

1 Absorption de la lumière

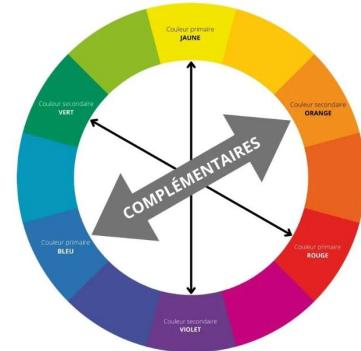
1.1 Interaction entre rayonnement et matière

En physique, un rayonnement désigne la propagation d'énergie émise par une source. Le rayonnement électromagnétique se propage sans support matériel, mais peut rencontrer de la matière.

Lors d'interactions matière/rayonnement, l'énergie transférée par le rayonnement peut être absorbée par la matière : ce phénomène est appelé absorption du rayonnement.

Remarque : La couleur des solutions est la manifestation de l'absorption de lumière visible. Les solutions colorées absorbent principalement les radiations correspondant à leur couleur complémentaire.

Par exemple, une solution de bleu de méthylène absorbe principalement la couleur orange, elle paraît bleue (couleur complémentaire).



1.2 Absorption des rayonnements par une solution

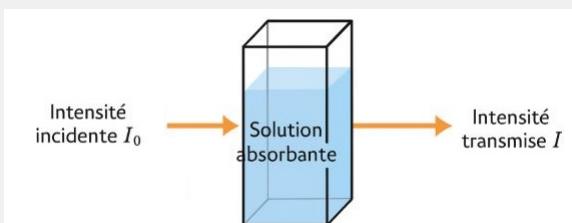
1.2.1 Schéma de principe de l'absorption

Une solution colorée est placée dans une cuve en verre. Un faisceau lumineux de longueur d'onde connue est dirigé à travers cette solution.

Une partie de la lumière incidente est transmise à travers la solution et une autre partie est absorbée par la solution.

Intensité lumineuse transmise et absorbée

Une partie de la lumière incidente est absorbée, le reste est transmis :



- I_0 : intensité lumineuse incidente, émise par la source avant d'entrer dans la cuve.
- I : intensité lumineuse transmise, mesurée après le passage dans la solution.
- $I_a = I_0 - I$: intensité lumineuse absorbée par la solution (non représentée directement mais déduite)

1.2.2 Transmittance

La transmittance est une mesure quantitative de l'absorption d'une radiation à une longueur d'onde donnée par un composé.

Soit I_0 l'intensité incidente de la lumière arrivant sur l'échantillon et I l'intensité transmise par l'échantillon. On appelle transmittance T le rapport suivant :

Transmittance T

$$T = \frac{I}{I_0}$$

- T : transmittance (sans unité)
- I : intensité lumineuse transmise
- I_0 : intensité lumineuse incidente

La transmittance T est inférieure ou égale à 1. Elle est égale à 1 pour une solution qui n'absorbe pas du tout la lumière. C'est une grandeur sans unité.

1.2.3 Absorbance

L'absorbance A est une grandeur plus pratique à utiliser, car elle varie de façon linéaire avec la concentration (contrairement à la transmittance T). L'absorbance A d'une solution de transmittance T est donnée par la relation :

Absorbance A

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

- A : absorbance (sans unité)
- T : transmittance (sans unité)
- I : intensité lumineuse transmise
- I_0 : intensité lumineuse incidente

Comme la transmittance, l'absorbance est une grandeur sans unité. Plus une solution absorbe la lumière, plus son absorbance est grande.

2 Loi de Beer-Lambert

2.1 Énoncé de la loi

L'absorbance des solutions éclairées en lumière monochromatique dépend de quatre facteurs :

- l'épaisseur de solution traversée
- la longueur d'onde de la lumière utilisée
- la nature du soluté que contient la solution
- la concentration de la solution

L'absorbance d'une solution est donnée par la loi de Beer-Lambert :

Loi de Beer-Lambert

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

- A : absorbance (sans unité)
- ε : Coefficient d'extinction molaire en mètre carré par mole ($m^2 \cdot mol^{-1}$)
- l : épaisseur de solution traversée en mètre (m)
- C : concentration molaire de la solution en mole par mètre cube ($mol \cdot m^{-3}$)

Remarque 1 : Le coefficient d'extinction molaire ε est un facteur qui dépend à la fois de la nature du soluté et de la longueur d'onde utilisée.

Remarque 2 : Les unités fréquemment utilisées sont l'épaisseur l de solution traversée en cm, la concentration molaire de la solution C en $mol.L^{-1}$ et le coefficient d'extinction molaire ε en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

2.2 Conditions d'utilisation de la loi de Beer-Lambert

Pour que la loi de Beer-Lambert s'applique, il faut que :

- la lumière soit monochromatique
- les solutions utilisées soient très peu concentrées (Dans le cas contraire, elles peuvent absorber toute la lumière).
- les solutions soient homogènes (ni suspension, ni émulsion) et non fluorescente.

2.3 Exploitation de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance A mesurée par un spectrophotomètre à la concentration C d'une espèce en solution. On peut ainsi déterminer la concentration C de solutions colorées ou absorbant dans l'UV-visible.

2.3.1 Détermination directe (sans étalonnage)

Si le coefficient d'absorption molaire ε est connu pour une espèce à une longueur d'onde donnée, on peut appliquer directement la loi de Beer-Lambert pour déterminer la valeur de la concentration de la solution après avoir mesuré la valeur de son absorbance.

Exemple : Une solution a un coefficient d'absorption molaire $\varepsilon = 5000 L.mol^{-1}.cm^{-1}$. L'épaisseur de solution traversée est $l = 1,0\text{ cm}$. Et l'absorbance mesurée est $A = 0,50$.

$$A = \varepsilon \times l \times C \quad \text{donc} \quad C = \frac{A}{\varepsilon \times l} = \frac{0,50}{5000 \times 1,0} = 1 \times 10^{-4} mol.L^{-1}$$

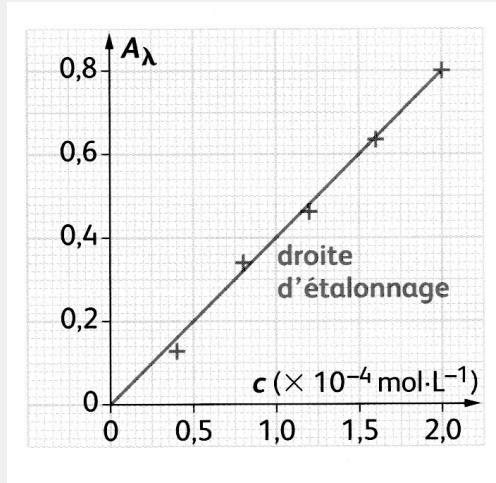
2.3.2 Méthode avec étalonnage (courbe d'étalonnage)

Lorsque le coefficient d'absorption molaire ε est inconnu, on réalise une gamme d'étalonnage :

- Préparer une série de solutions de concentrations connues.
- Mesurer leur absorbance A à une longueur d'onde choisie (λ_{max}).
- Tracer la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration. On obtient une droite qui passe par l'origine : $A = k \times C$
- Mesurer l'absorbance A de la solution inconnue.
- Déterminer la concentration C de la solution par interpolation graphique ou par équation de la droite.

Remarque : On se place à la longueur d'onde pour laquelle l'absorption est maximum. Cela permet d'avoir une meilleure précision pour les mesures. Le tracé de la courbe $A = f(\lambda)$ pour cette substance permet donc de déterminer la longueur d'onde de travail. (Pour une solution de permanganate de potassium, on observe un maximum à 525 nm. C'est cette longueur d'onde que l'on choisira pour longueur d'onde de mesure.)

Exemple : On réalise une série de solutions de concentrations connues puis on mesure leur absorbance A à une longueur d'onde choisie (λ_{max}). La courbe de l'absorbance en fonction de la concentration est la suivante :



La solution inconnue a une absorbance $A = 0,50$.

On peut déterminer la concentration de la solution par deux méthodes différentes :

- On lit sur le graphe la valeur de la concentration pour l'absorbance de la solution inconnue : $C = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
- On peut également déterminer la valeur de la concentration de cette solution en utilisant l'équation de la droite : $A = 4000 \times C$.

$$A = 4000 \times C \quad \text{donc} \quad C = \frac{A}{4000} = \frac{0,50}{4000} = 1,25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

3 Spectrométrie d'absorption UV-visible

3.1 Principe général

La spectroscopie UV-Visible est une technique d'analyse optique qui repose sur l'absorption de la lumière par un échantillon dans la gamme de longueurs d'onde ultraviolet (100-400 nm) et visible (400-750 nm).

Lorsqu'un rayonnement traverse un milieu contenant une substance absorbante, une partie de la lumière est absorbée tandis que le reste est transmis. L'absorbance ainsi mesurée est directement liée à la concentration du composé d'intérêt grâce à la loi de Beer-Lambert.

3.2 Le spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est l'appareil utilisé en spectrométrie. Un spectrophotomètre UV-Visible est un instrument de laboratoire qui permet de mesurer l'absorption de la lumière par un échantillon à différentes longueurs d'onde.

Il est composé de plusieurs éléments essentiels :

- Source lumineuse : Le spectrophotomètre doit émettre un faisceau de lumière couvrant le spectre UV (100-400 nm) et visible (400-750 nm). On utilise principalement :
 - Lampe deutérium : source d'UV, efficace entre 160 et 400 nm.
 - Lampe tungstène-halogène : source de lumière visible, efficace entre 320 et 1100 nm.
- Monochromateur : Avant d'atteindre l'échantillon, la lumière est séparée en différentes longueurs d'onde à l'aide de :
 - Prismes en quartz : utilisés dans certains instruments plus anciens.
 - Réseaux de diffraction : plus courants, car ils offrent une meilleure résolution spectrale.
- Le rôle du monochromateur est de sélectionner une longueur d'onde spécifique pour réaliser l'analyse.
- Cuves : L'échantillon analysé est placé dans une cuve en verre, en plastique ou en quartz.
 - Cuves en quartz : utilisées pour les mesures en UV (transparence dans l'UV).
 - Cuves en plastique : adaptées aux analyses en domaine visible uniquement.
- Les dimensions standards des cuves sont de 1 cm de trajet optique, ce qui correspond au paramètre l dans l'équation de Beer-Lambert.
- DéTECTEURS et mesure du signal : Après avoir traversé l'échantillon, la lumière résiduelle est captée par un détecteur, qui convertit l'intensité lumineuse en signal électrique.
 - Photodiodes : utilisées dans les spectrophotomètres classiques, elles mesurent l'intensité lumineuse à une longueur d'onde donnée.
 - Barrettes de diodes : permettent d'enregistrer simultanément l'ensemble du spectre UV-Visible, rendant l'analyse plus rapide.

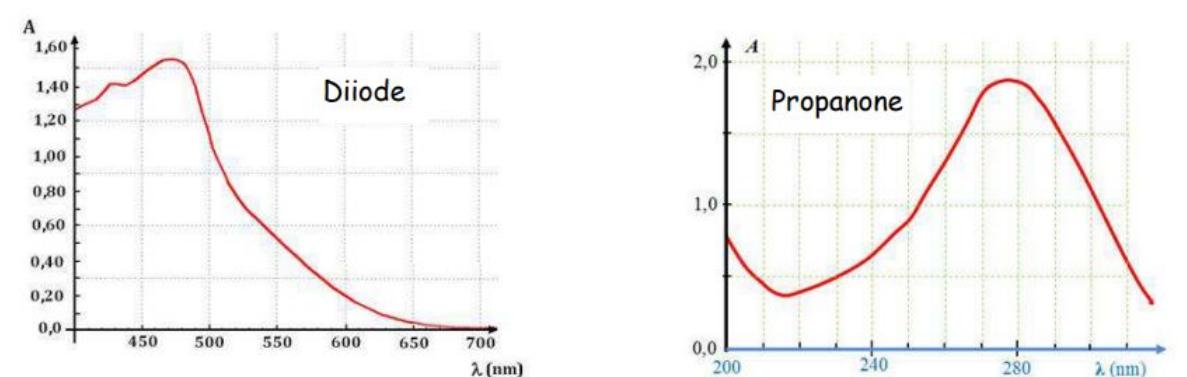
Le signal est ensuite traité par un logiciel qui affiche le spectre d'absorption, permettant une interprétation précise des résultats.

3.3 Allure du spectre

Le spectrophotomètre permet de tracer la courbe représentant l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ . Il est obtenu en balayant toutes les longueurs d'onde entre 100 et 800 nm. On observe un spectre de larges bandes.

Une espèce chimique peut être identifiée grâce à son spectre caractéristique.

Spectre UV- visible d'une solution aqueuse de diiode et d'une solution de propanone



La solution aqueuse de diiode absorbe dans le visible, elle est colorée. La solution de propanone absorbe principalement dans l'UV, elle est incolore.

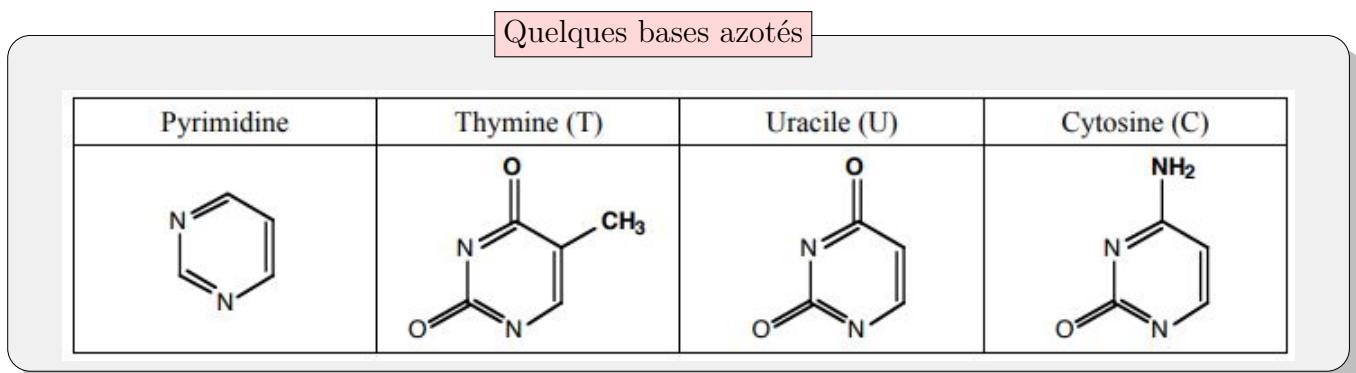
3.4 Absorption dans le domaine UV des biomolécules

3.4.1 Généralités

Les macromolécules biologiques (nucléiques et protéines) absorbent la lumière dans l'UV (200-300 nm), grâce à leurs groupes aromatiques et leurs liaisons conjuguées.

Cette propriété est largement utilisée en biochimie pour doser ou caractériser ces molécules.

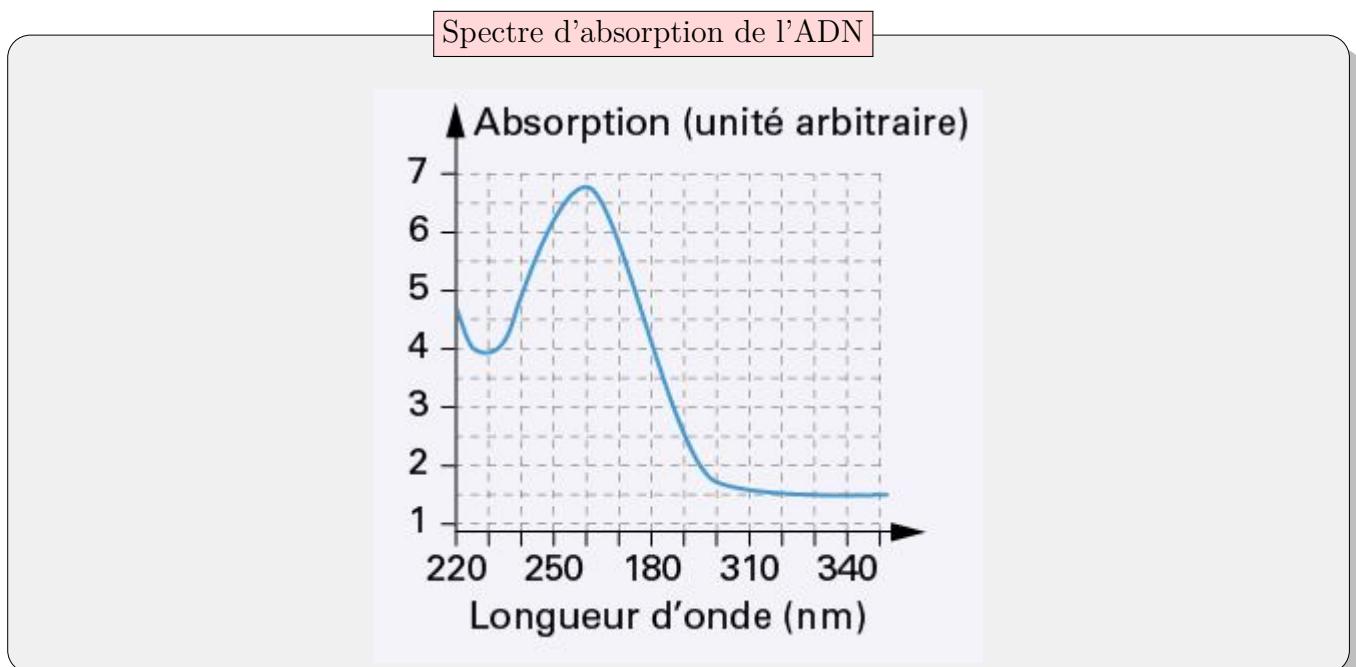
Les bases azotées aromatiques (adénine, guanine, cytosine, thymine, uracile) absorbent fortement dans l'UV. Le maximum d'absorption est observé pour une longueur d'onde $\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$.



3.4.2 L'ADN et l'ARN

Les bases azotés (purines et pyrimidines) qui entre dans la composition des acides nucléiques (ADN et l'ARN) absorbent dans les UV avec un maximum à 260 nm.

Cette propriété d'absorption permet de doser la concentration des acides nucléiques.



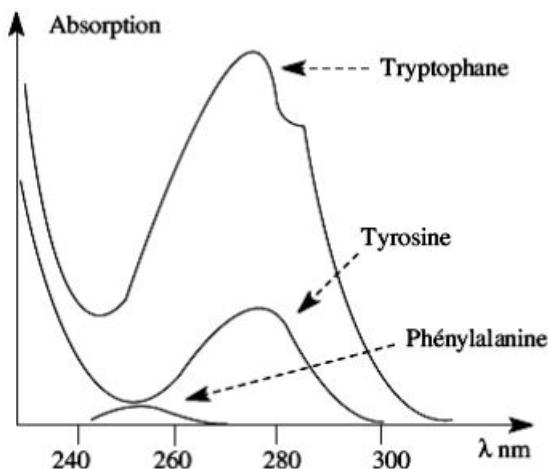
3.4.3 Les protéines

Les trois acides aminés aromatiques (tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr), phénylalanine (Phe)) ont un pic d'absorption à une longueur d'onde plus élevée que les autres autres acides aminés :

- Phénylalanine (Phe) : $\lambda_{max} = 257 \text{ nm}$
- Tyrosine (Tyr), phénylalanine (Phe) : $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$.

Comme toutes les protéines possèdent des résidus aminoacyles aromatiques (tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr), phénylalanine (Phe)), cette propriété d'absorption à 280 nm (principalement dû au Trp et Tyr) est mise à profit pour détecter simplement, par mesure spectrophotométrique, la présence de protéines dans un liquide donné.

Spectres d'absorption d'acides aminés présents dans les résidus des protéines



Remarque : La capacité des protéines à absorber la lumière ultraviolette à 280 nm permet d'estimer la contamination par les protéines lors de la purification des acides nucléiques :

$$P \text{ (pureté)} = A_{260} / A_{280} \text{ (Une solution d'ADN est considérée pure si } 1,7 \leq P \leq 2)$$