

# Fiche TP : La spectrophotométrie UV-visible

## I Aspects théoriques de la spectroscopie UV-vis

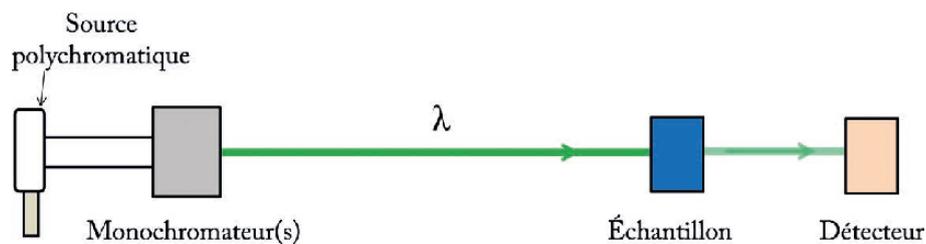
La spectroscopie UV-visible est la spectroscopie utilisant le rayonnement le mieux connu : la lumière visible. Dans certains cas, on peut également utiliser la lumière ultra-violette. Le rayonnement utilisé est alors constitué de photons dont les énergies permettent de faire des transitions électroniques, comme dans la partie spectroscopie du chapitre A1. Il y a deux possibilités sur le devenir du rayonnement :

- Le rayonnement possède une énergie correspondante à une transition entre deux niveaux électroniques. Alors il est absorbé par l'échantillon et ne le traverse pas.
- Le rayonnement possède une énergie qui ne correspond pas à une transition entre deux niveaux électroniques. Il n'interagit pas avec l'échantillon et le traverse sans être modifié.

On comprend donc que l'intensité du faisceau lumineux de sortie dépend de l'interaction ou non du faisceau avec l'échantillon, conditionnée par son énergie (liée à sa longueur d'onde par la formule de Planck).

## II Aspects expérimentaux

La mesure est réalisée dans un spectrophotomètre et le fonctionnement est donné ci-dessous :



La source émet un rayonnement qui est filtré pour être monochromatique. L'intensité de ce rayonnement est connue et notée  $I_o$ . Le détecteur en fin de parcours mesure l'intensité après l'absorption par l'échantillon, notée  $I_f$ . Le spectrophotomètre renvoie alors la valeur d'absorbance :

$$A = \log \left( \frac{I_o}{I_f} \right)$$

### Remarques

- On appelle transmittance la valeur :

$$T = \frac{I_f}{I_o}$$

On a donc :  $A = -\log(T)$ .

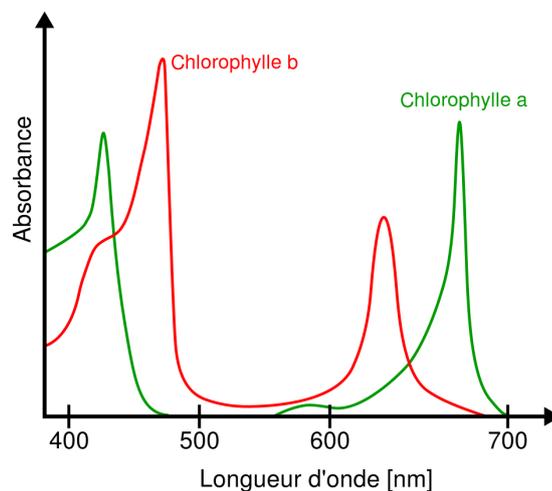
- Comme  $I_o > I_f$ , l'absorbance est nécessairement positive.

Un spectrophotomètre possède deux modes de fonctionnement classiques :

#### Mesure d'une longueur d'onde unique :

L'utilisateur indique la longueur d'onde de travail et le spectrophotomètre renvoie une unique mesure qui est l'absorbance à cette longueur d'onde.

**Balayage de spectre :** L'utilisateur indique un intervalle de longueur d'onde et le spectrophotomètre mesure pour chacune des longueurs d'onde de l'intervalle la valeur d'absorbance. Il trace ensuite le graphique  $A = f(\lambda)$  qui est nommé spectre d'absorption.



Spectre d'absorption de la chlorophylle

Avant de pouvoir utiliser le spectrophotomètre pour une mesure ou une série de mesure, il faut l'étalonner : on appelle cela faire le blanc. Il s'agit alors de remplir une cuve avec le solvant incolore de la solution étudiée (souvent l'eau), de placer la cuve dans l'appareil et d'indiquer à l'appareil de faire le blanc. Il convient par la suite de garder la même cuve pour toutes les mesures et donc de la nettoyer entre deux mesures, puis de la sécher (pour éviter une dilution parasite). On procède de la solution la plus diluée à la solution la plus concentrée.

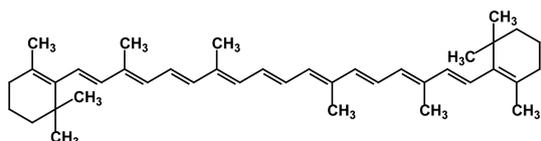
### III Pourquoi des entités sont colorées ?

De manière générale, ce sont les molécules colorées qui sont analysables. On notera que lorsque les molécules organiques sont colorées, c'est souvent suite à la présence d'un système conjugué plus ou moins étendu. Du côté inorganique, les complexes, c'est-à-dire des entités centrées sur un centre métalliques, sont souvent très colorés.

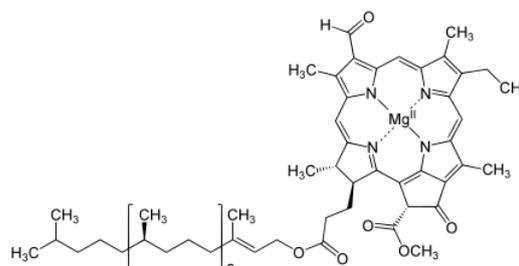
#### Propriété

Plus le système conjugué est étendu, plus la transition énergétique est basse en énergie et plus la transition est vers les hautes longueurs d'onde.

#### Exemple



(a) Le  $\beta$ -carotène



(b) La chlorophylle

### IV Loi de Beer-Lambert

Il est possible de montrer que lorsqu'une molécule en solution absorbe, selon certaines conditions, l'absorbance observée est proportionnelle à la concentration de la molécule en solution. C'est la loi de Beer-Lambert.

**Propriété: Loi de Beer-Lambert**

L'absorbance  $A$  d'une solution peut s'exprimer grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A = \sum_i \epsilon_i \times l \times c_i$$

Avec :

- $i$  : molécule absorbante
- $l$  : longueur de la cuve en cm
- $c_i$  : concentration de  $i$  en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
- $\epsilon_i$  coefficient d'absorption molaire en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Remarque**

Cette loi ne peut s'appliquer que si les critères suivants sont respectés :

- Les espèces absorbantes en solution sont diluées :

$$C < 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

En effet, si elles sont trop concentrées, elles pourraient interagir et changer leurs propriétés d'absorption.

- L'absorbance totale est peu élevée :

$$A < 1,5$$

Dans le cas contraire, le détecteur de l'appareil n'est pas assez sensible pour mesurer la très faible intensité du faisceau une fois absorbé par l'échantillon.