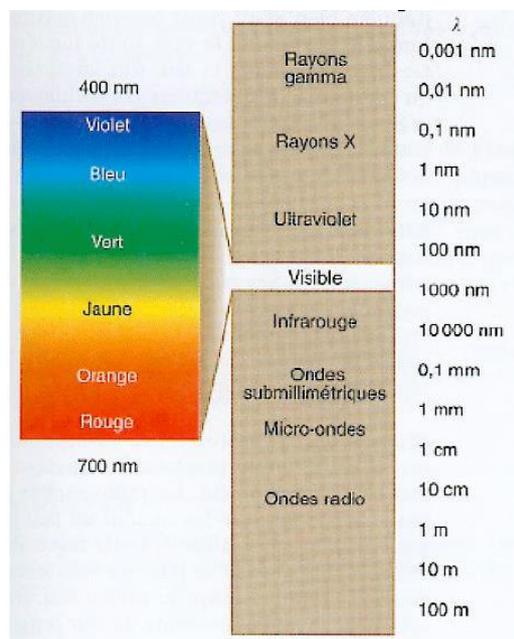


FICHE TP : PRINCIPE DE LA SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE

I. INTERACTION LUMIERE-MATIERE

La spectrophotométrie est l'**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA LUMIERE ET UNE SUBSTANCE**.

La lumière peut être décrite comme une onde électromagnétique, caractérisée par une longueur d'onde unique λ lorsque l'on parle de lumière monochromatique.

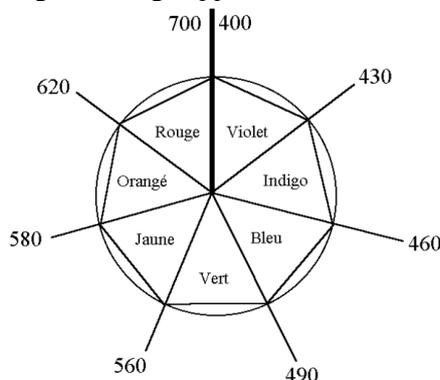


Le spectre électromagnétique

Lorsque de la lumière traverse une substance, elle est en partie transmise et en partie absorbée.

On étudie ici le cas de la **SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION UV-VISIBLE** : on soumet la substance étudiée à des longueurs d'onde comprises **entre 200 nm et 750 nm environ**.

- entre 200 nm et 400 nm environ : il s'agit du **DOMAINE DU PROCHE ULTRAVIOLET (UV)**
- entre 400 nm et 750 nm environ : il s'agit du **DOMAINE DU VISIBLE**
Si une substance absorbe dans un certain domaine de longueur d'onde du visible, elle apparaît alors colorée : la couleur de la substance perçue par l'œil est la couleur complémentaire de la couleur absorbée.
On détermine les couleurs complémentaires grâce à la roue des couleurs : la couleur complémentaire est la couleur diamétralement opposée sur le disque ; par exemple, une solution qui absorbe les radiations rouge et orange apparaît bleu.



Roue des couleurs : deux couleurs complémentaires sont diamétralement opposées.

LA SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE CORRESPOND A DES TRANSITIONS ELECTRONIQUES AU NIVEAU DE LA SUBSTANCE.

II. PRINCIPE DU SPECTROPHOTOMETRE D'ABSORPTION UV-VISIBLE

Nous ne traiterons ici que du cas des spectrophotomètres avec monochromateur. Il existe en effet des spectrophotomètres avec polychromateur dont le fonctionnement est différent.

Un spectrophotomètre mono-faisceau comporte 3 éléments principaux :

◆ UNE SOURCE DE LUMIERE POLYCHROMATIQUE

Pour la plupart des spectrophotomètres UV-visible, on utilise principalement deux types de lampes (sources de spectre continu) afin de couvrir la totalité du spectre recherché :

La partie visible du spectre est fournie à l'aide d'une **lampe à incandescence** (filament de tungstène avec enveloppe en silice pour une meilleure transparence dans l'UV proche), dont l'intensité d'émission dans l'UV est insuffisante.

La partie UV du spectre est donc obtenue avec une **lampe à décharge** au deutérium alimentée sous 300 à 400 V. La pression de la vapeur est moyenne de façon à obtenir un continuum d'émission.

Le passage de l'UV au visible s'opère par commutation des sources autour de 350 nm.

◆ UN MONOCHROMATEUR

Son rôle est d'extraire du rayonnement émis par la source une bande spectrale la plus étroite possible dont on peut faire varier la longueur d'onde. La réalisation utilise un système dispersif, autrefois à l'aide de prismes, désormais à l'aide de réseau de diffraction par réflexion, plan ou concave à environ 1200 traits par mm. La sélection de la longueur d'onde de travail λ se fait par rotation du réseau. Cette rotation, contrôlée par microprocesseur et moteur pas à pas, peut permettre de balayer (scan) une zone spectrale dans des limites définies par l'opérateur.

Remarque : un monochromateur n'est jamais parfait, il subsiste toujours un intervalle de longueur d'onde $\Delta\lambda$.

◆ UN DETECTEUR

Les détecteurs couramment employés sont des tubes photomultiplicateurs, dont la tension de sortie est proportionnelle au flux lumineux reçu, et des photodiodes.

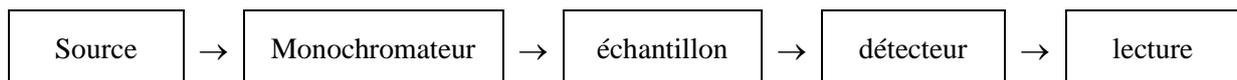


Schéma d'un spectrophotomètre mono-faisceau avec monochromateur :

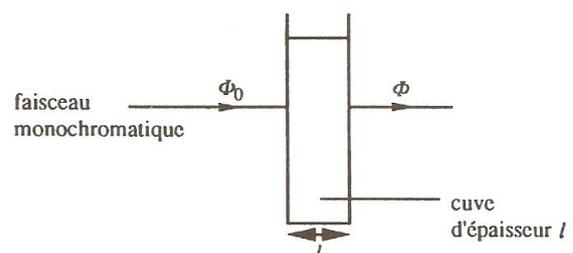
Un spectrophotomètre double-faisceau est relativement similaire. Après le monochromateur, le faisceau est partagé en deux. L'un des faisceaux traverse l'échantillon, tandis que l'autre traverse un « blanc » (même cuve et même solvant que l'échantillon) et est donc utilisé comme référence. Ces instruments peuvent alors être équipés de deux détecteurs (ce qui permet de mesurer simultanément les deux faisceaux) ou d'un simple détecteur qui alterne entre la mesure du faisceau échantillon et celui du blanc.

III. DEFINITION DE L'ABSORBANCE ET LOI DE BEER-LAMBERT

1. TRANSMITTANCE ET ABSORBANCE

On considère un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde λ traversant une solution placée dans une cuve de longueur l .

Φ_0 est le flux lumineux incident et Φ est le flux lumineux transmis (en Watt).



L'intensité du faisceau incident (en W.m^{-2}), notée I_0 , est : $I_0 = F_0 / S$.

L'intensité du faisceau transmis, notée I , est : $I = F / S$.

On appelle **TRANSMITTANCE** (exprimée en %) le rapport du flux lumineux transmis et du flux

lumineux incident : $T = \frac{F}{F_0} = \frac{I}{I_0}$.

$T = 0$ signifie que le milieu est opaque et $T = 1$ ($T = 100\%$) signifie qu'il est complètement transparent.

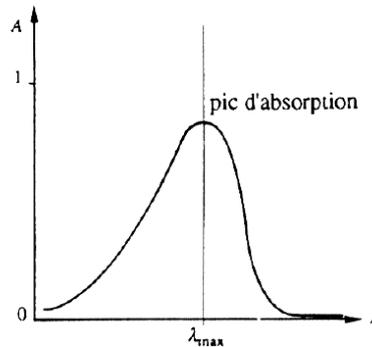
On utilise plus communément l'**ABSORBANCE**, notée A , définie par :

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

L'absorbance A est sans dimension

2. SPECTRE D'ABSORPTION D'UN COMPOSÉ

Le spectre d'un composé est la courbe représentant l'absorbance de ce composé en fonction de la longueur d'onde, $A = f(\lambda)$:



Exemple d'un spectre d'absorption

On peut observer des domaines où le flux lumineux traversant l'échantillon n'est pas affaibli et des domaines où le flux est affaibli. L'absorption passe par un maximum au moins à une longueur d'onde donnée, notée λ_{\max} .

Le spectre d'absorption d'un composé a deux intérêts majeurs :

- un spectre d'absorption UV-visible est caractéristique d'une substance donnée ; il peut donc être utilisé pour identifier une substance.
- le spectre sert à déterminer la longueur d'onde λ_{\max} correspondant à l'absorption maximale, qui est en pratique et généralement la longueur d'onde à laquelle on se place pour réaliser les mesures d'absorbance les plus précises (voir paragraphe IV.1).

3. LOI DE BEER-LAMBERT

L'expérience a permis d'établir, pour un échantillon d'une substance absorbante suffisamment diluée de concentration c , dans une cuve d'épaisseur ℓ , traversée par un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde λ , la **LOI DE BEER-LAMBERT** :

LOI DE BEER-LAMBERT

$$A = \epsilon \cdot \ell \cdot c$$

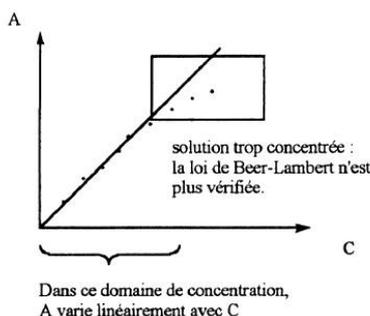
avec : ℓ → la **LONGUEUR DE LA CUVE** (en cm généralement)

c → la **CONCENTRATION** de la solution en substance absorbante (en mol.L⁻¹)

ϵ → le **COEFFICIENT D'ABSORPTION MOLAIRE** de la substance absorbante (généralement en L.cm⁻¹.mol⁻¹). Il dépend de la substance considérée, de la longueur d'onde, de la nature du solvant et de la température.

Remarque : le coefficient d'absorption molaire ϵ est très dépendant de la longueur d'onde pour une substance donnée. C'est ce paramètre qui varie lorsque l'on trace le spectre d'une solution et qui est donc responsable de l'allure du spectre.

⚠ La loi de Beer-Lambert n'est vérifiée que pour des valeurs faibles de concentrations (inférieure à 0,01 mol.L⁻¹ environ). Si la concentration est plus grande, les molécules sont trop proches les unes des autres et subissent entre elles des interactions qui modifient leurs propriétés d'absorption.



Courbe d'étalonnage d'une solution trop concentrée

Rem. : Il y a d'autres conditions de validité de la loi de Beer-Lambert : la solution ne doit être ni fluorescente, ni hétérogène (bulles, précipité, ...) et la solution ne doit pas être le siège d'une réaction photochimique.

⚠ La loi de Beer-Lambert est une grandeur additive. Si la solution contient plusieurs espèces colorées de concentrations c_i , on peut considérer qu'elles absorbent la lumière indépendamment.

On peut alors écrire à une longueur d'onde donnée: $A = \sum_i A_i = \sum_i \epsilon_i \cdot \ell \cdot c_i$

IV. REALISATION DES MESURES

1. CHOIX DE LA LONGUEUR D'ONDE D'ETUDE

LORSQUE L'ON SOUHAITE UTILISER LA LOI DE BEER-LAMBERT POUR DETERMINER DES CONCENTRATIONS A PARTIR DES MESURES D'ABSORBANCE, LA LONGUEUR D'ONDE CHOISIE EST COURAMMENT CELLE DU MAXIMUM D'ABSORPTION λ_{\max} .

Il y a deux raisons à cela :

- à cette longueur d'onde, la sensibilité des mesures S est la meilleure ; en effet, $S = \frac{dA}{dc} = \epsilon \cdot \ell$ est maximale quand ϵ est maximale (donc pour une variation de concentration dc donnée, dA sera maximale).
- au maximum d'absorption λ_{\max} , on a $\frac{dA}{d\lambda} = 0$: la lumière n'étant jamais rigoureusement monochromatique (intervalle $\Delta\lambda$) , dA sera minimisée et on réduit ainsi l'imprécision sur la mesure de l'absorbance A .

2. REGLAGE DU ZERO DE L'APPAREIL

Afin d'étudier l'absorption de la lumière par la substance colorée seule, il faut s'affranchir de la lumière absorbée par la cuve et le solvant : **POUR CELA, AVANT LA MESURE, ON REGLE L'ABSORBANCE A ZERO QUAND LA CUVE REMPLIE DE SOLVANT UNIQUEMENT EST PLACÉE DANS LE SPECTROPHOTOMETRE.** Cette cuve de référence est communément appelée le blanc.

Rem. : Plus généralement le blanc est constitué de tout ce qui compose la solution échantillon à l'exception de la substance à doser afin qu'elle soit la seule responsable de l'absorbance lors de la mesure.

3. PRECISION DES MESURES D'ABSORBANCE

On retiendra que **LA MEILLEURE PRECISION DE MESURE DE L'ABSORBANCE EST OBTENUE LORSQUE CELLE-CI EST COMPRISE ENTRE 0,1 ET 1 ENVIRON.**

En-dessous de 0,1, la précision chute rapidement et les mesures ne sont pas fiables

Au-dessus de 1, les écarts à la loi de Beer-Lambert peuvent devenir significatifs et la précision du détecteur diminue.

4. REALISATION PRATIQUE DES MESURES

- Remplir la cuve au 2/3 avec le solvant seul en veillant à bien essuyer les parois extérieures de la cuve ; éliminer les bulles d'air qui peuvent éventuellement se former lors du remplissage de la cuve ; nettoyer les faces transparentes de la cuve à l'aide de papier joseph.
- Placer la cuve dans le spectrophotomètre ; faire attention à la position des faces transparentes par rapport au faisceau lumineux ; régler l'absorbance à zéro. Attention : certaines cuves ont un sens passant à respecter.
- Vider la cuve, la rincer, la sécher puis la remplir avec la solution à étudier (*ou* vider la cuve, la rincer plusieurs fois avec la solution à étudier puis la remplir avec cette même solution)
- Placer la cuve dans l'appareil et lire la valeur d'absorbance affichée. Cette valeur correspond à l'absorbance de la solution seule.