0}{I}$$

Coefficient d'extinction moléculaire : K_{mol} ou ϵ_{mol} .

C'est la densité optique pour l'unité d'épaisseur d'une solution dont la concentration est d'une molécule-litre.

Si M = poids moléculaire et c' = concentration de la solution en molécules par litre. On a :

$$K_{mol} = \frac{K}{c'} = \frac{d}{c' \cdot l} = \frac{M \cdot d}{c \cdot l}$$

ADDITIVITÉ DE LA LOI DE LAMBERT

Supposons trois milieux absorbants, disposés à la file les uns des autres et successivement traversés par un faisceau de lumière monochromatique, d'intensité I_0 (fig. 2).

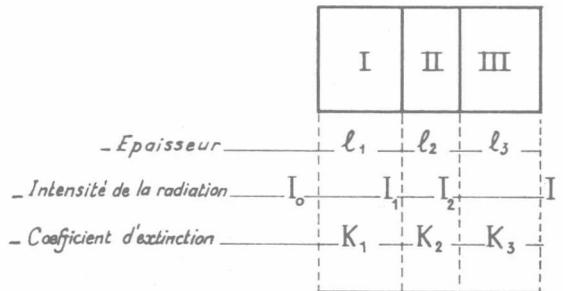


FIG. 2. — Additivité de la loi de BEER-LAMBERT.

Si d_1, d_2, d_3 sont les densités optiques des milieux, on peut l'écrire :

$$d_1 = \log \frac{I_0}{I_1} = K_1 l_1$$

$$d_2 = \log \frac{I_1}{I_2} = K_2 l_2$$

$$d_3 = \log \frac{I_2}{I} = K_3 l_3$$

Or, $\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_0}{I_1} \cdot \frac{I_1}{I_2} \cdot \frac{I_2}{I} = \log \frac{I_0}{I_1} + \log \frac{I_1}{I_2} + \log \frac{I_2}{I} = K_1 l_1 + K_2 l_2 + K_3 l_3$

d'où il résulte que si $d_T = \log \frac{I_0}{I}$ c'est-à-dire la densité optique totale de l'ensemble,

$$d_T = d_1 + d_2 + d_3.$$

Ce principe de l'additivité de la loi de Lambert s'applique très souvent en absorptiométrie. C'est le cas de la cuve à faces parallèles des photocolorimètres ; elle contient une solution et il faut y considérer successivement :

la cuve, d'épaisseur de parois l_c , dont le verre ou le quartz a un coefficient d'extinction K_c ;

le solvant, d'épaisseur l_s , de coefficient d'extinction K_s ;

la substance absorbante d'épaisseur l_a , de coefficient d'extinction K_a et de concentration c

$$\log \frac{I_0}{I} = K_c \cdot l_c + (K_s + K_a \cdot c) l = d.$$

d est la densité optique de l'ensemble.

Remarque. — L'importance de cette relation est grande, car elle permet d'effectuer ce que l'on appelle « des essais à blanc ». On appelle ainsi des échantillons contenant toutes les substances gênantes qui interviennent dans une réaction et tous les réactifs, hormis l'élément à doser. On retranche de la densité optique totale, la densité optique de l'« essai à blanc » pour obtenir la densité optique cherchée.

ÉTUDE QUANTITATIVE DE L'ABSORPTION

On appelle spectre d'absorption d'un milieu la courbe représentative de la quantité de lumière absorbée par la solution en fonction de la longueur d'onde.

1) Courbe spectrale de transmission, en fonction de la longueur d'onde :

$$\frac{I}{I_0} = f(\lambda).$$

Le milieu étudié est soumis à des radiations monochromatiques d'intensité incidente I_0 et de longueur d'onde λ ; pour chacune d'elles, on mesure par un récepteur approprié, cellule photo-électrique par exemple, l'intensité incidente et l'intensité émergente, ce qui permet, à chaque fois de calculer la transmission T ou le pourcentage de transmission % T . Sur papier millimétré, on porte, en ordonnées, ces pourcentages de transmission et, en abscisses, les longueurs d'onde correspondantes.

On obtient ainsi, s'il s'agit d'une solution, une courbe dont la forme dépend de la nature du corps dissout, de sa concentration et de l'épaisseur de solution traversée.

Filtres. — On se sert souvent de cette expression % de transmission, en fonction de la longueur d'onde, pour caractériser un filtre, c'est-à-dire, un système optique qui absorbe d'une façon sélective les radiations lumineuses.

Pour certaines d'entre elles, il se comporte comme un corps parfaitement opaque ; pour d'autres, il est transparent ou partiellement transparent, laissant passer de 50 à 100% de l'intensité incidente.

Les filtres sont le plus souvent utilisés pour isoler, du rayonnement total d'une source, les radiations d'un certain domaine spectral. C'est ainsi qu'un verre de WOOD, à l'oxyde de nickel supprime les radiations dans le visible et isole une bande large d'environ 1 000 Å avec un maximum accusé à 3 550 Å (fig. 3). Un grand

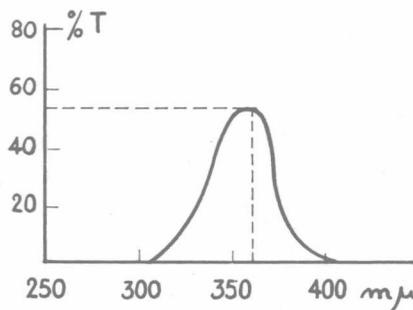


FIG. 3. — Courbe spectrale de transmission d'un filtre de Wood

nombre de photocolorimètres sont équipés soit avec des verres colorés Schott ou des plaques de gélatine colorée « Ecrans Wratten », classés par numéros, qui rappellent leurs caractéristiques.

Ils sont justement définis par leur courbe spectrale de transmission ; les caractéristiques sont : la longueur d'onde du maximum de transmission en Angströms ou plutôt en millimicrons ; le maximum de transmission ; le monochromatisme. Cette dernière qualité s'exprime par la notion de largeur de bande. Si, sur la courbe de transmission, on trace, à la demie-hauteur de la transmission maxima, une parallèle à l'axe des abscisses, on obtient sur la courbe du filtre deux points correspondants à deux longueurs d'onde différentes.

L'intervalle de ces deux points, mesuré sur l'axe des abscisses, représente en millimicrons la « largeur de la bande transmise » par le filtre (fig. 4).

On peut aussi utiliser un filtre pour délimiter une région spectrale dans laquelle un colorant parasite est éliminé ou dans laquelle une transformation peut être suivie avec le maximum de sensibilité, ou, au contraire, négligée. Par exemple, avec un filtre vert convenable, une

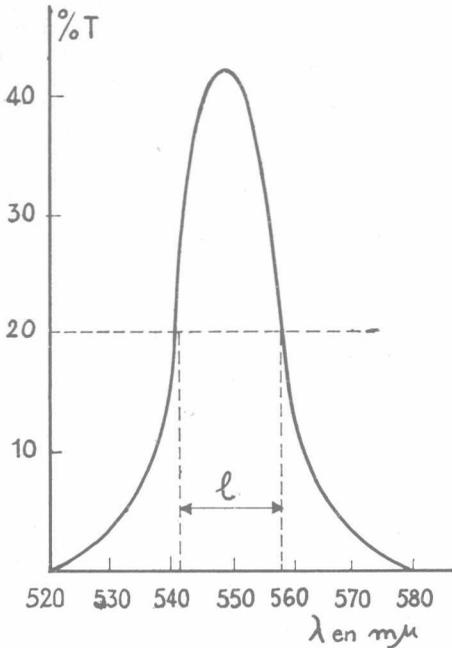


FIG. 4. — Courbe spectrale de transmission d'un filtre interférentiel l = largeur de raie

transformation de HbO_2 en Hb ne modifie pas le résultat photométrique. Au contraire, l'emploi d'un filtre rouge exalte au maximum la différence.

Les filtres en matières colorantes à haute transparence, en verre ou en gélatine, etc..., ne peuvent être fabriqués que pour des largeurs de raies assez étendues, supérieures à $20 \text{ m}\mu$; on peut évidemment pour diminuer celles-ci disposer plusieurs de ces filtres, les uns derrière les autres, mais l'ensemble ne possède qu'une faible luminosité.

La chaleur non seulement peut altérer ces filtres si elle dépasse une certaine température; mais, même à un degré supportable pour la matière du filtre, elle agit sur leur courbe d'absorption. La composition spectrale de la lumière transmise s'en trouve modifiée. Pour éviter cette cause d'erreur on a l'habitude de placer entre la source lumineuse et le filtre, un autre filtre, qui arrête les rayons infra-rouges.

2) Courbe spectrale d'absorption. $d = f(\lambda)$ ou $K = f(\lambda)$.

Le spectre d'absorption d'un composé en solution peut être aussi construit, à partir de la densité optique $d = \log \frac{I_0}{I} = f(\lambda)$ ou du coefficient d'extinction $K = f(\lambda)$; il suffit de travailler avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, pour que les mêmes valeurs expriment ces deux coefficients.

La plupart des photomètres sont gradués en « densité optique »; il suffit donc d'interposer une solution du corps considéré à concentration choisie, placée dans une cuve à faces parallèles convenable ou une cellule spéciale, sur le trajet d'un faisceau lumineux, monochromatique, dont on fait varier la longueur d'onde. On porte, sur papier millimétré, les densités optiques en ordonnées et en abscisses les longueurs d'onde. On obtient ainsi une courbe, qui répond à une cellule d'épaisseur donnée « l » et à une solution de concentration c . Cette courbe varie avec l et c ; en particulier les maxima s'aplatissent avec l'accroissement de la dilution (fig. 5). Aussi est-il pré-

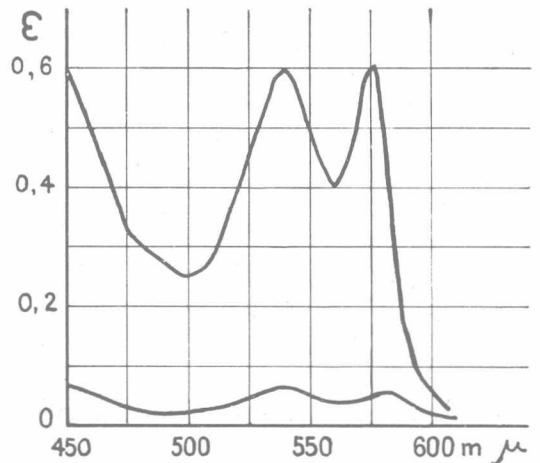


FIG. 5. — Courbe d'absorption de l'hémoglobine $\varepsilon = f(\lambda)$

I : Concentration = $0,7 \text{ gr/litre}$

II : Concentration = $0,14 \text{ gr/litre}$

Les maxima du coefficient d'extinction s'aplatissent avec l'accroissement de la dilution.

férable d'établir la courbe $K_{sp} = f(\lambda)$, où l'on s'affranchit de ces deux variables, et qui est rigoureusement caractéristique d'une substance dans un solvant connu.

Si la concentration c est inconnue, on ne peut calculer K_{sp} ; on obtiendra cependant, en partant des densités optiques, une courbe indépendante de la concentration, en se servant de papier semi-logarithmique. On portera les densités optiques en ordonnées logarithmiques et les longueurs d'onde en abscisses; on obtient ainsi ce que l'on appelle « La courbe caractéristique d'absorption », dont la forme est indépendante de la concentration; elle ne dépend que de la substance étudiée (fig. 6).

En effet, supposons que l'on opère avec la même solution, dans la même cuve, ce qui est habituel, et que l'on ait :

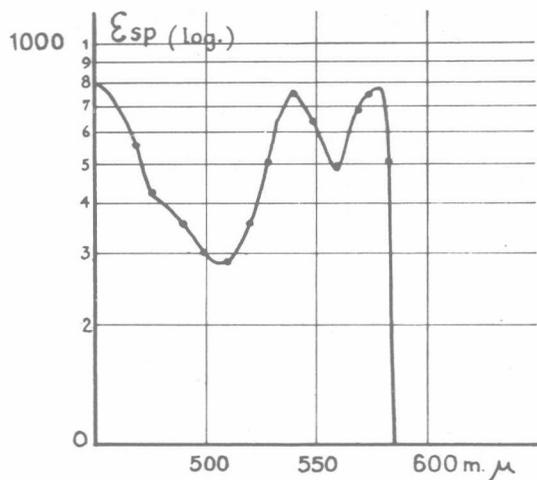


FIG. 6. — Courbe d'absorption caractéristique de l'hémoglobine $\log \epsilon_{sp} = f(\lambda)$

pour λ_1 $d_1 = K_{sp_1} \cdot c \cdot l$

pour λ_2 $d_2 = K_{sp_2} c \cdot l$

$$\frac{d_1}{d_2} = \frac{K_{sp_1}}{K_{sp_2}}$$

$$\log d_1 - \log d_2 = \log K_{sp_1} - \log K_{sp_2}$$

La valeur $\log d_1 - \log d_2$ est donc indépendante de la concentration. Quelles que soient les valeurs données à c , dans les limites de validité de la loi de BEER-LAMBERT, les courbes $\log d = f(\lambda)$ seront superposables par simple translation de l'axe des abscisses.

B. ABSORPTION D'UN RAYONNEMENT COMPLEXE

Il faut ici distinguer deux cas selon que le milieu traversé se comporte, envers les radiations qui composent le rayonnement complexe comme un milieu neutre ou indifférent ou au contraire comme un milieu préférentiel ou sélectif.

1° Milieu neutre. — Dans un milieu neutre, l'absorption est globale et porte d'une façon uniforme sur toutes les radiations composantes. Le rayonnement, malgré sa complexité se comporte comme une radiation monochromatique et obéit aux mêmes lois. L'absorption est une fonction exponentielle de l'épaisseur du milieu traversé et de sa concentration, s'il s'agit d'une solution. La loi qui régit le phénomène est la loi de BEER-LAMBERT. C'est cette

propriété que l'on utilise, lorsqu'en colorimétrie on se sert d'un coin gris-neutre pour affaiblir l'intensité d'un faisceau lumineux de référence ou de mesure dans les photolorimètres.

C'est à cette même propriété que l'on fait appel en « opacimétrie », pour mesurer l'absorption des milieux troubles, quand les particules en suspension ne sont pas trop petites, par rapport aux longueurs d'onde des rayons lumineux et que leur indice de réfraction est suffisamment différent de celui du liquide.

Compte tenu de ces conditions expérimentales, l'absorption n'étant pas sélective, on applique la loi de BEER-LAMBERT pour évaluer la masse de matière en suspension par la mesure de la densité optique du système.

Cependant, la neutralité d'un milieu trouble est approximative. La plupart absorbent sélectivement les radiations de grande longueur d'onde, dans le visible, du rouge au jaune.

2° Milieu sélectif. — En milieu sélectif, les lois de BEER-LAMBERT régissent l'absorption de chacune des radiations simples, mais elles ne s'appliquent plus du tout à l'ensemble du rayonnement (fig. 7).

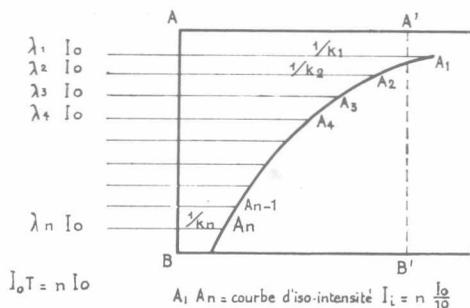


FIG. 7. — Absorption d'un rayonnement complexe en milieu sélectif

Supposons un milieu absorbant sélectif donné, qui reçoit en AB les radiations lumineuses composantes d'un faisceau complexe, de même intensité incidente I_0 , de longueurs d'onde différentes $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \dots \lambda_n$.

Notons, pour chacune de ces radiations la longueur du parcours nécessaire pour réduire leur intensité incidente I_0 , supposée identique pour toutes, au dixième de sa valeur $0,1 \cdot I_0$. Nous connaissons cette longueur ; elle est pour chaque radiation, respectivement :

$$\frac{I}{K_1}, \frac{I}{K_2} \dots \frac{I}{K_n}$$

avec

$K_1 = 0,43 \mu_1 ; K_2 = 0,43 \mu_2 \dots K_n = 0,43 \mu_n$, $\mu_1, \mu_2 \dots \mu_n$, étant pour chacune des radia-

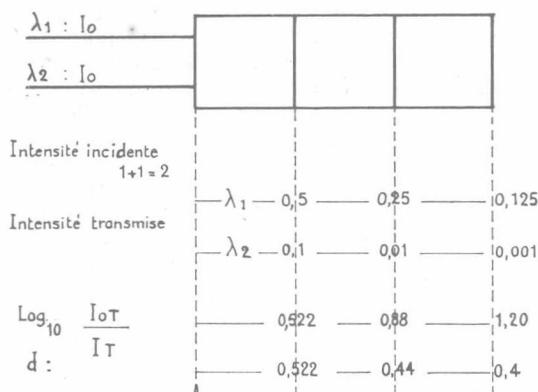


FIG. 8.

tions simples considérées, le coefficient d'absorption du milieu pour chacune d'elles. Il exprime, peut-on dire, la sensibilité de la molécule du milieu envers chacune des radiations, d'une façon isolée.

Pour chacune des radiations, nous déterminons ainsi un point où l'intensité de la lumière transmise sera $\frac{I_0}{10}$: $A_1, A_2, A_3 \dots A_n$.

Ces points sont en effet à des distances différentes de AB : $K_1, K_2, K_3 \dots K_n$, fonction de μ donc de la longueur d'onde de chacune des radiations $\lambda_1, \lambda_2 \dots \lambda_n$.

Sur la courbe irrégulière A_1, A_2, \dots, A_n , l'intensité globale est $n \cdot \frac{I_0}{10}$; on voit qu'il n'en est pas de même sur une tranche de section A'B' du milieu, perpendiculaire à la direction du faisceau lumineux.

Le calcul conduit à des résultats identiques : Supposons un milieu absorbant sélectif divisé en trois tranches d'épaisseur-unité. Faisons tomber sur cette cuve un rayonnement complexe, composé de deux radiations monochromatiques d'égale intensité = I , de longueurs d'onde différentes : λ_1 et λ_2 (fig. 8).

λ_1 subit dans son passage à travers une tranche d'épaisseur-unité une absorption de 50 %, et λ_2 , une absorption de 90 %.

La concentration étant identique, les densités optiques calculées devraient être identiques ; le calcul montre qu'il n'en est rien : La loi de Beer-Lambert n'est pas satisfaite dans le cas d'un rayonnement complexe.

C. CONDITIONS DE VALIDITÉ DES LOIS DE BEER-LAMBERT

Les lois de BEER-LAMBERT qui régissent les phénomènes d'absorption ne sont applicables

que dans certaines conditions techniques qui doivent être rigoureusement respectées. Ces conditions sont les suivantes :

- 1° Monochromatisme du faisceau incident.
- 2° Stabilité chimique de la substance absorbante dissoute. Influence de la dilution sur certaines constantes de la solution.
- 3° Importance négligeable de la diffusion.

1) MONOCHROMATISME DU FAISCEAU INCIDENT

Comme on l'a vu, les lois de BEER-LAMBERT ne s'appliquent exactement qu'aux radiations simples ; mais, l'usage de radiations simples est un idéal rarement atteint.

Lorsqu'on utilise comme source lumineuse un spectre discontinu, on peut assez facilement en isoler une raie et considérer, malgré le phénomène de DOPPLER, qu'on travaille avec un faisceau monochromatique.

En général, la source utilisée à un spectre continu, dont il faut isoler, par un filtre ou un monochromateur, une bande de longueurs d'onde aussi étroite que possible, dont les extrêmes ne s'écartent l'une de l'autre que de quelques millimicrons : de dix à vingt μ dans les appareils à récepteurs sensibles.

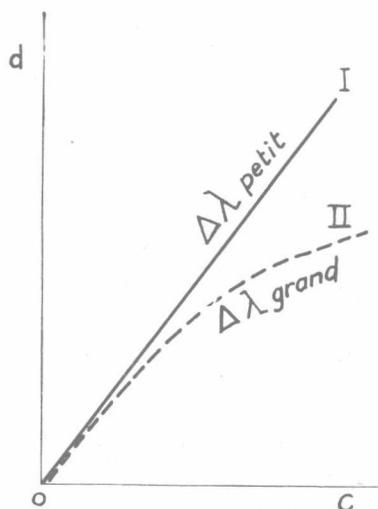


FIG. 9. — Courbe des densités optiques en fonction des concentrations, en rapport avec le choix de la radiation lumineuse.

- I : au palier maximum de la courbe d'absorption $\Delta\lambda$ est petit K_{sp} est grand, $d = f(c)$ est une fonction linéaire.
- II : dans une zone de plus grande pente Δ est grand K_{sp} petit, la courbe $d = f(c)$ n'est plus une fonction linéaire de la concentration.

On choisit comme radiation celle dont la longueur d'onde correspond à un maximum de la courbe d'absorption, $K = f(\lambda)$, de la substance à doser.

Ceci pour les deux raisons suivantes :

1° Parce que, c'est dans la zone des longueurs d'onde un peu inférieures au maximum que la courbe d'absorption se rapproche de l'horizontale et que, pour une différence $\Delta\lambda$, ΔK est le plus petit ; la courbe $d = f(c)$ est linéaire (fig. 9).

2° Parce que, dans cette zone, d'après la formule $d = K_{sp} \times c \times l$, K_{sp} , étant à un maximum, une petite variation de la concentration de la solution Δc sera multipliée par un coefficient important et se traduira par une variation d'autant plus importante : Δd de la densité optique, ce qui accroît la sensibilité du système.

2) CARACTÉRISTIQUES DE LA SOLUTION

Les solutions concentrées ne suivent pas la loi de BEER : l'absorption augmente plus fortement que la concentration, anomalie attribuée aux forces de VAN-DER-WALLS ; le coefficient d'extinction K dépend de l'indice de réfraction de la solution.

En effet, dans la formule de BEER $I = I_0 \alpha^{cl}$, ce n'est pas α lui-même, mais l'expression

$\frac{\alpha n}{(n^2 + 2)^2}$ qui est indépendant de la concentration (n est l'indice de réfraction de la solution). D'après la théorie de la dispersion de la lumière, l'indice « n » augmente avec la concentration ; de telle sorte que I diminue en fonction de l'accroissement de « n ». Cependant, si la concentration du corps dissout est inférieure à 10^{-2} M, l'erreur relative atteint rarement 0,1 %.

Les interactions moléculaires ou ioniques, en milieu très concentré, ainsi que les réactions chimiques peuvent aboutir à une relation non linéaire entre densité optique et concentration ; l'influence des réactions chimiques étant d'ailleurs de beaucoup la plus importante.

C'est ainsi que certains sels de Cobalt forment des complexes colorés dont la constitution varie avec la concentration. Dans certains solvants, la concentration favorise des polymérisations, des associations moléculaires qui modifient l'absorption du fait des variations de la concentration ou du coefficient d'extinction.

La méconnaissance de ces inter-réactions chimiques explique l'apparente contradiction entre les résultats de la mesure expérimentale et les calculs théoriques. Il s'agit d'exceptions apparentes plutôt que réelles aux lois de l'absorption.

Les modifications du pH modifient les coefficients d'extinction de certaines substances

en solution ; il en est ainsi de la méthémoglobine.

3) MILIEUX DIFFUSANTS

Dans les milieux diffusants, l'opacité n'est pas seulement due à l'absorption ; une partie de l'intensité incidente est diffusée latéralement et échappe à la mesure. La diffusion apporte aux mesures de densité optique une erreur par excès.

Pour DOGNON, tant que la diffusion reste relativement faible, l'erreur reste modeste par rapport à l'absorption ; on obtient une correction approximative en considérant que l'absorption réelle est donnée par la valeur de l'absorption en position rapprochée habituelle, c'est-à-dire moyenne, diminuée de la différence entre les valeurs des absorptions relatives correspondant aux deux positions extrêmes (ou mieux des densités optiques). On peut aussi utiliser le colorimètre intégrateur à sphère du même auteur (voir page 36).

En spectrophotométrie précise, ces erreurs ne jouent pas ; car on ne fait pas de mesures sur une solution qui ne soit absolument transparente à l'œil.

Néanmoins, certains réactifs forment avec le corps à doser une laque colorée dans laquelle le colorant est adsorbé sur des particules colloïdales, avec changement de couleur. Bien que de telles solutions soient transparentes, la lumière est partiellement diffractée, absorbée et réfléchiée ; la densité optique est plus élevée que celle qui correspond à la seule absorption. Entre certaines limites de concentration, l'écart est souvent proportionnel à la concentration du colloïde, de telle sorte que la densité optique mesurée reste, dans ces conditions, proportionnelle à la concentration de la substance à doser.

Dans ces cas, il est utile de vérifier, sur une courbe d'étalonnage, si la loi de BEER est satisfaite. Même si les écarts sont modestes, lorsque la concentration du corps dissout s'élève, ou se servira de la courbe d'étalonnage.

La complexité de ces phénomènes engage d'ailleurs à préférer comme mode de dosage la technique dite différentielle (voir page 45).

D. LES PHÉNOMÈNES ÉLECTRONIQUES DE L'ABSORPTION ET LES ÉCHANGES D'ÉNERGIE AU NIVEAU DE L'ATOME ET DE LA MOLÉCULE

1) RAPPEL DES NOTIONS FONDAMENTALES

L'atome. — L'atome est constitué d'un noyau central, de masse élevée, autour duquel

gravitent un certain nombre d'électrons, qui évoluent sur des orbites, que l'on admet elliptiques. Ils sont animés d'un mouvement de rotation sur eux-mêmes, autour d'un de leurs diamètres.

L'énergie d'un électron dépend de la distance de son orbite au noyau ; à chaque orbite correspond donc un niveau d'énergie ; les plus bas niveaux d'énergie correspondent aux orbites situées le plus près du noyau.

b) **La molécule.** — La molécule est constituée par l'union de plusieurs atomes, deux par exemple, pour simplifier. Chaque atome conserve ses électrons profonds, à peu près aux mêmes niveaux quantiques d'énergie que lorsqu'il est isolé. Au contraire, les électrons les plus superficiels, ceux qui assurent les propriétés chimiques de la molécule sont situés sur la même orbite, où il n'est pas possible d'en discerner l'appartenance.

2) LES ÉCHANGES D'ÉNERGIE

a) **Au niveau de l'atome.** — Un atome au repos se trouve dans un état de stabilité correspondant à une énergie minimum W_r ou état fondamental.

Lorsqu'une radiation lumineuse est absorbée dans un milieu matériel, elle apporte à un atome un quantum d'énergie $h\nu$ ou photon, qui éloigne du noyau un des électrons jusqu'à un niveau correspondant à une énergie maxima $W_r + h\nu$.

L'atome ainsi porteur de l'excédent d'énergie $h\nu$ est dit activé.

Cette activation est d'autant plus élevée que l'électron a été plus éloigné du noyau. A partir d'une certaine valeur de cet accroissement d'énergie, l'électron est projeté hors de l'atome ; ce dernier perd une charge négative, il est ionisé positivement. C'est l'effet photo-électrique qu'utilisent les cellules photo-électriques pour transformer l'énergie lumineuse en une énergie électrique dont on peut mesurer l'intensité.

b) **Au niveau moléculaire.** — Les molécules possèdent une énergie due aux électrons : W_e , qui est l'énergie électronique ; mais, elle ne représente pas à elle seule toute l'énergie moléculaire W , il existe encore une énergie W_o , liée aux oscillations des atomes composants, l'un par rapport à l'autre, autour d'une position moyenne, et une énergie W_c , due à la rotation de la molécule entière autour d'un de ses axes.

L'absorption d'un photon peut se faire au bénéfice de chacune de ces énergies.

Il faut moins d'énergie pour faire tourner la molécule que pour faire osciller ses atomes ;

il en faut plus que dans ces deux alternatives pour déplacer un électron.

C'est pourquoi les manifestations spectrales de l'absorption se déplacent vers les courtes longueurs d'onde, lorsqu'on passe de la rotation à l'oscillation, puis au déplacement électronique.

Energie de rotation pure → Infra-rouge lointain (raies fines)

Energie de vibration → Proche infra-rouge

Energie électronique → visible et ultra-violet.

Ce sont ces phénomènes qui rendent le spectre d'absorption d'une molécule particulièrement complexe car tous vont s'y inscrire, ils ne sont jamais isolés. La vibration s'accompagne souvent de rotation ; cette association fait apparaître dans le spectre une bande d'absorption « oscillation-rotation » qui se résout en trois bandes rapprochées P, Q, R. Q est la raie fondamentale qui répond au phénomène d'oscillation.

On ne peut également produire de déplacement électronique sans provoquer la vibration et la rotation. Aussi trouve-t-on, à côté de la « raie électronique », tout un système vibration-rotation, dans le spectre d'absorption.

Ainsi, le spectre d'absorption d'une substance donne des renseignements sur sa structure moléculaire et permet de fructueux rapprochements entre des corps différents et cependant doués de propriétés bio-chimiques analogues (Raymond LATARJET).

3) LA DÉSACTIVATION

Après un temps très court (10^{-8} à 10^{-4} seconde), l'état activé de la molécule prend fin par un phénomène de désactivation. Ce phénomène se traduit par l'apparition de chaleur ou une émission de lumière. Cette émission de lumière porte le nom de *fluorescence*.

GÉNÉRALITÉS SUR LA FLUORESCENCE. LOI DE STOCKES

La fluorescence est donc la propriété que possèdent certains corps, lorsqu'ils reçoivent une radiation de longueur d'onde λ_a qu'ils absorbent, d'émettre et de diffuser une radiation de longueur d'onde λ_b , supérieure à celle de la radiation excitatrice.

C'est un phénomène instantané ; il cesse dès que le rayonnement excitateur est supprimé. L'émission se produit dans toutes les directions, comme une lumière diffusée.

Loi de Stockes. — Pour qu'il y ait fluorescence, il faut qu'il y ait absorption. Celle-ci ne porte généralement pas sur une seule radiation excitatrice λ_0 , mais sur un ensemble de radiations compris entre deux longueurs d'onde extérieures λ_1 et λ_2 , λ_0 correspond à l'absorption

maxima. La lumière de fluorescence comporte aussi un groupe de radiations, une bande d'émission, comprise entre 2 longueurs d'onde extrêmes : $\lambda'_1 \lambda'_2$ avec λ_f , qui en est l'axe.

Le maximum de la courbe d'absorption du faisceau excitateur dans l'intervalle considéré $\lambda_1 \lambda_2$: λ_0 est moins élevé dans l'échelle croissante des longueurs d'onde que le maximum de la courbe de réémission : λ_f

$$\lambda_0 < \lambda_f$$

Par exemple :

Corps	λ excitation en millimicrons	λ fluorescence en millimicrons	couleur de fluorescence
Fluorescéine . . .	450	525	verte
Quinine.	310	420	bleue
Porphyrine . . .	350	650	rouge

On ne peut exciter une fluorescence jaune avec un rayonnement rouge. Inversement, avec des rayons ultra-violetes, on peut exciter toutes les fluorescences visibles des substances non transparentes dans l'ultra-violet.

Intensité de fluorescence.

Une solution rendue fluorescente se comporte comme une source de rayonnement complexe, dont on peut établir le spectre.

Ce spectre est caractéristique de la substance émettrice ; chacune de ses radiations correspond, en effet, au saut d'un électron entre deux niveaux d'énergie et la répartition statistique des différents sauts possibles, c'est-à-dire des activations, ne dépend que de la structure de la molécule. Mais, de nombreux facteurs interviennent qui compliquent les spectres de lumière de fluorescence et en rendent l'interprétation délicate.

Par contre, il n'en est pas de même de l'Intensité de fluorescence.

Celle-ci est proportionnelle, sans ambiguïté :

- 1° A l'intensité du faisceau incident.
- 2° A la concentration de la substance émettrice dans le milieu absorbant.

3° A l'épaisseur du milieu traversé.

En effet, l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre n des désactivations dans l'unité de temps, lui-même sous une étroite dépendance du nombre N des activations. Ce dernier est en rapport intime avec l'absorption du flux excitateur, condition première du phénomène.

Or, l'absorption du faisceau incident, est fonction de la concentration et de l'épaisseur du milieu traversé c'est-à-dire des conditions géométriques de l'expérience.

Remarque.

Les phénomènes de fluorescence semblent donc obéir à des lois simples qui devraient en rendre facile l'application à l'analyse. La réalité est toute autre, pour les raisons suivantes :

1° A côté des activations lumineuses qui interviennent directement sur l'intensité fluorescente diffusée, il en est d'autres, non lumineuses, engendrées par induction entre molécules voisines. Leur nombre croît avec la concentration de la solution. De ce fait, le rendement de fluorescence, donné par le rapport $\frac{n}{N}$

des désactivations aux activations, décroît au fur et à mesure que la concentration de la solution augmente, suivant une loi sensiblement exponentielle. De telle sorte que l'intensité de fluorescence croît avec la concentration, passe par un maximum, puis décroît, au moment où le phénomène, que nous venons de décrire est dominant.

2° Au fur et à mesure que la concentration de la solution croît, augmente parallèlement l'absorption par la substance émettrice, des radiations émises, car, les bandes d'absorption et d'émission sont proches l'une de l'autre et chevauchent.

Il y a auto-absorption.

3° Le solvant, indépendamment de toute combinaison chimique avec la substance dissoute, intervient sur l'intensité de fluorescence, en modifiant le phénomène de base d'activation.

L'ABSORPTIOMÉTRIE EN ANALYSE QUANTITATIVE

Comme on l'a vu l'absorption des radiations lumineuses par une solution est proportionnelle, toutes choses égales d'ailleurs, à la concentration de la substance dissoute. C'est sur cette propriété fondamentale et, par conséquent, sur l'application des lois de BEER-

LAMBERT que reposent les méthodes absorptiométriques utilisées en analyse quantitative. Celles-ci participent donc à la fois aux possibilités mais aussi aux restrictions que permettent ou qu'imposent ces lois.

Pour mesurer une absorption lumineuse par