

La spectrophotométrie

1- Définition

La **spectrophotométrie** est une méthode analytique **quantitative** qui consiste à mesurer l'**absorbance** ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

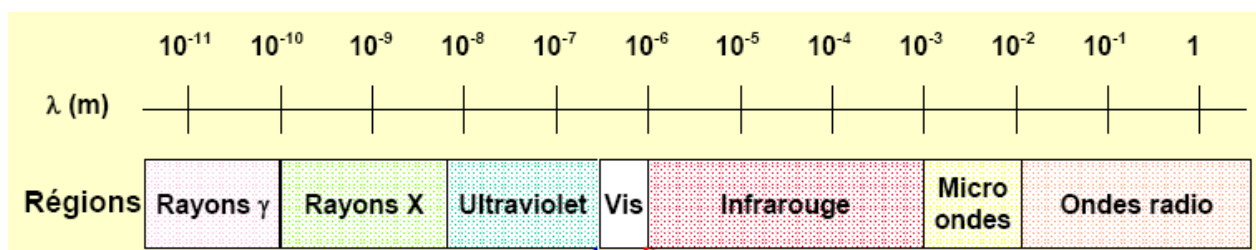
L'**absorbance** mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. On utilise aussi les termes **densité optique**, **opacité** ou d'**extinction** selon les domaines.

Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). Le domaine du visible et de l'UV a été abondamment étudié, et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison chimique, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l'analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un **spectrophotomètre** préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

2- Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique est la description de l'ensemble des rayonnements électromagnétiques classés par fréquence, longueur d'onde. Le spectre électromagnétique s'étend théoriquement de zéro à l'infini en fréquence (ou en longueur d'onde), de façon continue. On le divise en plusieurs grandes classes de rayonnement, qui s'étudient par des moyens particuliers à chacune d'entre elles.



2-1- Décomposition de la lumière blanche (visible)

La lumière blanche est composée d'une infinité de couleurs, comme nous pouvons le voir au quotidien en observant un arc-en-ciel.

La lumière blanche résulte de la superposition des radiations monochromatiques de longueur d'onde dans le vide comprise entre 400 et 800 nm. C'est une radiation polychromatique (à la différence de la lumière laser, par exemple).

2-2- Le rayonnement ultraviolet (UV)

Les UV, également appelé lumière noire, parce qu'il n'est pas visible à l'œil nu, est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible, mais plus longue que celle des rayons X (**190 à 400 nm**). Il ne peut être observé qu'indirectement, soit par fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés.

3- Domaine UV-visible de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est l'étude quantitative des interactions entre la lumière et la matière. Lorsque de la lumière traverse une substance, elle est en partie **transmise** et en partie **absorbée**.

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet. Les infrarouges ne sont pas utilisés en spectrophotométrie, car ils dépendent surtout de la température de la solution et non de sa concentration, ils sont plutôt couverts par **la spectroscopie en infrarouge**.

4- Principe

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'**absorbance** de la solution comme le logarithme décimal du rapport entre l'intensité énergétique I_0 à une longueur d'onde donnée, avant traversée du milieu, et l'intensité énergétique transmise I

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right).$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

4-1- loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert est une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse. La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique. Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

- A_{λ} est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde λ ;
- c (en mol.L⁻¹) est la concentration de l'espèce absorbante ;
- l (en cm) est la longueur du trajet optique ;
- ε_{λ} (en mol⁻¹.L.cm-1) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Ce coefficient dépend de :

- la nature de la substance
- la longueur d'onde λ de la lumière
- la nature du solvant
- la température.

La loi de Beer-Lambert est additive (mais non la transmittance).

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\varepsilon_{\lambda,i}, l = 1\text{cm}, c_i) = \varepsilon_{\lambda,1} c_1 + \varepsilon_{\lambda,2} c_2 + \dots + \varepsilon_{\lambda,n} c_n$$

4-2- Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert

- la lumière utilisée est monochromatique
- la concentration n'est pas trop élevée : $c \approx 10^{-2}$ mol.L⁻¹
- la solution n'est pas fluorescente : pas de réémission de lumière dans toutes les directions
- la dilution n'entraîne pas un déplacement de l'équilibre chimique :
 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (orange) + $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{HCrO}_4^-$ (incolore en milieu acide)
- la solution doit être limpide (pas de précipité ou de trouble qui entraîneraient une diffusion de la lumière)

5- Spectrophotomètre

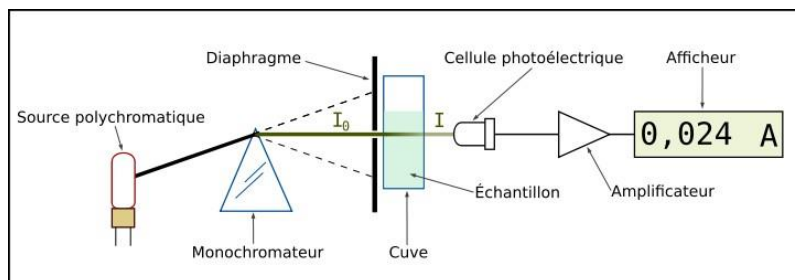


Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau

Un **spectrophotomètre** mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée **une absorbance** à une longueur d'onde donnée, ou pour produire **un spectre d'absorbance**. Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies par l'opérateur.

Un spectrophotomètre U.V./visible comprend 4 parties essentielles.

➤ La source lumineuse : elle est constituée par :

- Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine des UV
- Une lampe à filament de tungstène pour le domaine visible
- Une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Elle fonctionne sous forme de flash, juste au moment de faire une mesure.

➤ La cuve :

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La longueur de la cuve est définie (1, 2, 4 ou 5 cm de trajet optique). Elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV, les cuves sont en quartz, elles ne peuvent être ni en verre ni en plastique.

6- Applications

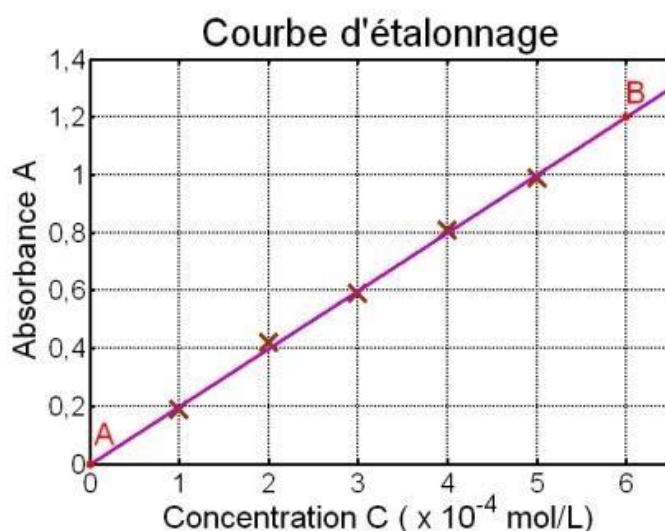
Détermination d'une concentration inconnue.

Suivi de la cinétique d'une réaction chimique.

Colorimétrie (connaître la couleur de l'échantillon).

6-1- Détermination d'une concentration inconnue

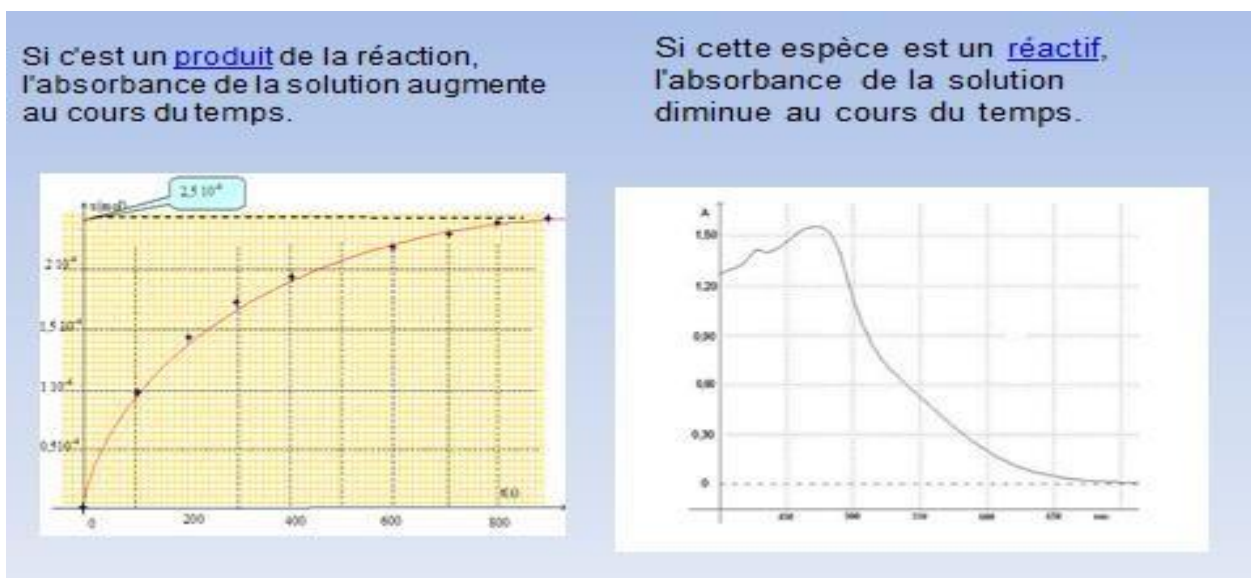
Connaissant le spectre d'absorption d'une espèce chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde λ_{max} , les variations de l'intensité I d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur l de solutions de concentrations diverses. Ceci permet d'établir expérimentalement la courbe $A = f(c)$ reliant l'absorbance et la concentration de la substance étudiée (avec $l = 1\text{cm}$), en effectuant les mesures de A pour diverses concentrations. Cette courbe est une **courbe d'étalonnage**.



La courbe expérimentale d'étalonnage permet ensuite de déterminer la concentration inconnue d'une solution de cette substance par simple mesure de son absorbance et report sur le graphe $A = f(c)$.

6-2- Suivi de la cinétique d'une réaction chimique

Lorsqu'au cours d'une réaction chimique dont on veut étudier la cinétique de l'une des espèces chimique en solution, on peut par spectrophotométrie d'absorption suivre la concentration de cette espèce. Si cette espèce est un réactif, l'absorbance de la solution diminue au cours du temps. Si au contraire, c'est un produit de la réaction, l'absorbance de la solution augmente au cours du temps.

6-3- Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN➤ **Détermination de la pureté :**

260 nm et 280 nm sont respectivement les longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines. Le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm est utilisé pour s'assurer de la pureté d'ADN de tout contaminant d'ADN soit protéine ou ARN.

- Ce rapport (DO_{260}/DO_{280}) doit être compris entre 1.6 et 2 pour que l'ADN soit suffisamment pur
- Si ce rapport est supérieur à 2 ($DO_{260}/DO_{280} > 2$) cela veut dire que l'ADN est contaminé par les ARN
- Si ce rapport est inférieur à 1.6 ($DO_{260}/DO_{280} < 1.6$), cela veut dire que l'ADN est contaminé par les protéines.

➤ **Détermination de la concentration :**

À 260 nm une unité de densité optique correspond à 50 µg / ml pour une solution d'ADN double brin. On mesure à 260 nm la DO d'une dilution d'ADN et on déduit la concentration d'ADN grâce au calcul suivant :

$$[C] (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{facteur de dilution} \times DO_{260} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Le facteur de dilution est égal à : Vol total / vol d'ADN