

# **Méthodes optiques : spectrophotométrie d'absorption moléculaire**

## 1. Principe de l'absorption moléculaire

Lorsqu'un rayonnement lumineux traverse de la matière, certaines longueurs d'onde sont absorbées de manière sélective par la ou les particules présentes dans la matière traversée.

Lorsqu'une molécule absorbe un photon, l'énergie des électrons de valence et de certains électrons impliqués dans les liaisons moléculaires (notamment les doubles liaisons) augmente et passé d'un état initial à un état excité. Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'émission de chaleur de l'énergie absorbée.

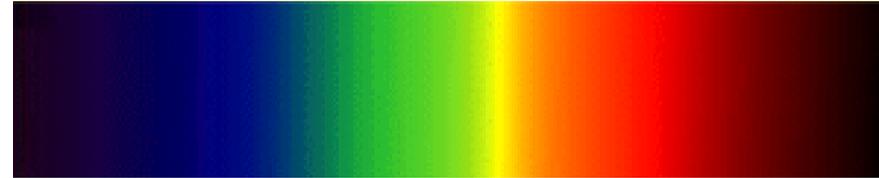
Un composé apparaît coloré, si lorsqu'il est éclairé par de la lumière blanche, il ne transmet pas toutes les radiations reçues : il absorbe majoritairement la couleur complémentaire à la sienne.

Définition : **chromophore** = **groupement d'atomes comportant une ou plusieurs doubles liaisons, et formant avec le reste de la molécule système conjugué, c'est-à-dire une alternance de simples et de doubles liaisons, et responsable d'une absorption caractéristique.**

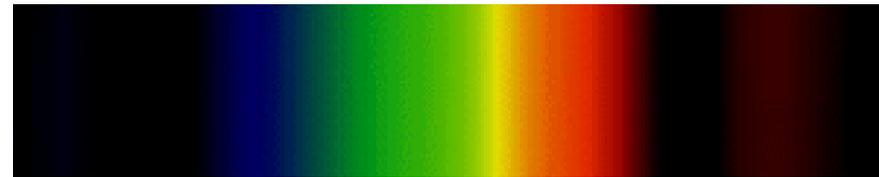
On peut déterminer un spectre d'absorption d'un composé (spectre de bande).

Exemple : spectres d'absorption de pigments présents dans les feuilles.

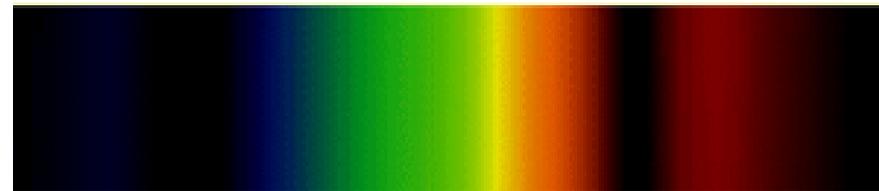
spectre témoin



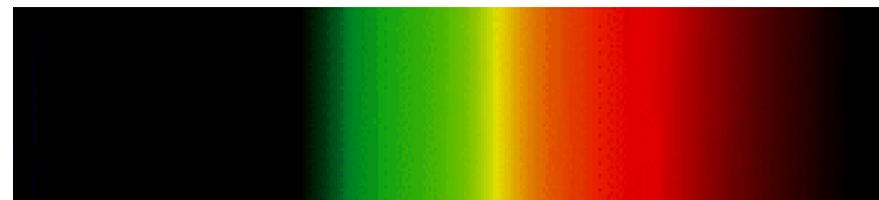
spectre d'absorption de la chlorophylle *a*



spectre d'absorption de la chlorophylle *b*



Spectre d'absorption du  $\beta$ -carotène



On peut caractériser l'absorbance  $A_\lambda$  d'une molécule à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée par la relation suivante :

$$A_\lambda = \log_{10} \left( \frac{\phi_0}{\phi_T} \right)$$

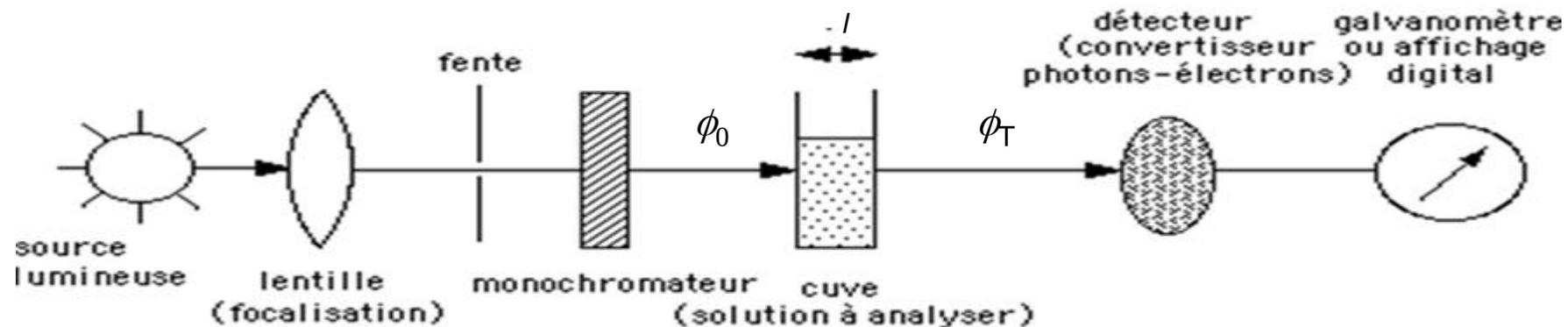
avec : -  $\phi_0$  = intensité du faisceau lumineux incident

-  $\phi_T$  = intensité du faisceau lumineux transmis dans la même direction que le faisceau lumineux incident

## 2. Appareillage : les spectrophotomètres

### 2.1. Spectrophotomètre monofaisceau

Document n°1 : schéma simplifié d'un spectrophotomètre monofaisceau



mesure des intensités des flux de lumière incidente  $\phi_0$  et transmise  $\phi_T$ .

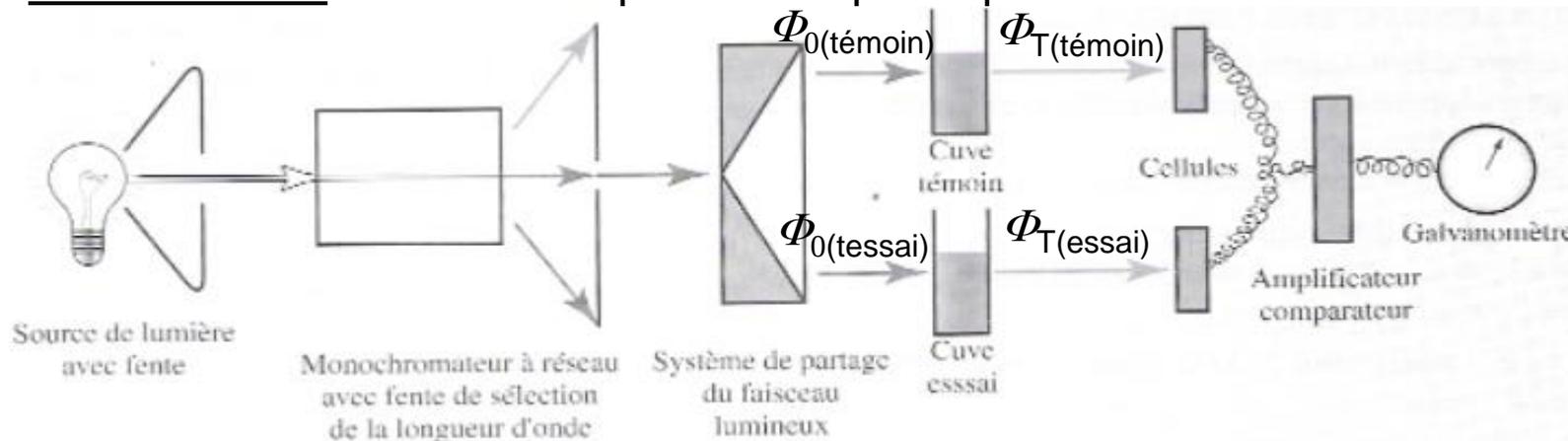
lentille + fente  $\Rightarrow$  obtention d'un monofaisceau

Monochromateur = sélection d'une longueur d'onde  $\lambda$   $\Rightarrow$  obtention d'un monofaisceau monochromatique

Détermination de la **transmittance** :  $T = \frac{\phi_T}{\phi_0}$  donc calcul de **l'absorbance  $A_\lambda$**  :  $A_\lambda = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{\phi_0}{\phi_T}\right)$

## 2.2. Spectrophotomètre double faisceau

Document n°2 : schéma simplifié d'un spectrophotomètre double faisceau



Un diviseur de faisceau envoie alternativement le faisceau vers la cuve témoin puis vers la cuve essai.

Un système de miroir permet d'envoyer ces deux faisceaux vers le même détecteur qui reçoit donc alternativement le faisceau d'intensité transmise  $\phi_{T(témoin)}$  du témoin et celle  $\phi_{T(essai)}$  de l'échantillon.

Le signal du capteur est alors traité par un microprocesseur qui permet d'afficher la différence d'absorbance entre les deux cuves  $A_{\lambda(essai)} - A_{\lambda(témoin)}$ .

## 2. Appareillage : les spectrophotomètres

### 2.2. Sources lumineuses et cuves

En fonction des longueurs d'onde d'absorption, la nature de la source lumineuse et de la cuve est différente :

	Spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible	Spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'UV
Lampes	lampe à filament de tungstène en atmosphère d'halogène (lampe à iode)	- lampe à arc en atmosphère de deutérium - lampe à arc en atmosphère de xenon
Cuves	- en polystyrène (usage unique) - en verre	- en quartz - en plastique spécial

## 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

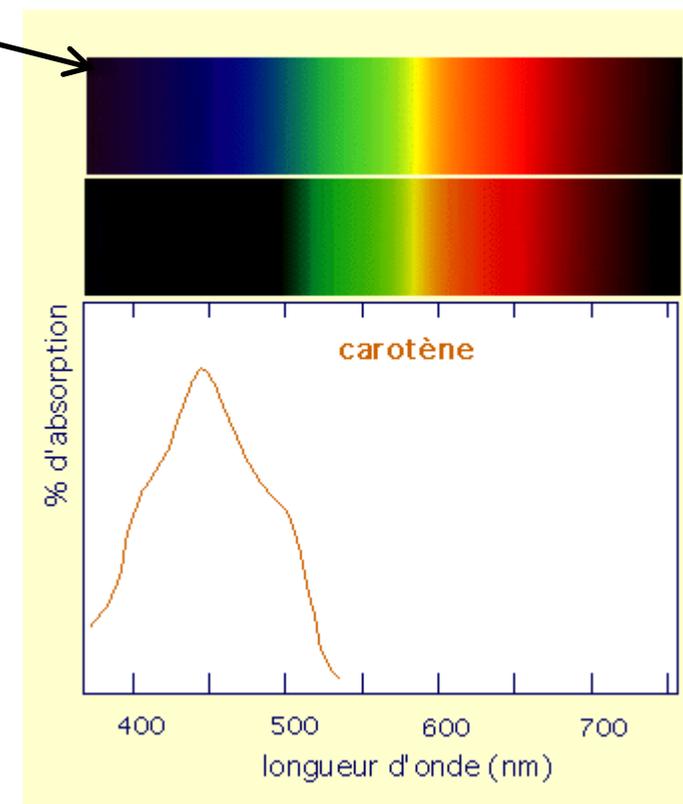
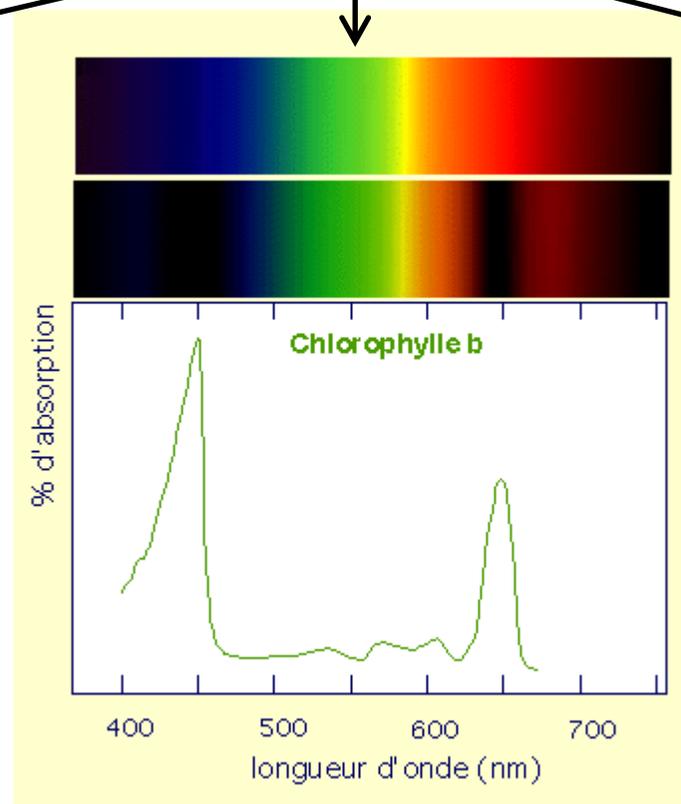
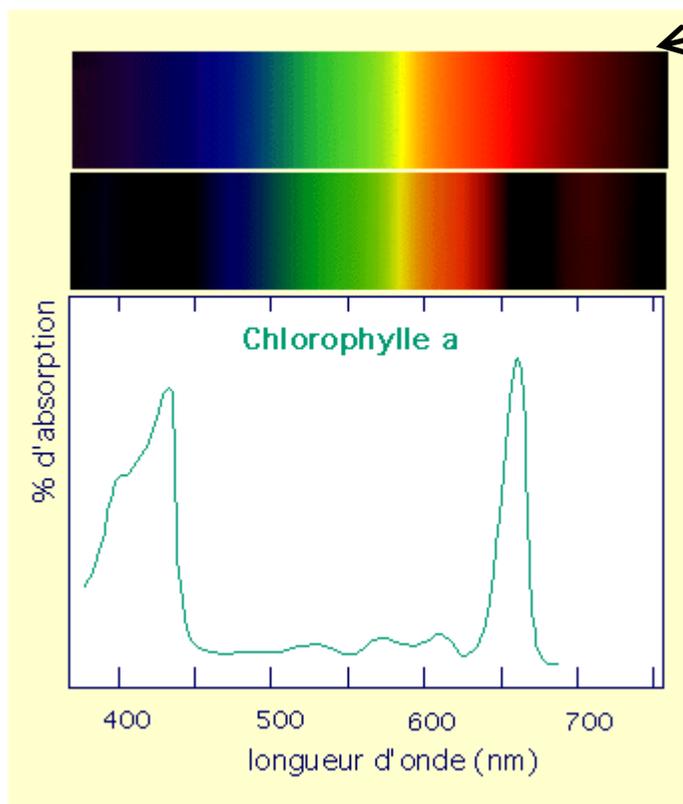
### 3.1. Aspect qualitatif : spectre d'absorption et caractérisation de biomolécules

**Définition** : **spectre d'absorption** = mesure de l'absorbance pour différentes longueurs d'onde  $\lambda$ .

⇒ représentation graphique  $A = f(\lambda)$  caractéristique d'une molécule.

⇒ permet de déterminer  $\lambda_{\max}$  qui est la longueur d'onde à laquelle la molécule absorbe le plus.

spectre témoin



**Q1.** Déterminer les  $\lambda_{\max}$  des pigments d'une feuille.

- pour la chlorophylle a :  $\lambda_{\max} = 430 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$
- pour la chlorophylle b :  $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$
- pour le carotène :  $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$

### 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

#### 3.2. Aspect quantitatif : application aux dosages

##### 3.2.1. Loi de Beer-Lambert

**Loi de Beer-Lambert :** 
$$A_{\lambda} = \log_{10} \left( \frac{\phi_0}{\phi_T} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c_{(\text{molécule qui absorbe ; solution dans la cuve})}$$

Avec :

- $A_{\lambda}$  : absorbance mesurée à la longueur d'onde  $\lambda$ , sans unité,
- $\phi_0$  : intensité du faisceau lumineux incident, sans unité,
- $\phi_T$  : intensité du faisceau lumineux transmis, sans unité,
- $\varepsilon_{\lambda}$  : coefficient d'absorption moléculaire de la molécule qui absorbe à la longueur d'onde  $\lambda$  (ou coefficient d'extinction molaire de la molécule qui absorbe à longueur d'onde  $\lambda$ ), en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , ou  $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ,
- $l$  : trajet optique (épaisseur de la cuve), en cm (en général  $l = 1$  cm),
- $c_{(\text{molécule qui absorbe ; solution dans la cuve})}$  : concentration en quantité de matière de la molécule qui absorbe dans la solution présente dans la cuve, en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

#### 3.2. Aspect quantitatif : application aux dosages

##### 3.2.2. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert est valide que dans certaines conditions :

- travailler avec une lumière monochromatique (impossible dans l'absolu),
- la solution contenant la substance qui absorbe doit être limpide,
- concentration pas trop élevée, c'est-à-dire  $c_{\text{(molécule qui absorbe ; solution dans la cuve)}} < 0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,
- absence de diffusion et de fluorescence de la solution,
- la substance qui absorbe ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident. Donc on ne doit pas travailler avec  $A_{\lambda} > 1,5$ .
- la substance qui absorbe ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant (homogénéité).

### 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

#### 3.2. Aspect quantitatif : application aux dosages

##### 3.2.3. Additivité de la loi de Beer-Lambert

Si dans une solution on a plusieurs substances X et Y absorbantes à la même longueur d'onde  $\lambda$  (caractérisées respectivement par  $\varepsilon_{\lambda(\text{substance X})}$  et  $\varepsilon_{\lambda(\text{substance Y})}$ ) de concentration  $c_{(\text{substance X ; solution dans la cuve})}$  et  $c_{(\text{substance Y ; solution dans la cuve})}$  respectivement, l'absorbance  $A_{\lambda}$  de la solution pour un trajet optique  $l$  est la somme des absorbances d'une solution 1 de X seul de concentration  $c_{(\text{substance X ; solution 1 dans la cuve})}$  et d'une solution 2 de Y seul de concentration  $c_{(\text{substance Y ; solution 2 dans la cuve})}$  :

$$\begin{aligned} A_{\lambda} &= \varepsilon_{\lambda(X)} \cdot l \cdot c_{(X ; \text{solution dans la cuve})} + \varepsilon_{\lambda(Y)} \cdot l \cdot c_{(Y ; \text{solution dans la cuve})} \\ A_{\lambda} &= l \cdot (\varepsilon_{\lambda(X)} \cdot c_{(X ; \text{solution dans la cuve})} + \varepsilon_{\lambda(Y)} \cdot c_{(Y ; \text{solution dans la cuve})}) \end{aligned}$$

### 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

#### 3.2. Aspect quantitatif : application aux dosages

##### 3.2.4. Applications de la loi de Beer-Lambert

Loi de Beer-Lambert utilisée pour le dosage de soluté :

- **par méthode directe** :

L'absorbance mesurée est due directement au soluté qui absorbe présent dans l'échantillon.

- **par méthode indirecte** :

L'absorbance mesurée est celle d'une autre substance qui absorbe présente dans l'échantillon, et dont la concentration est en relation avec celle du soluté à doser dans l'échantillon.

Pour les dosages spectrophotométriques on se place généralement à  $\lambda = \lambda_{\max}$  de la molécule qui absorbe.

Pour la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le visible, ou **colorimétrie**, les solutés n'étant pas toujours colorés, ils peuvent le devenir grâce à des **réactifs** appropriés, si possible **spécifiques** et **sensibles**.

Exemple : réaction des acides aminés avec la ninydrine

### 3. Applications de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

#### 3.2. Aspect quantitatif : application aux dosages

##### 3.2.4. Applications de la loi de Beer-Lambert

##### 3.2.5. Détermination de la concentration en quantité de matière d'un soluté

Deux cas de figures :

- si  $\varepsilon_\lambda$  est connu :

Par mesure de  $A_\lambda$ , on peut déterminer  $c_{(\text{soluté} ; \text{solution dans la cuve})}$  par le calcul grâce à la loi de Beer-Lambert.

- si  $\varepsilon_\lambda$  est inconnu :

On détermine  $c_{(\text{soluté} ; \text{solution dans la cuve})}$  par comparaison avec une ou plusieurs solutions étalons, ou standards, qui sont des solutions de concentrations connues en soluté.

- utilisation d'UN SEUL ÉTALON :

On opère par comparaison entre une solution étalon, ou standard, et un échantillon et dont les volumes de prise d'essai d'étalon et d'échantillon sont identiques.

- utilisation d'une GAMME D'ÉTALONS :

On utilise plusieurs solutions étalons de concentrations connues mais différentes afin de construire la représentation graphique  $A_\lambda = f(c_{(\text{soluté} ; \text{solution étalon dans la cuve})})$ , ou **courbe d'étalonnage**.

La concentration en soluté dans l'essai (échantillon) est déterminée par résolution graphique.

## Annexes : couleurs absorbées et couleurs complémentaires

