

SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE UV-VISIBLE

1 Principe

1.1 Rappels sur le rayonnement UV-Visible :

1.2 Principe de l'absorption UV-visible :

2 Aspect qualitatif

2.1 Transitions électroniques :

2.2 Le spectre UV-visible

2.3 Effet du solvant

2.4 Interet analytique des spectres d'absorption UV-visible

3 Aspect quantitatif

3.1 Loi de l'absorption

3.2 Validité de la loi

3.2.1 Domaine d'application de la loi / condition de proportionnalité

3.2.3 Condition sur le signal

3.3 Application à l'analyse quantitative : le dosage

3.3.1 L'étalonnage

3.3.2 Le choix de la longueur d'onde

3.3.3 Especes dosables

4 Appareillage

4.1 Différents composants

4.2 Différents types de spectrophotomètres

5 Sources d'erreurs

6.1 Erreur liées au monochromateur

6.2 Erreurs liées au système de détection (Rc-appareil de mesure)

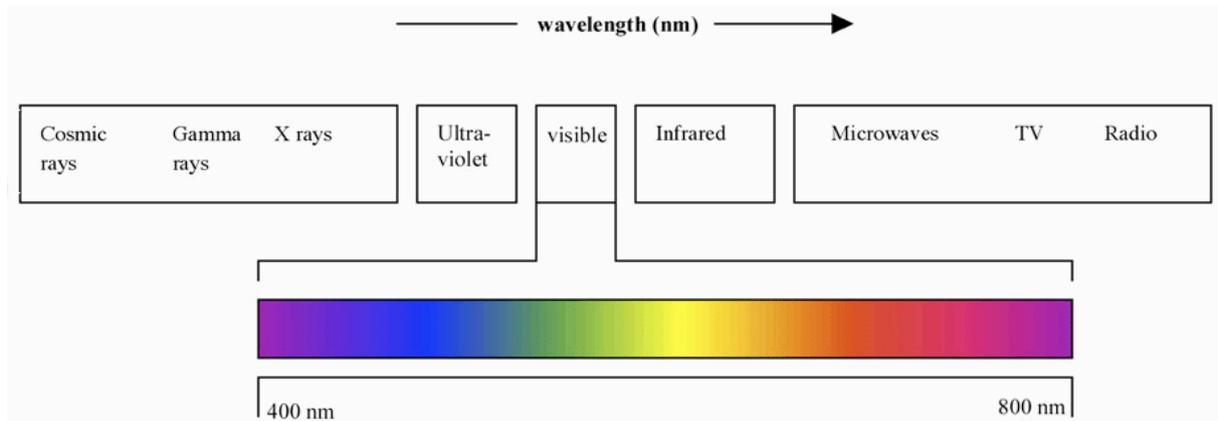
6 Contrôle des spectrophotomètres (λ , A, $h\nu$)

7 Conclusion

1 Principe

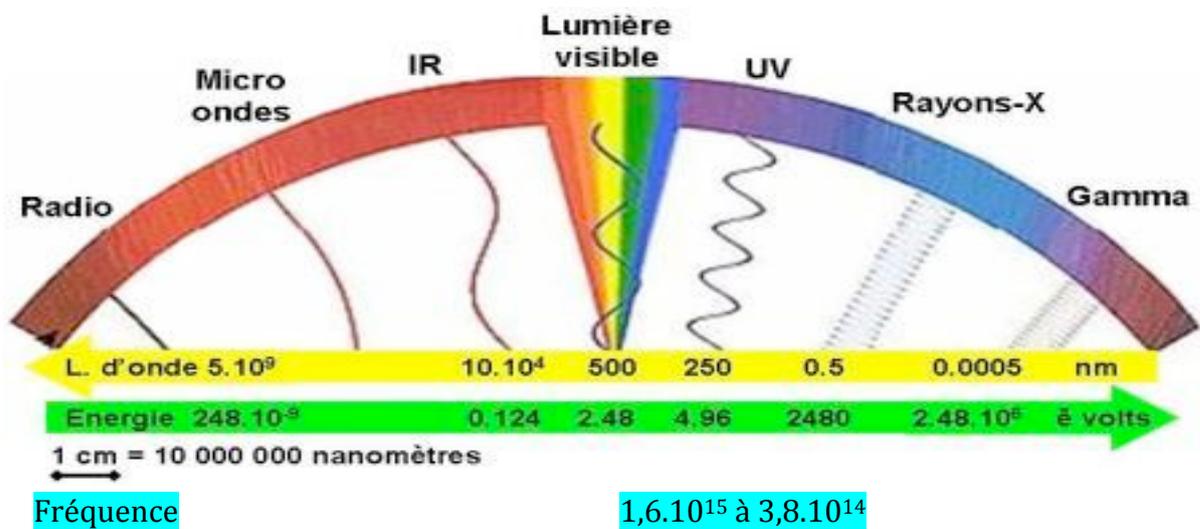
1.1 Rappels sur le rayonnement UV-Visible :

- Les ondes électromagnétiques **visibles** ont une longueur d'onde qui s'étant de **400 à 800nm**
- Les ondes **UV** s' étendent de **200à 400 nm.**



- Ces rayons électromagnétiques transportent une énergie E exprimée par la relation suivante :

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$



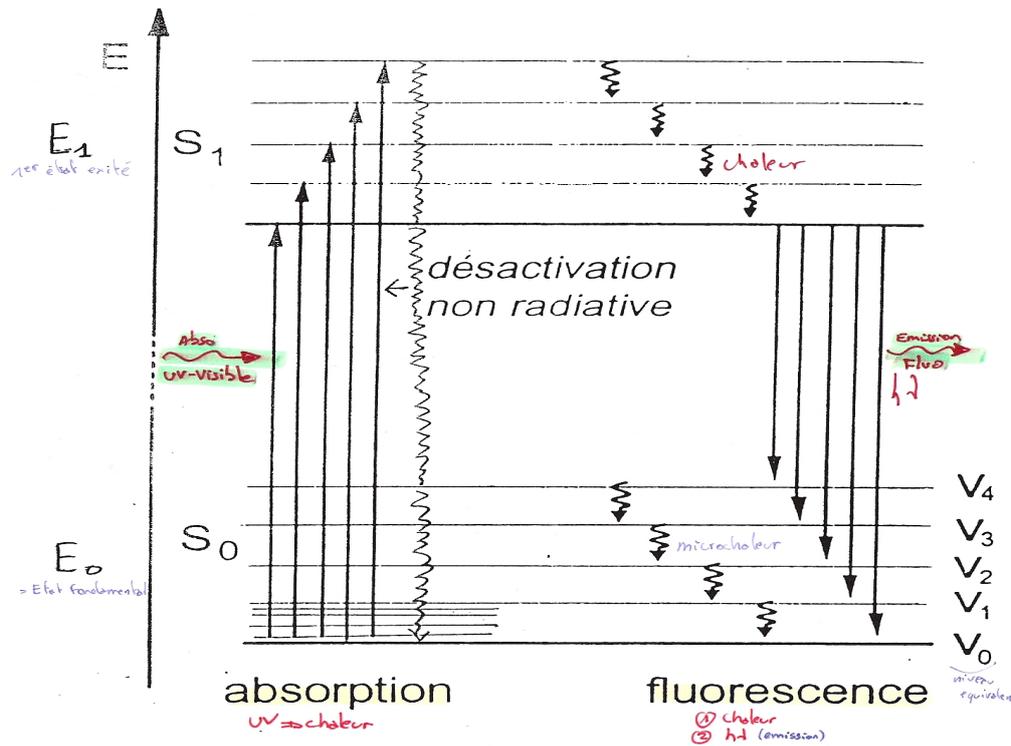
- Ces énergies correspondent aux énergies de **transition électronique** de molécules → à T° ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamental, plusieurs états de vibrations peuvent être occupés conformément à la répartition de Boltzman.

1.2 Principe de l'absorption UV-visible :

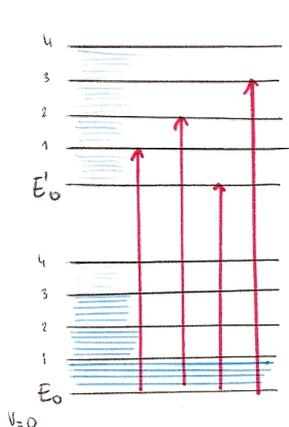
- La spectrométrie d'absorption moléculaire (SAM) étudie les variations des transitions électroniques résultant d'une absorption photonique par des molécules absorbantes. Ce sont les transitions électroniques des électrons de liaisons (couche de valence) qui permettent de caractériser une molécule (et non les atomes qui la constituent).
- Certaines molécules vont avoir la propriété de pouvoir absorber un rayonnement électromagnétique, dont la longueur d'onde s'étend de 200 nm à 800 nm, et entraîner un changement de leur états de vibration ou de rotation électroniques.
 - Absorption grâce à des groupements chromophores (système conjugué $(\pi-\sigma-\pi)$ / électrons délocalisés)
 - Certains groupements n'ont pas de système conjugués, mais modifient le spectre UV lorsqu'il sont lié à une gpt chromophore → Gpt auxochrome (-OH, -OCH₃, -NH₂...)
- Lorsque qu'une molécule absorbe un photon d'énergie, les électrons vont passer de l'état fondamental E₀ à l'état excité E₁ (instable). Il y a ensuite retour à l'état E₀ avec émission de microchaleur et non de photons lumineux (Fluorescence).

NB :

- Cette absorption n'est possible que si cette énergie correspond à une transition électronique à la molécule → Utilisation d'un faisceau monochromatique.



MECANISME DE L'ABSORPTION UV
ET DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE



— : niveaux de vibrat°
— : niveaux de rotat°
— : niveaux électronique

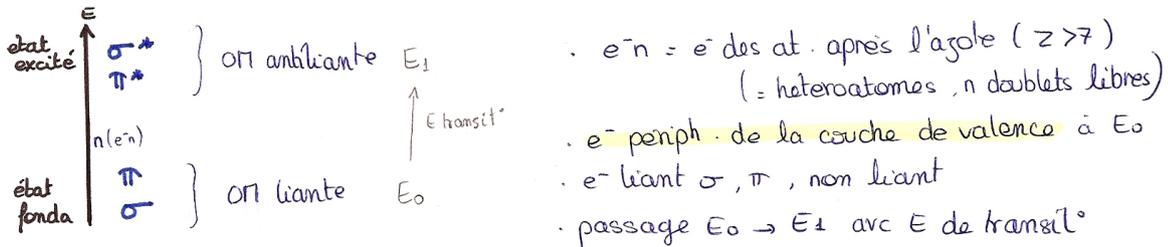
- nivx électronique : les écarts d'E entre ces niveaux st de l'ordre de qlq eV, conduisant à des absorpt° ds l'UV-Vis, comme pr les atomes.
- nivx de vibrat° : qlq dixièmes d'eV et absorpt° ds domaine IR moyen.
- nivx de rotat° : qlq millièmes d'eV, IR lointain

2 Aspect qualitatif

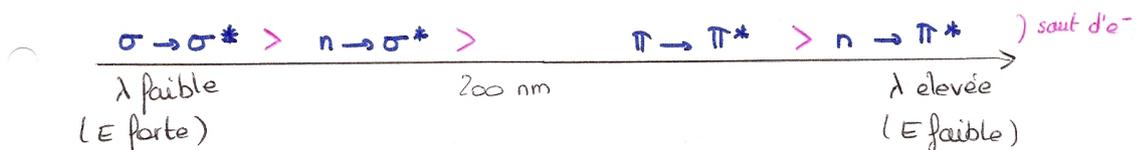
2.1 Transitions électroniques :

2) Transit° concernées :

↳ transit° d'e⁻ entre orbitales molécule. (.:OM)



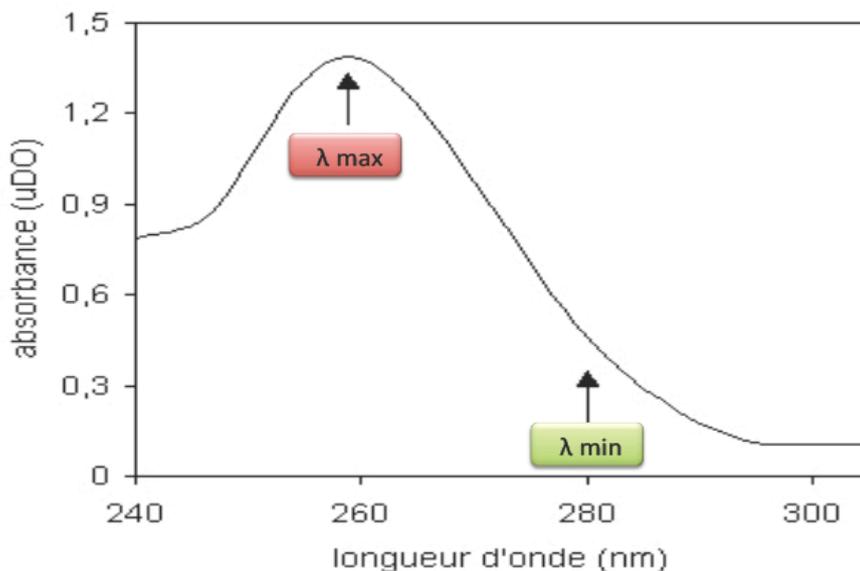
Transit° observées : $\sigma > \sigma^*$ et $\pi > \pi^*$ \Rightarrow forte intensité
 $n > \sigma^*$ et $n > \pi^*$ \Rightarrow fble intensité



Rmq : transit° $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$: les \oplus ut. en spectro UV-Vis.
 (correspondent au domaine de λ visible)

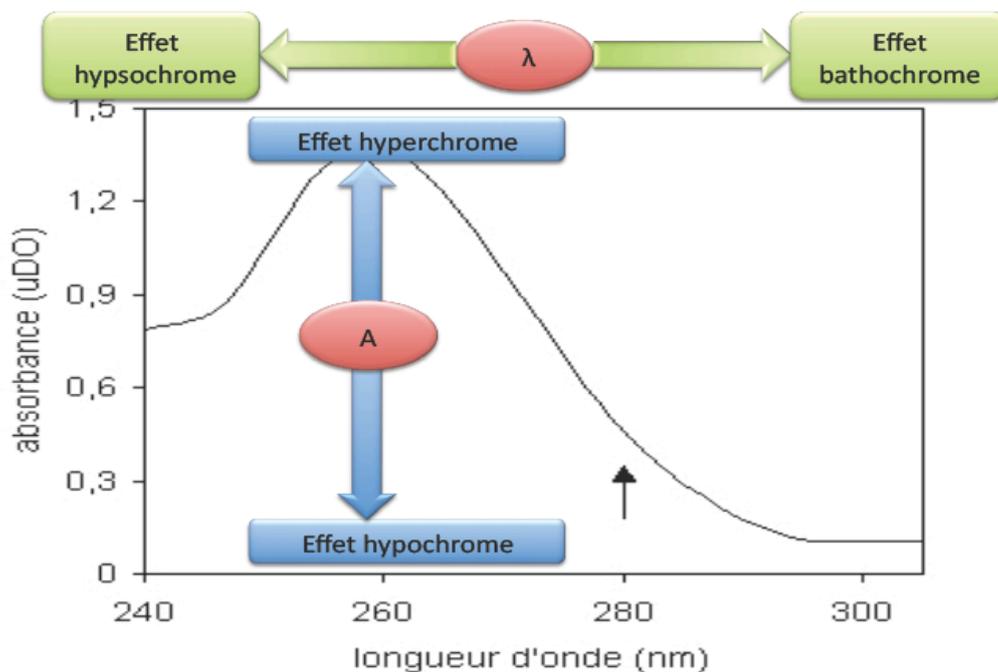
2.2 Le spectre UV-visible

- Représente l'intensité de l'absorption à différentes longueur d'ondes $A=f(\lambda)$
- C'est un spectre de bandes (/molécules) caractérisé par un maximum d'absorption (λ_{max}) et un minimum d'absorption (λ_{min})
- Pour un dosage quantitatif, on se placera à λ_{max}



2.3 Influence du solvant

- Le solvant influence à la fois **la position** des bandes d'absorption, leur **intensité** et leur **forme**, par sa **polarité** et son **pH**.
- **Influence de la polarité :**
 - Si solvant polaire (interaction soluté/solvant) → Elargissement des bandes
 - Si solvant apolaire → Retrecissement des bandes
- **Influence du pH :** ionisation du chromophore → Variations des bandes
- Un bon solvant ne doit pas absorber (interférences) à la longueur d'étude
 - Exemple de bon solvant : **Methanol**, Hexane (UV)
- Un solvant peut modifier l'absorbance ou la longueur du spectre, on parlera des termes suivants :



- **Le milieu peut influencer la mesure :**
 - / modification du signal mesuré → **Effet de matrice**
 - / présence de **substances absorbantes parasites** qui sont mesurés simultanément

NB :

- Les spectres de bandes des gaz sont plus larges que ceux des liquides → meilleure identification des gaz (analyse qualitative) , dosage pour les liquides (analyse quantitative).

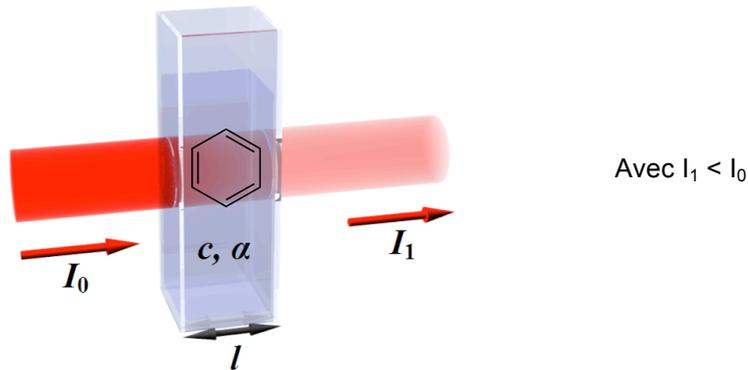
2.4 Interet analytique des spectres d'absorption UV-visible

- **Identification seulement de groupes fonctionnels** et pas vraiment de molécules.
 - Ex : Spectre de l'acétaldéhyde et du propionaldéhyde quasi identiques
- L'identification formelle sera réservée à d'autres techniques (RMN, SM, IR)
- Néanmoins, on peut affirmer la **non identité** de 2 composés si les spectres sont différents.
- Mais apporte des renseignements précieux, notamment au niveau de **l'isomérie/ tautomérie**.

3 Aspect quantitatif

3.1 Loi de l'absorption

- Lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmet (émergent) présente une intensité I inférieure à $I_0 \rightarrow$ Il y a eu **absorption** énergétique (=photons) par les molécules en solutions.



- Ce phénomène d'absorption est évalué par le rapport :

	$I/I_0 =$ Transmission (T) (exprimée en %)
	$\text{Log}(T) = \text{log}(I/I_0) =$ Absorbance (A)
Loi de BEER LAMBERT	$\rightarrow I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$
Loi de l'additivité des A	$\rightarrow A = A_1 + A_2 + \dots$

Loi de BEER LAMBERT

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

➤ **Avec :**

- A = Absorbance (sans unité)
- c = concentration de la solution absorbante (en M ou en g%)
- ϵ = Coefficient d'extinction **moléculaire** si c en **mol/L** (M)
= Coefficient d'extinction **spécifique** si c en **g/100mL** (g%)
 \rightarrow On le note alors $A_{1\%}^{1\text{cm}}$
- l = largeur de la cuve en cm (généralement = 1cm)

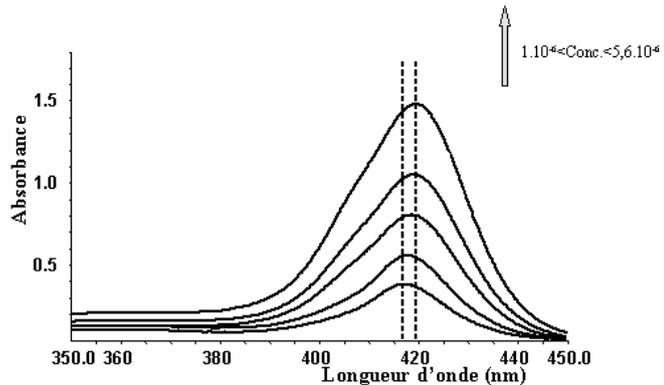
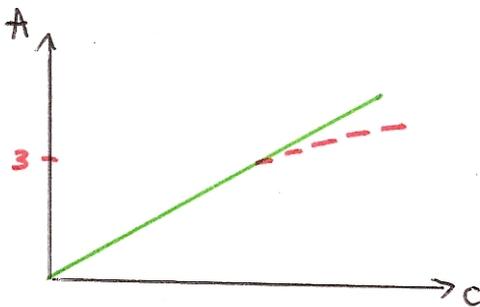
ϵ varie en fct de la T° , λ et du solvant
 \rightarrow Il peut être identique à 2 λ différentes

A est indépendant de I_0 et de l'appareillage

3.2 Validité de la loi

3.2.1 Domaine d'application de la loi / condition de proportionnalité

- **La loi de Beer-Lambert est linéaire si :**
 - La solution est diluée et de concentration fixe.
 - ϵ est constant \rightarrow Lumière monochromatique (λ constante) (/bande passante)
 - l sont constante \rightarrow Faisceau perpendiculaire à la cuve
 - La solution est transparente
 - La solution est non fluorescente
 - La solution est stable du point de vue photo chimique
 - Pas de réaction avec le solvant
- Dans les autres cas la relation $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ ne s'applique plus (non proportionnel)

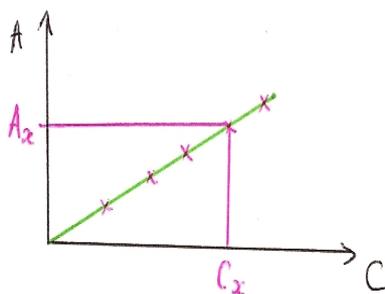


3.2.3 Condition sur le signal

- I_0 doit traverser la cuve $\rightarrow I_0$ doit être absorbé uniquement par les molécules à doser
- I_0 doit être formé uniquement de photons absorbables (/ lumière parasite \rightarrow Baisse de A)

3.3 Application à l'analyse quantitative : le dosage

- L'absorption du rayonnement UV-visible par les molécules, permet de mesurer la concentration de ces espèces présentes dans le trajet optique
- On ne mesure pas directement la concentration, mais on procède à un étalonnage en utilisant des mélanges étalons de concentrations connues.

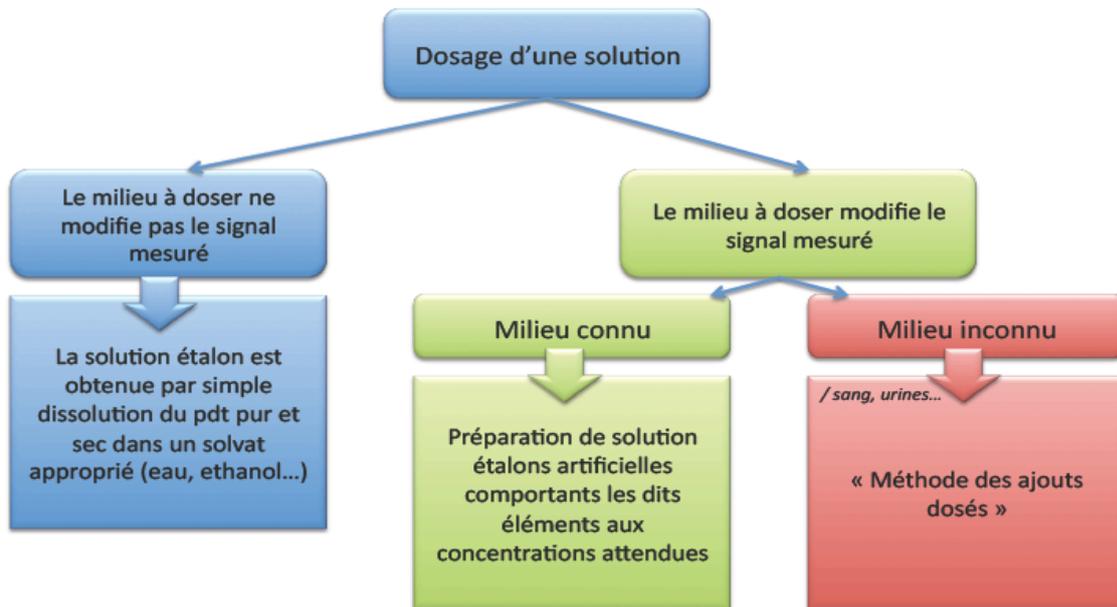


analyse quantitative = au max d'absorpt' (λ_{max})

zone d'absorbance optimale : 0,5 à 0,9 UA.

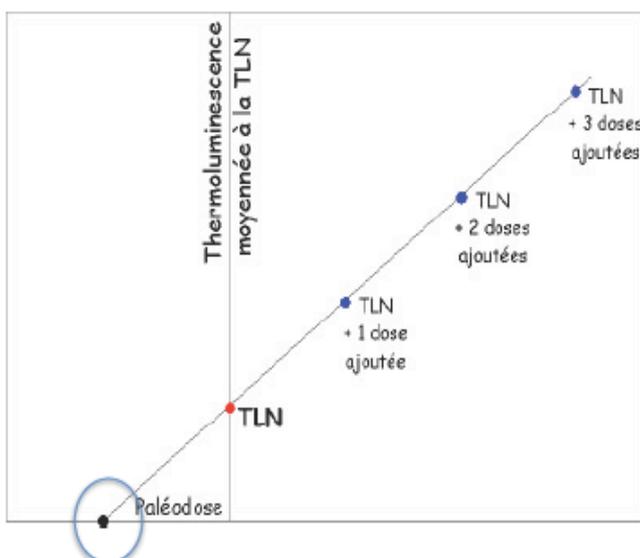
3.3.1 L'étalonnage

- Pour tout dosage, le procédé d'étalonnage doit essentiellement tenir compte de « l'effet de matrice » potentiel du milieu à doser



Méthodes des ajouts dosés

- Ajout d'un **volume constant** de **solution à doser** dans tous les tubes d'étalonnage
- Ajout de **quantités croissantes** d'un **étalon** de soluté à doser.
- Le volume final doit être constant dans tous les tubes.
- La concentration de l'échantillon à doser est déterminée en traçant la droite de même pente passant par l'origine



- Permet de corriger les effets de matrice dans le cas des milieux complexes.

- Ne corrige pas les interférences spectrales !

3.3.2 Le choix de la longueur d'onde

- On mesure l'absorption en se plaçant à la longueur d'onde d'absorption maximale (λ max), de la molécule à doser, car :
 - Au λ max, l'absorbance mesurée est la plus grande puisque ϵ est maximum → méthode **plus sensible**
 - Au λ max, ϵ est le plus constant sur un petit domaine de longueur d'onde → La lumière est plus monochromatique → **Linéarité optimum.**

NB : limite de linéarité

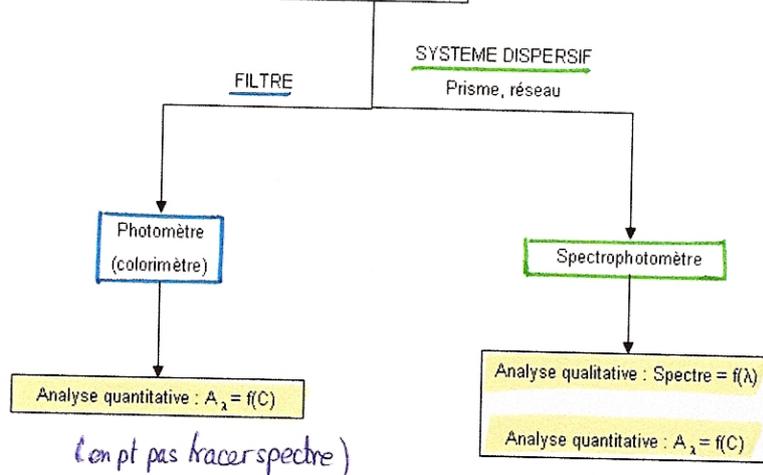
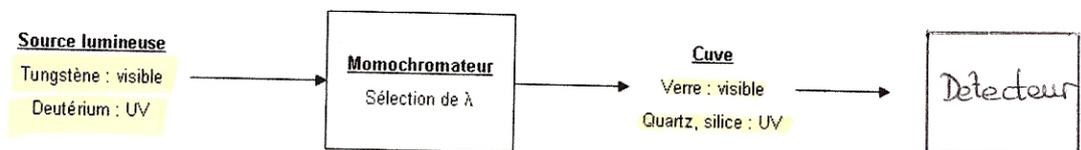
3.3.3 Espèces dosables

- **Composés organiques :**
 - Avec doubles liaisons saturées, gpt chromophore → -C=O, -NO, N=N, aromatiques
 - Saturés avec hétéroatomes à électrons de valence → N, O, S, X
- **Composés minéraux :**
 - Ions et complexes des 2 premières séries de transition → $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, Cu^{2+} , Co^{2+}
- **Complexe colorés** → Sulfocyanure de fer

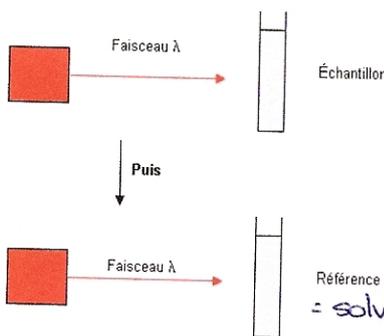
4 Appareillage

4.1 Différents composants

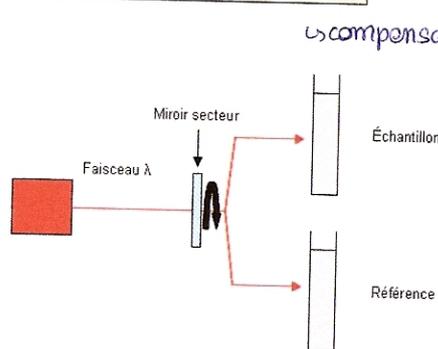
- **Source de lumière monochromatique :**
 - Visible : Lampe à incandescence à Tungstène et iode
 - UV : Lampe à arc à Deutérium ou à Xenon , ou mercure
- **Monochromateur (sélection de la longueur d'onde) :**
 - Prisme
 - Réseau
- **Cuve :**
 - Visible : Verre
 - UV : Quartz = silice
- **Détecteur** = Photomultiplicateur ou photopiles
- **Appareil de mesure = galvanomètre ou enregistreur graphique (+/- amplificateur)**



Spectrophotomètre SIMPLE FAISCEAU



Spectrophotomètre DOUBLE FAISCEAU



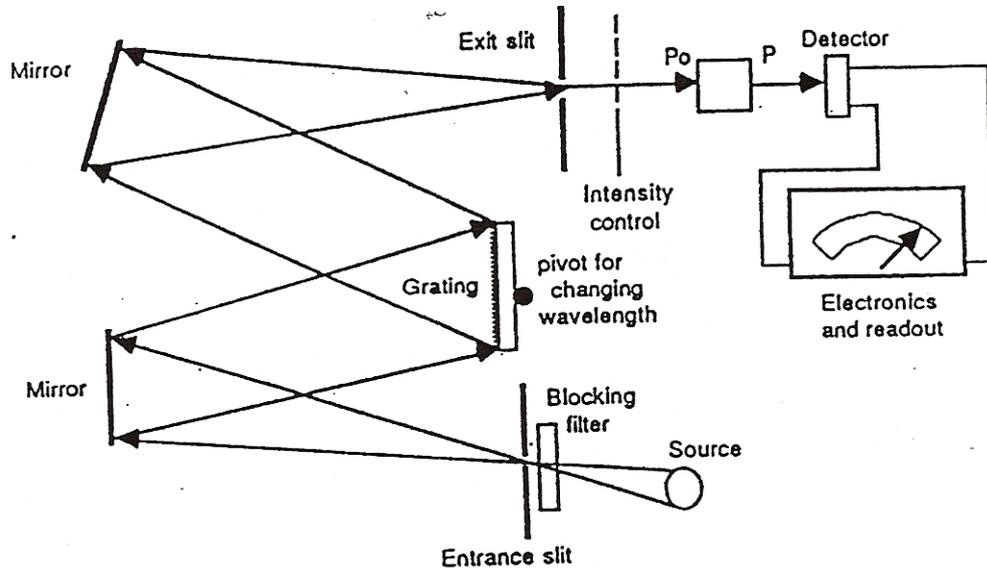
↳ compensat' automatiq du solvant

0 abs. (100% T)

4.2 Différents types de spectrophotomètres :

➤ Spectrophotométrie simple faisceau

- Nécessite une mesure d'absorbance pour le blanc et une pour l'étalon



Spectrophotomètre à réseau simple faisceau

➤ Spectrophotométrie double faisceau

- Compensation automatique du solvant = blanc automatique
- Equipé d'un miroir tournant et d'un miroir semi-argenté qui permettent une lecture simultanée de la cuve blanc + étalon par le détecteur

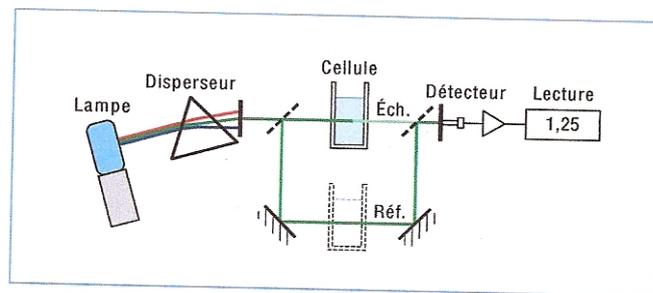
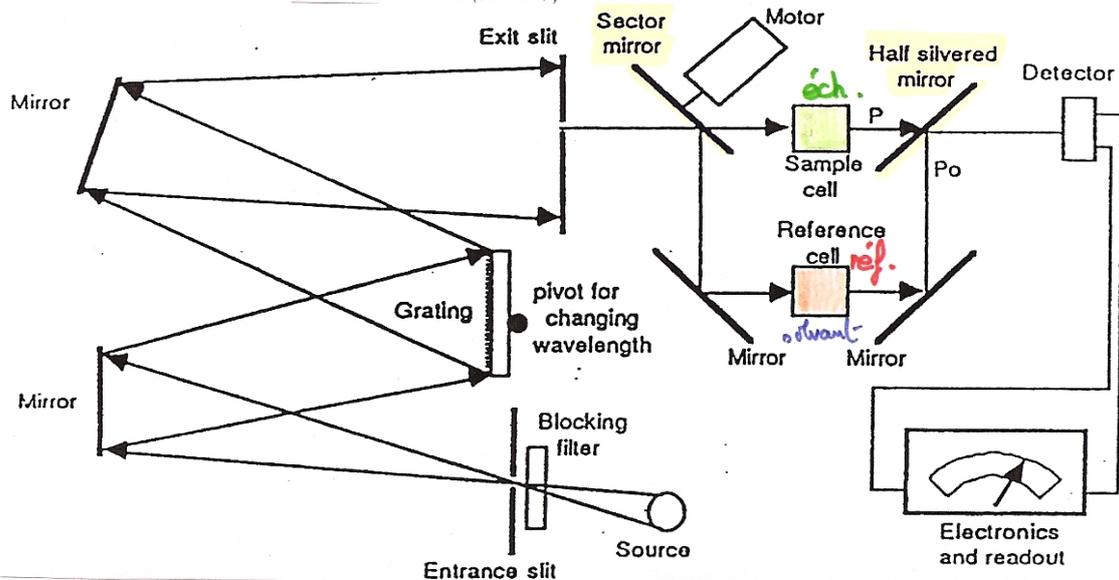
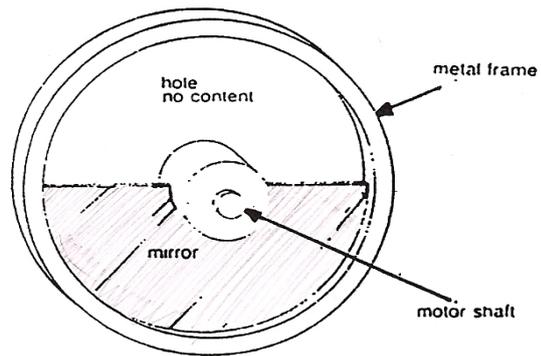
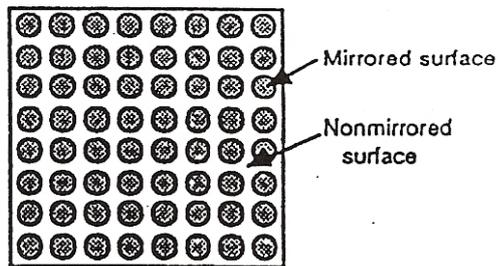


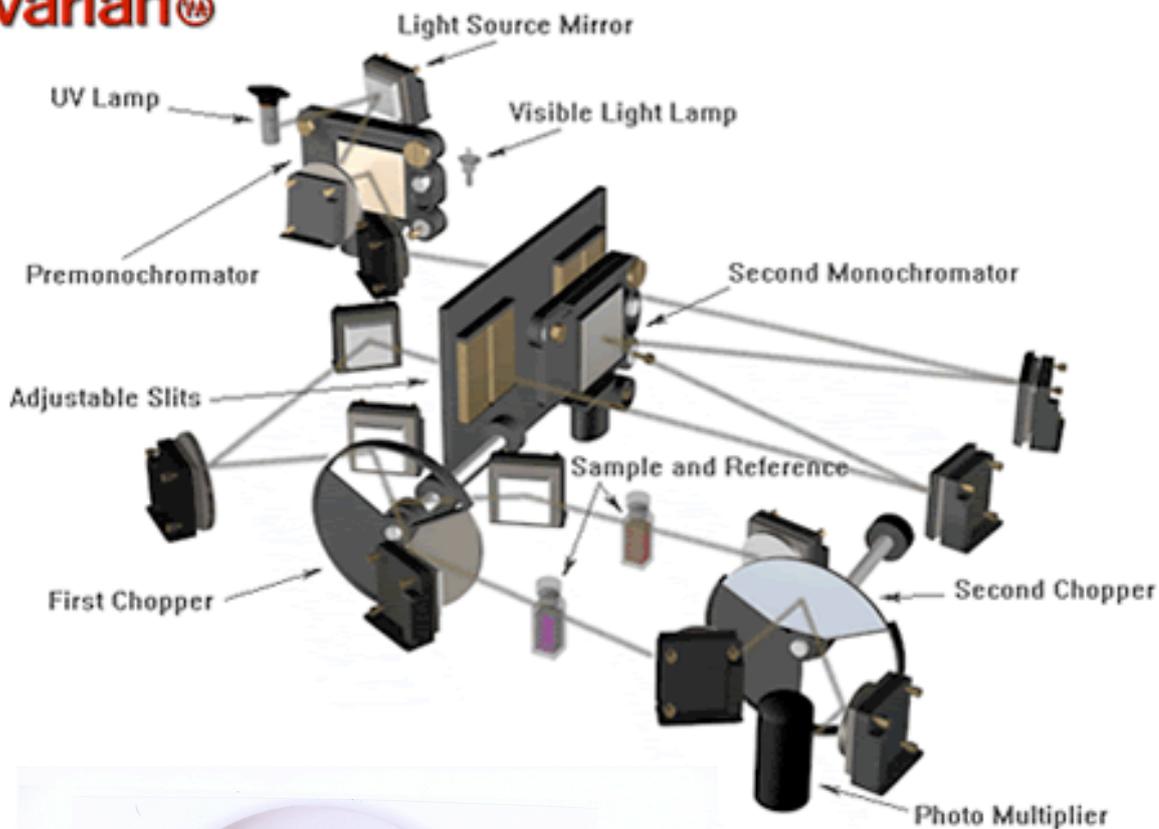
Figure 8 - Schéma de principe du spectrophotomètre à double faisceau (doc. Oriel)





Miroir secteur

varian®



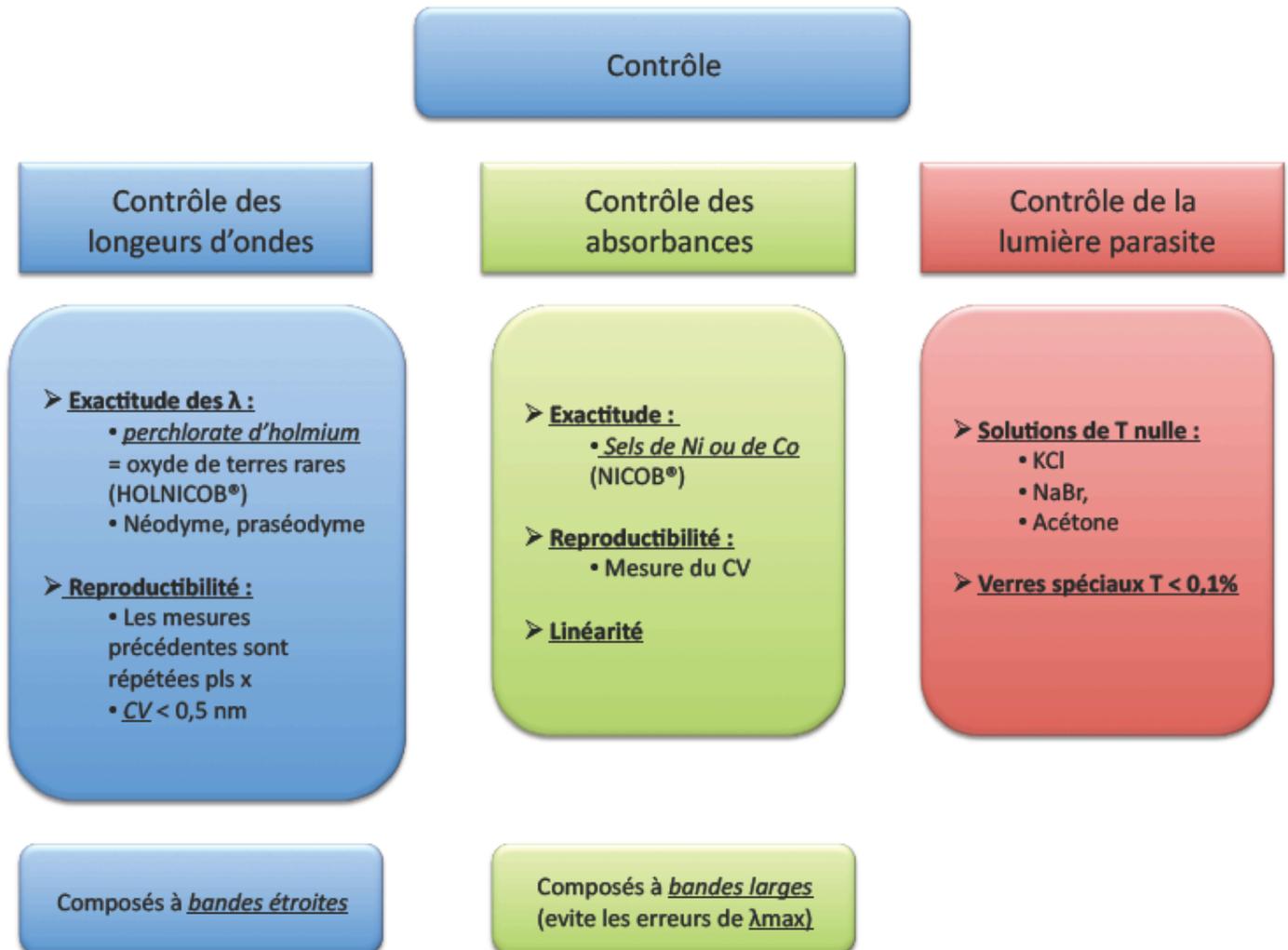
5 Sources d'erreurs

5.1 Erreur liées au monochromateur

5.2 Erreurs liées au système de détection (Rc-appareil de mesure)

6 Contrôle des spectrophotomètres (λ , A, $h\nu$)

- Les spectrophotomètres doivent être testés **lors de leur mise en route**, mais également **régulièrement** pdt les années d'utilisation.



7 Conclusion

- La spectrophotométrie est une technique plutôt adaptée à l'**analyse quantitative** (dosage) des composés absorbants dans l'UV-visible / chromophore.
- L'analyse qualitative est possible, mais il est difficile de différencier 2 composés dont la structure chimique est proche.