

II. LE SPECTROPHOTOMÈTRE

1. Définition

Le spectrophotomètre est un instrument essentiel utilisé pour mesurer l'intensité de la lumière absorbée par un échantillon. Cette mesure permet de déterminer la concentration des solutés dans une solution.

2. Applications biotechnologiques : utilisé dans la quantification de l'ADN, de l'ARN et des protéines.

3. Instrumentation du spectrophotomètre

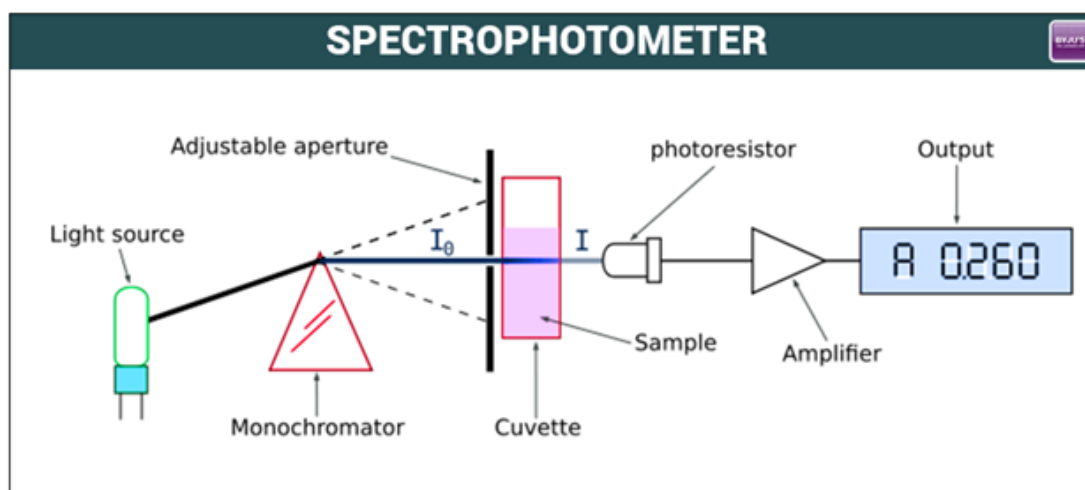


Fig. 1 : Spectrophotomètre Instrumentation. <https://cdn1.byjus.com/wp-content/uploads/2018/11/chemistry/2017/01/20060501/Spectrophotometer-Principle.png>

Un spectrophotomètre est composé de deux instruments :

- Spectromètre : il sert à produire de la lumière de n'importe quelle longueur d'onde
- Photomètre : il sert à mesurer l'intensité de la lumière

Le spectrophotomètre est conçu de manière à ce que le liquide ou l'échantillon soit placé entre le spectromètre et le photomètre. Le photomètre mesure la quantité de lumière qui traverse l'échantillon et transmet un signal de tension à l'écran. Si l'absorption de la lumière change, le signal de tension change également. Les spectrophotomètres sont disponibles dans une grande variété de formes et de tailles et ont des utilisations multiples. Les différents types de spectrophotomètres disponibles sont tous différents les uns des autres, en fonction de leur

application et des fonctionnalités souhaitées. Les spectrophotomètres les plus populaires sont ceux à 45 degrés, sphériques et multi-angles.

spectrophotomètres. Un autre concept étroitement lié est celui de la spectroscopie, qui mesure simplement l'absorption de la lumière provenant de sa source ainsi que l'intensité de la lumière.

L'instrument spectrophotomètre de base se compose d'une source lumineuse, d'un affichage numérique, d'un monochromateur, d'un secteur de longueur d'onde pour transmettre une longueur d'onde sélectionnée, d'un collimateur pour la transmission d'un faisceau lumineux droit, d'un détecteur photoélectrique et d'une cuvette pour placer un échantillon.

L'intensité de la lumière est symbolisée par I_0 , qui mesure le nombre de photons par seconde. Lorsque la lumière traverse la solution témoin, elle n'absorbe pas la lumière et est symbolisée par I . D'autres facteurs importants sont l'absorbance (A) et la transmittance (T).

- Lorsqu'une longueur d'onde monochromatique I_0 traverse une solution absorbante de concentration C_1 contenue dans un récipient d'épaisseur L_1 . Notez qu'une partie de ce rayonnement est absorbée par l'échantillon et une autre partie est transmise (I_1).
- Lorsqu'une longueur d'onde monochromatique I_0 traverse une solution absorbante de concentration élevée C_2 ($C_2 > C_1$) contenue dans un récipient d'épaisseur L_1 . Notez qu'une partie de ce rayonnement est absorbée par l'échantillon et une autre partie est transmise (I_2) ou ($I_1 > I_2$).
- Lorsqu'une longueur d'onde monochromatique I_0 traverse une solution absorbante de concentration élevée C_2 contenue dans une cuvette d'épaisseur L_2 (ou $L_2 > L_1$). Notez qu'une partie de ce rayonnement est absorbée par l'échantillon et une autre partie est transmise (I_3) ou ($I_2 > I_3$).

Nous pouvons voir que la quantité d'absorbant est liée à la concentration de la solution et à l'épaisseur de la cellule.

- Transmission $T = I/I_0$
- Transmittance = $T\%$
- Absorbance $A = -\log T$

$$A = -\log (I/I_0) = \log (I_0/I)$$

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l C$$

ϵ = coefficient d'extinction molaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹) ou absorptivité molaire (ou coefficient d'absorption) ; il s'agit d'une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée.

C = concentration et l = longueur de la cuvette.

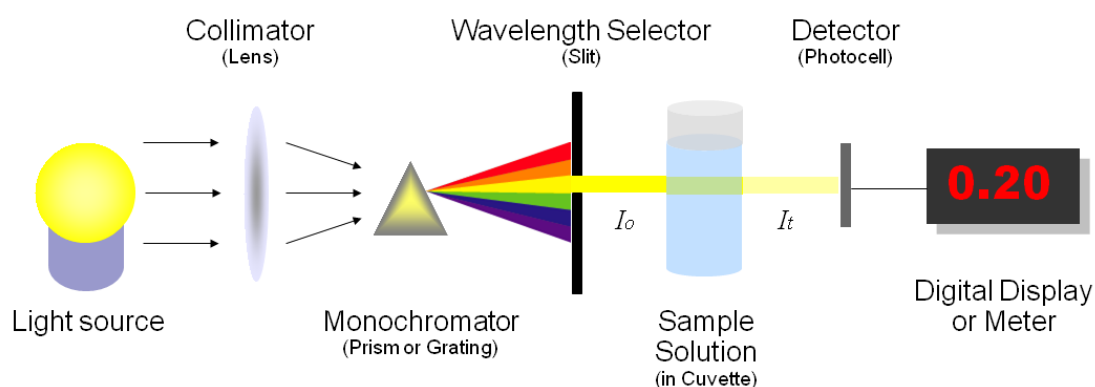


Fig 2: Basic structure of spectrophotometers (CC BY-4.0; Heesung Shim via LibreTexts)
https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/8475/spectrophotometer_structure.png?revision=1&size=bestfit&width=893&height=324

4. Excitation des électrons

Lorsqu'une longueur d'onde est appliquée à une solution, les électrons absorbent l'énergie et passent de l'état fondamental à l'état excité. Pour revenir à l'état fondamental, ils émettent une longueur d'onde qui est détectée et donne un spectre appelé spectre d'absorption. Celui-ci montre l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

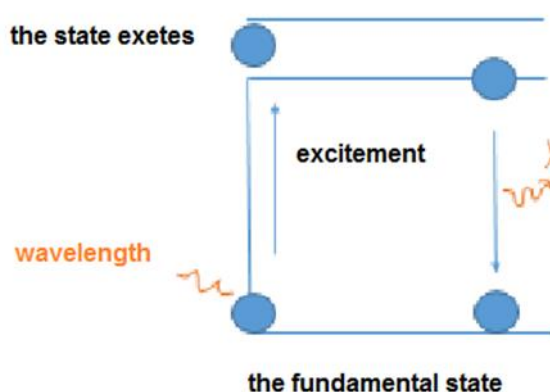


Fig 3: excitation of electrons

Un spectromètre est nécessaire pour produire une gamme de longueurs d'onde, car différents composés absorbent mieux à différentes longueurs d'onde. Par exemple, le p-nitrophénol (forme acide) présente une absorbance maximale à environ 320 nm et le p-nitrophénolate (forme basique) absorbe mieux à 400 nm, comme illustré sur la figure 4.

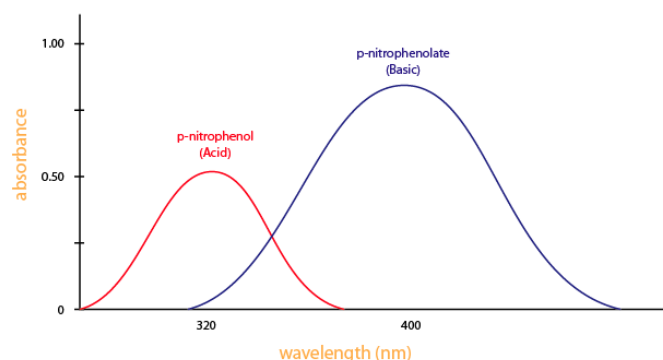


Fig 4: Absorbance of two different compounds.
<https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/8478/wave.png?revision=1>

En observant le graphique représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, on peut également constater la présence d'un point isosbestique. Un point isosbestique correspond à la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance de deux espèces ou plus est identique. L'apparition d'un point isosbestique dans une réaction démontre qu'aucun intermédiaire n'est nécessaire à la formation d'un produit à partir d'un réactif. La figure 5 illustre un exemple de point isosbestique.

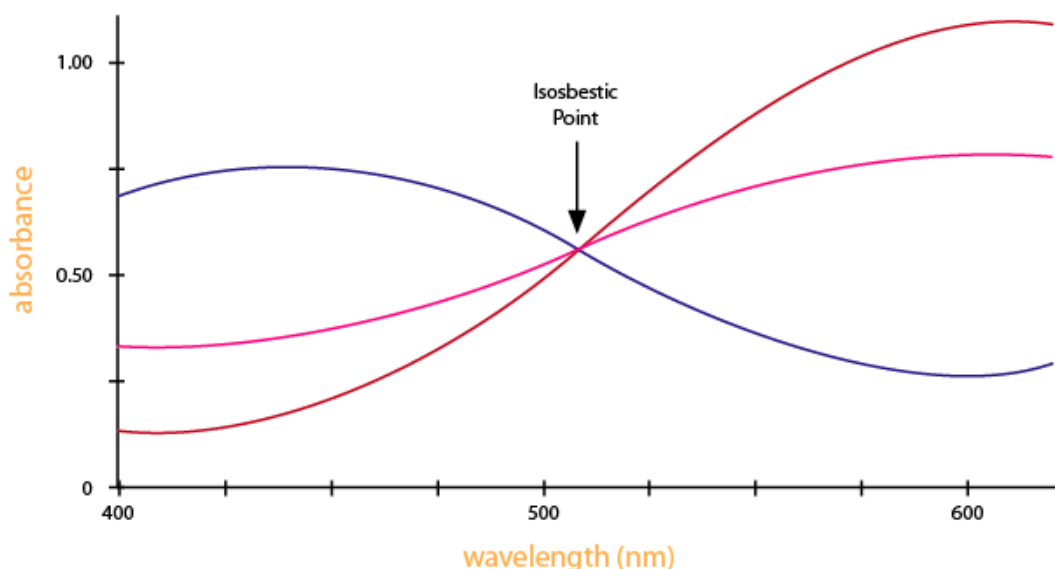


Fig. 5 : Exemple de point isosbestique (CC BY-4.0 ; Heesung Shim via LibreTexts).
<https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/8471/isopoint.png?revision=1>

4. Utilisation d'un spectrophotomètre

□ Pour déterminer l'absorbance de l'espèce colorée, il est nécessaire de réaliser au préalable un « blanc », c'est-à-dire d'enregistrer l'intensité lumineuse traversant une cuvette contenant le solvant (sans l'espèce chimique dont on souhaite mesurer l'absorbance). • Des cuves en quartz sont nécessaires pour les mesures UV, car le plastique et le verre absorbent ce rayonnement. L'eau absorbe également les UV ; il faut donc utiliser un solvant transparent aux UV comme le cyclohexane ou le dichlorométhane.

4.1. Installation des cuves

- Remplir une cuvette avec la solution à analyser ; remplir une autre cuvette identique avec le solvant de cette solution : il s'agit de la cuvette témoin.
- Ne pas toucher les surfaces d'entrée et de sortie du faisceau lumineux avec les doigts ; elles doivent être parfaitement propres.
- Insérer la cuvette de manière à ce que la face propre soit perpendiculaire au faisceau lumineux.

4.2. Spectrophotomètre connecté à un ordinateur

4.2.1. Enregistrement d'un spectre d'absorption : Passer en mode « spectre » et sélectionner l'affichage de l'absorbance.

❶ Définir les paramètres d'acquisition :

- la plage de longueurs d'onde à analyser ; si aucune information n'est disponible, choisir entre 400 nm et 800 nm ;
- le pas ; en général, choisir 1 nm.

❷ Début de l'acquisition ; Le logiciel vous demande d'insérer la cuvette vide. Insérez-la et cliquez sur OK.

L'ordinateur enregistre l'intensité de la lumière transmise pour chaque longueur d'onde dans la plage sélectionnée

❸ Remplacez la cuvette blanche par celle contenant la solution à étudier. Cliquez sur OK.

L'ordinateur enregistre l'intensité de la lumière transmise pour chaque longueur d'onde, calcule l'absorbance et affiche le spectre d'absorption.

2.2 Enregistrement de l'absorbance à une longueur d'onde donnée

Régalez l'appareil en mode « mesure d'absorbance ».

- ❶ Régalez la longueur d'onde de mesure.
- ❷ Répétez les étapes ❷ et ❸ de la section 4.2.1.

4.3 Spectrophotomètre non connecté à un ordinateur

- ❶ Régalez la longueur d'onde de mesure.
- ❷ Insérez la cuvette vide. Appuyez sur le bouton « absorbance zéro ».
- ❸ Insérez la cuvette contenant la solution à étudier. Lisez l'absorbance affichée.
- ❹ Pour tracer un spectre, répétez les trois étapes ci-dessus pour chaque longueur d'onde étudiée.

5. Bonnes pratiques d'utilisation du spectrophotomètre

- Procédez à l'étalonnage du Utilisez un spectrophotomètre à chaque analyse d'un groupe d'échantillons.
- Maintenez le couvercle du porte-échantillon fermé pendant la mesure pour garantir une lecture correcte.
- Évitez de réutiliser les cuvettes jetables.
- Utilisez uniquement des cuvettes en quartz pour les analyses inférieures à 310 nm.
- Évitez l'utilisation de seaux en plastique si des solvants organiques sont utilisés.
- Utilisez de la verrerie en borosilicate de haute qualité pour la préparation des solutions étalons. Évitez autant que possible l'utilisation de verrerie en sodium-sodium, car un contact prolongé avec les solutions étalons peut la contaminer et, par conséquent, produire des résultats erronés.
- Nettoyez soigneusement les cuvettes en verre après utilisation. Jetez celles qui présentent des rayures sur la surface polie.

- Utilisez autant que possible des réactifs de haute qualité. Les réactifs de mauvaise qualité peuvent entraîner une contamination, même à très faible concentration. Les diluants utilisés (eau ou solvants) doivent être exempts d'impuretés.
- Vérifiez que les échantillons ou les solutions étalons n'ont pas été dégazés à l'intérieur du spectrophotomètre. Cuvettes.
- Lors de l'utilisation de nouvelles procédures, tenez compte du fait que toutes les substances ne sont pas conformes à la loi de Beer-Lambert. Effectuez des tests de linéarité sur la gamme de concentrations à utiliser.

6. Maintenance d'un spectrophotomètre

Les spectrophotomètres sont généralement des appareils très spécialisés et coûteux. Leur conservation dépend largement de leur installation et de leur utilisation. L'environnement et la qualité de l'alimentation électrique sont des facteurs primordiaux pour que l'appareil fonctionne conformément aux spécifications pour lesquelles il a été fabriqué.

Les opérations de maintenance peuvent être de complexité variable, allant du simple nettoyage des composants à des procédures spécialisées, qui ne doivent être effectuées que par des techniciens ou des ingénieurs ayant reçu la formation adéquate et disposant des informations techniques fournies par le fabricant.

Il est important de noter que la maintenance préventive d'un spectrophotomètre doit respecter les procédures et les fréquences recommandées par le fabricant. Voici quelques opérations de base réalisables en laboratoire :

- Nettoyer extérieurement le spectrophotomètre, y compris les commandes, les écrans et les unités de mesure. Utiliser un chiffon doux.