



# CHAPITRE 2: LA SPECTROPHOTOMÉTRIE

# Plan du cours

---

1. Introduction
2. Spectroscopie d'absorption dans l'UV-Visible
3. La loi de Beer-Lambert
4. Applications de la spectroscopie UV-visible

# 1. Introduction

---

- La spectroscopie ou spectrométrie est le domaine qui étudie la mesure de l'énergie transportée par les rayonnements électromagnétiques.
- C'est un ensemble de méthodes analytiques qui consistent à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution.

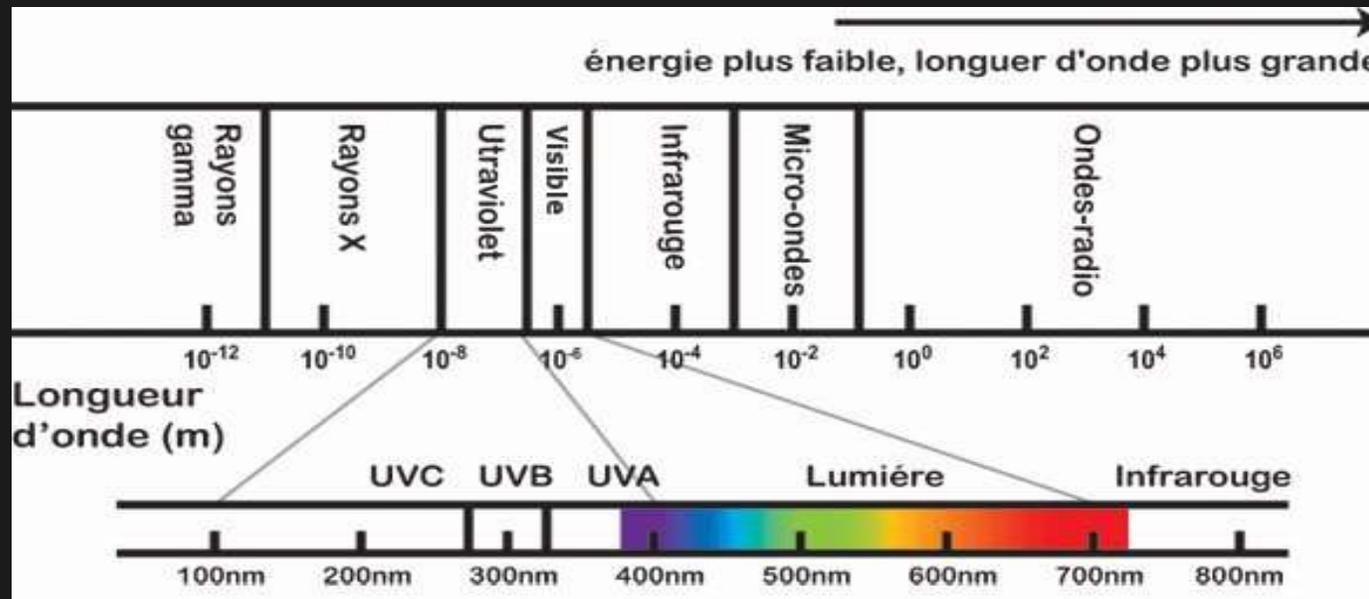
# 1. Introduction

---

- La spectrophotométrie est utilisée dans divers domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc....
- La technique de spectrométrie d'absorption UV-visible est la plus utilisée dans les laboratoires d'analyses biologiques

## 2. Spectroscopie d'absorption dans l'UV-Visible

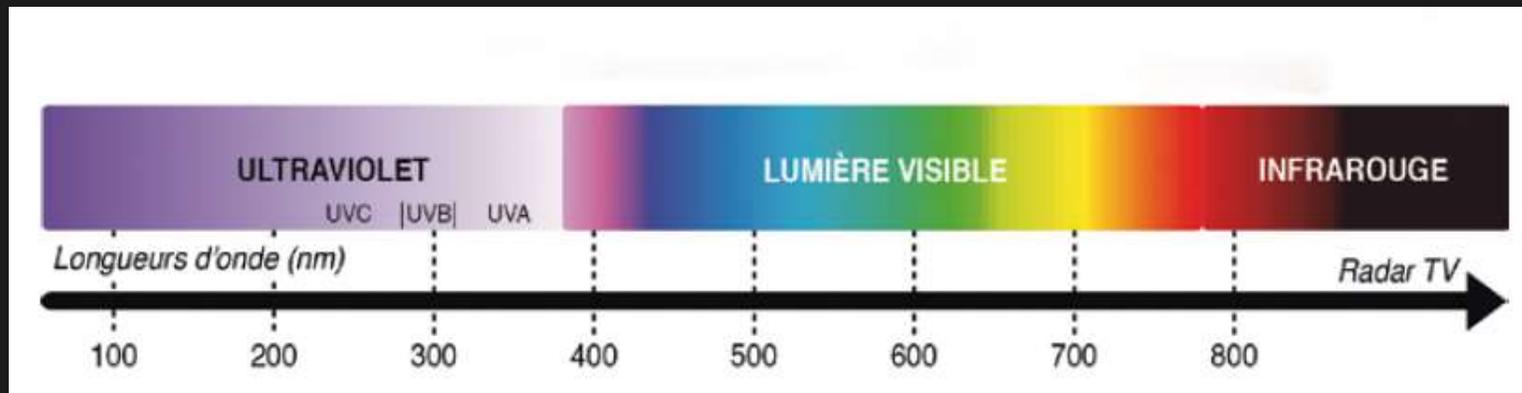
- Spectroscopie d'absorption dans l'UV-Visible est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.



Le spectre électromagnétique

## 2.1. Domaine UV-Visible

- Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet et du visible.
- Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm.
  - Visible : 400 nm (indigo) -800 nm (rouge).
  - Proche-UV : 200 nm -400 nm
  - UV-lointain : 10 nm- 200 nm .



## 2.1. Domaine UV-Visible

Pour les appareils usuels, les domaines utiles de longueur d'onde dans les domaines

UV-Visible sont :

UV	Visible
200 nm < $\lambda$ < 400 nm	400 nm < $\lambda$ < 800 nm

## 2.2. Appareillage

Le spectrophotomètre UV-visible est constitué des éléments suivants :

➤ **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

➤ **Détecteur** = Photomultiplicateur ou photopiles



Spectrophotomètre

## 2.3. Principe du spectromètre UV-visible

- Une source de lumière blanche traverse un monochromateur qui sélectionne une radiation de longueur d'onde  $\lambda$ . Le faisceau de lumière monochromatique incident d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant une solution colorée. Un photodétecteur convertit l'intensité lumineuse transmise  $I$  en un signal électrique. Enfin un analyseur traite le signal électrique et affiche la valeur de l'absorbance.

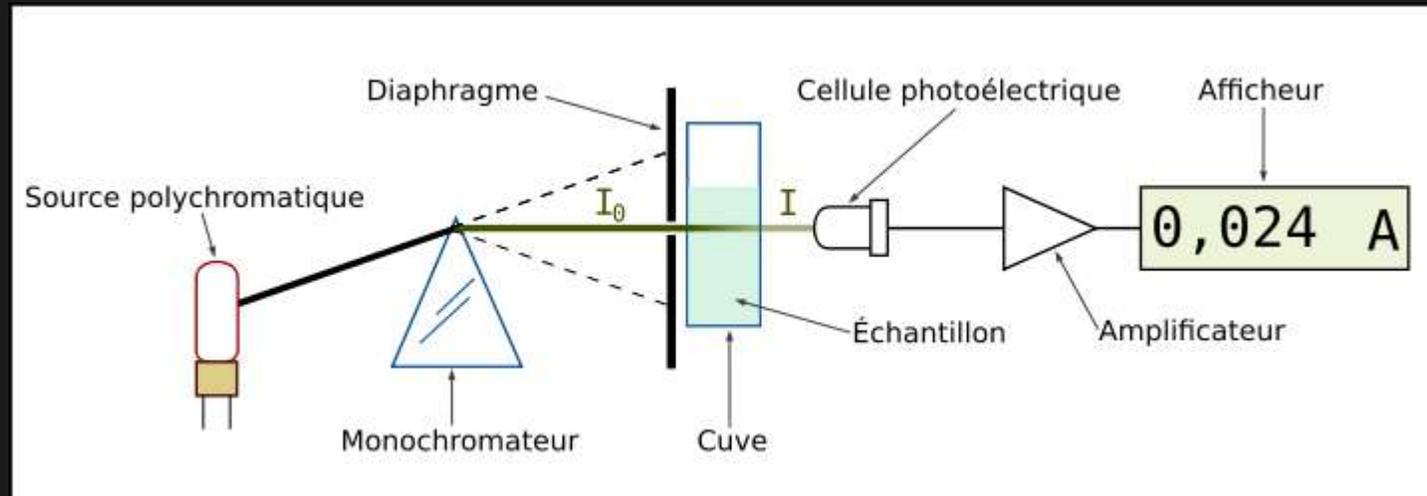


Schéma de principe du spectromètre UV-visible

## 2.4. Préréglage d'un spectrophotomètre monofaisceau

### ➤ Le choix de la longueur d'onde de travail

On règle le spectrophotomètre à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance de la solution étudiée, pour une plus grande précision et une plus grande sensibilité des mesures.

### ➤ Réglage du blanc

Le solvant et le(s) réactif(s) utilisés n'étant pas toujours transparents, il est obligatoire de réaliser un « blanc », c'est-à-dire une mise à zéro du dispositif (tarer), en ne plaçant que le solvant et le(s) réactif(s) utilisés dans la cuvette, avant la mesure de la cuvette contenant l'échantillon, et ce pour chaque longueur d'onde étudiée.

## 2.5. spectrophotomètre double faisceau

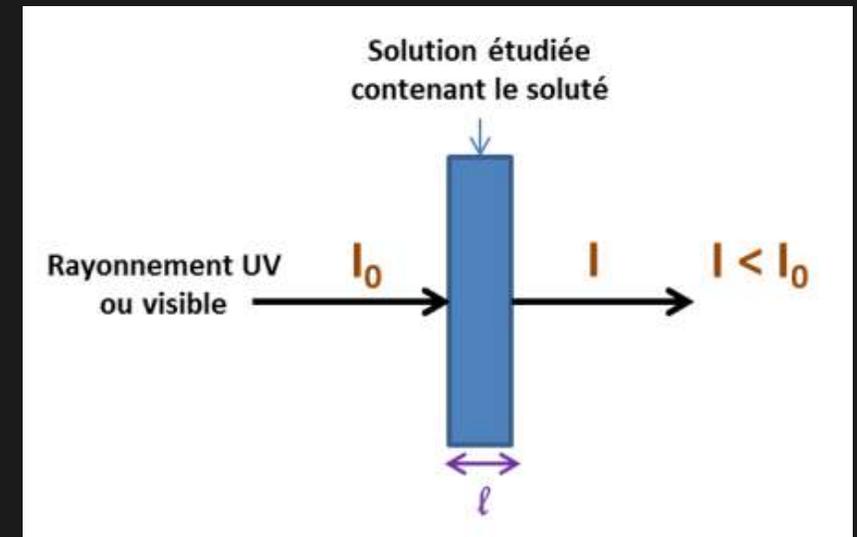
Sur un spectrophotomètre double faisceau, un second faisceau indique au premier traverse une cuve contenant le solvant sans l'échantillon. Un second photodétecteur relié à l'analyseur mesure l'absorbance de la cuve et du solvant. L'absorbance affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance de l'ensemble {cuve, solvant, espèce colorée} moins l'absorbance de l'ensemble {cuve, solvant}.



### 3. La loi de Beer-Lambert

La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration  $C$  contenue dans une cuve de longueur  $l$  est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$$



# 3. La loi de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

**A** : absorbance autrefois appelée densité optique (D.O.) ( sans unité)

L'absorbance A est la capacité d'une espèce chimique à absorber une lumière ( comprise entre 0 et 2)

**$\epsilon$**  : est le coefficient d'extinction molaire (coefficient d'absorption molaire); c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. ( $\epsilon$  est en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).

$\epsilon$  est le coefficient d'absorption spécifique si C en g/L ( $\epsilon$  est en  $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

**l** : est la largeur (épaisseur ) de cuve en cm

**C** : est la concentration de la solution ( $mol \cdot L^{-1}$ )

# 4. Applications de la spectroscopie UV-visible

---

- Le spectrophotomètre mesure la lumière absorbée par une solution (échantillon) à une longueur d'onde donnée, ce qui permet d'en déduire la concentration.
- Il est utilisé lors de la réalisation du test MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes).
- Il permet donc de réaliser des dosages biochimiques de nombreux paramètres sériques ou plasmiques (ex: glucose, urée, créatinine, calcium, albumine...) et des études de cinétique de réaction (détermination d'activité enzymatique).
- En microbiologie, la densité d'une culture bactérienne est estimée par sa turbidimétrie mesurée par l'absorbance d'un échantillon à 600 nm.

# 4. Applications de la spectroscopie UV-visible

---

➤ En biologie moléculaire, il est utilisé lors de l'extraction d'ADN, pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.