

SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE

ÉCOLE TECHNIQUE SUPÉRIEURE DU
LABORATOIRE

95, rue du Dessous des Berges, 75013 PARIS

<http://ligodin.free.fr>

godin.lionel@orange.fr



Licence des Industries Pharmaceutiques, Cosmétologiques, et de Santé : gestion,
production et valorisation.

Option CDA - Année 2024/2025

◆ Introduction

Cette technique présente de nombreuses qualités :

- technique d'un coût raisonnable : < 10 000 euros ;
- on dispose d'une abondante bibliographie et de notes d'applications dans de nombreux domaines ;
- de nombreuses espèces à l'état gazeux, liquide ou solide absorbent dans l'UV-visible, soit directement, soit après développement d'espèces absorbantes ;
- on peut obtenir de bonnes sensibilités, soit par préparation des échantillons, soit en modifiant des paramètres physiques comme la longueur du trajet optique par exemple ;
- les temps de réponse peuvent être très courts, même pour l'enregistrement de spectres complets.
- on trouve sur le marché des composants miniatures, des fibres optiques et des cellules couplées qui permettent de faire des mesures déportées ;
- les méthodes modernes de traitement des données permettent de résoudre des problèmes difficiles d'analyse multi-composants ou de suppression des interférences ;
- on peut coupler la spectrométrie UV-VIS avec d'autres techniques comme la chromatographie.

◆ Introduction

Cette technique présente quelques limitations :

- la dynamique (gamme de mesures) est réduite par la loi logarithmique et la lumière parasite ; il existe, de plus, les phénomènes de diffusion et de fluorescence ;
- les interférences spectrales ne sont pas toujours maîtrisées, de même que les effets physico-chimiques comme le pH, les effets du solvant, la température, ...

C'est une méthode d'analyse essentiellement quantitative, surtout lorsque plusieurs espèces absorbent, ce qui rend difficile la reconnaissance de la signature spectrale

- ◆ Document 1 : Principes

- ◆ 1) Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS

Le principe de la SAM dans l'UV et le visible repose sur l'**absorption du rayonnement par les molécules** dans le domaine allant de 190 à 800 nm (cf figure 1).

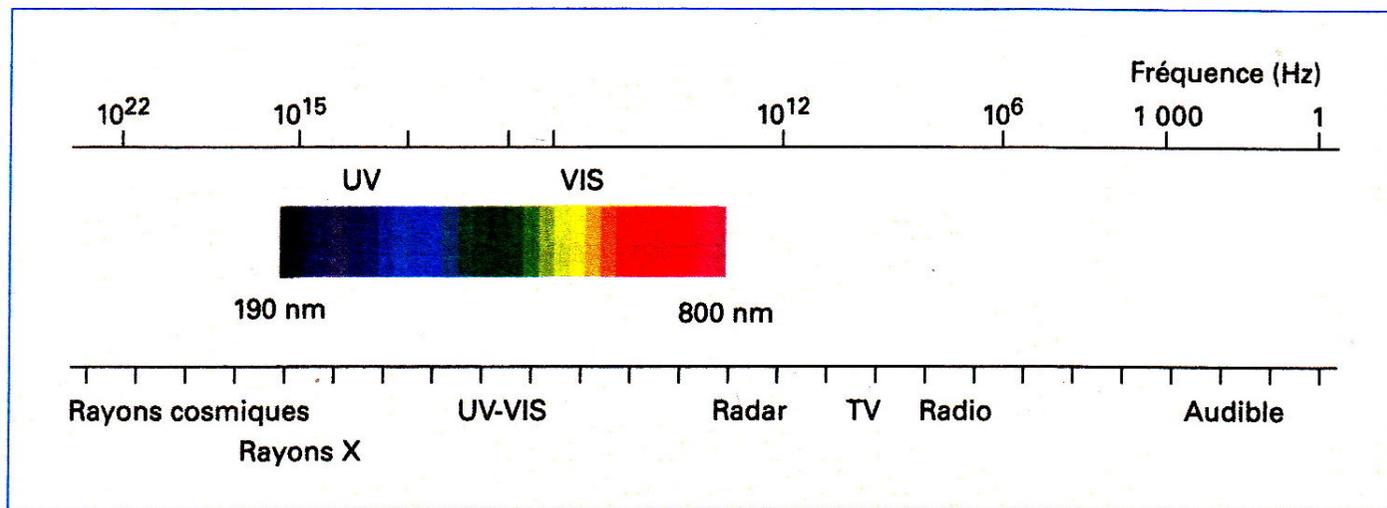


Figure 1 : *Domaine spectral du rayonnement e.m*

Dans cette application , on peut considérer le rayonnement UV-VIS comme une onde e.m qui transporte une énergie E liée à sa fréquence ν par la relation de Planck :

$$E = h.\nu = h.c/\lambda$$

avec h : constante de Planck à $6,63.10^{-34}$ J.s ;c vitesse de la lumière dans le milieu où se propage l'onde soit $3,00.10^8$ m.s⁻¹ dans le vide ou dans l'air ; λ longueur d'onde du rayonnement.

1/ Que peut-on dire du domaine UV-VIS par rapport au domaine spectral de l'ensemble des ondes e.m ?

2/ Déterminer les limites en énergie du rayonnement UV-VIS :

Ces énergies correspondent aux énergies de transition électronique des molécules : à température ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et de vibration fondamental.

Ces molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-VIS et changer leurs états énergétiques électroniques de vibration et de rotation, comme le montre la figure 2.

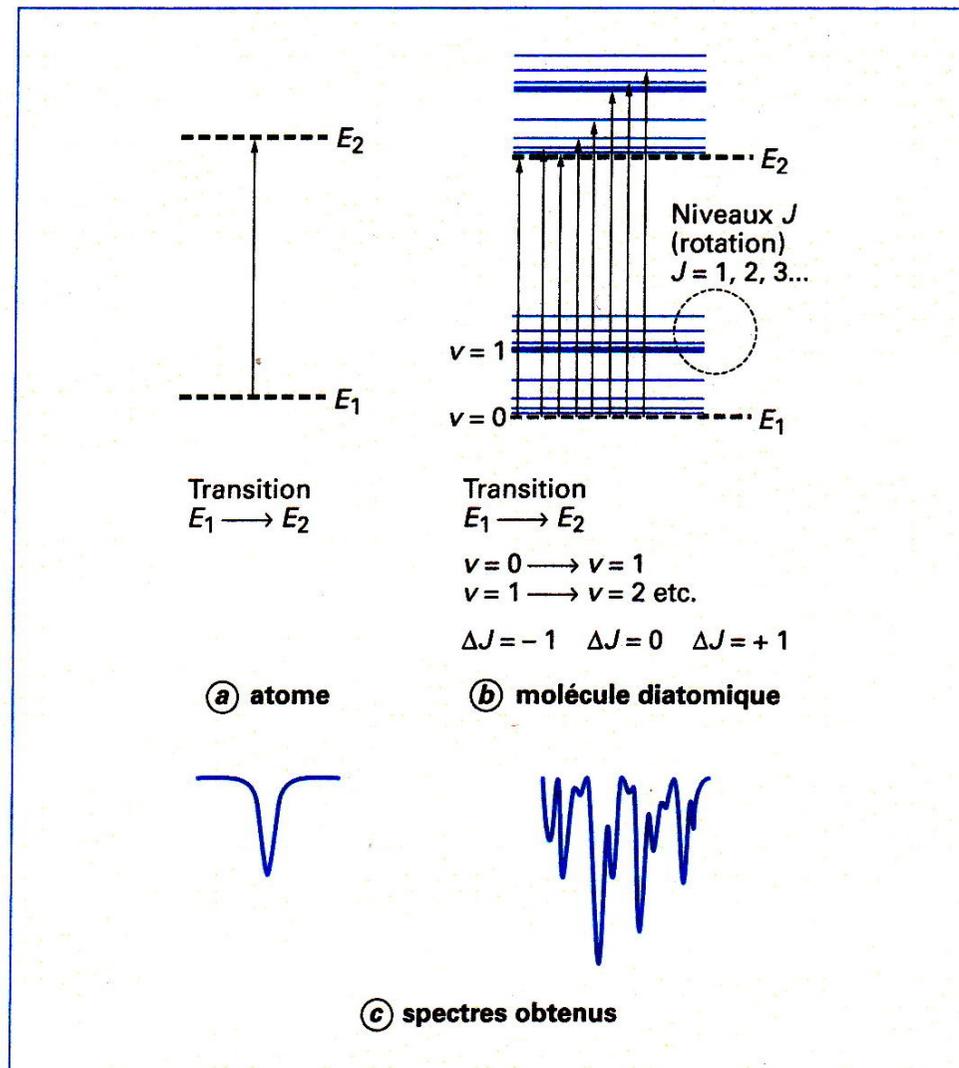


Figure 2 - Transitions électroniques des atomes et des molécules

La figure 2 représente un schéma simplifié de l'absorption du rayonnement UV-VIS par les atomes et molécules :

- **Pour les atomes**, il n'existe que des états électroniques quantifiés susceptibles d'absorber des photons. L'absorption du rayonnement se traduit par un spectre de raies pratiquement monochromatiques, absorption qui est mise en oeuvre dans la SAA.
- **Pour les molécules**, même simple comme les molécules diatomiques, les niveaux d'énergie quantifiés sont plus nombreux :
 - Les niveaux électroniques : les écarts d'énergie entre ces niveaux sont de l'ordre de quelques électronvolts conduisant à des absorptions dans le domaine de l'UV-visible comme pour les atomes.
 - Les niveaux de vibrations : les écarts d'énergie de quelques dixièmes d'électronvolt correspondent à des absorptions dans le domaine de l'infrarouge moyen soit de 2,5 à 40 μm .
 - Les niveaux de rotation : les écarts d'énergie sont de l'ordre de quelques millièmes d'électronvolts correspondants à l'infrarouge lointain.

Le nombre de photons absorbés entraîne une diminution de l'intensité du rayonnement UV-VIS transmis par le milieu. Cette diminution va dépendre du nombre de molécules traversées par le rayonnement. Ceci va se traduire par une loi d'absorption :

$$A(\lambda) = \log(I^0_\lambda/I_\lambda) = \varepsilon(\lambda).b.C$$

La loi de Beer-Lambert

Avec $A(\lambda)$ absorbance du milieu à la longueur d'onde λ ; I^0_λ intensité du rayonnement à la longueur d'onde λ avant traversée de la cuve ;

I_λ intensité du rayonnement à la longueur d'onde λ après traversée de la cuve ;

$\varepsilon(\lambda)$: coefficient d'absorption molaire (ex. Coefficient d'extinction moléculaire) exprimé en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, dont la valeur dépend de la longueur d'onde λ ; b : trajet optique de la cuve en cm ;

C : concentration en $mol.L^{-1}$ des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ .

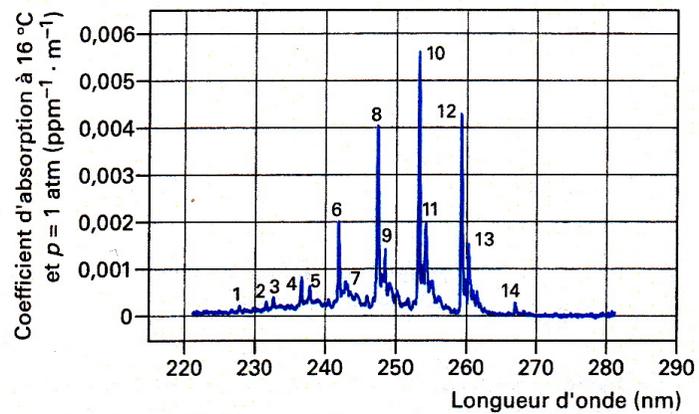
◆ 2) Spectres obtenus, analyse qualitative

Pour les nombreuses molécules gazeuses qui absorbe dans l'UV-visible comme le monoxyde d'azote NO, le dioxyde de soufre SO₂, l'ammoniaque NH₃, le dichlore Cl₂, l'hydrogène sulfureux H₂S, le benzène C₆H₆ etc.

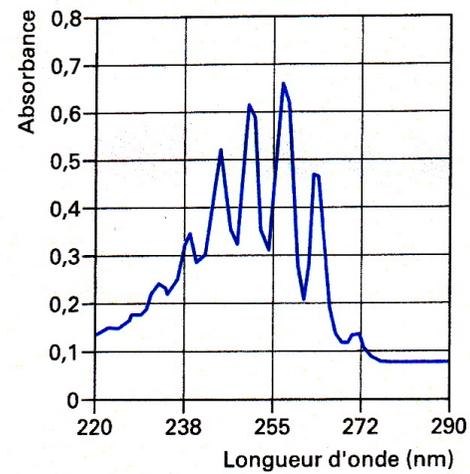
Les spectres obtenus sont une véritable **empreinte digitale** de ces molécules, si le spectromètre à une résolution suffisante.

On peut donc les reconnaître facilement, même dans un mélange, comme le montrent les spectres de la figure 3.

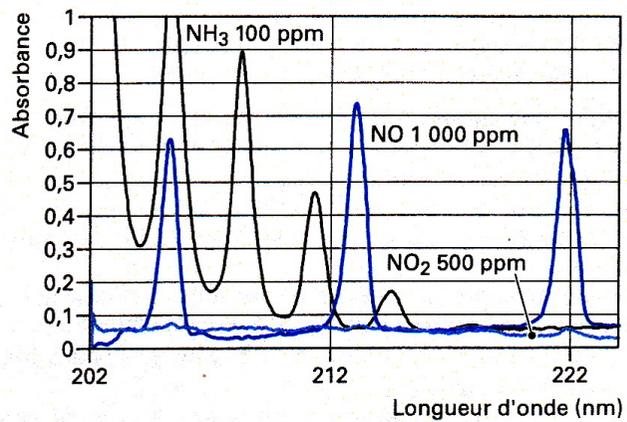
Dans le cas des liquides et des solutions, les interactions moléculaires viennent masquer les structures fines observées pour les gaz : on ne retrouve alors que des bandes plus ou moins larges qui peuvent rendre plus douteuse l'identification des molécules, ce qui explique que la spectrométrie d'absorption est **surtout une méthode d'analyse quantitative**.



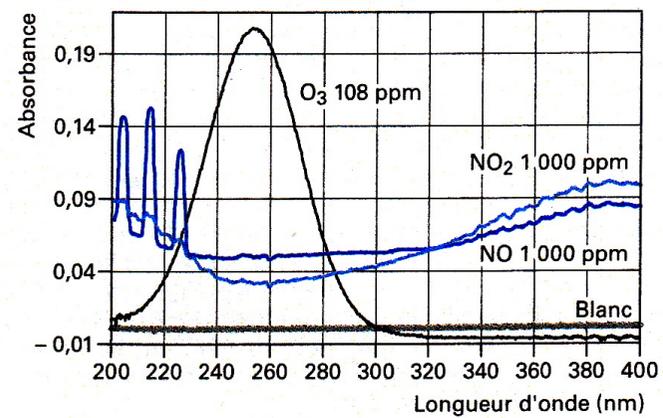
(a) benzène



(b) spectre d'absorption du benzène en solution



(c) spectres UV de NO, NO₂, NH₃



(d) spectres UV de NO, NO₂, O₃

Figure 3 - Quelques spectres d'absorption de molécules

1/ Que remarque-t-on sur la figure 3, entre les spectres (a) et (b) ?

Pour toutes les molécules mises en solution, les spectres UV-Visible se présente sous forme de bandes plus ou moins larges, les interactions avec les solvants venant masquer la structure fine.

Cette structure fine n'apparaît que pour les gaz, à condition d'avoir des spectrophotomètres à haute résolution, et aussi à condition que les gaz ne soient pas photo-dissociés par le rayonnement, comme le montrent les spectres de l'ozone et du dioxyde d'azote de la figure 3.

◆ 3) Lois de l'absorption, analyse quantitative

L'absorption du rayonnement UV-Visible par les molécules permet de déterminer la concentration de ces molécules présentes dans le trajet du rayonnement.

Il existe une loi simple entre quantité de rayonnement transmis par le milieu et concentration des molécules qui absorbent (on suppose que seule l'espèce à doser absorbe à cette longueur d'onde).

C'est la **loi de Beer-Lambert**, comme on l'a vue précédemment, qui relie absorption, à une longueur d'onde, de concentration C des molécules qui absorbent.

La figure 4 représente le schéma d'une cellule (cuve) et explicite les variables utilisées.

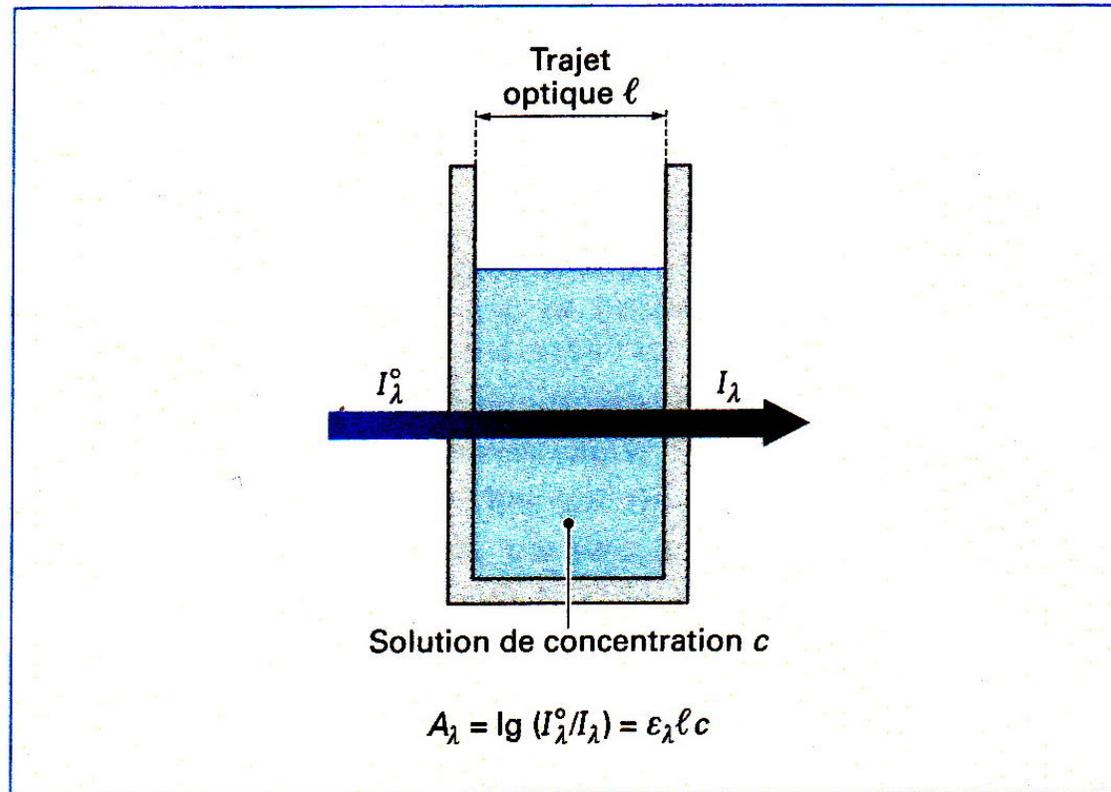


Figure 4 - Schéma d'une cellule d'absorption

L'absorbance A_{λ} est donc proportionnelle à la concentration C des molécules de l'espèce qui absorbe à cette longueur d'onde λ .

Il est alors possible de construire une droite d'étalonnage en utilisant plusieurs concentrations connues de la molécule à doser et en mesurant les absorbances correspondantes à la longueur d'onde λ .

Cette droite d'étalonnage permet de déterminer le coefficient d'absorption moléculaire $\epsilon(\lambda)$.

On utilise la droite d'étalonnage pour déterminer, par lecture directe, la concentration d'un échantillon donné $C_{éch}$.

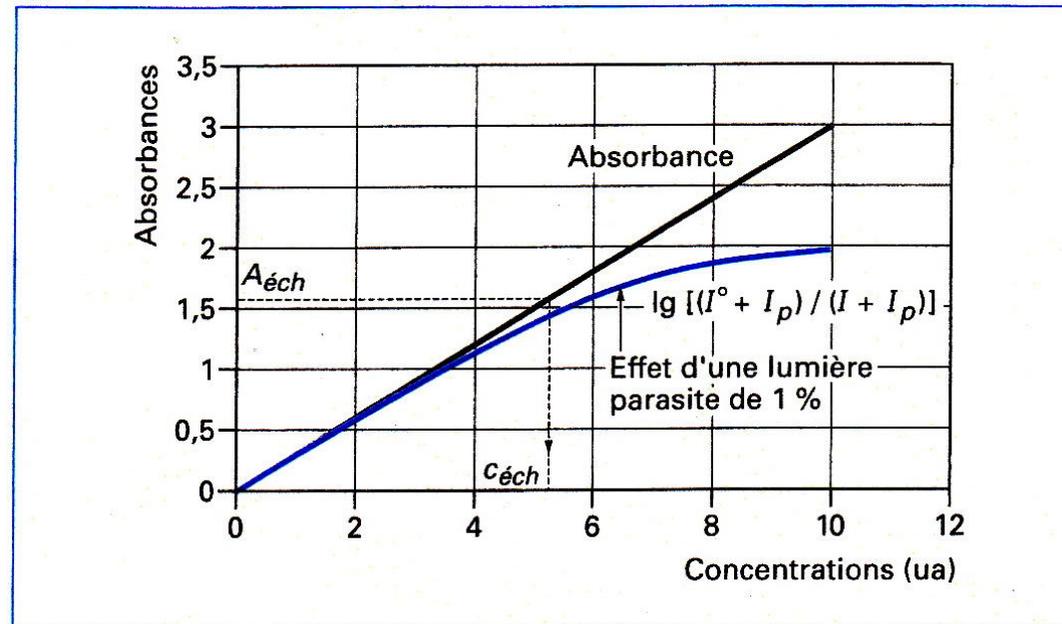


Figure 5 - Tracé de la droite d'étalonnage et détermination des concentrations inconnues

On a représenté, sur la même figure, l'effet d'une **lumière parasite**, c.a.d d'une lumière d'une autre longueur d'onde λ_p que celle pour laquelle on a tracé la loi de Beer-Lambert, et qui arrive au détecteur, superposé à la lumière de longueur d'onde de travail λ .

La loi de Beer-Lambert s'écrit alors:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_\lambda^0 + I_p}{I_\lambda + I_p}$$

L'effet d'une lumière parasite de 1% de I_λ^0 est représenté par la courbe bleue sur la figure 5.

1/ Quel impact a la lumière parasite sur la sensibilité de la méthode ?

2/ Pour des échantillons d'absorbance proche de 2, que dire de l'incertitude sur la détermination de $C_{éch}$?

Remarque : la lumière parasite augmente dans l'UV. Elle dépend des configurations des spectrophotomètres, elle peut prendre des valeurs élevées pour les spectromètres miniatures type PDA.

En présence de lumière parasite, la droite se transforme en **courbe**. Il vaut mieux éviter, dans ce cas, de faire par exemple une régression linéaire sur les points expérimentaux. La droite de régression va couper la courbe en deux points (cercles) comme le montre la figure 6 provoquant une erreur (et non pas une incertitude) sur les résultats, sauf autour des deux points d'intersection représentés par les cercles bleus.

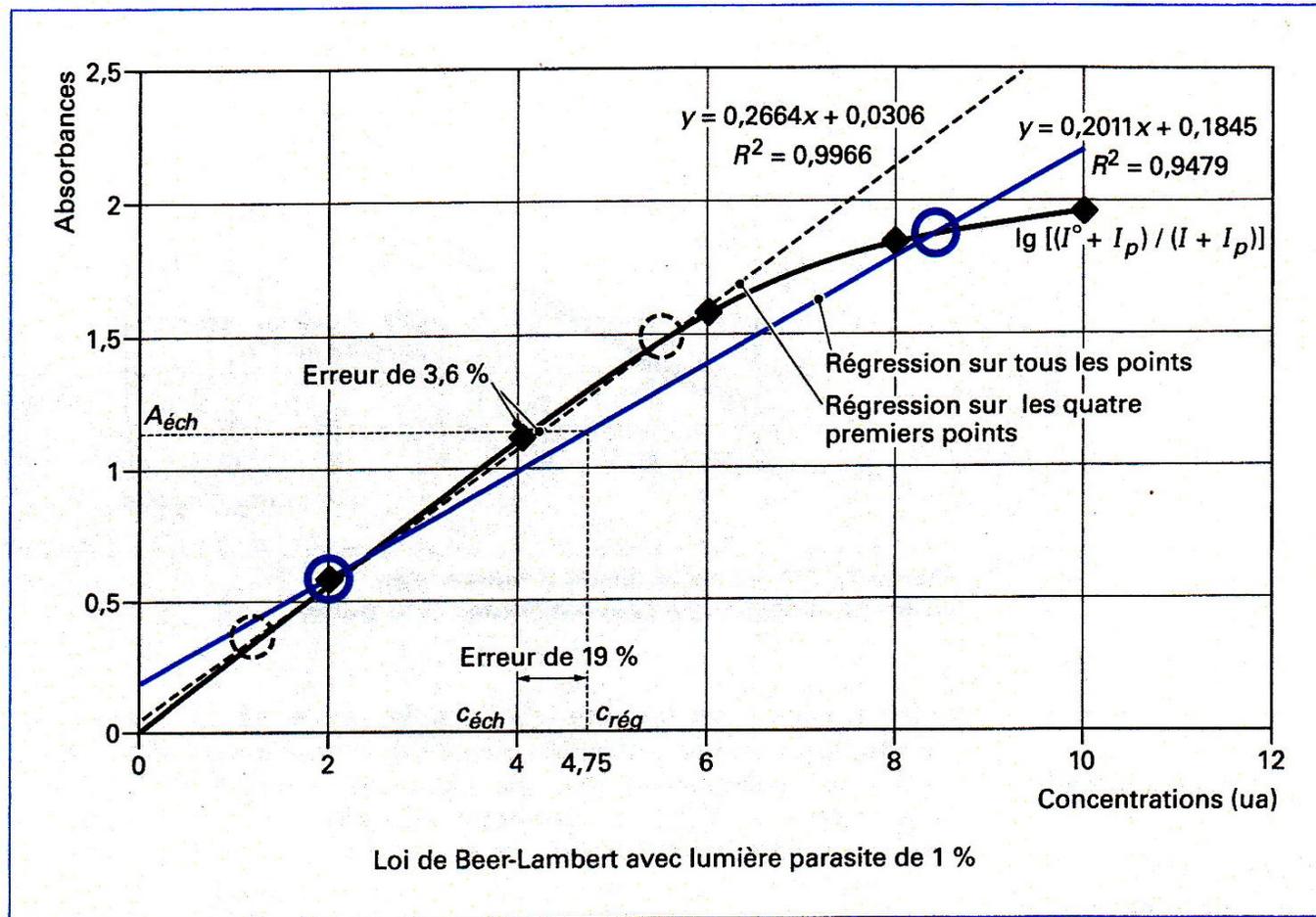


Figure 6 : Effet d'une régression linéaire sur la détermination de la concentration.

1/ Dans l'exemple de la figure 6, que peut-on dire de la droite de régression calculée sur tous les points par rapport à la courbe réelle ?

2/ Si l'on calcule la régression linéaire sur les 4 premiers points, on obtient la droite tracée en pointillée noir. Que peut-on dire du coefficient de détermination et de l'erreur dans ce cas ?

◆ 4) Lois d'additivité des absorbances

Dans le cas d'un mélange de molécules absorbantes 1, 2, ..., i, de concentrations respectives C_1, C_2, \dots, C_i , molécules n'interagissant pas entre elles, l'absorbance mesurée du mélange est la somme des absorbances individuelles dues à chaque molécule, à une longueur d'onde λ donnée :

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_i = \varepsilon_1(\lambda).b.C_1 + \varepsilon_2(\lambda).b.C_2 + \dots + \varepsilon_i(\lambda).b.C_i$$

◆ Document 2 : Instrumentation

◆ 1) Organisation des composants

Seuls les spectrophotomètres seront pris en compte ici.

On peut classer les appareils en deux catégories :

- Les **appareils à simple faisceau**, eux-mêmes subdivisés en appareil à montage optique direct ou à montage optique inversé ;
- Les **appareils à double faisceau**, à montage optique direct.

Ces appareils sont les plus performants en termes de possibilités d'analyses diverses et de caractéristiques métrologiques ; ce sont aussi les plus chers !

La figure 7 présente le schéma des appareils à simple faisceau, avec les deux montages existants

Ce montage nécessite deux mesures : un sur le blanc pour obtenir I^0 , l'autre sur les échantillons pour obtenir I .

Le disperser représenté par un prisme pour la simplicité des schémas est à l'heure actuelle constitué d'un monochromateur (fente d'entrée, réseau par réflexion et fente de sortie)

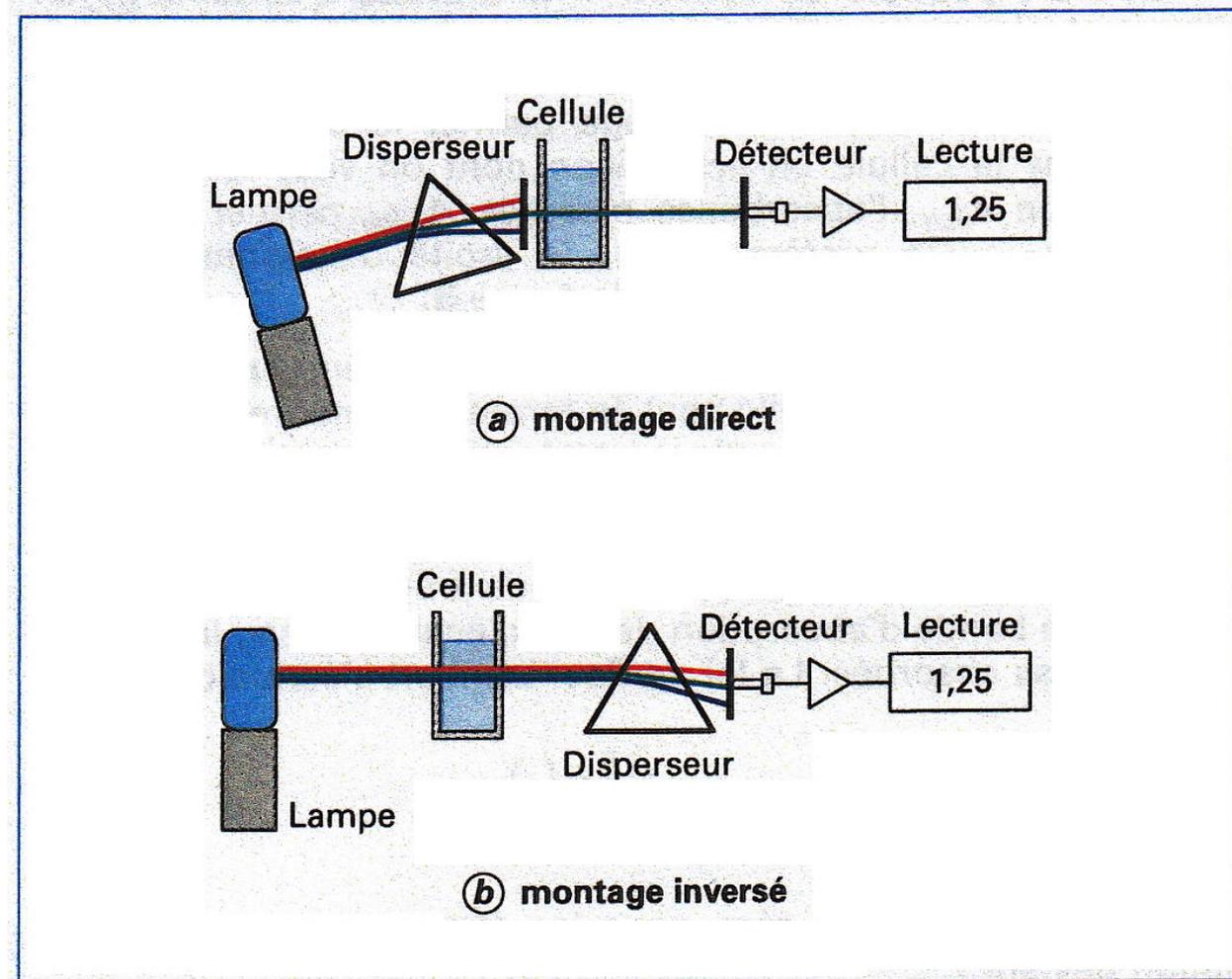


Figure 7 - Schéma des appareils à simple faisceau

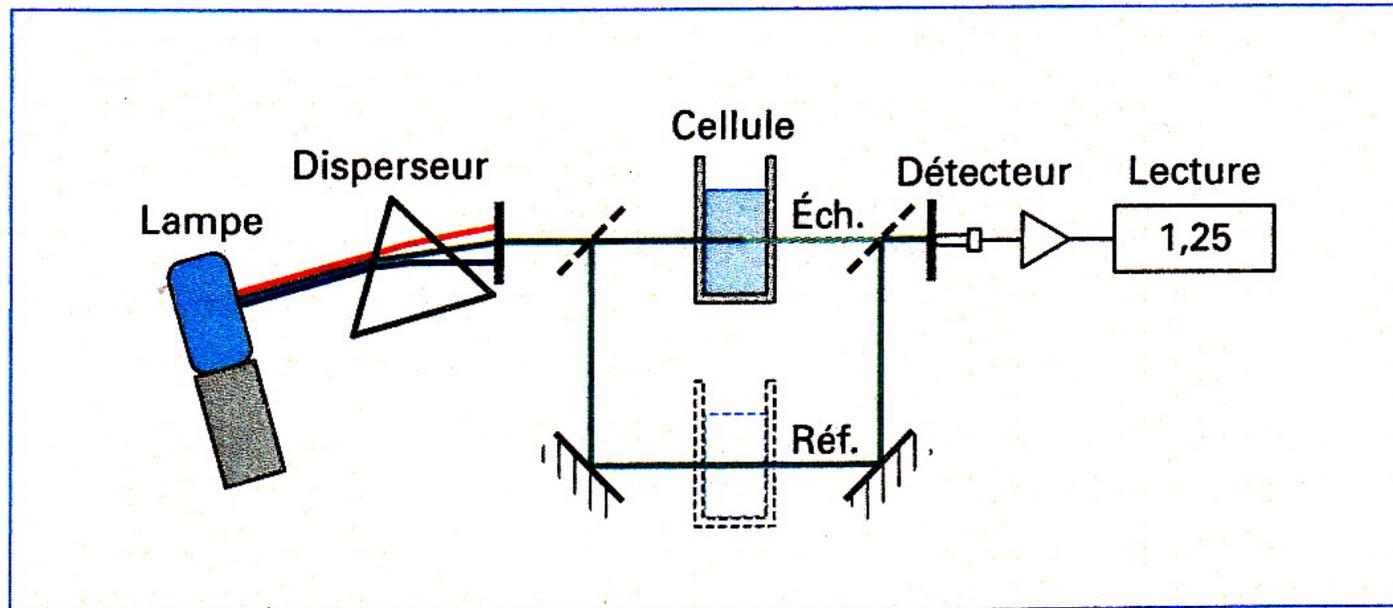


Figure 8 - Schéma de principe du spectrophotomètre à double faisceau (doc. Oriel)

À la sortie du monochromateur, un dispositif optique sépare le faisceau monochromatique en deux faisceaux qui vont traverser deux cuves :
La cuve de mesure et la cuve de référence.

Les deux faisceaux sont recombinaés et arrivent alternativement sur le détecteur.

C'est l'électronique qui se charge de mesurer indépendamment les intensités des deux faisceaux I^0_λ et I_λ et de calculer le pourcentage en transmittance ($100 \times I_\lambda/I^0_\lambda$) ainsi que l'absorbance.

◆ 2) Sources de rayonnement

Les sources de rayonnement sont constituées généralement de deux lampes pour couvrir tout le domaine UV-Visible.

Dans le domaine de l'UV, on utilise une **lampe au deutérium** qui émet un rayonnement continu.

Dans le visible, on utilise une **lampe à filament de tungstène** qui émet un spectre continu. L'ampoule contient un halogène qui permet de porter le filament vers 2850 K, sans trop réduire sa durée de vie.

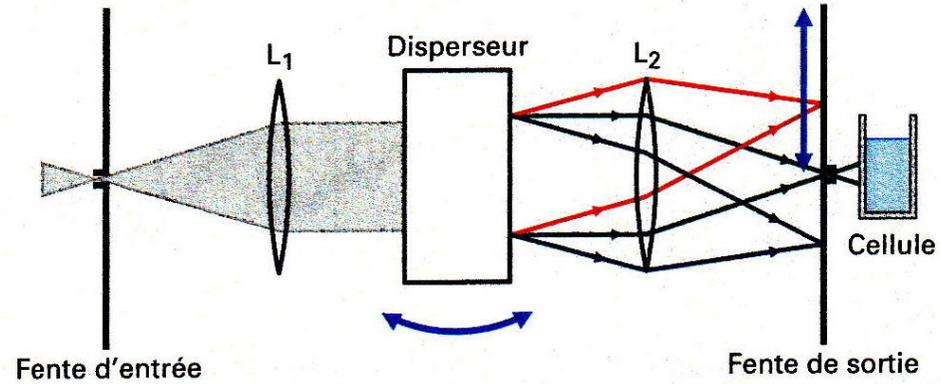
Dans certains cas, on peut n'utiliser qu'une seule lampe comme **la lampe au xénon à haute pression**, dont le spectre couvre tout le domaine UV-Visible.

Certaines de ces lampes ont l'avantage de ne fonctionner que le temps nécessaire à l'acquisition d'un spectre ou d'une mesure, ce qui garantit une durée de vie de plusieurs années et une lampe qui ne chauffe pas.

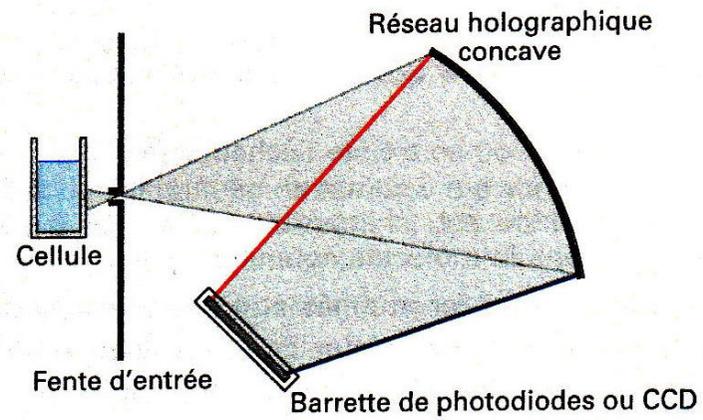
- ◆ 3) Monochromateur et polychromateur

On utilise les deux termes pour distinguer les montages à optique directe (**monochromateur**) et ceux à optique inversée (**polychromateur**).

La figure 9 présente les montages de monochromateurs et polychromateurs :



(a) monochromateur dispersif séquentiel à montage optique direct



(b) polychromateur à montage optique inversé

1/ Quelle est la différence essentielle entre les deux montages en terme de positionnement du compartiment échantillon recevant la (ou les) cuves ?

2/ Comment s'acquiert le spectre dans le cas du montage direct ?

3/ Comment s'effectue le balayage en longueur d'onde dans le cas du montage direct ?

4/ Quelle est la nature du disperseur ?

Les dimensions des réseaux sont de l'ordre de quelques cm, et ils peuvent contenir plusieurs centaines de milliers de sillons.

Pour les appareils à simple faisceau à montage inversé, le disperseur est le plus souvent un réseau holographique concave qui sert de disperseur et de miroir concave projetant le spectre sur les pixels de la barrette de photodiodes ou du CCD.

Chaque pixel « voit » une longueur d'onde, la largeur du pixel conditionnant la bande passante du polychromateur.

Il n'y a pas de pièces mobiles et les dimensions sont plus réduites que celles des montages à optique directe, gage de stabilité et de répétabilité en longueur d'onde.

5/ Lequel des deux montages est le plus rapide pour l'acquisition d'un spectre donné ?

6/ Quelle est la différence pour l'échantillon se trouvant dans la cuve, entre les deux montages, en terme de rayonnement reçu ?

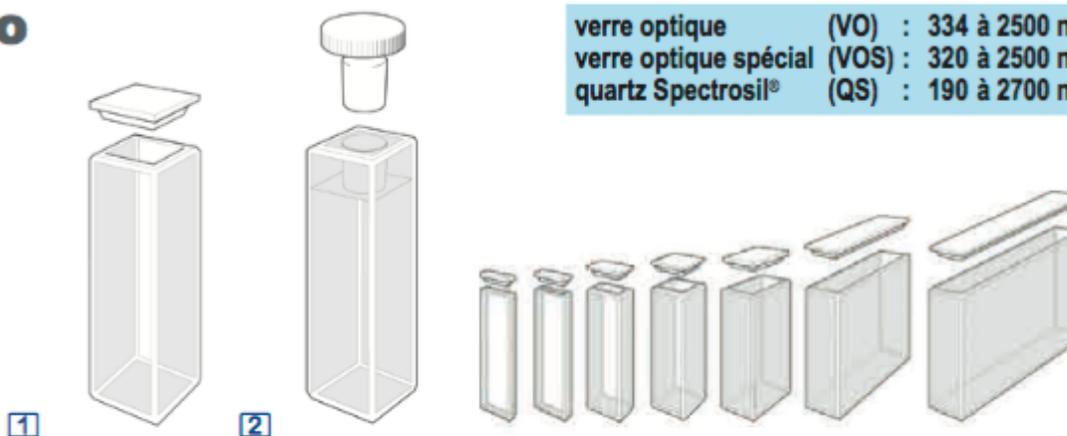
Remarque : dans l'UV, les molécules fragiles (biologiques) pourront être dissociées (ou devenir fluorescentes) si elles reçoivent en permanence tout le rayonnement, ce qui peut faire préférer le montage direct.

◆ 4) Cellules d'absorption

Elles dépendent de l'état physiques des échantillons. Il existe une très grande variété de cellules (et de compartiment où s'installent ces cellules) dont les trajets optiques peuvent aller de quelques micromètres (détecteur HPLC), à quelques centaines de mètres ! (mesure des polluants atmosphériques).

Cuves standard macro

- en verre optique, en verre optique spécial ou en quartz Spectrosil®
- toutes applications : mesures photométriques et colorimétriques
- couvercle ou bouchon en PTFE
- volume de 0,4 à 35 ml
- largeur : 12,5 mm
- hauteur : 45 mm
- livrées en coffret de 2 cuves

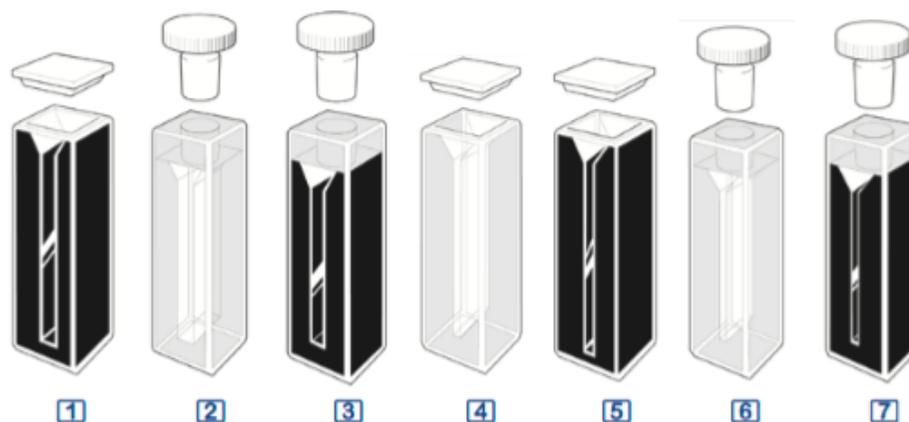


verre optique (VO) : 334 à 2500 nm
 verre optique spécial (VOS) : 320 à 2500 nm
 quartz Spectrosil® (QS) : 190 à 2700 nm

le coffret de 2 cuves			1 cuves spectro avec couvercle en PTFE						2 cuves spectro avec bouchon en PTFE					
			verre optique		verre optique spécial		quartz Spectrosil		verre optique		verre optique spécial		quartz Spectrosil	
trajet optique	longueur fenêtre	volume	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT
1 mm	10 mm	0,4 ml	CS5101		CS5201		CS5301		CS5401		CS5501		CS5601	
2 mm	10 mm	0,7 ml	CS5102		CS5202		CS5302		CS5402		CS5502		CS5602	
5 mm	10 mm	1,7 ml	CS5103		CS5203		CS5303		CS5403		CS5503		CS5603	
10 mm	10 mm	3,5 ml	CS5104		CS5204		CS5304		CS5404		CS5504		CS5604	
20 mm	10 mm	7,0 ml	CS5105		CS5205		CS5305		CS5405		CS5505		CS5605	
40 mm	10 mm	14,0 ml	CS5106		CS5206		CS5306		CS5406		CS5506		CS5606	
50 mm	9,5 mm	17,5 ml	CS5107		CS5207		CS5307		CS5407		CS5507		CS5607	
100 mm	9,5 mm	35,0 ml	CS5108		CS5208		CS5308		CS5408		CS5508		CS5608	

Cuves micro et semi-micro

- en verre optique spécial ou en quartz Spectrosil®
- cuves semi-micro : volume nécessaire inférieur de 50 % par rapport à une cuve standard
- cuves micro : volume nécessaire inférieur de 20 % par rapport à une cuve standard
- cuves de haute précision
- cuves à parois noires : amélioration de la sensibilité et de la linéarité
- couvercle ou bouchon en PTFE
- volume : 0,7 à 7 ml
- dim. cuve TO 10 mm : 12,5 x 12,5 mm
- dim. cuve TO 50 mm : 52,5 x 12,5 mm
- livrées en coffret de 2 cuves



le coffret de 2 cuves			cuves spectro avec couvercle en PTFE				cuves spectro avec bouchon en PTFE			
			verre optique spécial		quartz Spectrosil		verre optique spécial		quartz Spectrosil	
trajet optique	longueur fenêtre	volume	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT	référence	Prix HT
cuves semi-micro										
10 mm	4 mm	1,4 ml	CS5701		CS5901		CS6101 [2]		CS6301	
50 mm	4 mm	7,0 ml	CS5702		CS5902		CS6102		CS6302	
cuves semi-micro à parois noires										
10 mm	4 mm	1,4 ml	CS5703		CS5903 [1]		CS6103 [3]		CS6303	
50 mm	4 mm	7,0 ml	CS5704		CS5904		-		-	
cuves micro										
10 mm	2 mm	0,7 ml	CS5801		CS6001 [4]		CS6201		CS6401 [6]	
50 mm	2 mm	3,5 ml	CS5802		CS6002		CS6202		CS6402	
cuves micro à parois noires										
10 mm	2 mm	0,7 ml	CS5803		CS6003 [5]		CS6203		CS6403 [7]	
50 mm	2 mm	3,5 ml	CS5804		CS6004		-		-	

L'utilisation de fibres optiques (diamètre de quelques centaines de micromètres) permet d'aller faire des mesures in situ.

Les cellules de mesure associées aux fibres optiques peuvent se présenter sous forme cylindrique, comme les électrodes de mesure du pH par exemple. Elles sont plongées directement dans la solution à analyser.

◆ 5) Détecteurs

Le détecteur fournit une tension électrique proportionnelle à l'intensité du rayonnement, qui est ensuite convertie en absorbance ou transmittance via une calibration de l'appareil réalisée par le constructeur.

→ Le détecteur le plus performant est le **photomultiplicateur**, surtout utilisé dans les appareils à montage optique direct. Les taux de lumière parasite peuvent, dans ce cas, être très bas, de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} exprimés en absorbance, ce qui implique que l'on peut mesurer des absorbances de 6 ou 7. Il faut pour cela, des détecteurs ayant des seuils de détection très bas, car pour une absorbance de 6, seul 1 photon sur 1 million de photons incidents arrive au détecteur.

→ Pour les détecteurs multiples, les **barrettes de photodiodes** ont une bonne dynamique (mesure sur une large gamme de concentration) comparée à celle des **détecteurs CCD**, avec un seuil de détection plus élevé (on peut mesurer des absorbances jusqu'à 3 maximum).

Pour des appareils dont les taux de lumière parasite sont faibles (donc susceptibles de mesurer des faibles intensités lumineuses), il vaut mieux utiliser les CCD.

On trouve les deux configurations dans les appareils commerciaux.

◆ 6) Traitement des données

Les spectrophotomètres actuels sont en général pilotés par des ordinateurs équipés de **logiciels** plus ou moins sophistiqués.

◆ Document 3 : Paramètres instrumentaux

Nous allons décrire les paramètres instrumentaux qui interviennent dans les caractéristiques de performances des spectrophotomètres. Ces paramètres conditionnent notamment le domaine spectral, la résolution spectrale, le taux de lumière parasite, et la dynamique de la mesure, c'est-à-dire la gamme de concentrations que l'on peut parcourir sans être obligé de diluer les échantillons concentrés ou de concentrer les échantillons dilués.

◆ 1) Domaine spectral

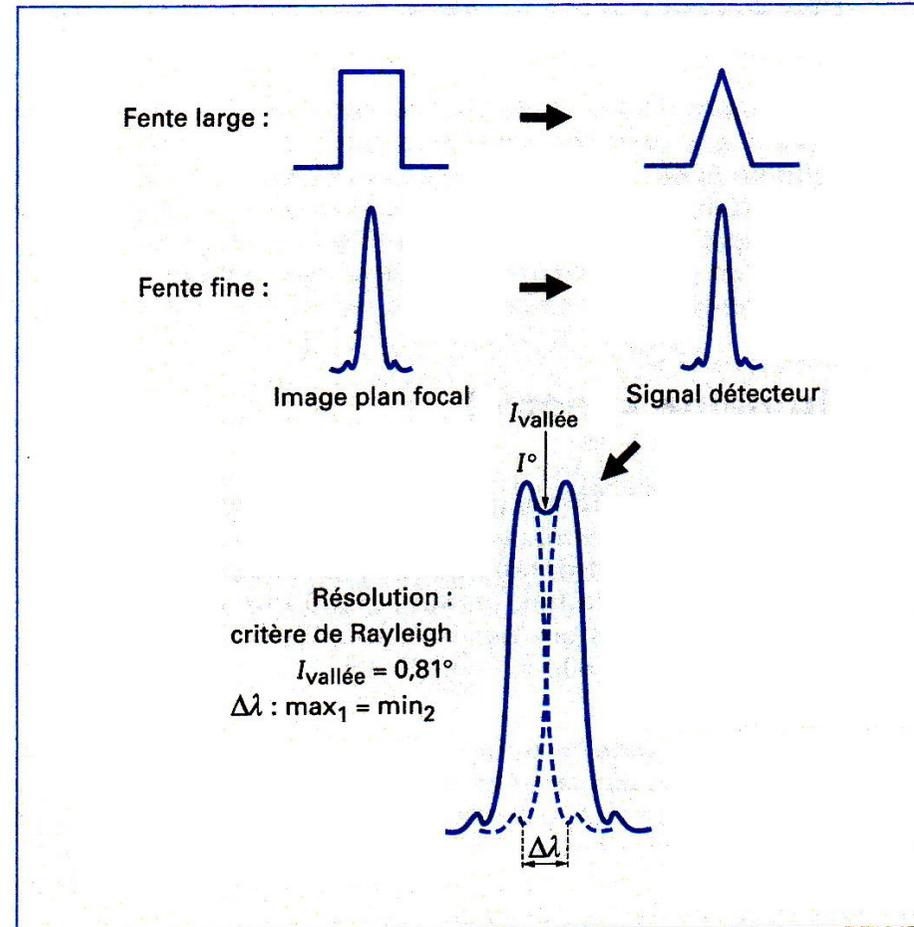
Les spectrophotomètres du domaine UV-Visible, couvrent le domaine de 190 à 800 nm, voir plus.

◆ 2) Résolution des spectrophotomètres

Si on éclaire les monochromateur ou polychromateur par un rayonnement monochromatique (laser), on va obtenir sur la surface du détecteur une image de la fente d'entrée éclairée par le laser.

Si l'on trace l'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde, on va obtenir un triangle de hauteur I^0 et de largeur $\Delta\lambda$.

La largeur du triangle à mi-hauteur $\Delta\lambda/2$ est appelée **bande passante** du monochromateur.



La figure 10 : Effet de la largeur de fente

Quand les fentes ont une largeur quasi-nulle, on pourrait s'attendre à obtenir un signal de largeur quasi-nulle. En réalité, on obtient une figure de diffraction, dont la largeur n'est pas nulle.

On définit la résolution limite par $R = \lambda/\Delta\lambda$

Quelle est l'intérêt d'avoir une résolution élevée (bande passante faible) ?

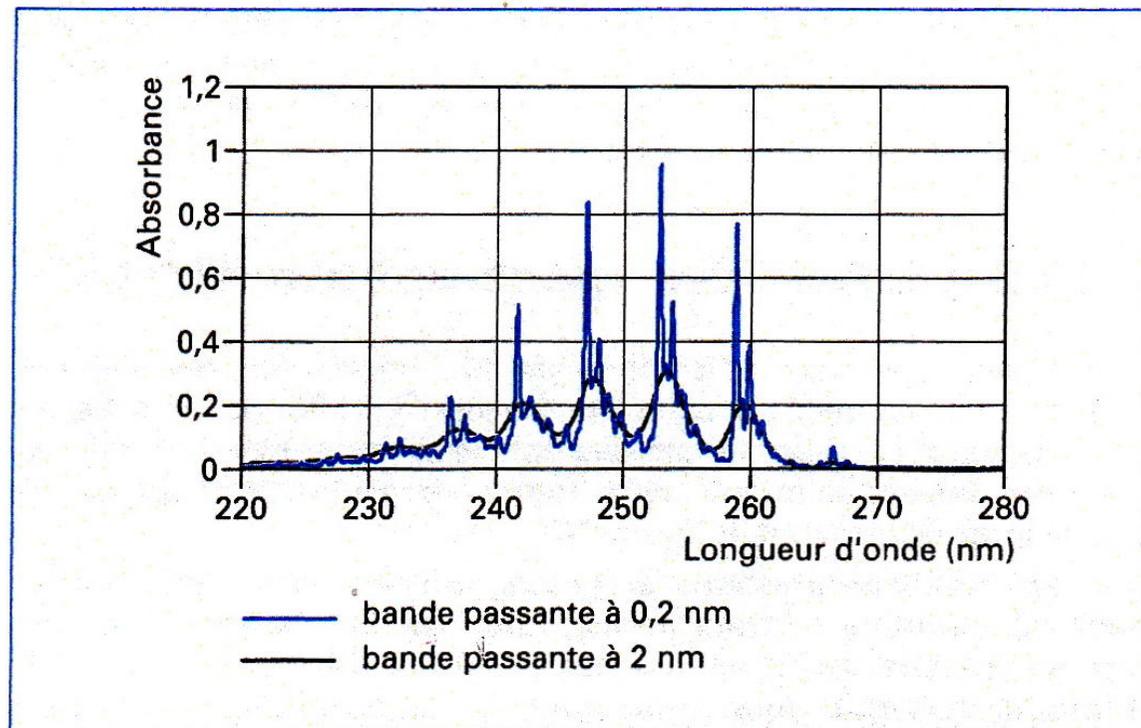


Figure 11 : Effet de la résolution sur l'absorbance du benzène gazeux

1/ Comparer les deux spectres en termes d'absorbance :

2/ Comparer les deux spectres en termes de séparation de raies de longueur d'onde proches :

Remarque : On montre qu'il suffit d'avoir une résolution correspondant à un $\Delta\lambda$ de l'ordre de dix fois plus petit que la largeur de la bande d'absorption étudiée pour que l'effet sur la valeur de l'absorbance soit négligeable

Dans le cas des molécules en solution, dans 99 % des cas, les bandes d'absorption ont une largeur supérieure à 20 nm. Une bande passante de l'ordre de 2 nm est donc suffisante.

◆ 3) Lumière parasite

La lumière parasite peut avoir plusieurs origines. Elle dépend aussi de la technologie utilisée. On peut la définir comme l'intensité du rayonnement parasite I_p qui arrive sur le détecteur superposé au rayonnement d'intensité I_λ , sélectionnée par le monochromateur, ou bien qui arrive sur le pixel qui reçoit I_λ .

La I.o de I_p peut être très différente de I_λ . Cette lumière parasite va intervenir dans la loi de Beer-Lambert et provoquer une courbure (cf figure 5). Une lumière parasite non absorbée telle que :

$I_p = 1 \% I_\lambda$ va limiter l'absorbance à 2, même si la concentration des espèces absorbantes tendait vers l'infini.

$I_p = 0,1 \% I_\lambda$ va limiter l'absorbance à 3, même si la concentration des espèces absorbantes tendait vers l'infini.

- ◆ 4) Dynamique de mesure

Elle peut-être définie comme l'étendue ou le domaine de concentrations qu'il est possible de couvrir pour une analyse avec une seule gamme d'étalonnage et le même trajet optique.

Plus cette dynamique est grande, moins il sera nécessaire d'intervenir sur les échantillons (dilution, extraction etc...) pour un même lot d'échantillons présentant une grande gamme de concentrations.

Pour les **fortes absorbances**, la dynamique est limitée par le taux de **lumière parasite**, et pour les **absorbances faibles**, c'est le bruit qui provoque des fluctuations du signal autour de I_0^λ . Ce bruit appelé **bruit de grenaille** est dû à l'arrivée aléatoire des photons sur le détecteur.

➤ Il existe d'autres paramètres qui interviennent sur les caractéristiques de performance des spectrophotomètres, comme **la répétabilité du positionnement en longueur d'onde**, les variations d'intensité de la source. Ces paramètres peuvent avoir une influence très grande sur la qualité des mesures.

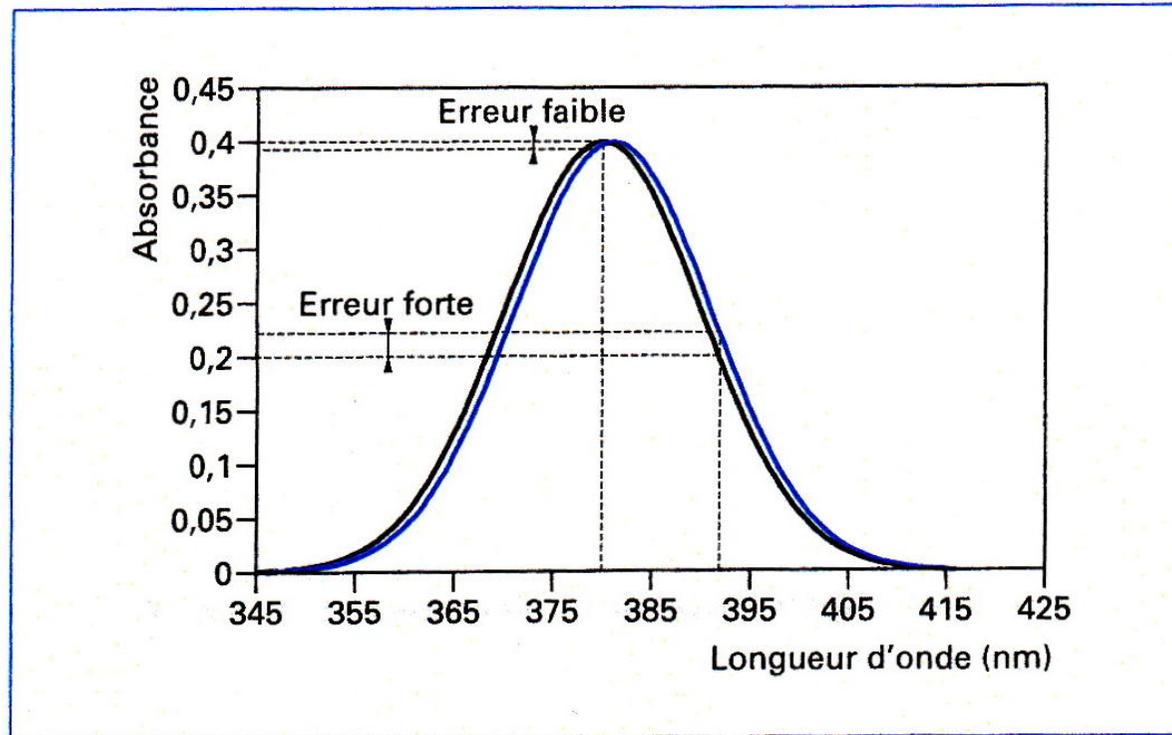


Figure 12 : Variations de l'absorbance avec la répétabilité du positionnement en l.o.

À quelle I.o. vaut-il mieux travailler et pourquoi ?

➤ Les dérives d'intensité de la source n'interviennent que pour les mesures de longue durée, comme les études de cinétique.

◆ Document 4 : Conduite d'une analyse

- ◆ 1) Cas simple ou classique : utilisation d'une seule l.o.

Ce cas s'applique lorsque la bande d'absorption de l'espèce à doser est isolée, et que les facteurs physico-chimiques influents sont absents ou maîtrisés.

La procédure consiste à :

Tracer le spectre d'absorption d'un étalon, par exemple, pour choisir la l.o de travail.

1/ À quel endroit du spectre, cette l.o. doit-elle être choisie et pourquoi ?

On règle ensuite les paramètres instrumentaux : l.o de travail, cuve utilisée, BP du monochromateur (d'autant plus étroite que la bande d'absorption est étroite, en respectant le facteur 1/10), durée d'analyse, nombre de mesurages par échantillon ...

Établir une droite d'étalonnage avec des étalons (au moins 5 incluant le blanc) dont la matrice sera le plus proche possible des échantillons, dans la gamme d'absorbances où la réponse $A = f(C)$ est linéaire.

2/ Que représente la pente de la droite d'étalonnage ?

Mesurer les absorbances données par les échantillons par rapport au blanc.

Déterminer la concentration des échantillons à l'aide de la Loi Beer-Lambert :

$$C_{\text{éch}} = \frac{A_{\lambda \text{ éch}}}{\epsilon_{\lambda} \cdot b}$$

Donner les résultats en faisant figurer l'incertitude élargie. On peut faire une régression linéaire sur les points expérimentaux obtenus pour les étalons, ce qui permet le calcul des écarts-type estimés sur la pente et l'ordonnée à l'origine et donc l'incertitude sur la concentration en choisissant le facteur d'élargissement $k = 2$ en général.

Exemple d'expression de résultats :

$$C = (25,30 \pm 0,20) \text{ mg.L}^{-1} (k = 2)$$

On rappelle que le nombre de décimales doit être cohérent avec l'incertitude mesurée.

- ◆ 2) Cas simple à deux I.o.

On peut étendre le cas simple à la détermination des concentrations de **deux espèces présentes simultanément dans les échantillons**. La procédure est la même que précédemment, mais il faut choisir deux I.o où les espèces absorbent, et tracer deux droites d'étalonnage pour chaque I.o pour obtenir les coefficients d'absorption $\varepsilon_1(\lambda_1)$, $\varepsilon_2(\lambda_1)$, $\varepsilon_1(\lambda_2)$, $\varepsilon_2(\lambda_2)$.

Pour les échantillons, on mesure les deux absorbances $A(\lambda_1)_{\text{éch}}$ et $A(\lambda_2)_{\text{éch}}$ aux I.o λ_1 et λ_2 . On dispose alors de deux équations à deux inconnues de concentrations $C_1 \text{ éch}$ et $C_2 \text{ éch}$:

$$A(\lambda_1)_{\text{éch}} = \varepsilon_1(\lambda_1).C_1 \text{ éch} + \varepsilon_2(\lambda_1). C_2 \text{ éch}$$

et

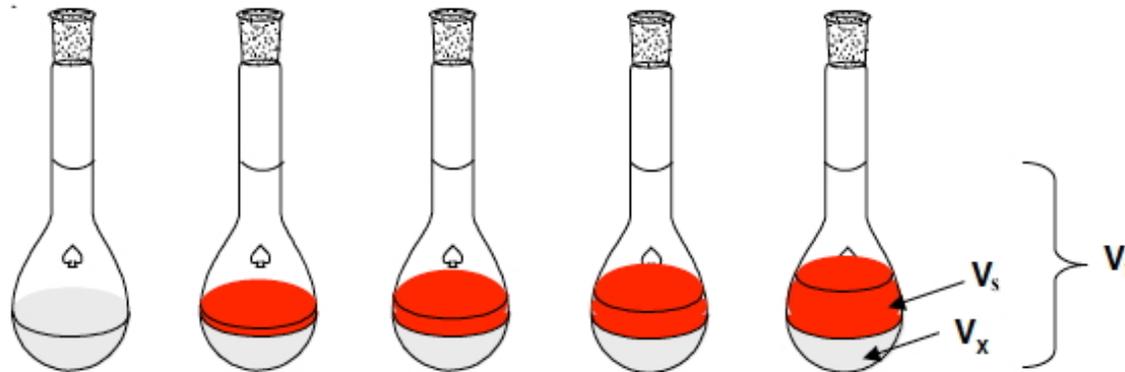
$$A(\lambda_2)_{\text{éch}} = \varepsilon_1(\lambda_2).C_1 \text{ éch} + \varepsilon_2(\lambda_2). C_2 \text{ éch}$$

3) Méthode des additions connues

Lorsqu'il est difficile de reconstituer la matrice des échantillons pour réaliser les étalons, on peut utiliser la méthode des ajouts dosés :

⇒ Elle consiste à ajouter des quantités connues d'une solution étalon à des prélèvements identiques d'échantillon. Chaque solution est ensuite diluée jusqu'à un volume donné avant de mesurer son absorbance.

Cette méthode permet de savoir si l'espèce dosée se comporte de la même manière dans le milieu d'analyse et dans la gamme.



⇒ Supposons que plusieurs prélèvements identiques V_x de solution inconnue de concentration C_x soient transférés dans des fioles jaugées de volume V_t .

⇒ À chacune de ces fioles, on ajoute un volume variable V_S de solution étalon de l'analyte de concentration C_S . On ajoute ensuite éventuellement les réactifs qui développent la couleur et chaque solution est diluée jusqu'au trait de jauge.

1/ La loi de Beer est respectée, Donner l'expression de l'absorbance A des solutions, et simplifier l'expression en posant $k = \epsilon \cdot b / V_t$:

⇒ Un graphique de $A = f(V_S)$ doit donner une droite de la forme : $A = mV_S + p$

avec $m = kC_S$, pente de la droite et $p = kV_xC_x$ ordonnée à l'origine.

⇒ Une analyse des moindres carrés peut être utilisée pour déterminer m et p ; on détermine C_x à partir du rapport p/m .

2/ Donner l'expression de C_x en fonction du rapport p/m , de C_S et de V_x :

⇒ On peut obtenir une valeur approchée de l'écart-type sur C_x en admettant que les incertitudes sur C_s , V_x sont négligeables par rapport à celles sur m et p .

Dès lors, on admet que la variance relative du résultat $(S_C/C_x)^2$ est la somme des variances relatives sur m et p :

$$\left(\frac{S_{C_x}}{C_x}\right)^2 = \left(\frac{S_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{S_p}{p}\right)^2 \quad \Rightarrow \quad S_{C_x} = C_x \cdot \sqrt{\left(\frac{S_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{S_p}{p}\right)^2}$$

Remarque : si l'on, veut épargner du temps ou de l'échantillon, il est possible d'effectuer une analyse d'addition connue en n'utilisant que deux prélèvements d'échantillon. Dans ce cas, on ne fait qu'une seule addition connue V_S d'étalon à l'un des deux échantillons.

Dès lors,

$$A_1 = \frac{\varepsilon \cdot b \cdot V_x \cdot C_x}{V_t}$$

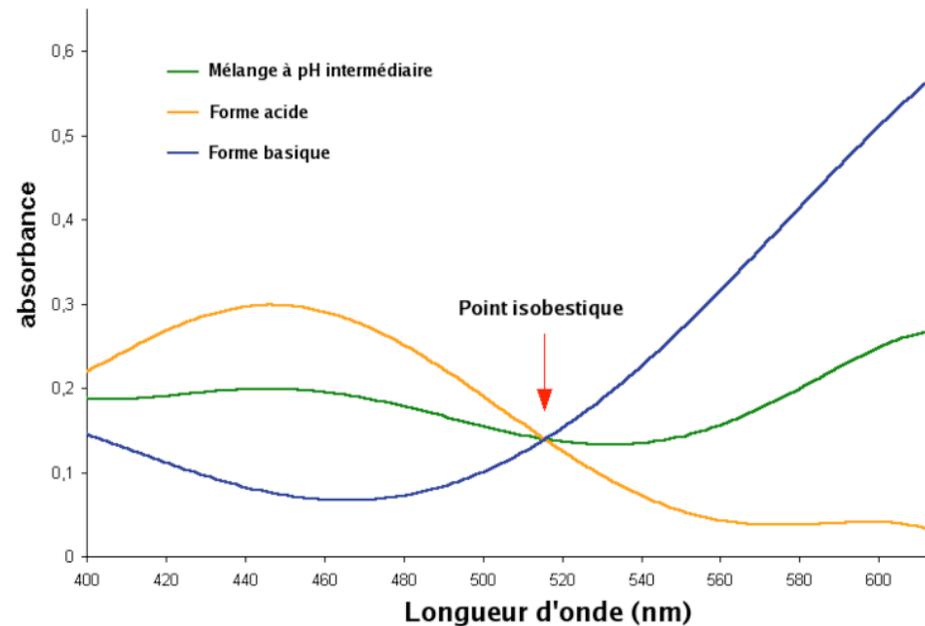
$$A_2 = \frac{\varepsilon \cdot b \cdot V_S \cdot C_S}{V_t} + \frac{\varepsilon \cdot b \cdot V_x \cdot C_x}{V_t}$$

Où A_1 et A_2 sont respectivement les absorbances de l'échantillon dilué et de l'échantillon dilué avec étalon.

3/ Diviser la seconde équation par la première, et donner une expression de C_x :

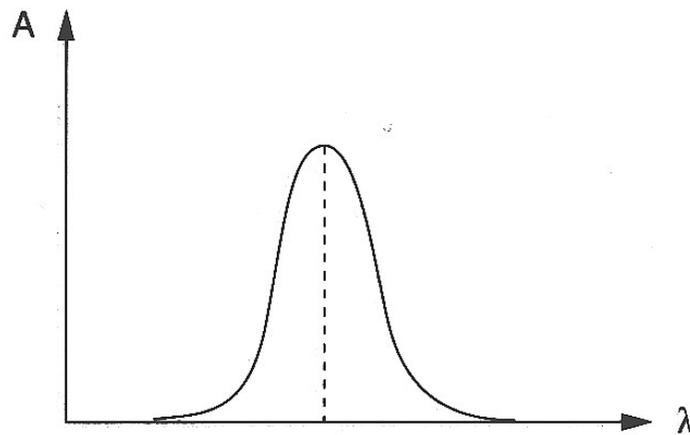
4) Détermination du point isobestique

- ⇒ Les espèces chimiques peuvent changer d'ionisation en fonction du pH.
- ⇒ Un **point isobestique** se trouve à une **l.o spécifique** pour laquelle deux (ou plus) espèces chimiques possèdent le **même coefficient d'absorption molaire**
- ⇒ Ce point représente des coordonnées (λ , ε) sur un **diagramme isobestique** pour lesquelles le **spectre d'absorption** de 2 espèces se croisent.



5) La spectrophotométrie dérivée

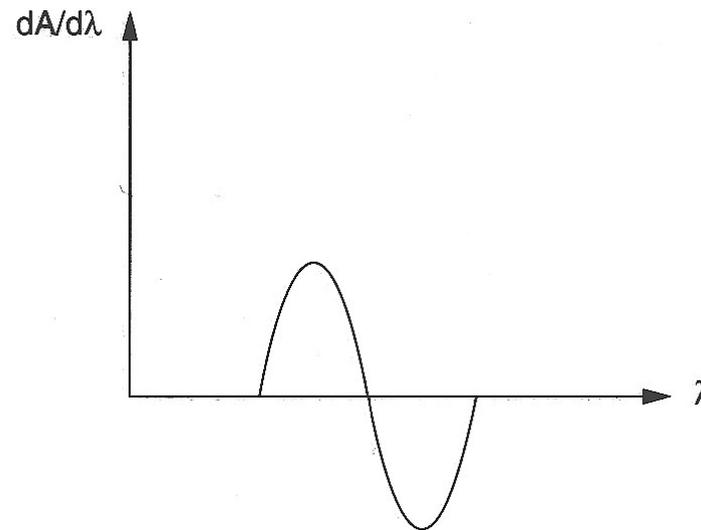
- ⇒ Elle consiste à transformer le spectre d'absorption (ordre 0) en spectre dérivée 1^{ère}, 2^{nde}, ...
- ⇒ Avec cette méthodologie, des différences presque imperceptibles sur le spectre original peuvent être mises en évidence.



Spectre d'ordre zéro
 $A = f(\lambda)$

■ Spectres dérivés.

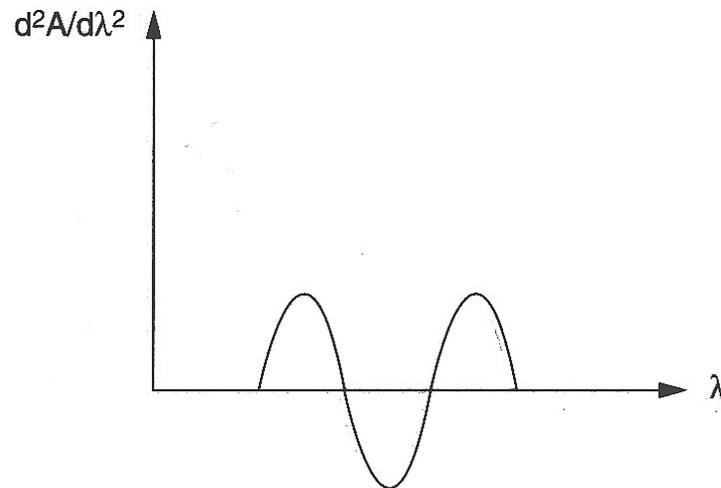
⇒ Le spectre de dérivée 1^{ère} représente la pente du spectre original en chacun de ses points, c.a.d qu'il consiste en l'enregistrement du gradient $dA/d\lambda = f(\lambda)$.



Spectre d'ordre un
 $dA/d\lambda = f'(\lambda)$

Q/ Montrer que $dA/d\lambda$ reste proportionnelle à la concentration en dérivant la loi de Beer-Lambert :

■ Spectres dérivés.



Spectre d'ordre deux
 $d^2A/d\lambda^2 = f''(\lambda)$

Elle présente les avantages suivants :

- ⇒ l'obtention **d'une meilleure résolution du spectre** : elle permet la détermination des l.o maximales d'absorption lorsque la bande d'absorption est large.
- ⇒ La résolution d'une **analyse quantitative** en présence de **milieux troubles**
- ⇒ Des possibilités supérieures d'**analyse quantitative de mélanges**

◆ Document 5 : Domaines d'application

◆ 1) Quelques exemples

La spectrophotométrie est utilisée dans de nombreux domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie, etc...

Aussi bien au laboratoire que sur site industriel. Les possibilités apportées par l'analyse multi variable permettant l'analyse de plusieurs constituants, en limitant les phénomènes d'interférences spectrales ou physico-chimiques, ont ouvert de nouvelles utilisations, notamment pour l'analyse industrielle.

Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux tests de dissolution de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie UV-Visible. Il en est de même pour l'industrie agro-alimentaire.

- ◆ 2) Applications particulières, couplages

- **Les analyses en ligne, notamment l'analyse des gaz** dont beaucoup ont des spectres d'absorption en UV. L'analyse de l'ozone dans l'air ambiant est réalisée par absorption UV avec des analyseurs installés dans les réseaux de mesure de la pollution atmosphérique.

Citons encore les spectrophotomètres qui peuvent mesurer des polluants atmosphériques (SO₂, NO, NO₂, O₃, benzène, toluène, etc...) sur des trajets ouverts de plusieurs centaines de mètres dans l'air ambiant, mais aussi dans les cheminées industrielles.

- **Les spectrophotomètres équipés de fibres optiques** vont permettre des mesures déportées dans des réacteurs ou des canalisations, ou même dans les milieux naturels comme les eaux souterraines.

- **Les spectrophotomètres peuvent servir de détecteur** pour d'autres techniques analytiques comme l'HPLC. Ce sont généralement des appareils à barrettes de photodiodes bien adaptés à ce type de détection : les espèces séparées par la colonne chromatographie passent individuellement devant le détecteur qui peut acquérir le spectre complet pendant le temps de passage du constituant.