

La spectrophotométrie

La spectroscopie est l'étude quantitative des interactions entre la matière et la lumière.

La spectrophotométrie est la mesure de l'interaction d'une radiation avec la substance qui l'absorbe.

I – La lumière et les couleurs

I.1 Qu'est-ce que la lumière ?

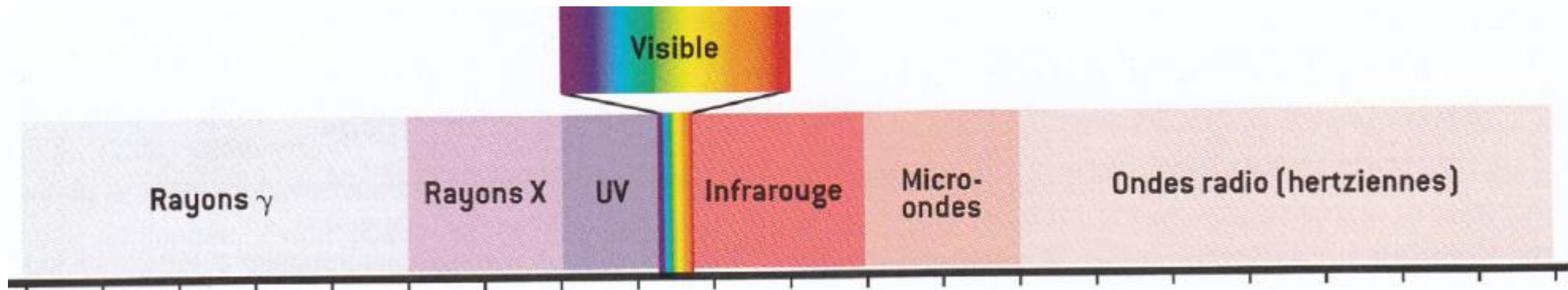
En fonction des propriétés que l'on souhaite observer, la lumière peut être décrite comme une radiation *électromagnétique*, *c'est à dire une onde, transversale, dont les grandeurs oscillantes* sont le champ électrique et le champ magnétique. Elle est caractérisée par une longueur d'onde unique λ lorsqu'on parle de lumière **monochromatique**.

La spectrométrie

La lumière peut être décrite aussi comme un flux de particules élémentaires, les **photons** (rem : noms donné par G.L. Lewis en 1926).

Chaque photon est assimilable à un quantum d'énergie $E = h.c/\lambda$. h est la constante de Planck.
 $h = 6,626.10^{-34}$ J.s

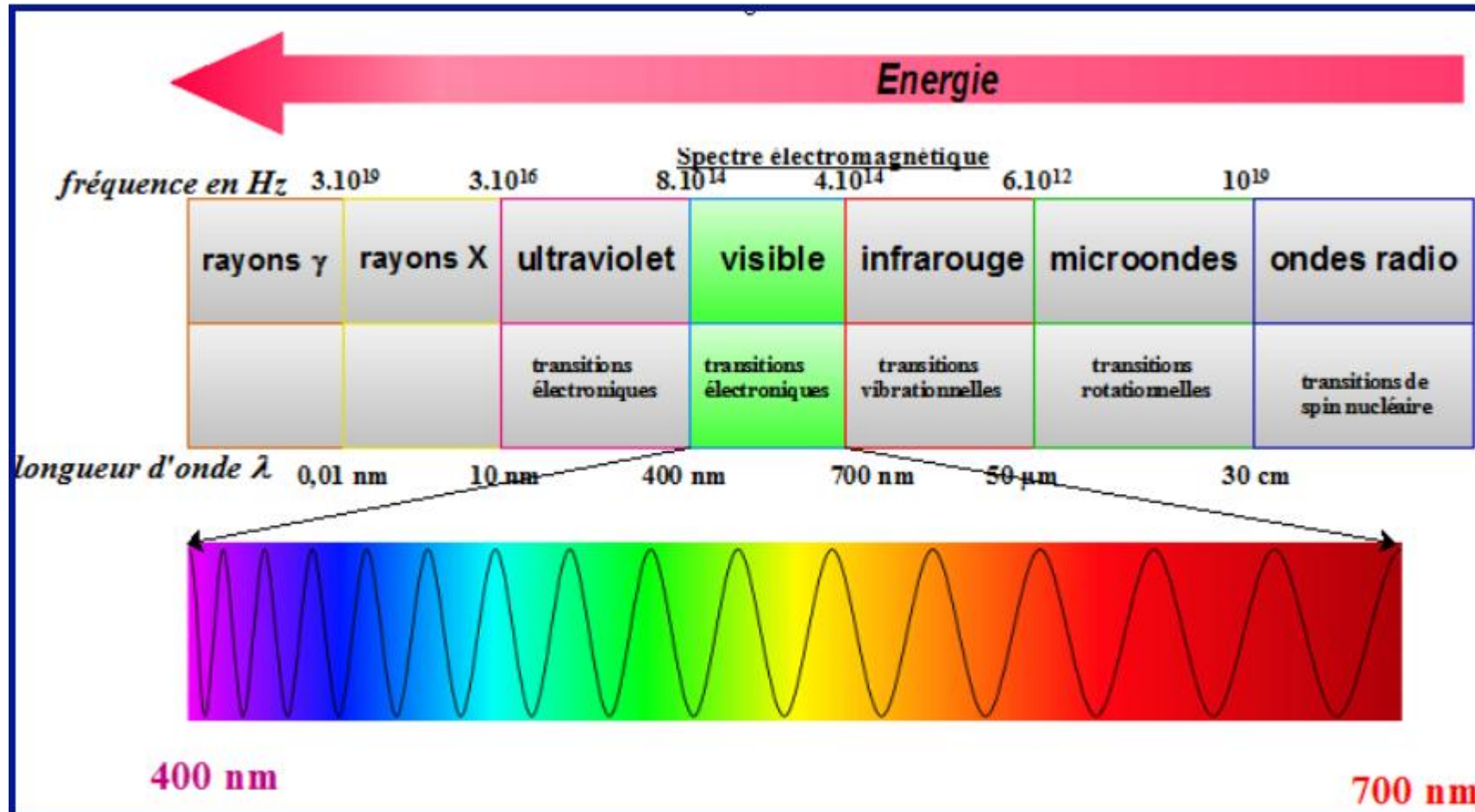
Le domaine **visible**, c'est-à-dire l'ensemble des longueurs d'onde auxquelles notre oeil est sensible, ne représente qu'une toute petite partie du spectre électromagnétique.



La spectrométrie

Ainsi, l'œil humain ne perçoit que les radiations dont la longueur d'onde est comprise **entre 400 et 800 nm**.

Pour $\lambda > 800 \text{ nm}$, on entre dans le domaine des rayonnements **infrarouges**, et pour $\lambda < 400 \text{ nm}$, dans le domaine des **ultraviolets**.



Nom des régions du spectre électromagnétique et spectroscopies correspondantes

1.2 La perception des couleurs

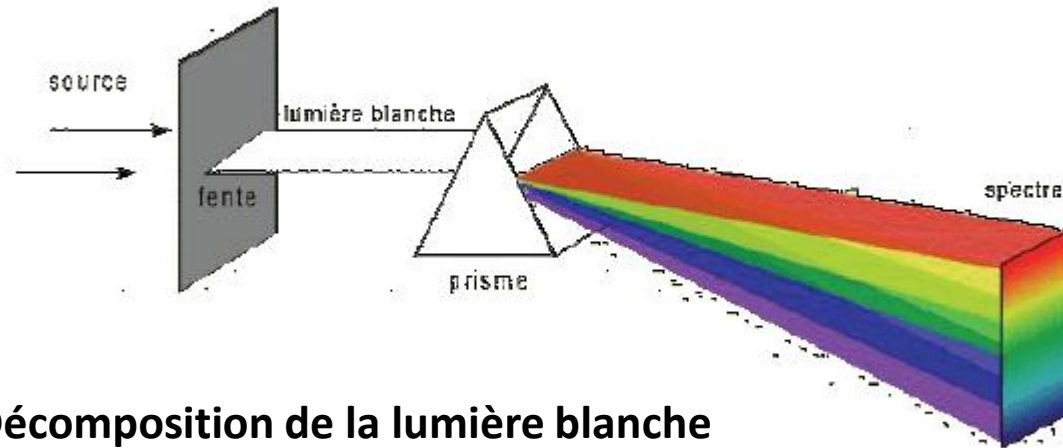
a) Lumière monochromatique

Lorsqu'une lumière monochromatique de longueur d'onde λ comprise entre 400 et 800 nm est captée par l'oeil, on perçoit une lumière colorée. La sensation de couleur est directement liée à la longueur d'onde de la radiation. Ainsi, lorsque λ croît de 400 à 800 nm, on perçoit successivement les couleurs : **violet, indigo, bleu, vert, jaune, orange et rouge**. **Ce sont les** couleurs de l'arc-en-ciel (à connaître).

Ultraviolet	Violet	Bleu	Vert	Jaune	Orange	Rouge	Infrarouge
< 400 nm	440-450	450-500	500-570	570-590	590-630	630-760	> 760 nm

b) Lumière polychromatique

Une lumière qui renferme plusieurs radiations de longueurs d'onde différentes est appelée lumière **polychromatique**. La lumière qui nous arrive du soleil ou d'une lampe à incandescence est un bon exemple de lumière polychromatique. Elle est appelée **lumière blanche**. **Elle renferme, entre autres, l'ensemble des radiations de longueur d'onde comprise entre 400 et 800 nm**. On peut s'en apercevoir en décomposant la lumière par un dispositif **dispersant** : **prisme**, gouttelettes d'eau dans le cas de l'arc-en-ciel.



Décomposition de la lumière blanche

En lumière polychromatique, la perception des couleurs par l'oeil est beaucoup plus complexe qu'en lumière monochromatique. Par exemple, la superposition des radiations rouge et verte est perçue comme jaune, l'oeil est incapable de faire la différence avec une lumière monochromatique jaune ! Ceci est mis à profit dans les écrans de télévision ou d'ordinateurs pour composer les couleurs à partir de mélanges de seulement trois radiations en proportions variables : rouge, vert et bleu. On parle de **synthèse additive des couleurs**.

La couleur des objets qui nous entourent est due à un processus différent :

- Un objet éclairé en lumière blanche apparaît blanc s'il diffuse et renvoie toutes les radiations sans les absorber : il renvoie de la lumière blanche.
- En revanche, un objet qui *absorbe dans un certain domaine de longueur d'onde* apparaît coloré : il renvoie toutes les radiations vers l'oeil, sauf une certaine couleur. La couleur que l'on perçoit alors est appelée la **couleur complémentaire de la couleur** absorbée. On parle dans ce cas de **synthèse soustractive de la couleur**.

On retiendra qu'à une longueur d'onde, il est possible d'associer une couleur, mais l'inverse n'est pas vrai.

Dans le visible, la sensibilité maximale de notre oeil se situe vers 550 nm, ce qui correspond précisément au maximum de la courbe d'émission du Soleil : au cours de son évolution, l'œil a donc optimisé sa sensibilité en fonction de la lumière solaire.

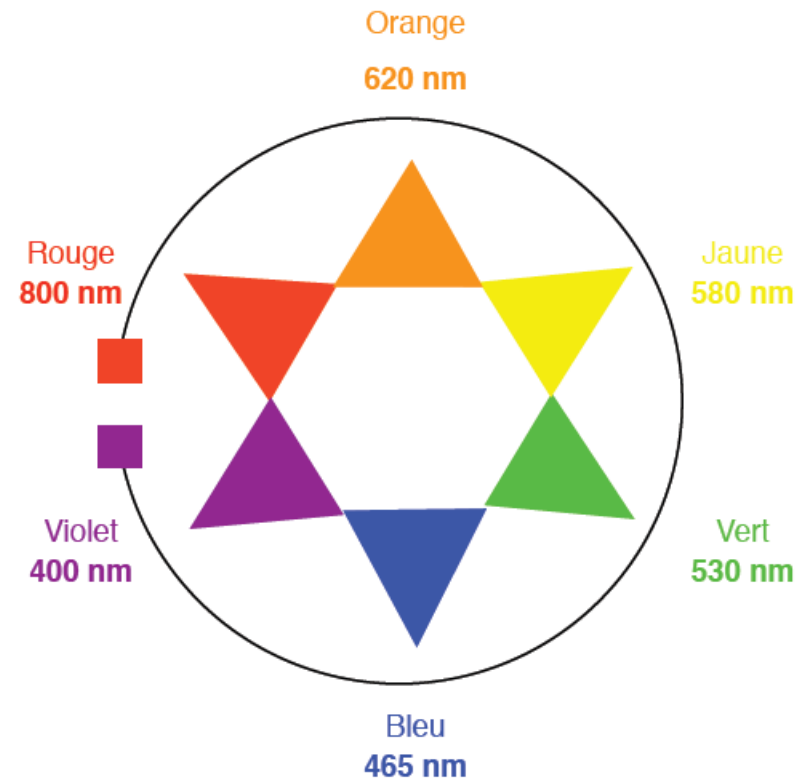
Une espèce incolore n'absorbe aucune radiation du spectre visible.

Lorsqu'une espèce chimique n'absorbe que dans un seul domaine de longueurs d'onde du visible, sa couleur est la couleur complémentaire de celle des radiations absorbées.

Lorsqu'une espèce chimique absorbe dans plusieurs domaines de longueur d'onde, sa couleur résulte de la synthèse additive des couleurs complémentaires des radiations absorbées.

La spectrométrie

On détermine les couleurs complémentaires grâce à **l'étoile chromatique ci-dessous ou au tableau ci-après**. La couleur complémentaire est la couleur diamétralement opposée sur le disque. Par exemple, un composé qui absorbe les radiations rouges et orange apparaît bleu. Un composé qui absorbe le bleu apparaît rouge-orangé.



Étoile chromatique

A horizontal bar showing the visible light spectrum with colors transitioning from red on the left to violet on the right.

Longueur d'onde λ	Couleur	Couleur complémentaire
400-435	Violet	Jaune-vert
435-480	Bleu	Jaune
480-490	Bleu-vert	Orange
490-500	Vert-bleu	Rouge
500-560	Vert	Pourpre
580-595	Jaune	Bleu
595-650	Orange	Bleu-vert
650-750	Rouge	Vert-bleu

Longueur d'onde associée à une couleur et couleur complémentaire

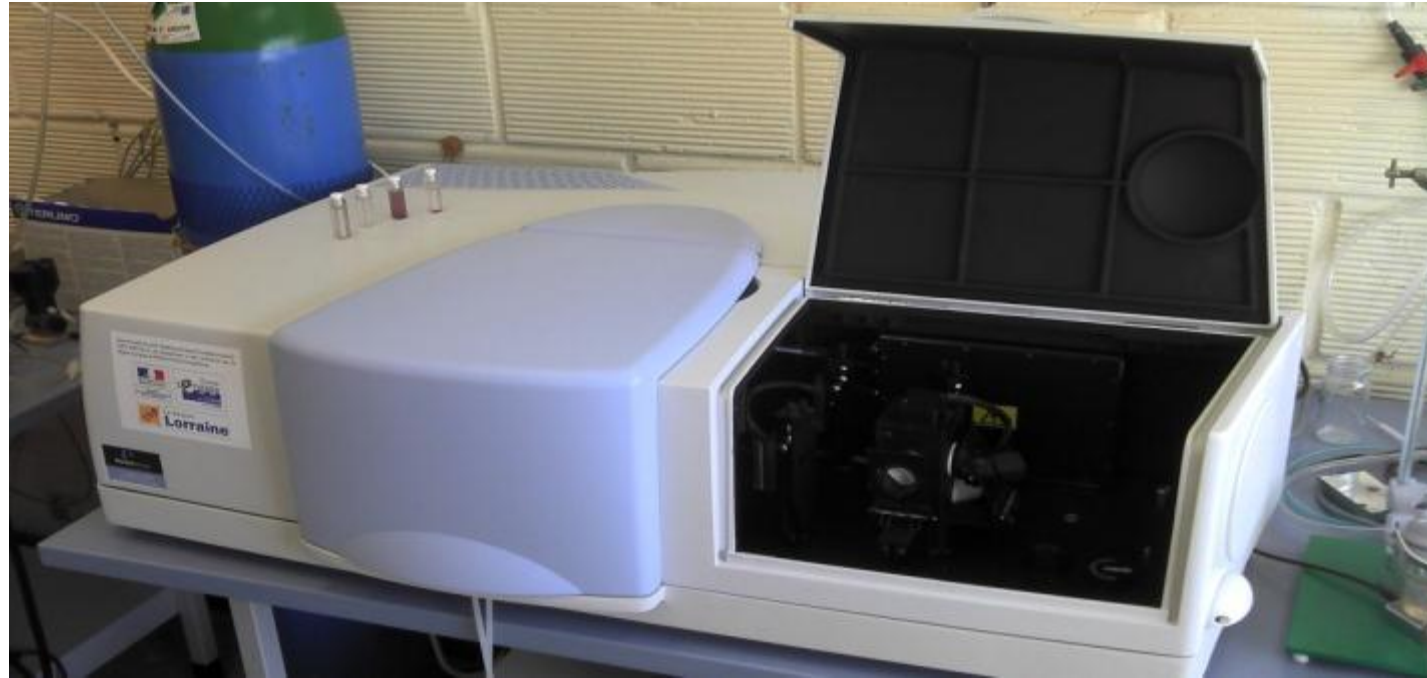
1.3 La lumière transporte de l'énergie

La lumière, et les rayonnements électromagnétiques en général, transportent de l'énergie.

L'œil humain a une sensibilité fortement dépendante de la longueur d'onde. Par exemple, à intensité énergétique égale, la lumière jaune est perçue bien plus facilement que la lumière bleue.

On retiendra que, comme l'œil humain, **le récepteur du spectrophotomètre a une sensibilité très variable selon la longueur d'onde. C'est une des raisons pour laquelle il faut** toujours régler le « zéro » à chaque fois que l'on fait une mesure d'absorbance après avoir modifié la longueur d'onde.

II- Spectrophotométrie UV/ Visible



Définition et but

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance et la transmittance d'une substance chimique donnée, généralement en solution grâce à l'interaction matière et rayonnement électromagnétique.

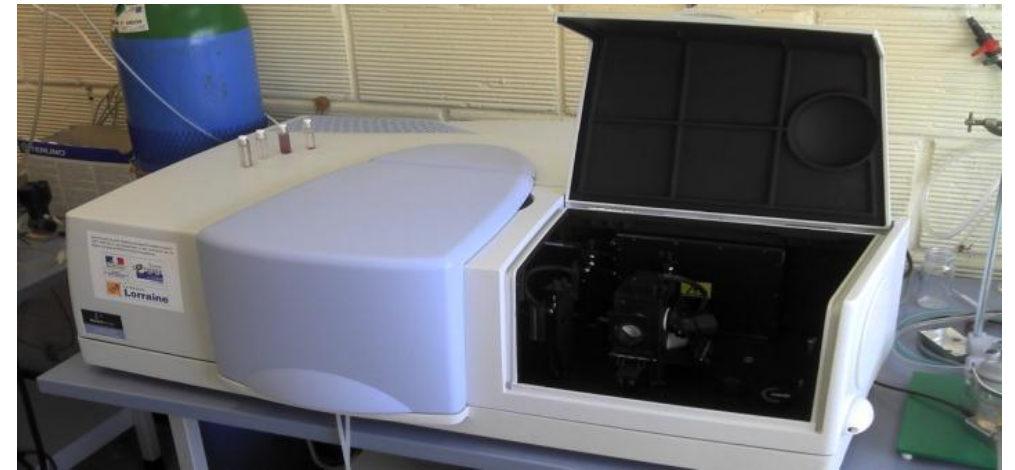
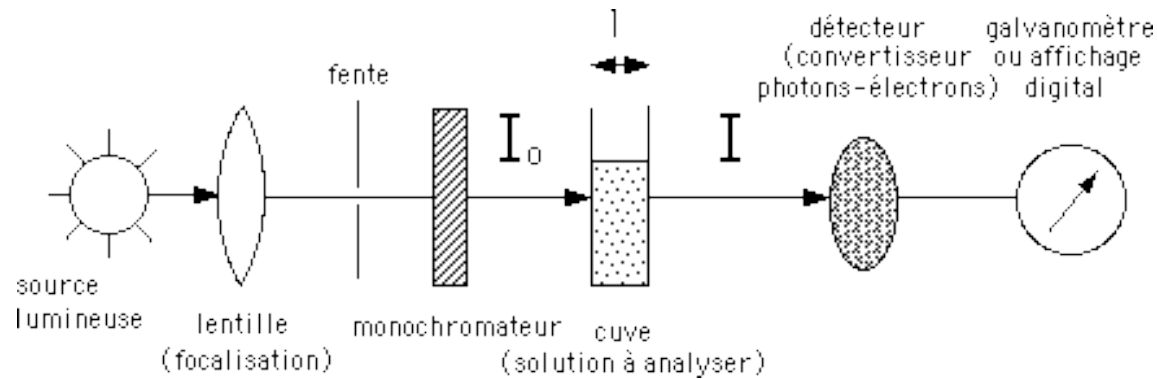
Ce contrôle a pour but de déterminer en partie la nature chimique de l'échantillon analyser, de déterminer son absorption (ou transmittance) en fonction de sa concentration mais aussi, déterminer ou prévoir la couleur de l'échantillon.

La source lumineuse est une lampe puissante de lumière blanche, émettant toutes les longueurs d'onde entre 300 et 800 nm environ.

Le domaine spectral étudié est donc celui du proche ultraviolet et du visible : on parle de spectrophotométrie UV-visible.

Appareil

L'appareil émet un rayonnement visible qui passe à travers la cuve de la solution à analyser, il compare ainsi l'intensité avant et après l'échantillon. L'appareil trace ensuite une courbe d'absorbance ou de transmittance.



Le faisceau de lumière émis par la source est décomposé par un **monochromateur**, de telle sorte qu'on obtienne un faisceau de lumière approximativement monochromatique.

Le faisceau traverse alors une **cuve**. **La cuve (en quartz, en verre ou en Plexiglas) doit être à faces parallèles** pour éviter des effets de lentille. Elle est de longueur utile l (*longueur optique*) et renferme le produit absorbant, à la concentration C .

l vaut couramment 1 cm, mais il est possible d'utiliser des cuves de plusieurs cm. Le rayon lumineux ayant traversé la cuve est ensuite focalisé sur un **détecteur**. **Celui-ci** convertit le flux énergétique lumineux reçu en un signal électrique.

II.2 L'absorbance : définition et mesure

Soit une solution (S) contenant une substance colorée dissoute dans un solvant incolore. Une mesure en spectrophotométrie est basée sur la comparaison du flux énergétique de deux rayons lumineux :

- un rayon traversant une cuve de référence, appelée communément le **blanc**, **contenant** uniquement le même solvant que (S), et donc a priori transparente vis-à-vis du rayon lumineux ;
- un rayon traversant une cuve identique contenant la solution (S).

Principe

On fait interagir une source lumineuse (entre 300 et 800 nm) avec une molécule, suivant la longueur d'onde utilisé et la nature de l'échantillon, l'énergie du rayonnement va faire passer des électrons de valences de la molécule à d'autres niveaux énergétiques. Cette énergie sera absorbé et le rayonnement sera en partie stoppé, on parle d'absorbance.

L'absorbance A ou densité optique DO (sans unité) se calcule grâce à la formule:

Avec I_0 l'intensité incidente
Et I l'intensité transmise

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

La transmittance (en pourcentage) se calcule grâce à la formule:

$$T\% = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

Variations de I, T et A

	I	T	A
Milieu transparent	I_0	100%	0
milieu opaque	0	0%	infinie

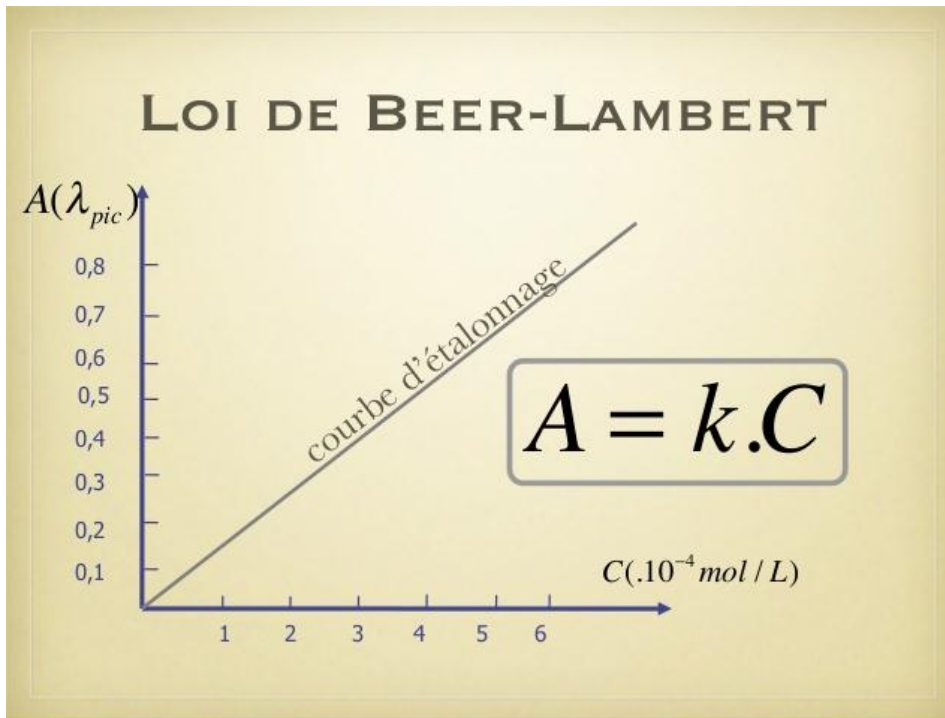
$A = -\text{Log} \left(\frac{I}{I_0} \right)$ soit : $A = -\text{Log} (T)$ La transmittance décroît lorsqu'un composé situé dans la cuve absorbe davantage.

Afin d'avoir une grandeur croissante avec le caractère absorbant, on utilise l'inverse de la transmittance, ou plus exactement le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance, que l'on nomme **absorbance** ou **densité optique**.

L'utilisation du logarithme est due à l'application de l'absorbance dans la formule de Beer-Lambert (détaillée ci-dessous).

II.4 La loi de Beer-Lambert

L'absorbance est proportionnel à la concentration et grâce à la loi de Beer-Lambert on peut retrouver la concentration de la substance dans la solution.



Loi de Beer-Lambert :

absorbance (sans unité)

trajet optique (cm)

$$A = \epsilon . l . c$$

coefficient d'absorption moléculaire
ou coefficient d'extinction molaire
($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

concentration de la substance
dans la solution (mol/l)

II.4 La loi de Beer-Lambert

b) Choix de la longueur d'onde d'étude

Lorsqu'on souhaite utiliser la loi de Beer-Lambert pour déterminer des concentrations à partir de mesures d'absorbance, **la longueur d'onde choisie est couramment celle du maximum d'absorption $\lambda_{\max}$. Il y a deux raisons à cela :**

C'est à cette longueur d'onde que la sensibilité *S des mesures est la* meilleure. Ceci signifie qu'on détectera de faibles variations de concentrations par une forte variation d'absorbance. De plus, travailler au maximum d'absorption permet de réduire au maximum l'imprécision due au fait que la lumière n'est jamais rigoureusement monochromatique (intervalle $\Delta\lambda$). De plus, si l'appareil se dérègle en cours d'expérience (légère variation de λ), la dérive de *A sera très faible*.

Additivité de l'absorbance :

A une longueur d'onde λ , l'absorbance *A* d'un mélange de *n* espèces absorbantes est la somme des absorbances des espèces.

$$A = \sum_{i=0}^n A_i(\epsilon_i \cdot l \cdot C_i)$$

Groupements chromophores :

Les groupements chromophores sont les groupements fonctionnels des composés organiques (cétones, alcènes, amines....etc.) responsables de l'absorption en UV-Visible.

Chromophores élémentaires	λ max (nm)	ϵ max (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
> C = C < (alcène)	173*	10000
- C C - (alcyne)	178*	2000
> C = O (cétone)	290	16
- CH = O (aldéhyde)	279	15
- COOH (acide)	208	32
- COCl (chlorure d'acide)	220	100
- CONH ₂ (amide)	220	63
- COOR (ester)	211	57
- NO ₂ (nitro)	214	17
- N = N - (azométhane)	338	4

La présence dans une même molécule de plusieurs de ces chromophores peut se traduire soit (1) par une simple additivité si ces chromophores sont indépendants, soit (2) par des effets **bathochromes** (déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde en UV ou vers le visible) et **hyperchromes** (augmentation du coefficient d'absorption moléculaire) lorsque ces chromophores sont conjugués

Les spectres dépendent également des interactions avec le solvant. Bien évidemment, dans l'eau, les spectres sont très souvent sensibles au pH qui modifie l'ionisation de certaines fonctions chimiques.

3-Dosages (= applications de la loi de Beer-Lambert) :

Deux cas sont possibles :

(1)-La **substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique** dans le visible (substance colorée) ou dans l'UV; on fait alors un **dosage direct**.

3-1-Méthode directe

- elle consiste à **mesurer A** et à **calculer c** .
- elle nécessite de **connaître le ϵ** de la substance à doser à la longueur d'onde choisie, et de bien caler le monochromateur, car ϵ varie avec λ .

(2)-**La substance à doser ne possède pas de pic d'absorption caractéristique**; il faut alors effectuer une **réaction colorée**; on fait alors un **dosage indirect**.

Les conditions d'une bonne méthode de dosage sont les suivantes :

- spécificité** : la réaction colorée doit être spécifique de la substance à doser (qui doit être seule à réagir avec les réactifs de coloration)

- solubilité** : le produit coloré obtenu doit être soluble; la solution doit être limpide pour permettre une lecture en spectrophotométrie d'absorption.

- stabilité** : la coloration doit être stable pendant un certain temps, pour permettre d'effectuer les lectures sans que la coloration n'évolue; généralement il faut une certaine durée de développement de la coloration pour qu'elle soit stable.

- proportionnalité** : l'intensité de la coloration obtenue (son absorbance) doit être proportionnelle à la quantité de substance à doser présente; cela nécessite de mettre les réactifs de coloration en excès (pour que la réaction colorée soit totale), et éventuellement de diluer la solution à doser (pour être dans les conditions de validité de la loi de Beer-Lambert).

- sensibilité** : la réaction colorée doit être sensible, pour permettre de doser des solutions de faibles concentrations .

3-2-Méthodes indirectes : elles ne nécessitent pas de connaître ε

a)-Méthode par comparaison avec un étalon unique:

- elle consiste à mesurer dans les mêmes conditions l'absorbance A_d de la solution à doser et l'absorbance A_{et} d'une solution "étalon" ou "standard" de concentration connue c_{et} , puis à calculer la concentration de la solution à doser c_d .
- elle suppose mais **ne vérifie pas la linéarité**.

b)-Méthode avec une gamme d'étalonnage :

- elle consiste à préparer une **gamme de dilutions** d'une solution étalon "mère", à mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons "filles", puis à tracer la **courbe d'étalonnage** $A = f(c)$. L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage; on fait ainsi une **détermination graphique** de la concentration de la solution à doser (la gamme doit encadrer la valeur probable de la solution à doser) ;
- elle permet de **vérifier la linéarité**, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation (tracé d'une droite statistique).

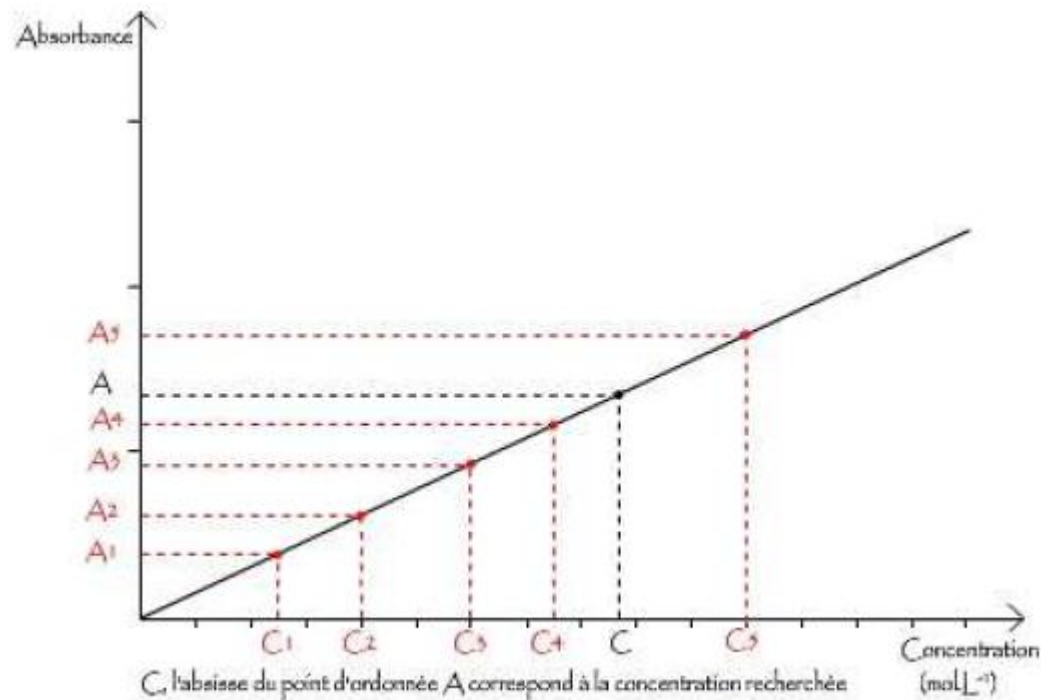
Détermination de la concentration d'une solution par étalonnage :

A partir de la loi de Beer Lambert, il est possible de déterminer la concentration d'une espèce par mesure de son absorbance.

Pour cela, on peut suivre le protocole expérimental suivant :

- On détermine la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption $\lambda_{\max}$.
- On prépare une série de solution à différentes concentrations C_i , et on mesure l'absorbance A_i de chacune de ces solutions à $\lambda_{\max}$.
- On trace la courbe d'étalonnage $A_i=f(C_i)$.
- On mesure l'absorbance A de notre solution de concentration inconnue à $\lambda_{\max}$.

A partir de la courbe on peut lire la concentration C de notre solution d'absorbance A .



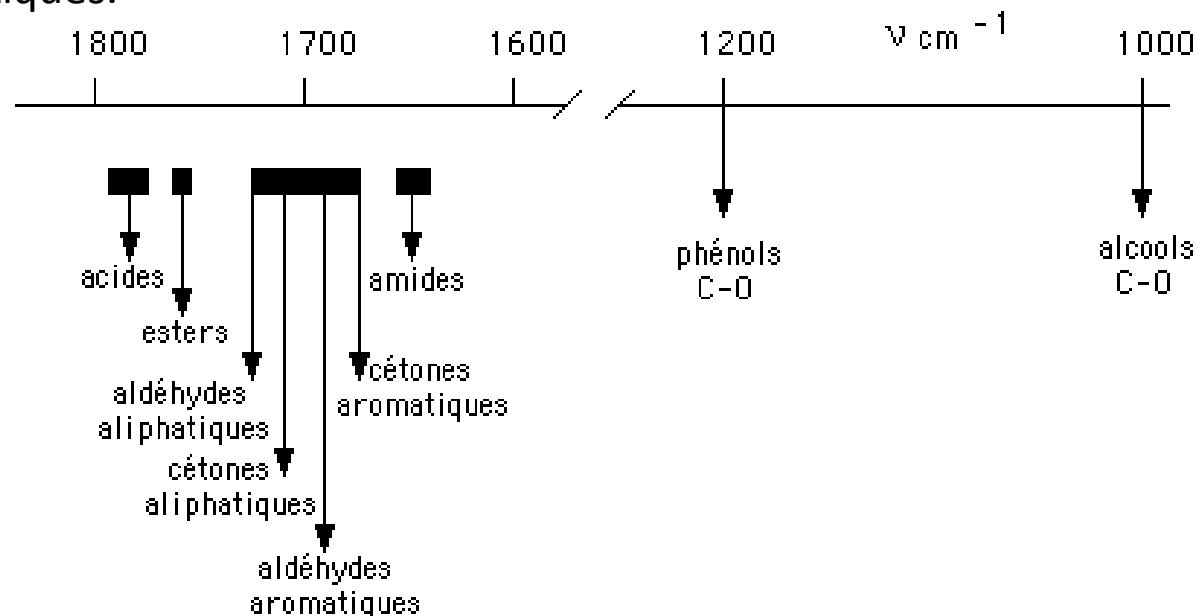
Courbe d'étalonnage.

2-SPECTROMETRIE IR

L'infrarouge analytique met à profit la plage des radiations électromagnétiques comprise entre 1 et 50 μm pour identifier ou doser des composés par des procédés basés sur l'absorption ou la réflexion de la lumière par l'échantillon

Le domaine de l'infra rouge utilisé sur les spectres habituels se situe entre 400 et 4000 cm^{-1} , ce qui correspond à des énergies situées autour de 30 kJ.mol^{-1} . Une telle énergie reste insuffisante pour provoquer des transitions électroniques comme en UV-Visible. Cette énergie va agir plutôt sur la vibration et la rotation des molécules.

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou pour tester la pureté d'une substance. Les différentes fonctions chimiques présentes sur une molécule donnée sont responsables de bandes d'absorption caractéristiques.



Exemples de valeurs des vibrations de valence ($\text{C}=\text{O}$ ou $\text{C}-\text{O}$) de carbonyles, carboxyles et dérivés divers (ν = nombre d'onde = $1/\lambda$).

2-SPECTROMETRIE IR

Les spectres d'absorption IR sont caractérisés par de faibles coefficients d'absorption molaire (compris entre 10 et 1500) : la méthode est donc peu sensible mais il existe maintenant des appareils dits "à transformée de Fourier" qui permettent l'accumulation et le moyennage de spectres successifs d'un même échantillon. En augmentant le temps d'accumulation, on arrive alors à obtenir des spectres avec de très faibles quantités de substance. Les spectres sont obtenus à partir de molécules à l'état gazeux, liquide (à l'état pur ou en solution dans des solvants "transparents" - CCl_4 , CHCl_3 , CS_2 ou huile de paraffine Nujol®), ou solide (pastillage dans du KBr).

Appareillage

L'échantillon est incorporé sur un support qui n'absorbe pas dans l'infra rouge, le support utilisé est le KBr.

Un mélange homogène de KBr contenant environ 1% de l'échantillon à analyser est broyé, ensuite placé dans un moule et soumis à une très forte pression. Il est ensuite extrait du moule sous forme d'une pastille très fine.

Fluorimétrie et chimiluminescence

*Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides (cristaux moléculaires ou ioniques), qu'ils soient purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Parmi les applications en analyse de ce phénomène, baptisé photoluminescence, se trouve la **fluorimétrie, une méthode** à la fois sélective et très sensible permettant de très nombreux dosages. L'intensité de fluorescence étant en rapport avec la concentration de l'analyte, les dosages sont faits à l'aide de fluorimètres ou de spectrofluorimètres. L'extinction extrêmement rapide de l'intensité lumineuse lorsque l'excitation cesse, fait également l'objet de mesures à des fins analytiques.*

*Par opposition, la **phosphorescence se caractérise par une décroissance dans le temps beaucoup plus lente**. La fluorescence est également mise à profit dans la conception de détecteurs utilisés en chromatographie liquide. Bien que l'origine en soit différente,*

*la **chimiluminescence, qui consiste en émission de lumière au cours de certaines réactions chimiques**, a reçu quelques applications en chimie analytique.*

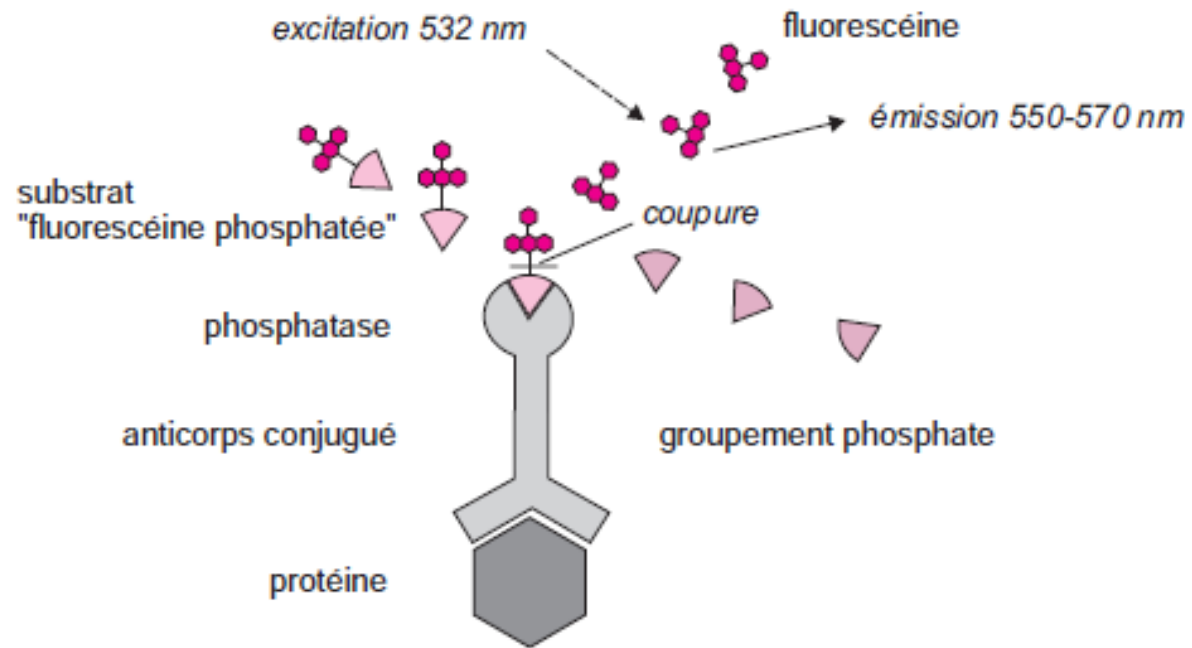
QUELQUES APPLICATIONS DE LA FLUORESCENCE

En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle (moins de 10 % de l'ensemble des composés), beaucoup peuvent le devenir par le biais d'une modification ou d'une association avec une autre molécule fluorescente. On peut greffer par exemple sur l'analyte un *réactif fluorophore par réaction chimique* (les 7-hydroxycoumarines peuvent être utilisées à cet effet). C'est la *dérivation de fluorescence*, qui rappelle le procédé employé en colorimétrie.

Pour doser les métaux sous forme de cations, on forme des complexes de chélation avec l'oxine (8-hydroxyquinoléine), l'alizarine ou la benzoïne, extractibles par les solvants organiques.

En biochimie la fluorescence trouve de nombreuses applications pour quantifier les protéines ou les acides nucléiques au moyen de réactifs qui se fixent spécifiquement sur ces composés. Cette approche, quelquefois très élaborée, en association avec l'électrophorèse, constitue une alternative plus sensible et moins contraignante que la révélation au moyen de substrats radioactifs.

La **chimifluorescence (à ne pas confondre avec la chimiluminescence)** est également un moyen particulièrement sensible de détection de protéines spécifiques. On doit disposer pour cela d'un anticorps spécifique porteur d'un conjugué enzymatique, tel une phosphatase (fig). Mis en présence d'un substrat tel un dérivé phosphaté de la fluorescéine, il y a libération de cette dernière facile à mettre en évidence par sa fluorescence déclenchée par une source excitatrice.



Processus d'un dosage de protéine par chimifluorescence en biochimie.

La figure regroupe simplement les réactions mises en jeu sachant que pour réaliser un tel dosage on suit un protocole dans lequel les différentes réactions se font au cours d'étapes distinctes.