

3. SPECTROPHOTOMETRIE D'ADSORPTION MOLECULAIRE

3.1. Absorption dans l'Ultra-Violet et le Visible

3.1.1. Domaine spectral et Principe

La spectroscopie d'absorption UV-VIS est l'une des méthodes d'analyses les plus utilisées. Elle permet l'analyse structurale de certaines molécules (utilisation rare), mais elle est souvent réservée aux analyses quantitatives par l'emploi de la loi de Beer-Lambert. Au fait, les composés qui ont un spectre d'absorption UV-VIS sont ceux qui peuvent absorber des photons où l'énergie correspond des longueurs d'ondes s'arrangeant dans le domaine 100nm-800nm. En revanche, le domaine 100nm-190nm (UV lointain ou UV de vide) n'est pas utilisé en analyse courante puisque l'O₂ et l'anhydride carbonique absorbent les radiations de ce domaine, et donc il nécessite des précautions d'utilisation, mesure en absence d'air.

L'absorption dans l'UV-VIS est basée sur l'interaction des photons de la source lumineuse avec les espèces d'un échantillon (ions, molécules). Ce phénomène permet aux électrons de valence des atomes et des molécules de passer d'un état fondamental (liante σ et π ou non liante n) à un état excité (anti-liante σ^* ou π^*), dont l'état fondamental représente une orbitale moléculaire occupée et l'état excité représente une orbitale moléculaire vacante. L'énergie absorbée responsable de ces transitions électroniques correspond à la différence d'énergie (ΔE) entre l'état fondamental et l'état excité (Audigié *et al.*, 1982) (Fig. 64). La modification de l'énergie électronique (E_{elec}) entraîne des perturbations de l'énergie vibrationnelle (E_{vib}) et rotationnelle (E_{rot}), avec : $E_{elec} > E_{vib} > E_{rot}$.

3.1.2. Spectre d'absorption moléculaire

Le spectrophotomètre UV/Visible permet d'obtenir le spectre d'un composé donné sous forme d'un tracé de la transmittance (T), ou de l'absorbance (A) en fonction des longueurs d'onde (Fig. 05). Au fait, un spectre UV/VIS est un diagramme qui représente l'absorption d'une radiation UV/VIS traversant l'espèce examinée en fonction de la longueur d'onde de la radiation. La longueur d'onde où le composé analysé donne un maximum d'absorbance s'appelle λ_{max} .

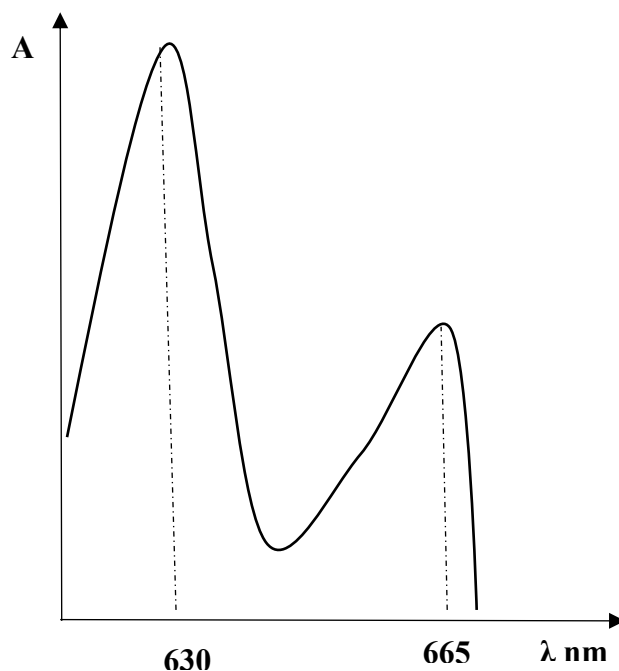


Figure 05: Spectre d'absorption moléculaire.

La quantité de la transmittance (T) et l'absorbance (A) peuvent être quantifiées à l'aide de la loi de Beer-Lambert, dont : $T = I/I_0$ et $A = -\log T = \log (I_0/I)$

- Si $I_0 = I$: milieu transparent
- Si $I = 0$: milieu opaque
- Si $I < I_0$: milieu partiellement absorbant (dans ce cas repose toutes les techniques d'analyse absorptiométrique).

3.1.3. Transitions électroniques

Dans ce paragraphes, on parle juste des transitions d'origine électronique accompagnées souvent avec celles vibrationnelles et rotationnelles.

L'absorption de la lumière UV-VIS entraîne une modification de l'énergie électronique de l'espèce qui se caractérise par le passage des électrons de l'état initiale liante à un état anti-liante plus énergétique (σ^* et π^*). Les transitions observées ont pour origine les électrons des liaisons σ ou π et les doublets non-liants n (Fig. 06). Les transitions permises sont :

- Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$: apparaît dans l'UV lointain car le déplacement d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) liante σ à une OM anti-liante σ^* demande beaucoup d'énergie (les hydrocarbures saturés qui ont ce type de liaisons sont transparents dans l'UV proche).

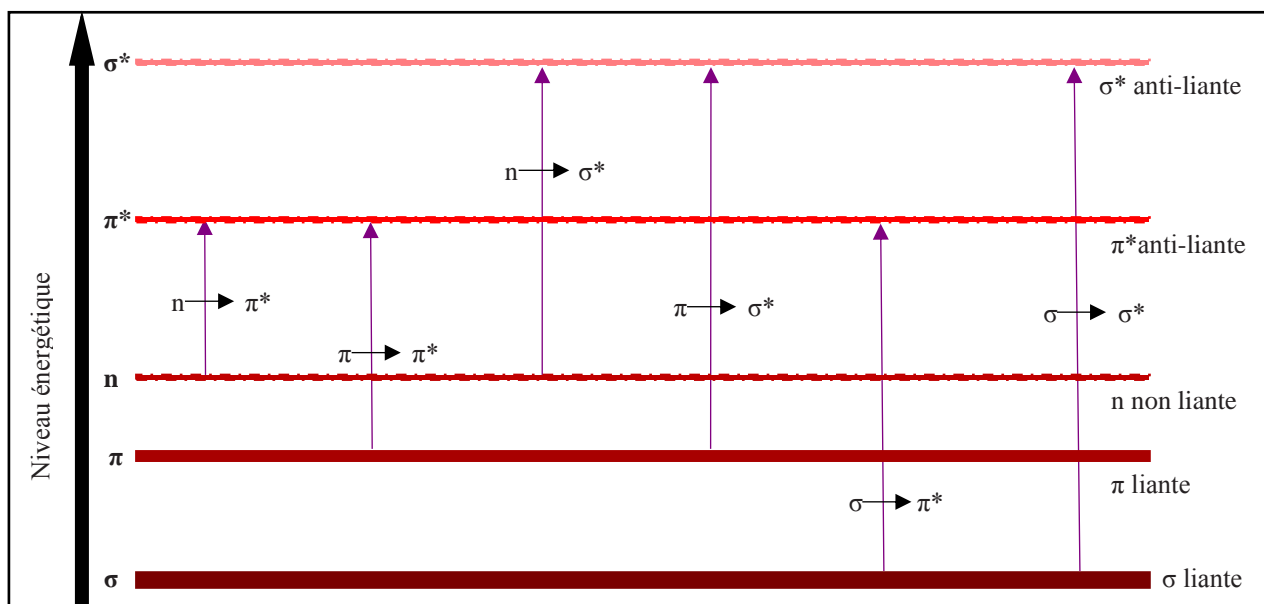


Figure 06: Représentation schématique des niveaux énergétiques.

- Transition $n \rightarrow \sigma^*$: nécessite une intensité énergétique moyenne, les électrons d'un doublet n non liant des atomes O, N, S, Cl se déplacent vers l'OM anti-liante σ^* .

- Transition $n \rightarrow \pi^*$: moins intense, causée par le passage d'un électron d'une OM non liante n à une autre anti-liante de type π^* (molécules contenant un hétéroatome avec un doublet non liant appartenant à un système insaturé, groupement carbonyle C = O).

- Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: forte intensité, résulte du déplacement d'un électron d'une OM liante π à une autre anti-liante π^* (molécules possédant de doubles liaisons).

3.1.4. Instrumentation de la spectrophotométrie UV-VISIBLE

L'appareil du spectrophotomètre contient deux parties essentielles, une optique représente la source lumineuse et le système dispersif (monochromateur) et celle responsable de la détection. En effet, le matériel optique utilisé doit être transparent dans ce domaine, le verre absorbe dans $\lambda < 350\text{nm}$ et donc remplacé par la silice fondu ou quartz. Les différents éléments sont en ordre suivant : une source de la lumière UV-VIS, une cellule de mesure, un monochromateur, un détecteur et un enregistreur du signal (Fig. 07).

- **Source lumineuse** : une *lampe à arc au deutérium* (D_2) recouvre le domaine de $\lambda < 350\text{ nm}$) et une *lampe à filament de tungstène* enveloppée de verre de silice (quartz) qui recouvre le domaine du visible, $\lambda > 350\text{ nm}$. Cette dernière peut contenir une petite quantité d'un halogène comme l'iode (*lampe à tungstène/halogène*) pour augmenter sa durée (*lampe QTH*). En outre, la *lampe à arc xénon* est aussi utilisée par les constricteur car elle recouvre le domaine $300 > \lambda > 1100\text{ nm}$. Toutes les lampes fournissent un spectre continu.

- **Monochromateur:** s'utilise pour sélectionner une longueur d'onde précise. Il constitue d'une fente d'entrée, un système dispersif et une fente de sortie qui sélectionne une seule longueur d'onde. Le système dispersif permet de décomposer la lumière émise de la source lumineuse en ses différentes radiations, il peut être un prisme, un réseau ou holographique).

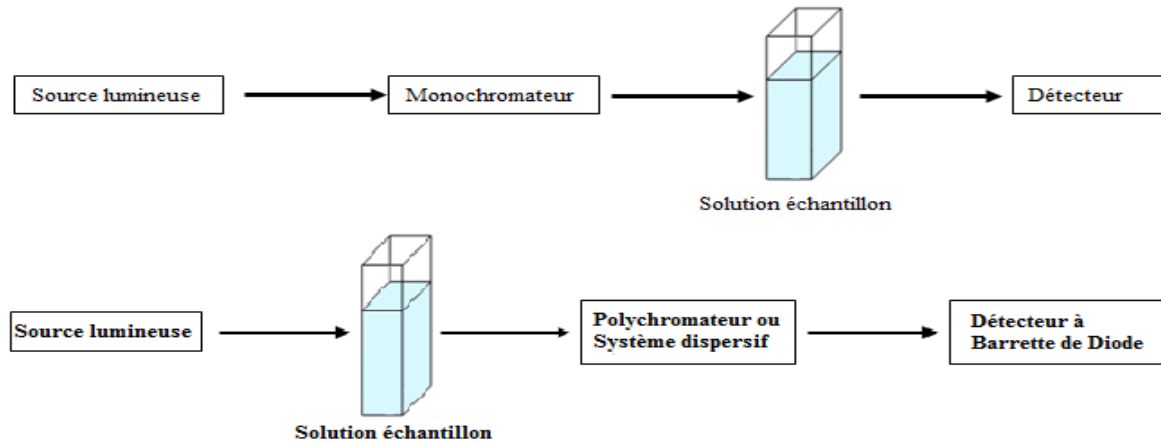


Figure 07: Instrumentation dans l'UV-Vis

- **Cellule de mesure :** tubes parallélépipédiques 'Cuvette' à base carrée de 1cm de trajet optique, dans lequel se trouve l'échantillon. Elle peut être en plastique (milieu aqueux) ou en verre (milieu aqueux et organique) qui s'utilise dans le visible. Les cuves en quartz sont destinées aux utilisations dans l'UV (Fig. 08).

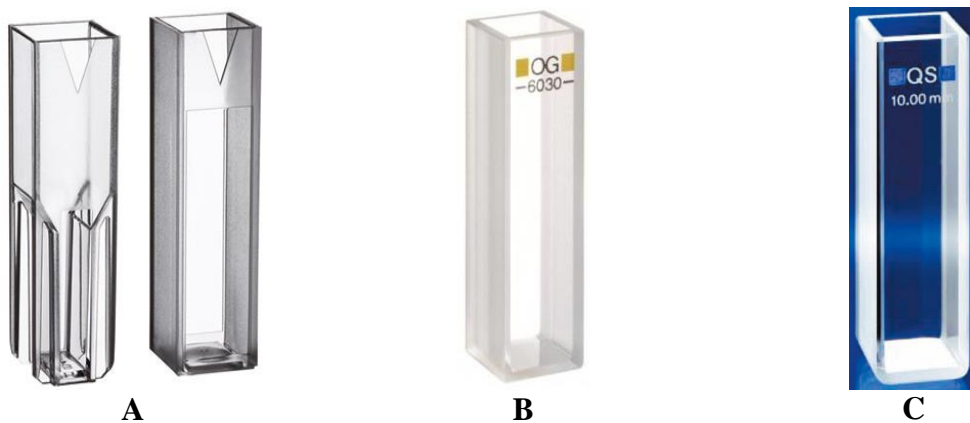


Figure 08: Cellules de mesure spectrophotométrique ; a en plastique, b en verre et c en quartz

L'absorbance mesurée par un spectrophotomètre correspond aux trois types d'absorbance : l'absorbance de la cuve, du solvant et de l'espèce à analyser. Dans ce cas, il est nécessaire de préparer un tube blanc pour soustraire les deux premières absorptions qui ne font pas partie de l'absorbance de l'espèce à doser.

- **Détecteur photoélectrique :** système de mesure de l'intensité lumineuse, basé sur la transformation d'un signal lumineux en signal électrique. Il doit fournir une réponse sur une large gamme de longueur d'onde et très sensible aux signaux reçus. Il peut être soit un tube

photomultiplicateur, soit une photodiode au silicium (semi-conducteur / détecteur à transfert de charge) soit une barrette de diodes. Dans ce dernier le système dispersif (polychromatique) se trouve après la cellule d'échantillon car il est basé sur la collection de toutes les informations en même temps.

- **Traitement du signal et affichage** : le détecteur passe le signal électrique à un dispositif électronique qui l'amplifie quand il est trop faible.

Il existe différentes catégories de spectrophotomètres. Au fait, des spectrophotomètres conventionnels qui utilisent un monochromateur situant avant la cellule d'analyse et des spectrophotomètres à barrettes d'iodes constituant un polychromateur situant après la cellule d'analyse (Fig. 07). Les deux catégories peuvent être présentes sous deux configurations, mono- et double faisceau.

3.1.4. Applications analytiques

3.1.4.1. Analyse qualitative

La spectrophotométrie UV/VIS peut s'utiliser pour détecter la présence de groupements chromophores mais ne permet pas l'identification que de certaines espèces analysées.

3.1.4.2. Analyse quantitative

- Méthode directe : En utilisant la loi de Bee-Lamber, $A = \epsilon l C$, on peut calculer la concentration C d'une substance (ϵ connu) après la mesure de son absorbance : $A = f(C)$.

- Analyse de mélange : si le mélange contient 2 composés, on peut quantifier l'absorbance de 2 longueur d'onde par l'emploi de l'additivité de la loi de Bee-Lamber, où :

$$A_{\text{tot}} = A_1 + A_2 = \epsilon_1 l C_1 + \epsilon_2 l C_2 = l(\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)$$

- Dosage des substances non absorbantes: dans son principe elle ressemble les *tests colorimétriques*. Pour un composé qui n'absorbe pas dans le domaine usuel (composé inorganique: cuivre, plomb, nickel ...), il doit se transformer à une dérivé qui lui confère un chromophore (transformation chimique par dosage chimique) absorbant. Cette dérivé doit être colorée, stable et produite d'une transformation spécifique, totale, rapide, reproductible. C'est le principe des *tests colorimétriques*.

- Mesure des activités enzymatiques : fait appel à la différence d'absorbance entre les formes réduites et oxydées des cofacteurs NAD ou NADP. Au fait, l'activité de l'enzyme glutathion peroxydase est évaluée à $\lambda = 340\text{nm}$ ou l'absorption de NADPH est diminuée grâce à son oxydation en NADP^+ .

- Contrôle de pureté : à chaque composé identifié et absorbe les radiations UV/VIS un spectre caractéristique, et donc la présence de n'importe quel impureté se traduit par modification du spectre. Cette modification est apparue par soit changement de la position de l'absorbance maximale, soit par l'apparition d'épaulements ou pics supplémentaires.

La spectrophotométrie UV/VIS peut être aussi utilisée en pharmacie pour déterminer la teneur en principe actif et la pureté de la matière première, en agroalimentaire, en toxicologie et en environnement.

Sites internet à visiter :

1/ <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>

2/ <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-uv-visible>