

Initiation à la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Partie théorique

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Objectifs pédagogiques: A la fin de la formation le stagiaire doit être capable de:
 - ▶ Énoncer le phénomène d'absorption moléculaire
 - ▶ Décrire les différentes parties d'un spectrophotomètre d'absorption moléculaire
 - ▶ Énoncer et mettre en pratique différentes méthodes quantitatives en absorption moléculaire

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Spectrométrie: interaction électromagnétique entre matière et ondes électromagnétiques
- ▶ Spectrophotométrie d'absorption moléculaire: domaine UV-visible

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Deux aspects de la lumière \Rightarrow la lumière est :
 - ▶ une onde électromagnétique caractérisée:
 - ▶ par sa fréquence $\nu = 1/T$ (T : période en s, ν en Hz)
 - ▶ par sa longueur d'onde $\lambda = c.T$ (c : célérité de la lumière, $c = 3.10^8$ m.s⁻¹, λ en m).
 - ▶ Constituée de "grains" de lumière, les photons, de masse nulle et se déplaçant à la vitesse c.

Chaque photon a pour énergie $E = h.\nu = h.c/\lambda$ (h : constante de Planck, $h = 6,626.10^{-34}$ J.s)

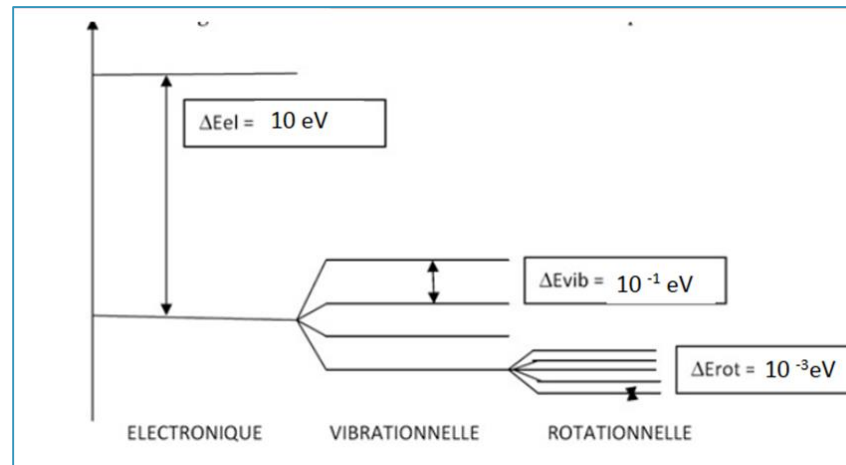
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Energie totale d'un édifice atomique :

$$E = E_{\text{él}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{trans}}$$

Avec $E_{\text{él}}$ = énergie électronique, E_{vib} = énergie vibrationnelle, E_{rot} = énergie rotationnelle et E_{trans} = énergie de translation du système.

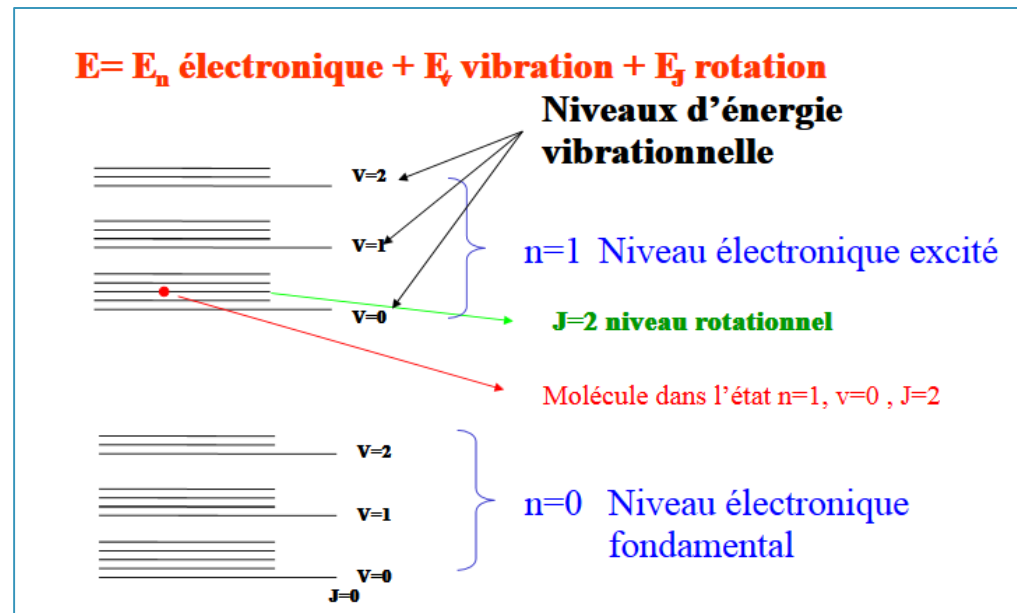
Les trois premières sont quantifiées



▶ ..

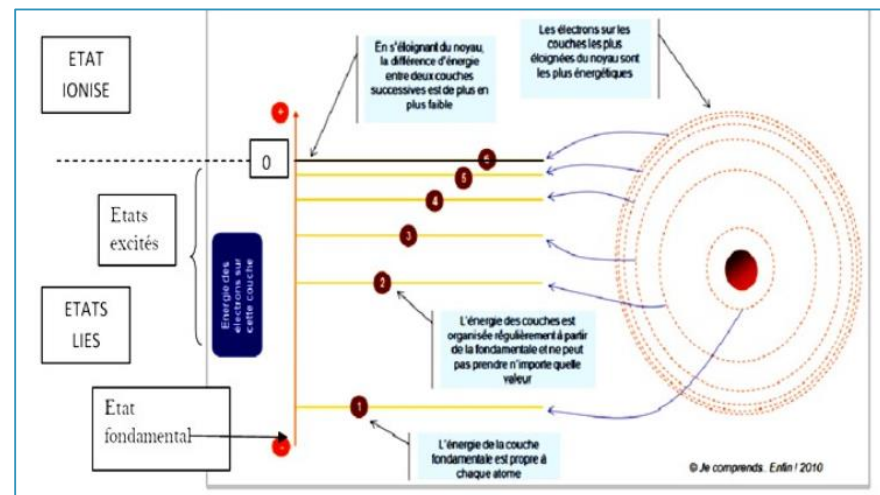
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Un atome ne peut exister que dans une suite discontinue d'états stationnaires dont l'énergie est bien déterminée et dans lesquels il n'émet aucun rayonnement.
- ▶ Représentation d'un diagramme énergétique simplifié d'une molécule diatomique



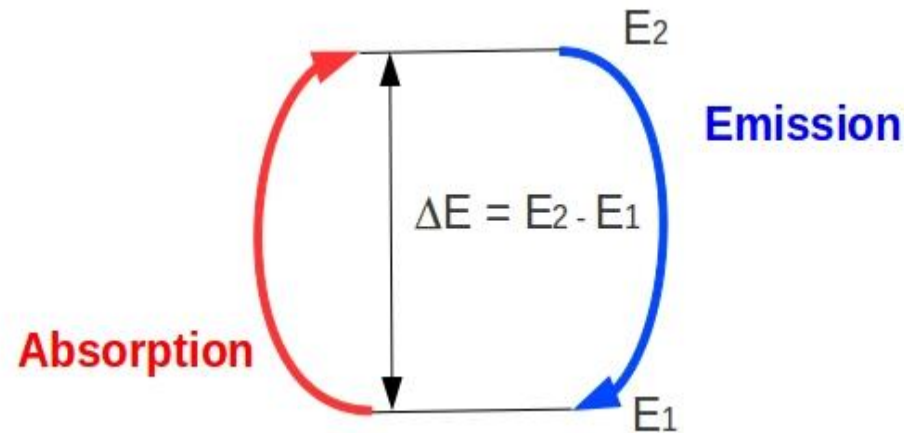
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Dans une molécule peut exister des transitions:
 - ▶ Rotationnelles (entre 2 états de même n et v) : elles sont dans le domaine du micro ondes → Spectre de raies
 - ▶ Vibrationnelles (entre 2 états de même n et de v différents) elles sont dans le domaine de l'infrarouge → Spectre de bandes
 - ▶ **Electroniques (entre 2 états de n différents) elles sont dans le domaine de l'UV et du visible → Spectre de bandes**



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

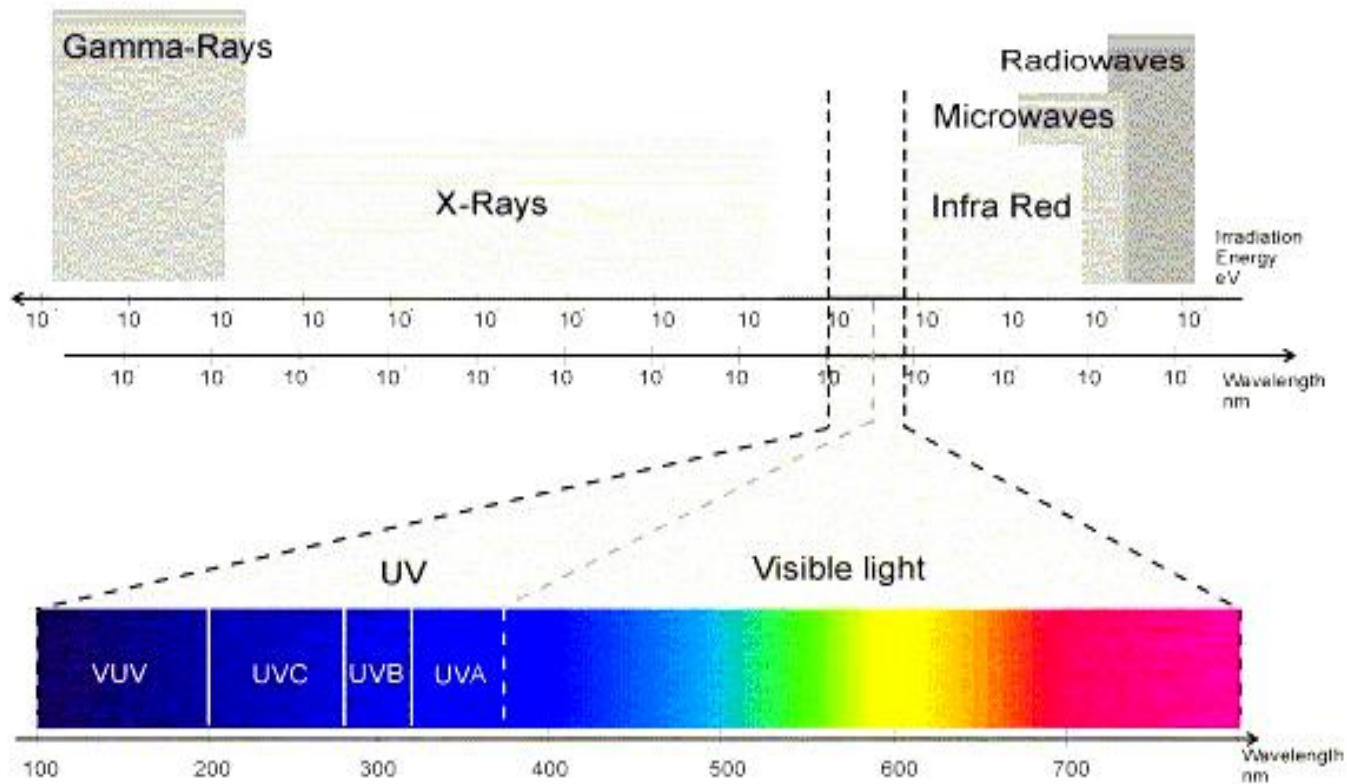
- ▶ La spectroscopie UV-visible concerne les électrons de valence
- ▶ Absorption : si le rayonnement électromagnétique permet de passer du niveau E_1 au niveau E_2 , le système doit acquérir de l'énergie



- ▶ Lorsqu'un atome passe de l'état fondamental à l'état excité, la différence d'énergie ΔE qu'il gagne est absorbée sous forme d'une radiation électromagnétique de fréquence ν avec $\Delta E = h \nu$.

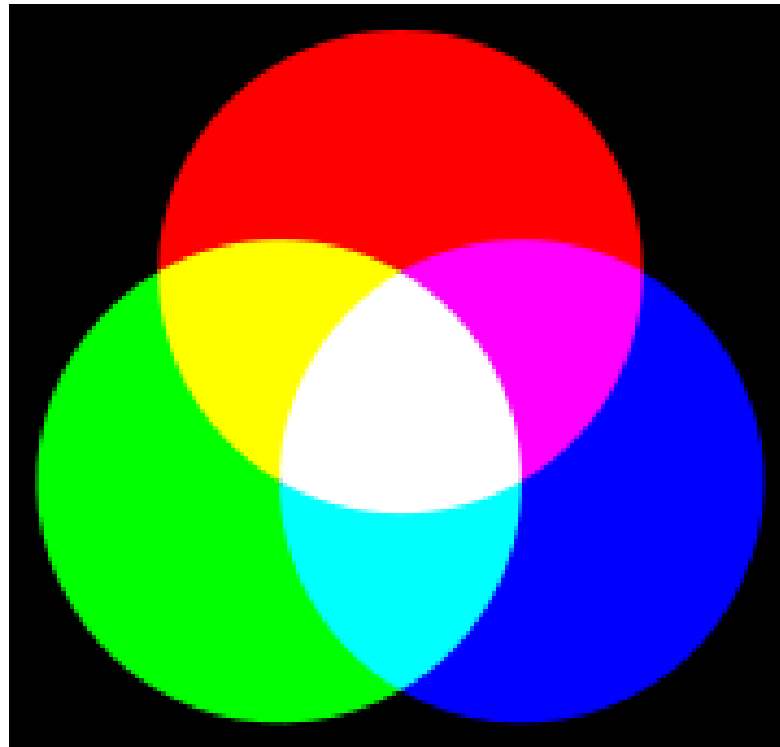
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

► Domaine UV - Visible



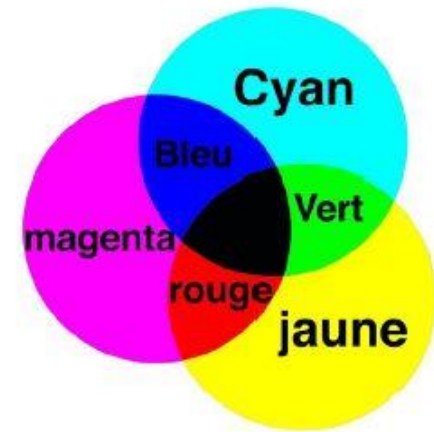
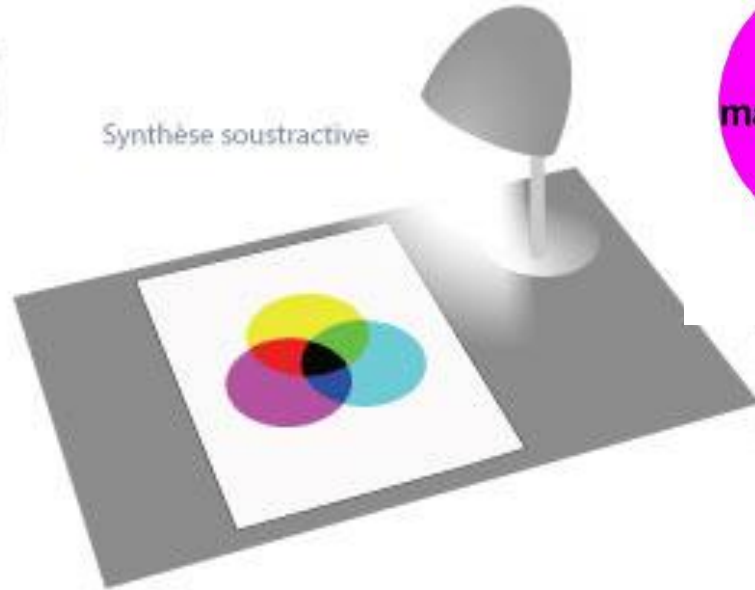
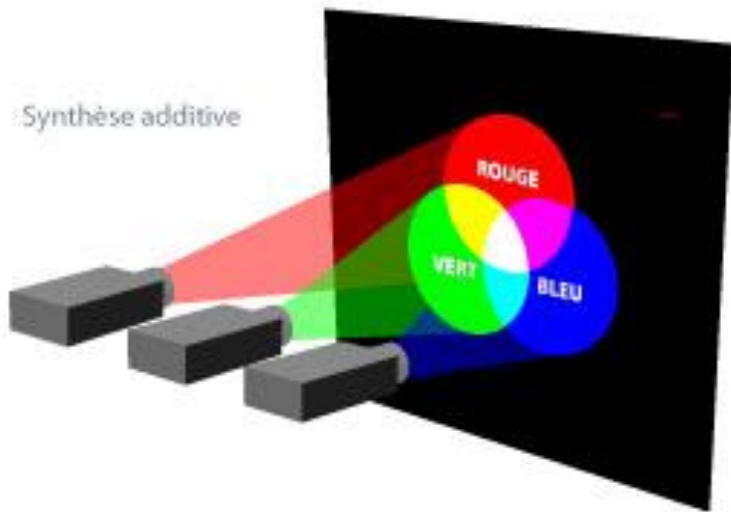
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Notion de couleurs primaires en physique
- ▶ Notion de couleurs secondaires en physique
- ▶ Notion de couleurs complémentaires



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Attention ! Ne pas confondre les couleurs complémentaires en physique et en peinture

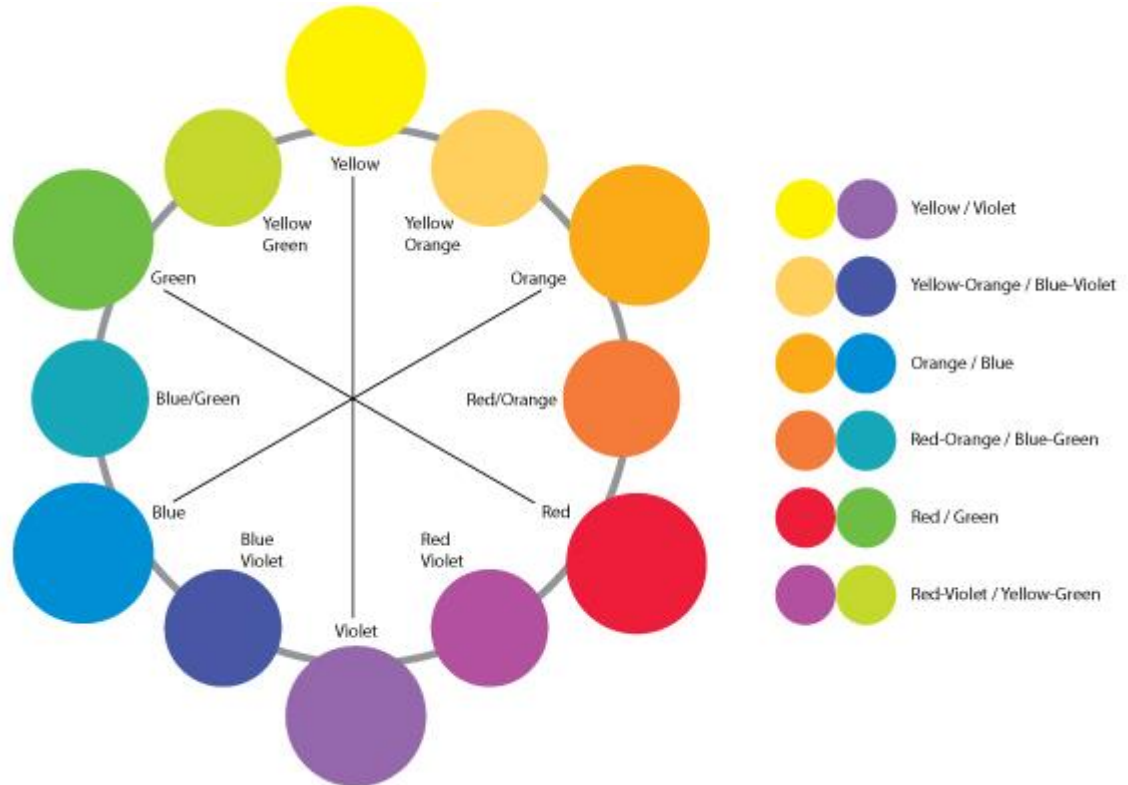


Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

► Notion de couleurs complémentaires



Complementary Color Scheme
Two colors opposite each other
on the color wheel.

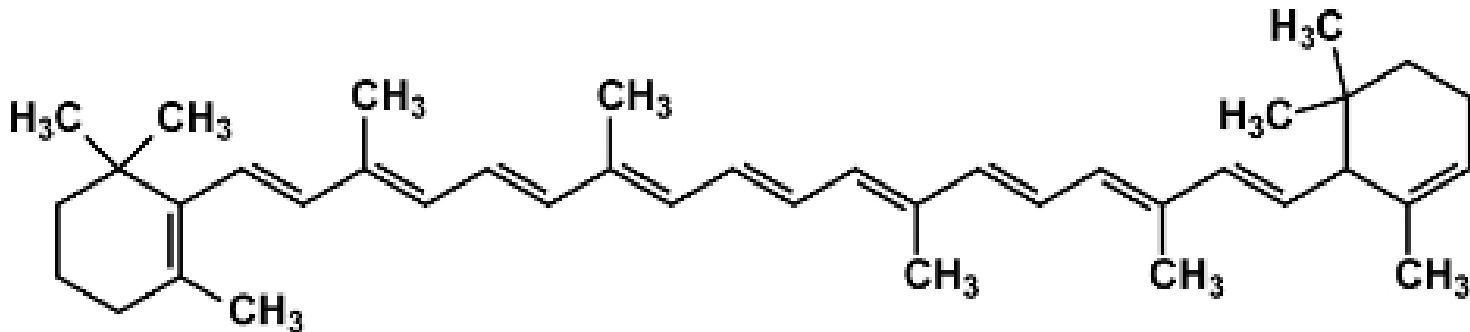


Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Une molécule peut absorber l'énergie de la lumière UV-VIS si celle ci permet des transitions électroniques au sein de la molécule entre différents niveaux d'énergie $\Delta E = E^* - E_{\text{fondamental}}$
- ▶ Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie E suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur, l'état excité, tel que $E = h.C/\lambda$
- ▶ Donc $\Delta E = E^* - E_{\text{fondamental}} = h.c/\lambda$
- ▶ Ces molécules possèdent des chromophores: groupements d'atomes responsables d'absorptions caractéristiques

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

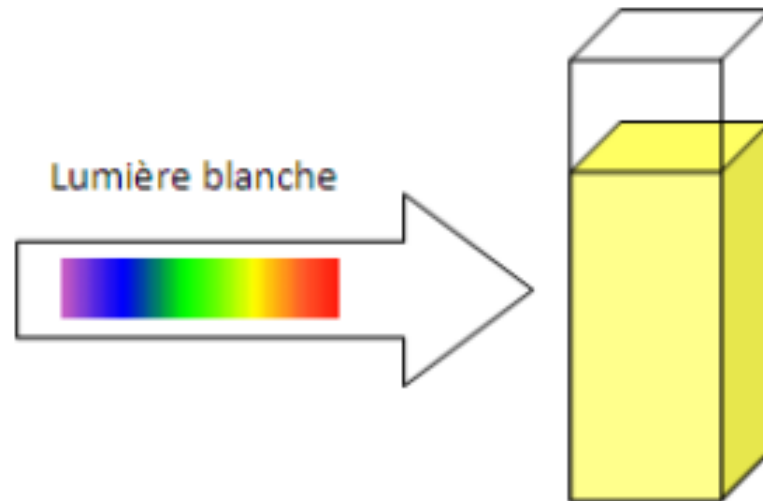
- ▶ La présence de doubles liaisons multiples et conjuguées ou de doublets non liants permet en général une bonne absorption dans l'UV-Visible.
- ▶ Exemple : le β -carotène, contenant 11 liaisons C=C conjuguées, a son maximum d'absorption vers 450 nm.



- ▶ Une solution de β -carotène absorbant dans le bleu, apparait de sa couleur complémentaire: l'orange.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

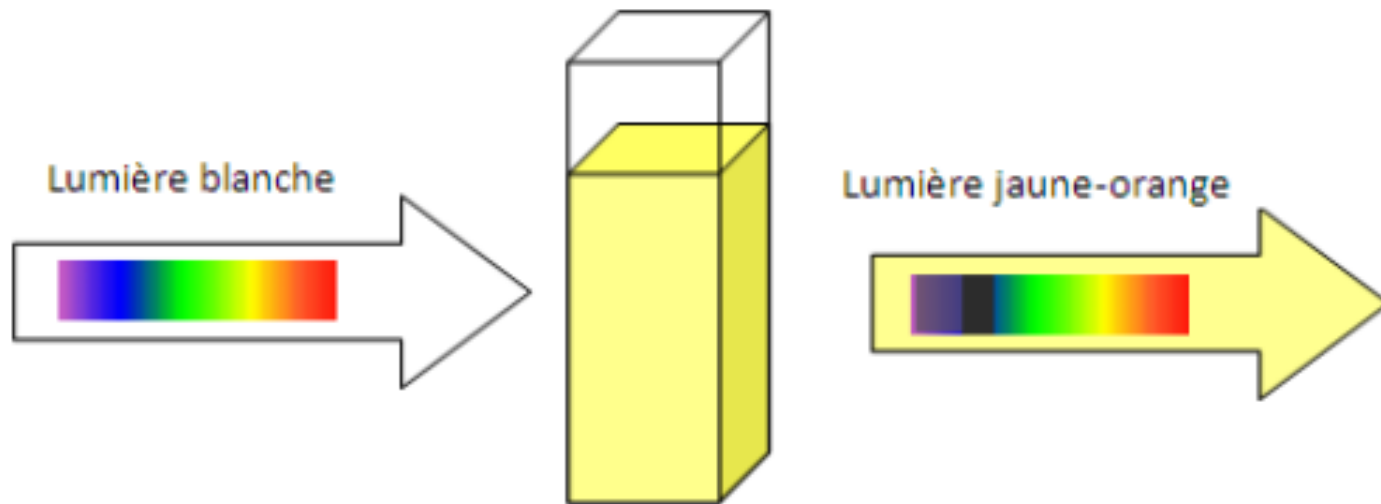
- ▶ Si une molécule absorbe **dans le visible** ses solutions sont colorées
- ▶ Sa couleur est la résultante des ondes transmises
- ▶ Exemple 1: Quelle est la couleur absorbée par cette solution qui nous parait jaune ?



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Quelle est la couleur absorbée par cette solution qui nous paraît jaune ?

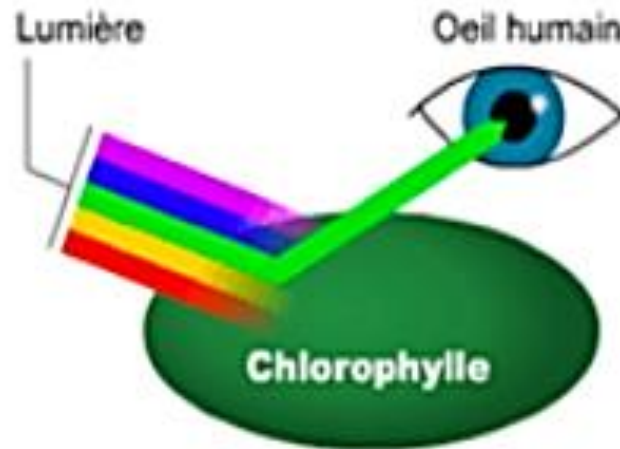
Réponse : couleur complémentaire du jaune = couleur bleu-violet



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Exemple 2 : Chlorophylle

- ▶ Quelles sont les ondes absorbées par une solution de chlorophylle qui nous paraît verte ?



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

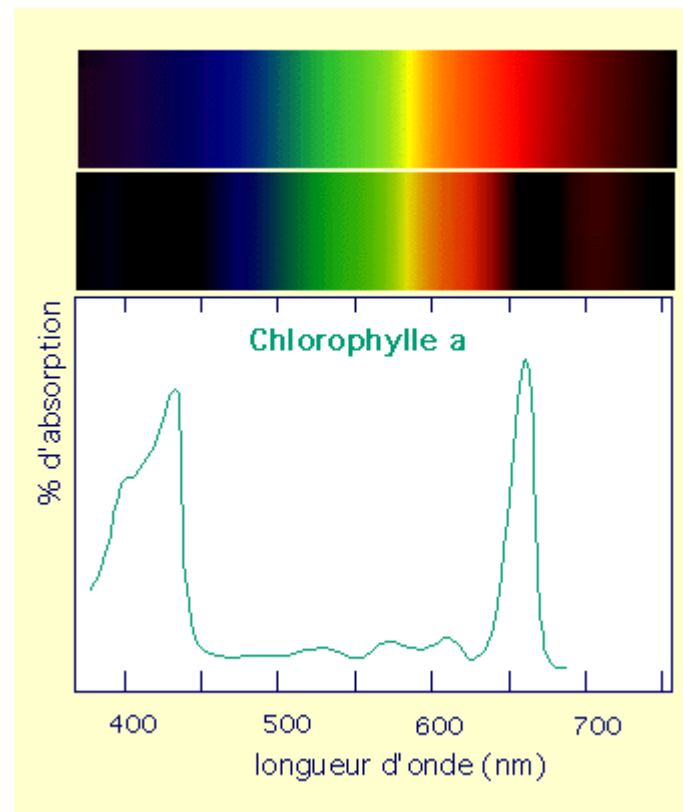
Exemple Chlorophylle

- ▶ Couleur verte
- ▶ Absorption des ondes électromagnétiques dans le rouge et le bleu

Lumière blanche

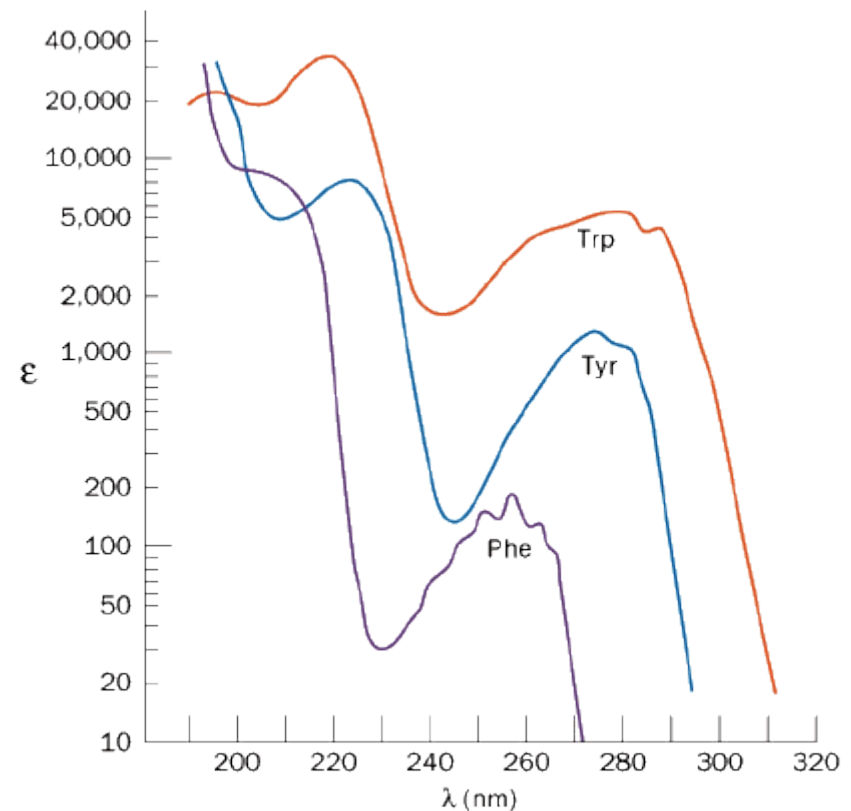
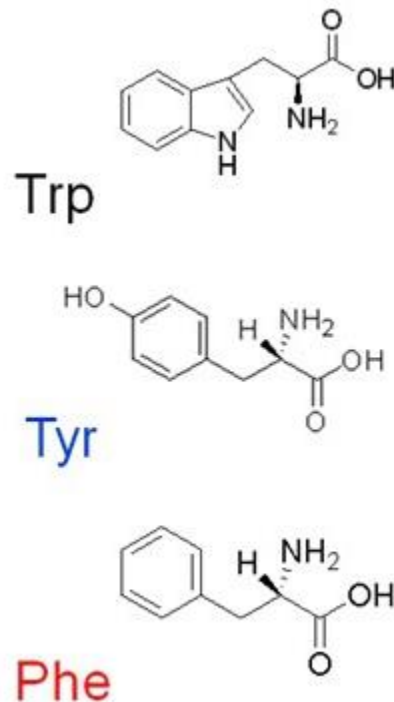
Lumière transmise

Spectre d'absorption



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Une molécule absorbant en UV est incolore pour l'œil humain
 - ▶ Ex: absorption d'un noyau aromatique, acides aminés aromatiques



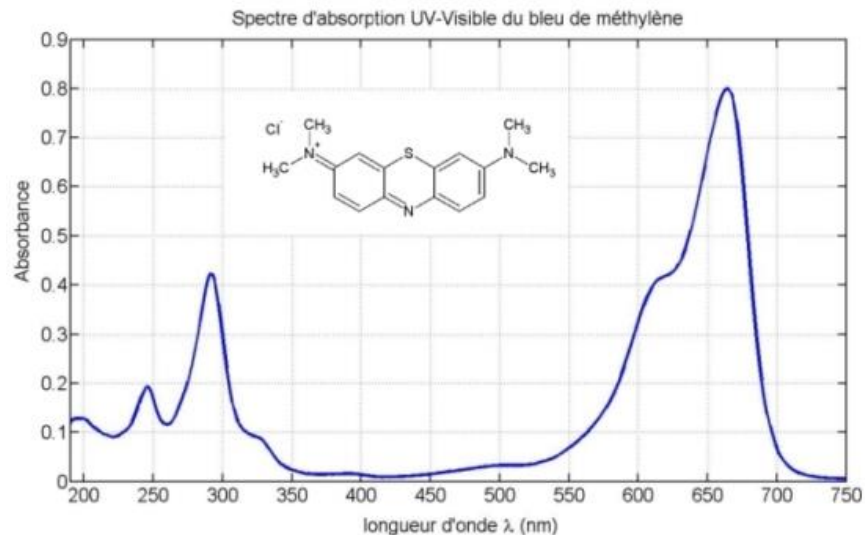
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Une molécule absorbant en UV est incolore pour l'œil humain

Groupes	Région d'absorption (nm)	Groupes	Région d'absorption (nm)
$>C=C<$	175	$-C\equiv C-$	160
$>C=O$	188	$-N=N-$	252
$-NO_2$ (nitro)	270	$-O-NO_2$ (nitrate)	270
$-O-NO$ (nitrite)	230	$-N=O$ (nitroso)	300
$>C=S$	330	$-C\equiv N$	> 160

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Spectre d'absorption lumineuse: représentation graphique des variations d'absorbance de la lumière transmise en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente en conditions définies (solvant, pH,...)



- ▶ Notion de λ_{\max}

En spectrophotométrie d'absorption moléculaire on travaille en **monochromatisme et à λ_{\max}**

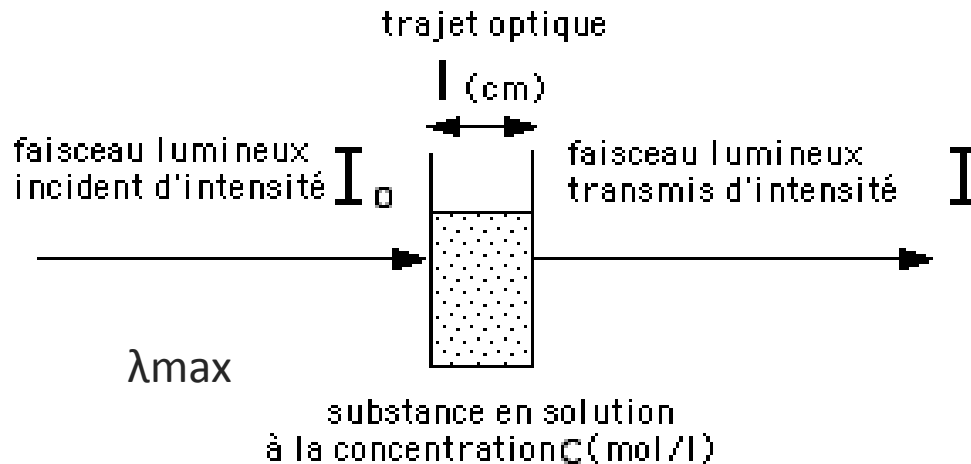
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

▶ Applications

- ▶ Caractérisation de molécules
- ▶ Dosages de molécules : méthode d'analyse quantitative
 - ▶ Mesure de l'absorbance (ou densité optique) d'une substance chimique en solution
 - ▶ Plus l'espèce à doser est concentrée, plus elle absorbe la lumière
 - ▶ Notion de proportionnalité énoncée par la loi de Beer-Lambert

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Principe du dosage spectrophotométrique : Loi de Beer-Lambert



TRANSMITTANCE ou TRANSMISSION

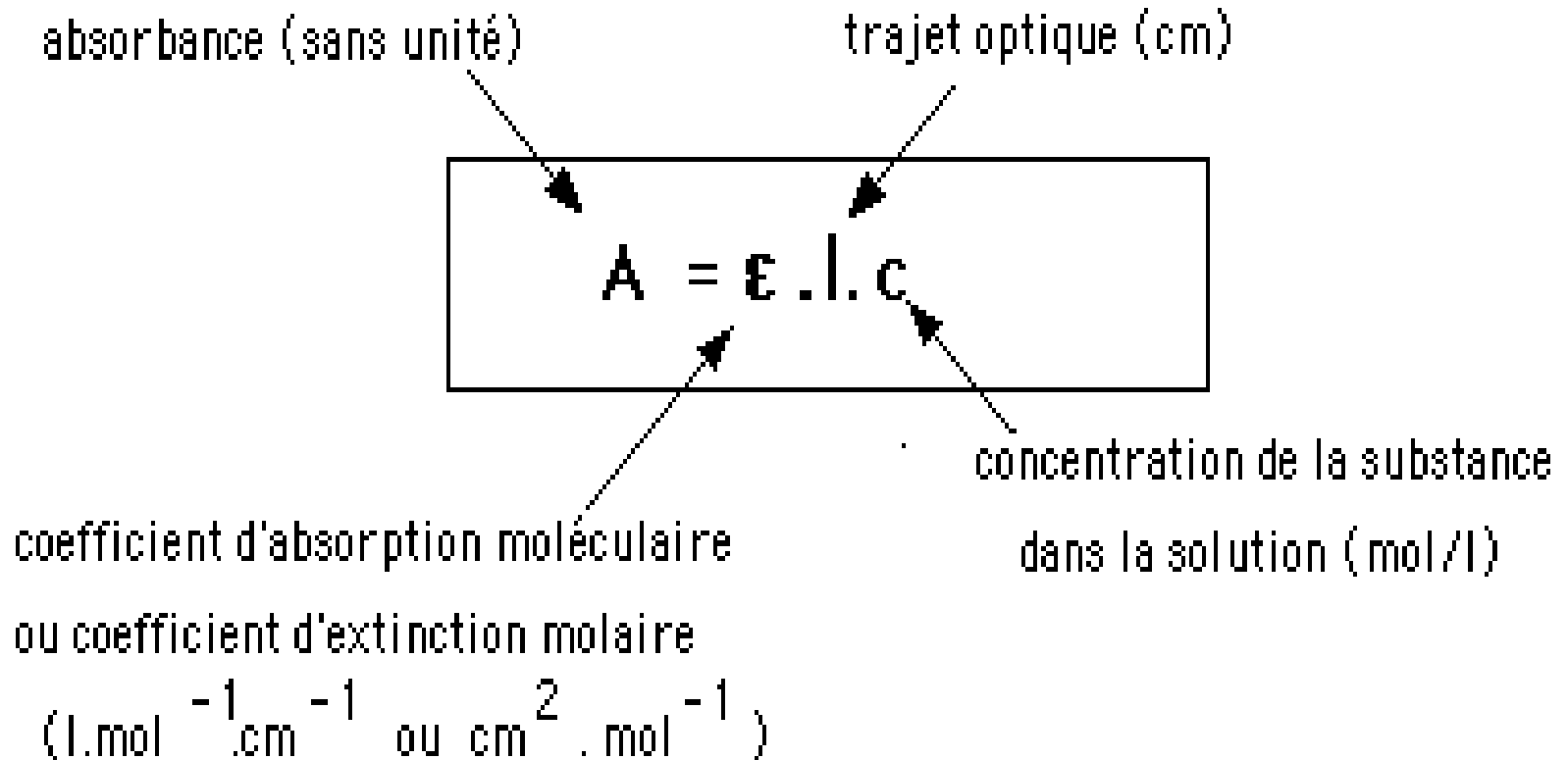
$$T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

ABSORBANCE ou DENSITE OPTIQUE
(D.O.) ou EXTINCTION
(E)

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

► Loi de Beer-Lambert



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

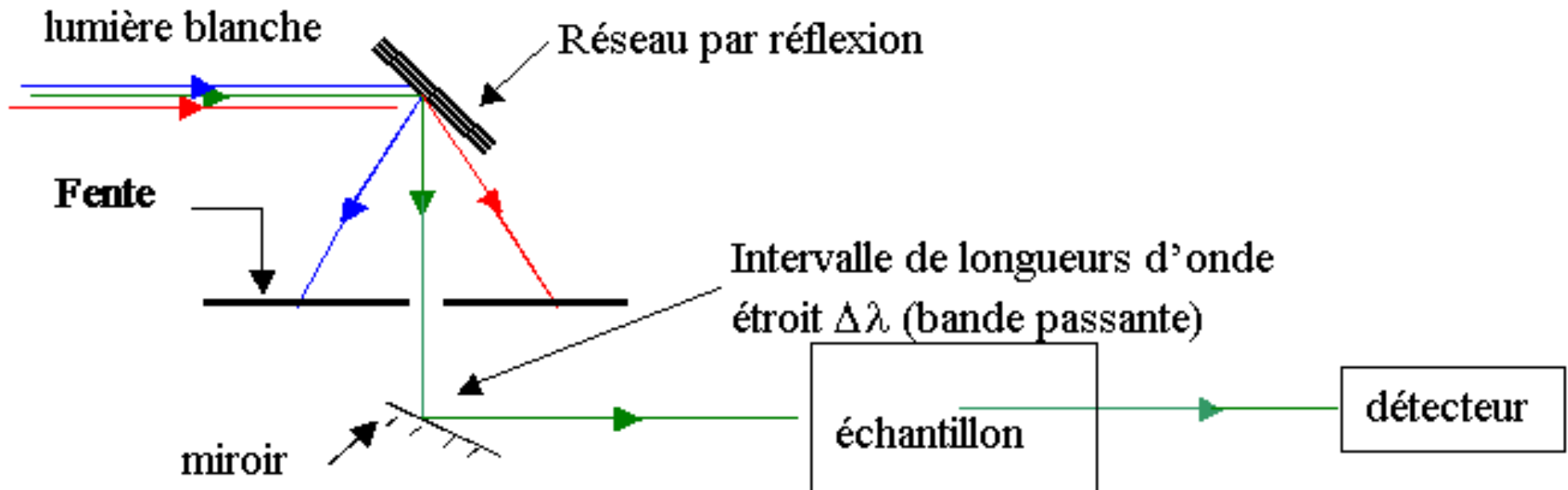
- ▶ Validité de la loi de Beer – Lambert :
 - ▶ Solutions limpides : pas de diffusion, de réflexion ni de diffraction de la lumière
 - ▶ S'applique à de faibles concentrations
 - ▶ Absence de fluorescence
 - ▶ Absence de réactions chimiques
- ▶ Propriétés de la loi de Beer – Lambert :
 - ▶ Additivités des absorbances

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le spectrophotomètre UV - Visible
 - ▶ Appareil permettant la mesure de l'absorbance d'une solution homogène à λ monochromatique
 - ▶ Différents types (suivant le type de monochromateur, appareil mono faisceau ou double faisceau, suivant le type de détecteur...)
 - ▶ Composants essentiels : source lumineuse, monochromateur, cuves et détecteur

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

► Principe du spectrophotomètre UV-Visible



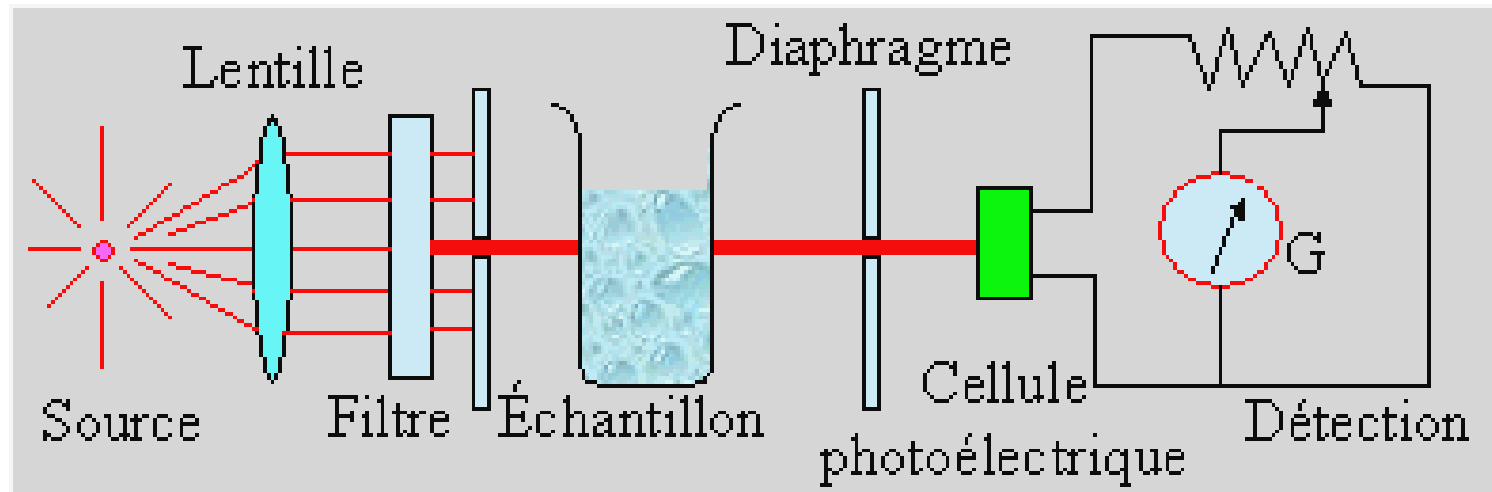
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
- ▶ Lampes = sources polychromatiques du spectrophotomètre UV – Visible
 - ▶ lampe à décharge au deutérium : domaine 190 à 400 nm (UV)
 - ▶ lampe à filament de tungstène : domaine 350 à 800 nm (Visible)
 - ▶ lampe à décharge au xénon : domaine UV et visible = lampe flash



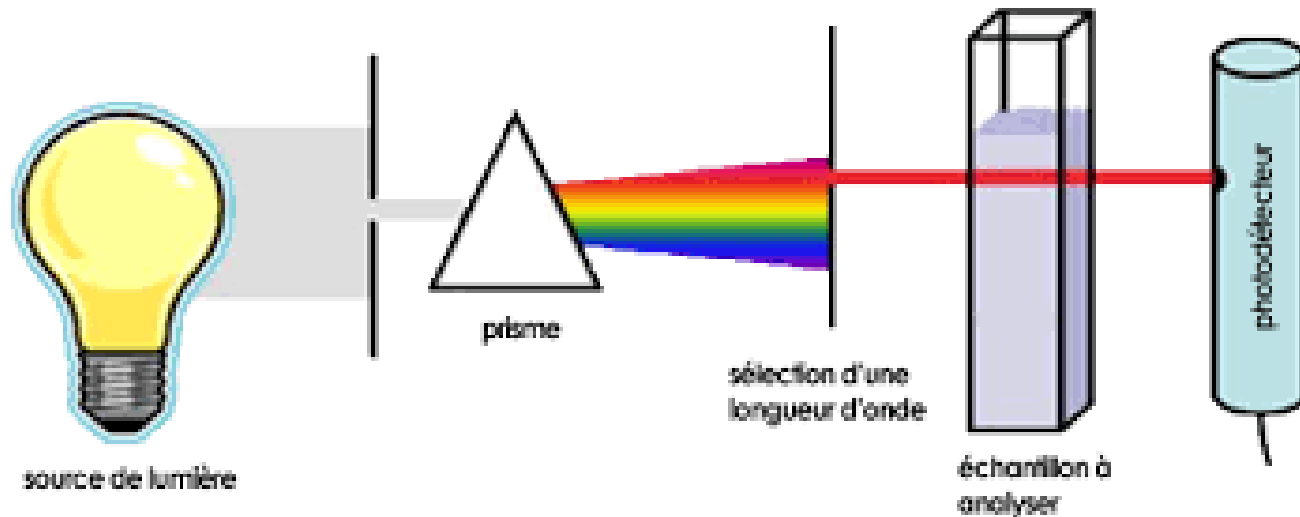
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
 - ▶ Monochromateur
 - ▶ Filtre coloré : que visible, appareil = photomètre



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
 - ▶ Monochromateur
 - ▶ Prisme : dispersion de la lumière



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
 - ▶ Monochromateur
 - ▶ Réseau : diffraction de la lumière

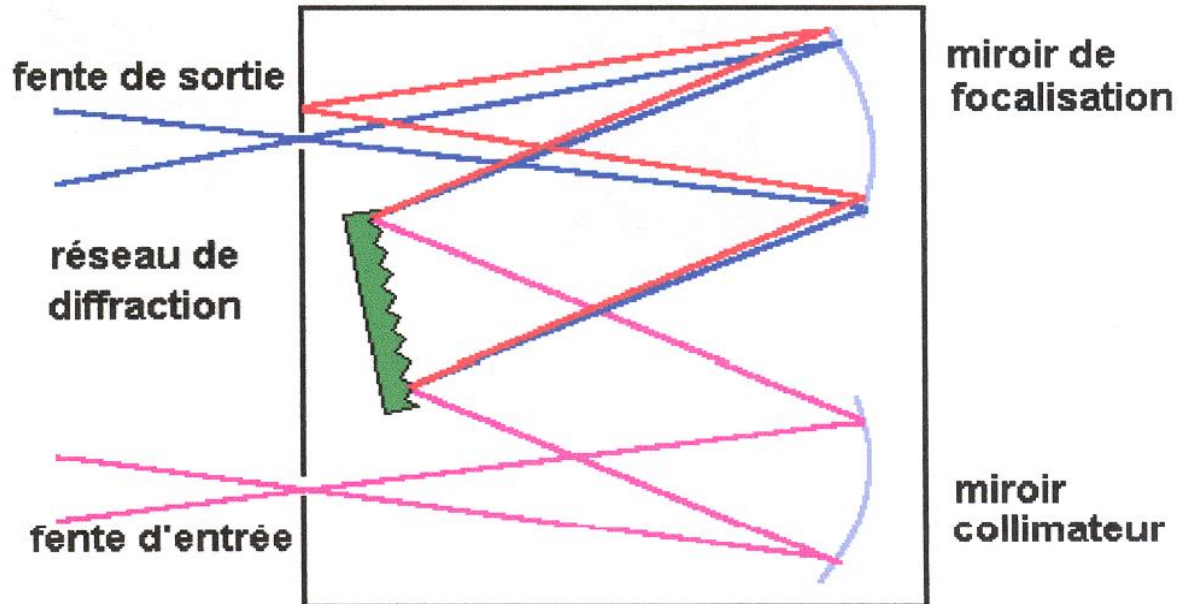


Figure 5 : monochromateur à réseau

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible

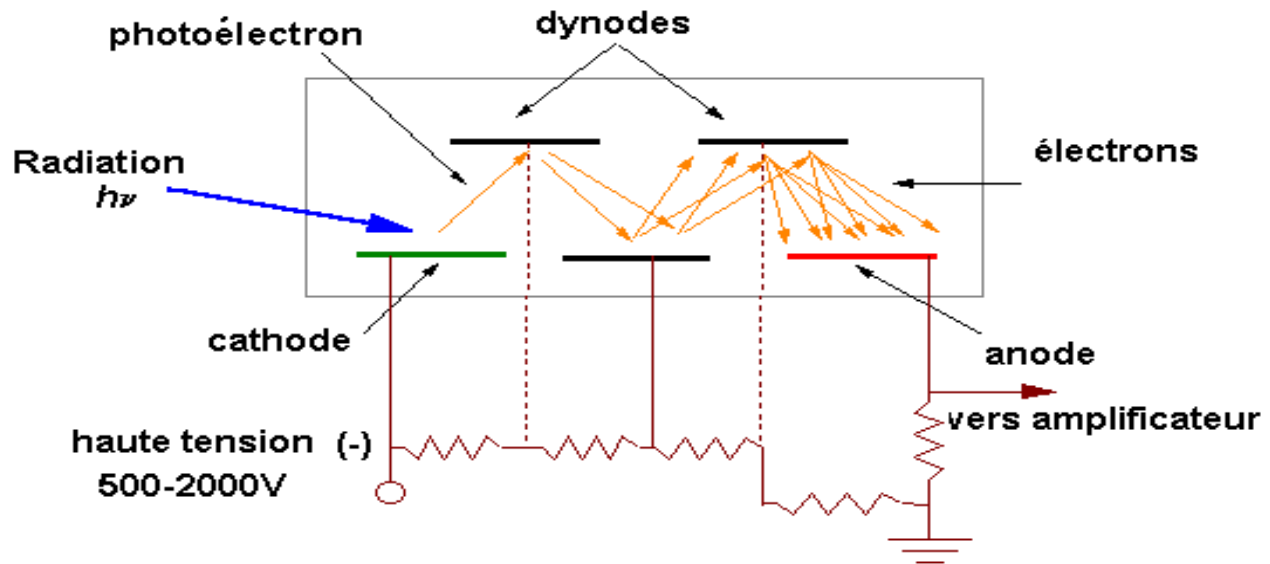
La cuve :

- ▶ Longueur du trajet optique
- ▶ Transparence aux radiations utilisées : quartz (UV + visible), verre (visible), plastique (PS : 340 à 900 nm, PMMA : 300 à 900 nm)
- ▶ Volume (macrocuve (2,5 – 4,5 ml), cuve semi micro (1,5 – 3 ml), cuve micro (70 – 850 μ l))



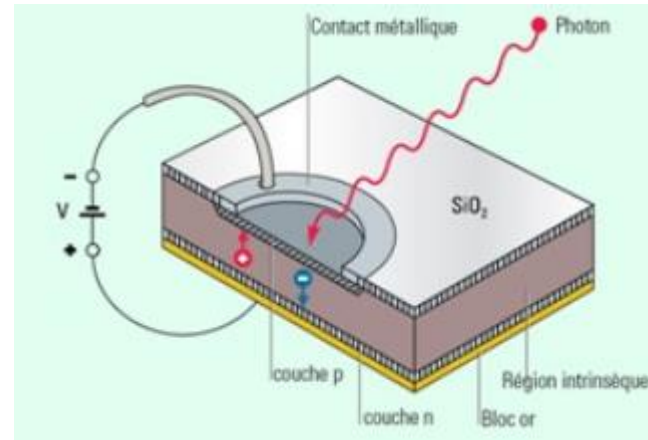
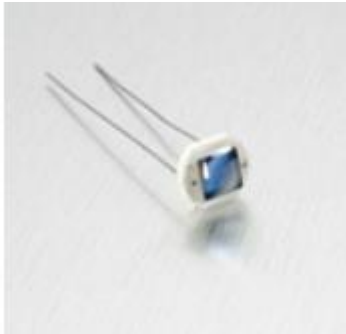
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
- ▶ Le détecteur :
 - ▶ Tube photomultiplicateur : Convertisseur photons / électrons : Basé sur l'effet photoélectrique: l'impact des photons peut éjecter des électrons créant un courant proportionnel au nombre de photons. Très grande sensibilité



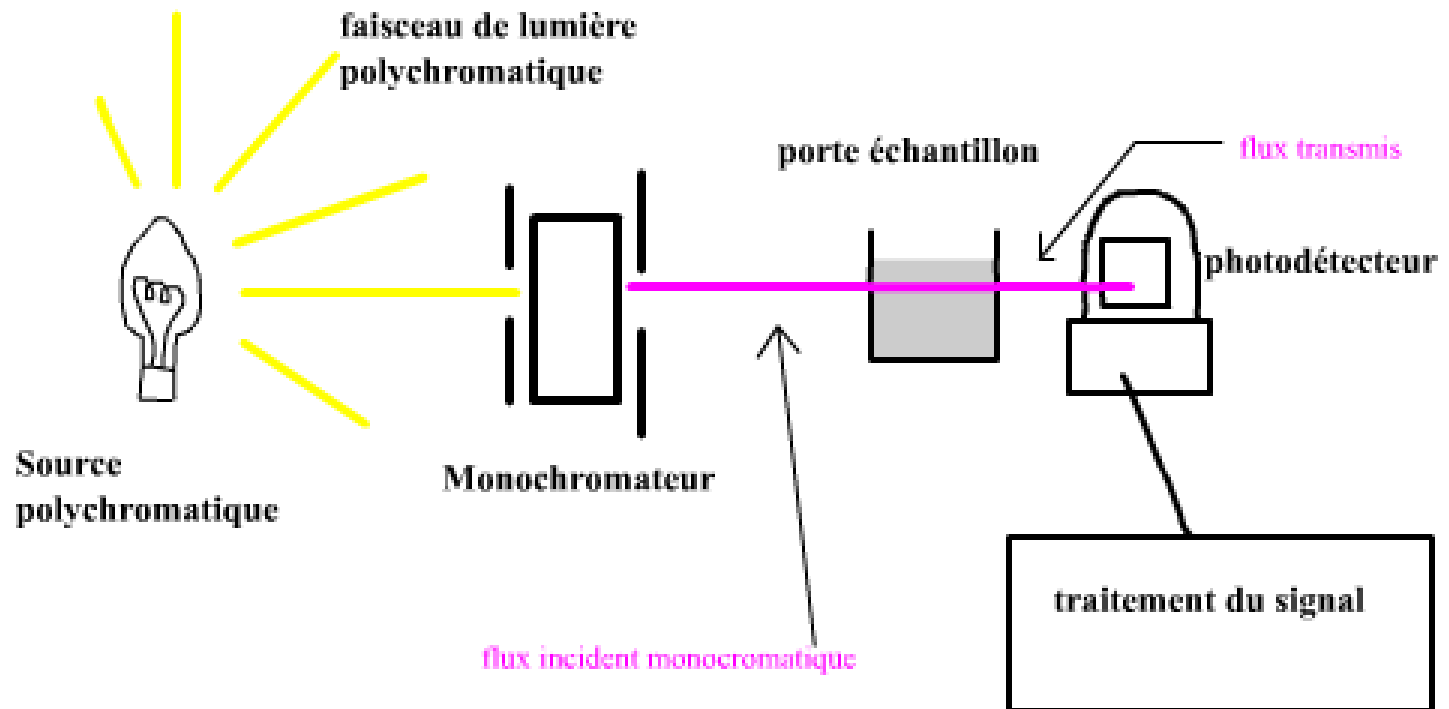
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Composants essentiels du spectrophotomètre UV-Visible
- ▶ Le détecteur :
 - ▶ Photodiode : Une photodiode est un composant semi-conducteur ayant la capacité de détecter un rayonnement du domaine optique et de le transformer en signal électrique.
 - ▶ Moins sensible que tube photomultiplicateur



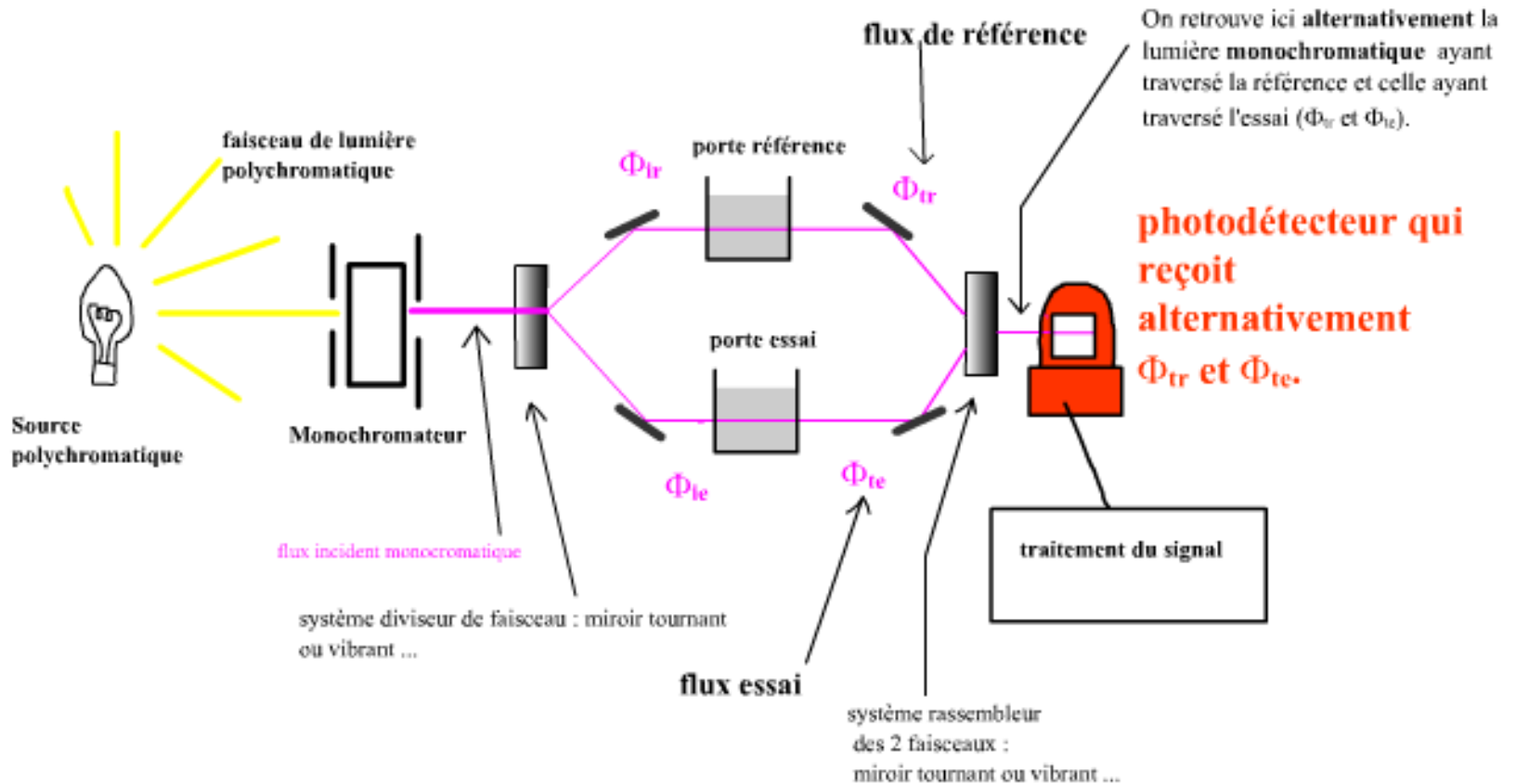
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Différents types d'appareillage
 - ▶ Spectrophotomètre UV-Visible monofaisceau



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Différents types d'appareillage
 - ▶ Spectrophotomètre double faisceau



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Différentes méthodes suivant les caractéristiques de la substance à doser:
 - ▶ La substance absorbe dans le visible ou dans l'UV (spectre présente pic d'absorption caractéristique) : dosage direct
 - ▶ N'absorbe pas dans le visible ou dans l'UV (spectre ne présente pas de pic d'absorption caractéristique) \Rightarrow molécule engagée dans réaction colorée : dosage indirect
 - substance incolore + réactif de coloration \rightarrow produit coloré dosé

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Dosage indirect
 - ▶ Méthode en point final : mesure de l'Abs en fin de réaction
 - ▶ Méthode en cinétique : mesure de l'évolution de l'Abs en fonction du temps

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Différentes méthodes de dosages:
 - ▶ Méthode absolue = Mesure de l'abs et calcul de C

$$C = \text{Abs} / \varepsilon \cdot l$$

- ▶ Nécessite de connaître le coefficient d'absorption moléculaire ε or ε dépend du solvant, du pH,

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

▶ Le dosage spectrophotométrique

▶ Différentes méthodes de dosages :

▶ Méthode relative : méthode par comparaison avec un étalon (standard)

▶ étalon unique

Préparation d'un témoin ou blanc réactif, d'un étalon, et d'un échantillon

Calcul de la concentration:

$$[\text{éch}] = \text{AbsC}_{\text{éch}} / \varepsilon \cdot \ell$$

$$[\text{étalon}] = \text{AbsC}_{\text{étalon}} / \varepsilon \cdot \ell$$

$$[\text{éch}] = \frac{\text{AbsC}_{\text{éch}} \times [\text{étalon}]}{\text{AbsC}_{\text{étalon}}}$$

AbsC = Abs corrigée = abs lue – absorbance témoin réaction

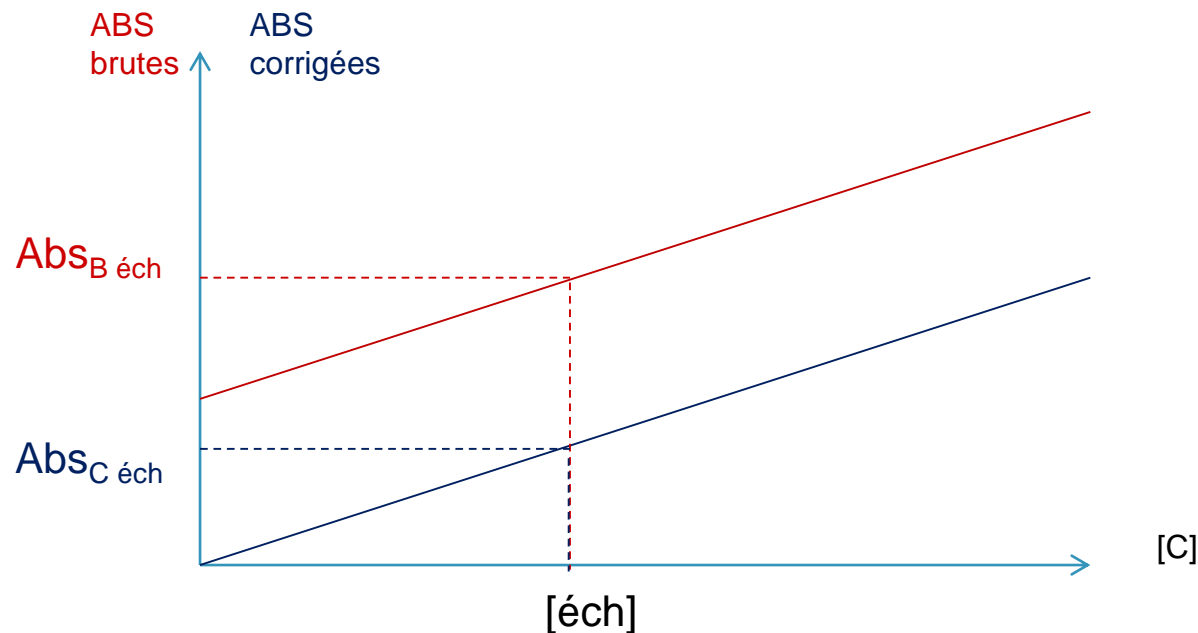
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Différentes méthodes de dosages :
 - ▶ Méthode relative : méthode par comparaison avec un étalon (standard)
 - ▶ gamme d'étalonnage

	std ₁	std ₂	std ₃	std ₄	std ₅	std ₆	éch
[conc]	0	[std] ₂	[std] ₃	[std] ₄	[std] ₅	[std] ₆	?
Abs brute (lue)	Abs _{B std1}	Abs _{B std2}	Abs _{B std3}	Abs _{B std4}	Abs _{B std5}	Abs _{B std6}	Abs _{B éch}
Abs corrigée	0	$\frac{\text{Abs}_{\text{B std2}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$	$\frac{\text{Abs}_{\text{B std3}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$	$\frac{\text{Abs}_{\text{B std4}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$	$\frac{\text{Abs}_{\text{B std5}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$	$\frac{\text{Abs}_{\text{B std6}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$	$\frac{\text{Abs}_{\text{B éch}}}{\text{Abs}_{\text{B std1}}}$

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Différentes méthodes de dosages :
 - ▶ Méthode relative : méthode par comparaison avec un étalon (standard)
 - ▶ Gamme d'étalonnage : détermination de la concentration de l'échantillon:
 - Lecture graphique



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Le dosage spectrophotométrique
 - ▶ Différentes méthodes de dosages :
 - ▶ Méthode relative : méthode par comparaison avec un étalon (standard)
 - ▶ Gamme d'étalonnage : détermination de la concentration de l'échantillon:
 - équation de la droite
 - Excel équation de la droite de tendance
 - Excel régression linéaire