Fiche TP n°4 : Spectrophotométrie

Programme officiel PCSI :

Notions et contenus	Capacités exigibles
Détermination expérimentale de grandeurs physiques ou spectroscopiques caractéristiques de l'espèce chimique.	Mesurer une absorbance. Déterminer un coefficient d'absorption molaire en spectroscopie UV-visible.

La spectrophotométrie est l'étude des interactions entre la matière et les radiations électromagnétiques. Nous limiterons notre propos à l'étude de la spectrophotométrie d'absorption dans le domaine du visible.
Le domaine visible correspond à un étroit domaine de longueurs d'ondes (ondes électromagnétiques) : $400\,nm < \lambda < 800\,nm$. À chaque longueur d'onde de ce domaine correspond une « couleur ». Une lumière qui contient toutes les radiations comprises entre 400 et 800 nm est appelée lumière blanche.

Ce document devra être complété par vos soins en utilisant le lien suivant :

http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/spectrometre

Nous utiliserons le spectromètre UV-Visible de deux manières :

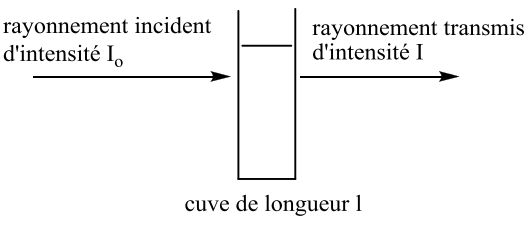
- Mesure de l'absorbance A à longueur d'onde fixée :

- Mesure, sur un échantillon de concentration donnée, de l'absorbance donnée en fonction de longueur d'onde :

I. Loi de Beer-Lambert

1. *Transmittance et absorbance*

Quand un rayonnement électromagnétique monochromatique, de longueur d'onde donnée λ, d'intensité incidente I_0 traverse un milieu homogène, sur une longueur *l*, une partie de ce rayonnement peut être absorbée, l'autre partie étant transmise. Soit I l'intensité du rayonnement transmis : $I \leq I_o$



On définit alors deux grandeurs. On appelle **transmittance** la grandeur notée T :

$$T = \frac{I}{I_0} \; avec \; 0 \leq T \leq 1$$

L'absorbance A, ou densité optique, est définie par :

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad A \geq 0$$

Quand A est nulle, l'intensité lumineuse n'est pas affaiblie ; le milieu est transparent.
Quand 0 < A : l'intensité lumineuse est affaiblie ; il y a absorption du rayonnement.

2. *Loi de Beer-Lambert*

Dans l'hypothèse où le milieu ne contient qu'une seule espèce absorbante, l'absorbance A est proportionnelle :

- **à la concentration C de cette espèce**
- **à la longueur *l* du milieu traversé par le rayonnement.**

Ce qui est traduit par la **loi de Beer – Lambert** :

$$A = \varepsilon_\lambda . l . C$$

avec ε_λ : constante de proportionnalité appelée **coefficient d'extinction molaire**. Ce coefficient, caractéristique de la substance absorbante dépend :

- fortement de la longueur d'onde λ
- plus faiblement du solvant et de la température du milieu.

Traditionnellement, les unités employées sont :

- A **sans unité, vu sa définition**
- *l* en **cm**
- C en **mol.L^{-1}**
- ε_λ est donc en **L.mol^{-1}.cm^{-1}**

Domaine de validité de la loi de BEER-LAMBERT : Le rayonnement doit être monochromatique (λ donnée), la concentration de l'espèce absorbante ne doit pas être trop grande, la solution ne doit pas être opaque (ce qui peut arriver en cas de présence de précipités, ou si une solution est trop concentrée), l'espèce absorbante ne doit pas participer à des équilibres qui modifient sa concentration (par exemple, déplacement d'un équilibre par dilution dans le cas des complexes).

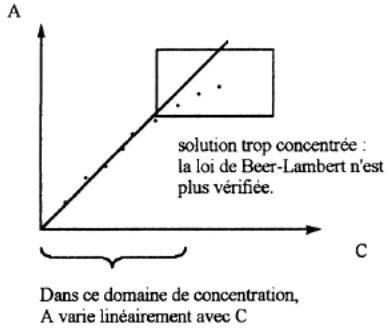


Figure 1 : Courbe d'étalonnage

Si, dans un milieu donné, plusieurs substances absorbent pour une même longueur d'onde λ, l'absorbance totale est la somme des absorbances dues à chaque espèce absorbante, soit :

$A = A_1 + A_2 + \ldots = \varepsilon_{1\lambda} . l . C_1 + \varepsilon_{2\lambda} . l . C_2 + \ldots$

II. Mesures spectrophotométriques

1. *Le spectromètre*

Les mesures spectrophotométriques sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre. Il comporte un système qui permet :

- d'obtenir une lumière monochromatique
- de mesurer I/I_0

Dans le cas d'un appareil monofaisceau comme celui que nous allons utiliser, le spectromètre se compose :

- d'une source polychromatique :

- d'un monochromateur :

- d'un détecteur :

- d'un emplacement réservé, entre le monochromateur et le détecteur pour la cuve contenant l'échantillon à analyser.

Les cuves peuvent être en plastique, en verre ou en quartz suivant la nature de la solution (Ne pas utiliser d'acétone avec les cuves en plastique, sinon on les dissout…) et l'étendue des longueurs d'onde à étudier. Il en existe de différentes longueurs 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ou 5 cm.

2. *Mise en œuvre expérimentale*

Réglage du zéro optique : À une longueur d'onde donnée, l'absorbance mesurée correspond à l'absorption de **l'espèce chimique absorbante**, **du solvant** et **des parois de la cuve**. Pour mesurer l'absorbance réelle d'un composé, il faut procéder par comparaison à un **tube témoin, ou blanc**, contenant le solvant et les autres constituants, dans une cuve identique à celle de la solution étudiée.

Pour réaliser une mesure, il faut donc :

- Choisir la cuve : cf II.1
- Allumer le spectromètre
- Choisir une longueur d'onde : cf III.3.
- Faire le blanc :

- Mesurer l'absorbance de l'échantillon :

Remarques :

- Si la valeur de l'absorbance dépasse 1,

- Si l'absorbance évolue :

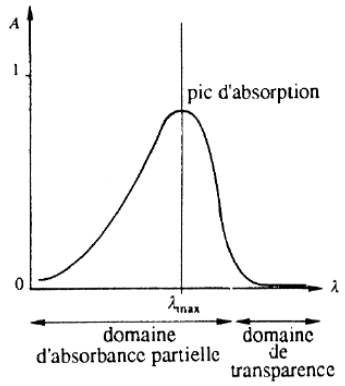
- La remise à zéro de l'absorbance avec le solvant doit être effectuée pour toute longueur d'onde car les coefficients d'extinction molaire de la cuve et du solvant dépendent aussi de la longueur d'onde…

III. Spectre d'absorption

1. *Présentation*

La courbe $A = f(\lambda)$, pour une cuve de dimension donnée et pour une substance de concentration donnée, s'appelle le **spectre d'absorption ou spectre optique de la substance**.

Pour caractériser un composé, on donnera sa longueur d'onde d'absorption maximale et la valeur de son coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde.



Exemple d'un spectre d'absorption

2. *Acquisition d'un spectre*

Il s'agit de mesurer, sur un domaine de longueur d'ondes, l'absorbance et de la reporter sur un graphe. Comme I_0 change avec λ, elle doit être mesurée, tout comme I, pour chaque longueur d'onde explorée. Pratiquement, tous les spectromètres permettent de mettre en mémoire la succession des valeurs de I_0 pour le domaine de longueurs d'onde étudié : il s'agit de faire le spectre du blanc ; reste à mesurer I et à tracer le graphe recherché.

Pour réaliser l'acquisition d'un spectre, il faut :

- Choisir la cuve : cf II.1.
- Allumer le spectromètre en mode "enregistrement de spectre"
- Sélection du domaine spectral : Trois réglages sont nécessaires : λ_{min}, λ_{max} et la vitesse de balayage. Plus le balayage est lent, meilleur est le rapport signal sur bruit.
- Enregistrement du spectre du blanc
- Enregistrement du spectre
- Examen du spectre

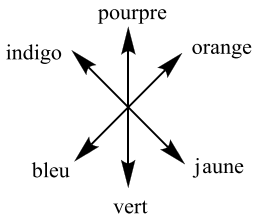
Plusieurs informations peuvent être obtenues grâce au spectre. Nous utiliserons principalement le (ou les) pic(s) d'absorption : longueur d'onde et absorbance du maximum d'absorption.

3. Choix de la longueur d'onde

A quelle longueur d'onde doit être faite la mesure spectrophotométrique ? Pourquoi ?

Il faut donc se reporter au spectre de la molécule étudiée pour déterminer la longueur d'onde de travail : soit le spectre de cette molécule sera fourni, soit la longueur d'onde du maximum d'absorption sera donnée.

Quel est le lien entre la couleur d'une espèce et la longueur d'onde du maximum d'absorption ?



Longueurs d'ondes absorbées (nm)	Couleur « absorbée » par la solution	Couleur de la solution
400-435	Violet	Vert-jaune
435-480	Indigo	Jaune
480-490	Bleu	Orange
490-500	Bleu-vert	Rouge
510-560	Vert	Pourpre
560-580	Vert-jaune	Violet
580-595	Jaune	Indigo
595-610	Orange	Bleu
610-750	Rouge	Bleu-vert