

La spectroscopie d'absorption moléculaire

ligodin@free.fr

<http://ligodin.free.fr>

INTRODUCTION

La spectroscopie moléculaire dans l'UV, le visible et l'IR est largement utilisée pour **l'identification** et le **dosage** d'innombrables espèces inorganiques et organiques.

La spectroscopie d'absorption UV-Visible est surtout employée en **analyse quantitative**.

La spectroscopie d'absorption IR est l'un des outils les plus puissants qui permettent de déterminer la **structure de composés** inorganiques et organiques. Elle joue également un rôle important en analyse quantitative, particulièrement dans le domaine des polluants environnementaux.

I - Les espèces absorbantes

1) Absorption par les composés organiques

1/ L'absorption du rayonnement par les molécules organiques dans le domaine de l.o compris entre 180 et 800 nm résulte des interactions entre quelles particules ?

⇒ Les l.o d'absorption d'une molécule organique dépendent de l'énergie de liaison de ses différents e⁻. Les e⁻ qui forment des liaisons simples C-C ou C-H sont si fortement liés que leur excitation nécessite une énergie correspondant à l'UV lointain (< 180 nm).

2/ Les spectres des liaisons simples ne sont guère exploités en raison des difficultés expérimentales inhérentes à ce domaine. Chercher le domaine d'absorption du quartz et de l'atmosphère pour compléter cette affirmation :

2) Les chromophores

Les e^- impliqués dans les liaisons doubles ou triples des molécules organiques ne sont pas aussi fortement liés et sont donc plus facilement excitables par le rayonnement ; c'est ainsi que **les espèces qui possèdent des liaisons insaturées** présentent généralement des **pics d'absorption utilisables**.

Les groupements fonctionnels organiques insaturés qui absorbent dans l'UV et le visible sont appelés des **chromophores**.

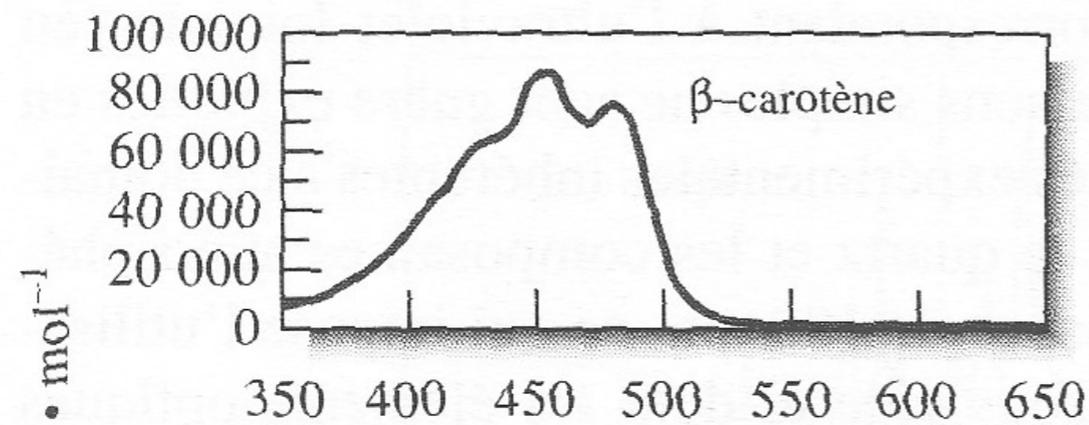
⇒ On donne sur la diapositive suivante un tableau présentant quelques valeurs de position et d'intensité de pics.

1/ Par quelles grandeurs sont caractérisées la position et l'intensité d'un pic ?

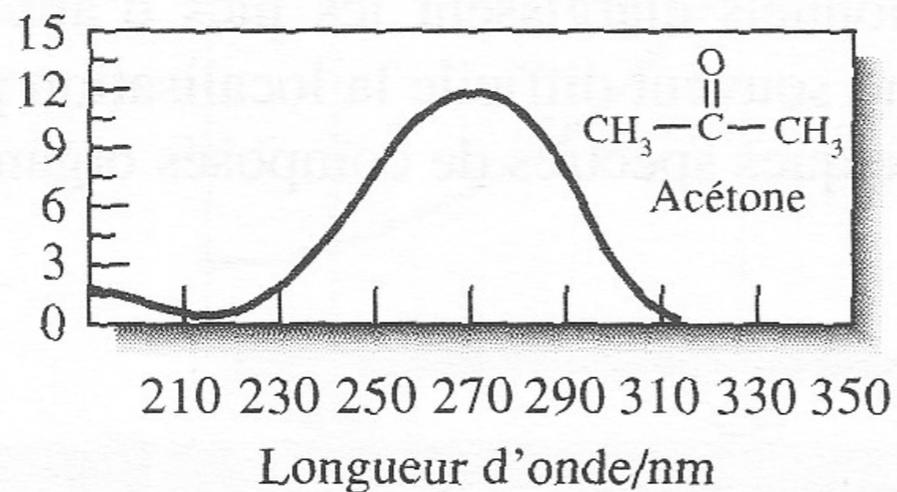
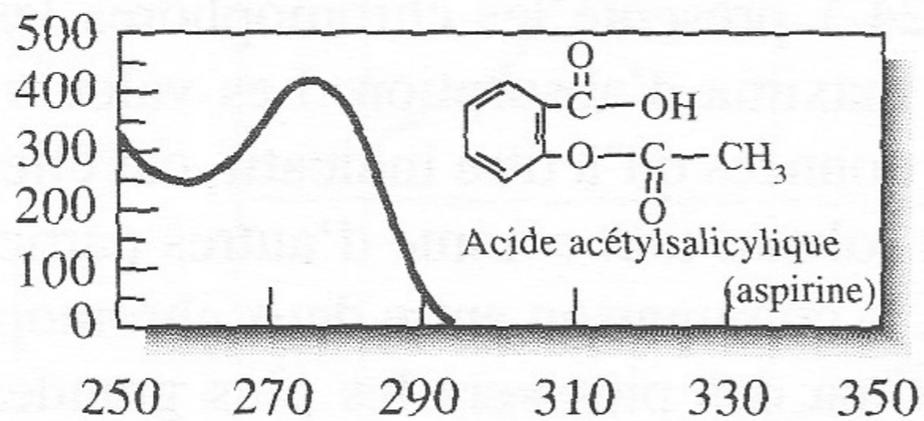
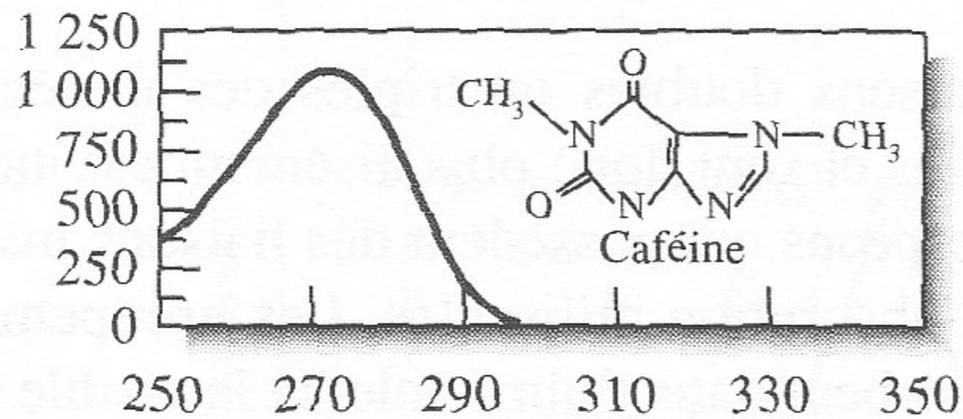
2/ Par quoi sont influencées La position et l'intensité d'un pic ?

Caractéristiques d'absorption de quelques chromophores organiques courants

Chromophore	Exemple	Solvant	λ_{\max}/nm	$\epsilon_{\max}/\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Alcène	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	177	13 000
Alcène conjugué	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	217	21 000
Alcyne	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	<i>n</i> -heptane	178	10 000
			196	2000
			225	160
Carbonyle	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	<i>n</i> -hexane	186	1000
			280	16
	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	<i>n</i> -hexane	180	grand
			293	12
Carboxyle	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	éthanol	204	41
Amido	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	eau	214	60
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	éthanol	339	5
Nitro	CH_3NO_2	iso-octane	280	22
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	éther éthylique	300	100
			665	20
Nitrate	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	dioxanne	270	12
Aromatique	Benzène	<i>n</i> -hexane	204	7900
			256	200



3/ Quel impact à la conjugaison entre 2 chromophores ou plus ?



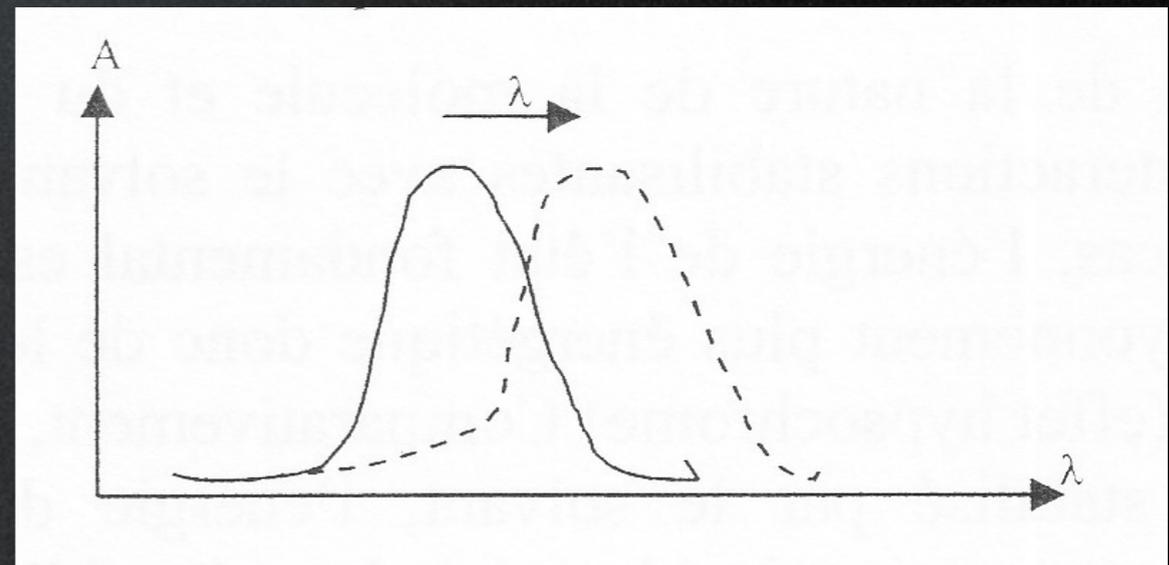
Exemples de spectres de composés organiques.

4/ Définir le terme auxochrome :

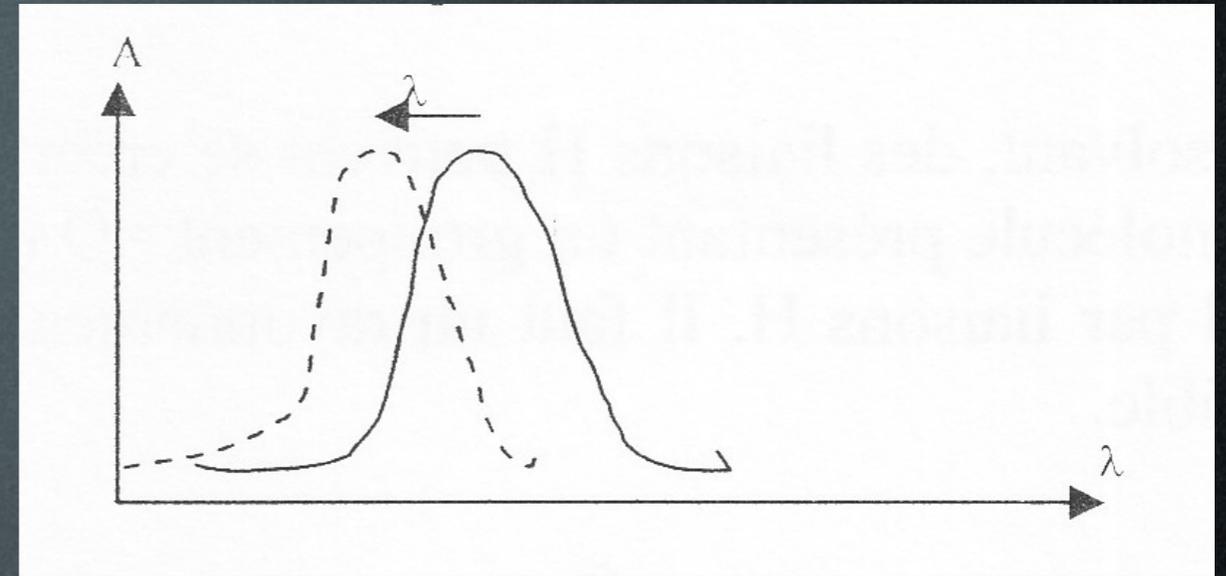
2.1 Description des variations des chromophores

Les termes suivants servent à décrire les changements observés au niveau des λ_{\max} et ϵ_{\max} .

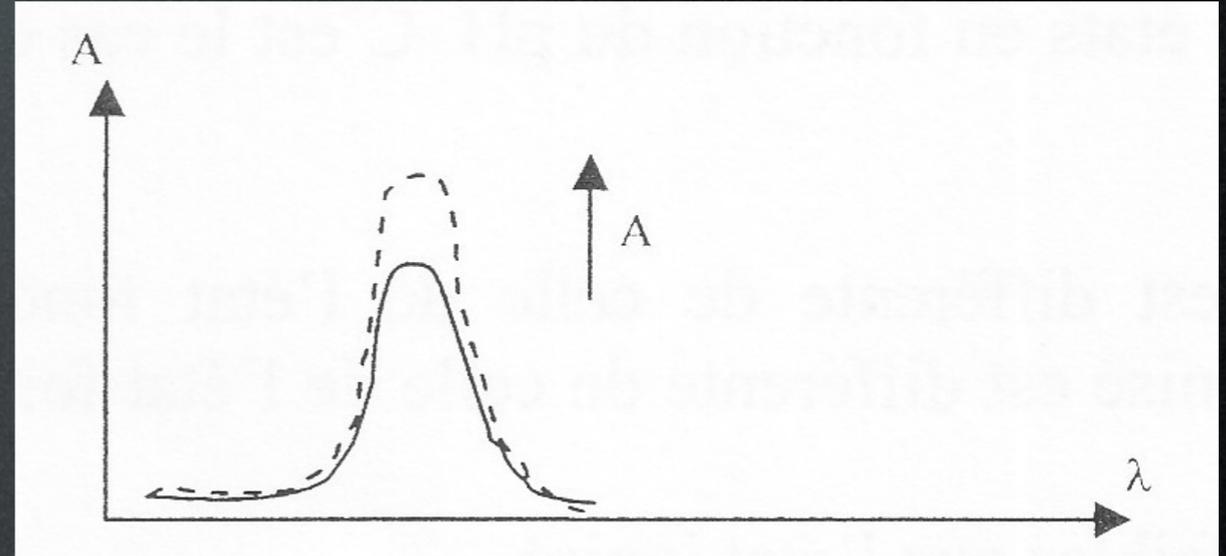
1/ Définir l'**effet bathochrome** (red shift) :



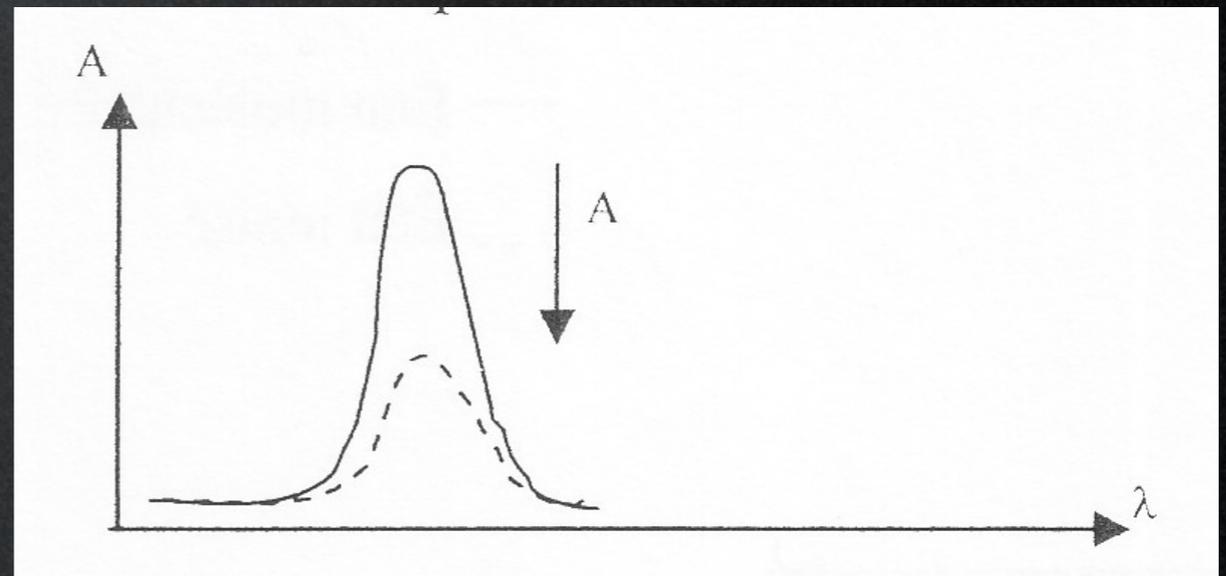
2/ Définir l'**effet hypsochrome** (blue shift) :



3/ Définir l'**effet hyperchrome** (effet quantitatif) :



4/ Définir l'**effet hypochrome** (effet quantitatif) :



2.2 Facteur modifiant l'absorption des chromophores : la conjugaison

Le tableau montre que la présence d'un seul chromophore n'amène pas obligatoirement l'apparition de bandes dans le visible voire dans l'UV proche (400-200 nm) (excepté pour l'alcène conjuguée) lorsque dans une même molécule coexistent 2 chromophores isolés, on constate que les caractéristiques d'absorption participent d'un simple effet d'additivité.

Caractéristiques d'absorption de quelques chromophores organiques courants				
Chromophore	Exemple	Solvant	λ_{\max}/nm	$\epsilon_{\max}/\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Alcène	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	177	13 000
Alcène conjugué	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -heptane	217	21 000
Alcyne	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	<i>n</i> -heptane	178	10 000
			196	2000
			225	160
Carbonyle	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	<i>n</i> -hexane	186	1000
			280	16
	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	<i>n</i> -hexane	180	grand
			293	12
Carboxyle	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	éthanol	204	41
Amido	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	eau	214	60
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	éthanol	339	5
Nitro	CH_3NO_2	iso-octane	280	22
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	éther éthylique	300	100
			665	20
Nitrate	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	dioxanne	270	12
Aromatique	Benzène	<i>n</i> -hexane	204	7900
			256	200

⇒ Le voisinage de 2 ou plusieurs chromophores conduit à un rapprochement des niveaux électroniques : **on dit qu'il y a conjugaison.**

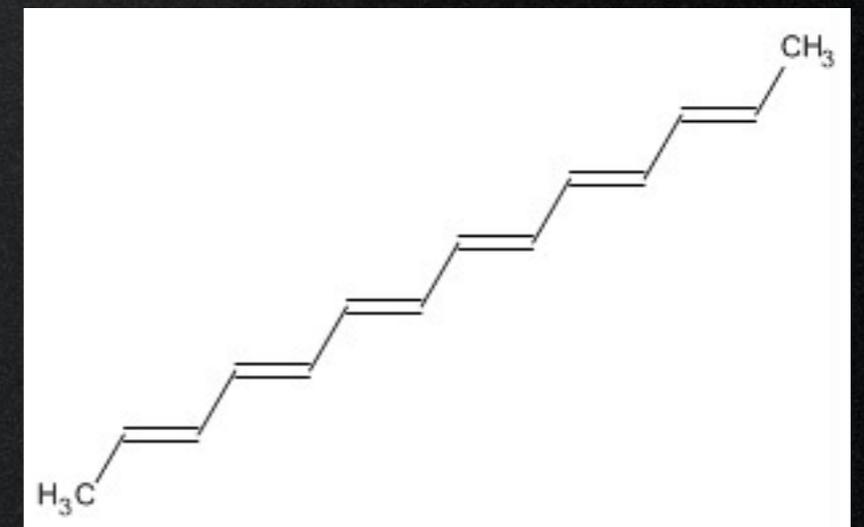
1/ Donner la longueur d'onde d'absorption maximale pour le buta-1,3-diène. Que dire de celle de l'éthylène ?

1,3-Butadiene

- Formule: C_4H_6
- Poids moléculaire: 54.09
- Structure Chimique:



2/ Dans quel domaine de longueur d'onde absorbe le tétradécahex-2,4,6,8,10,12-ène ?



2.3 Facteur modifiant l'absorption des chromophores : la solvatochromie

⇒ La **solvatochromie** est la variation de l'absorption due aux interactions du chromophore avec le solvant. En effet, le solvant crée des interactions avec la molécule ; un changement de solvant va provoquer un changement de l'absorption.
1/ Indiquer les 2 grands types d'interactions solvant-molécule responsable de ce phénomène :

➤ les interactions dipôle-dipôle :

Ces interactions dépendent de la nature de la molécule et du solvant. Certaines molécules peuvent créer des interactions stabilisantes avec le solvant quand elles sont à l'état fondamental.

2/ Dans ce cas, l'énergie de l'état fondamental est plus faible puisque stabilisé ; faudra-t-il apporter plus ou moins d'énergie pour avoir une transition ?

3/ Comparativement, si l'état fondamental de la molécule n'est plus stabilisé par le solvant, l'énergie de l'état fondamental est plus élevée ; Comment doit-être l'énergie du rayonnement incident ?

➤ Les liaisons H

4/ De telles liaisons peuvent se créer entre quels atomes de la molécule et du solvant ?

⇒ Par exemple, une molécule présentant un groupement =O (ester, cétone, ...) est stabilisée à l'état fondamental par liaison H. Il faut un rayonnement plus énergétique donc de 1.0 plus faible.

Inversement, certaines molécules créent des interactions stabilisantes quand elles st à l'état excité. Dans ce cas, l'état excité est stabilisé et l'énergie à apporter pour avoir une transition est moindre.

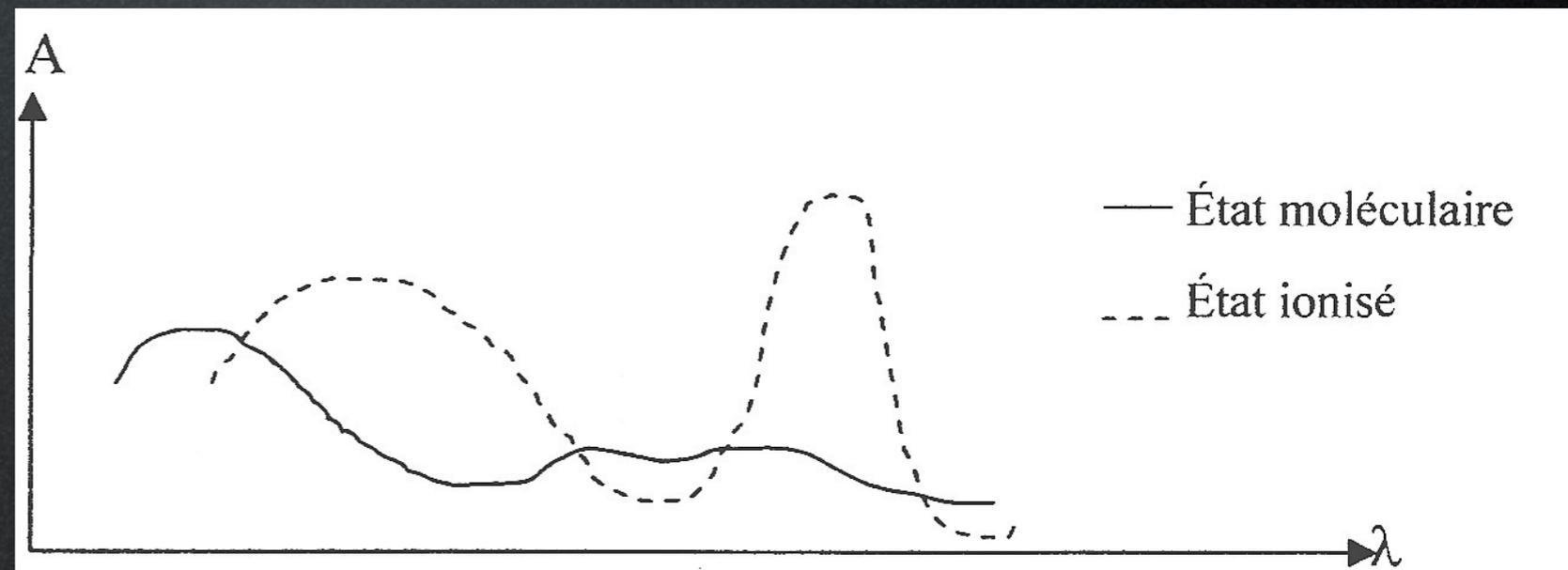
2.4 Facteur modifiant l'absorption des chromophores : le pH

⇒ De nombreuses molécules possèdent un groupement ionisable. Un groupement ionisable “change d'état” en fonction du pH et de son pK.

Une molécule possédant plusieurs groupements ionisables présentera différents états en fonction du pH. C'est le cas des acides aminés et par extension des protéines.

⇒ La structure électronique de l'état ionisé est différente de celle de l'état fondamental d'absorption.

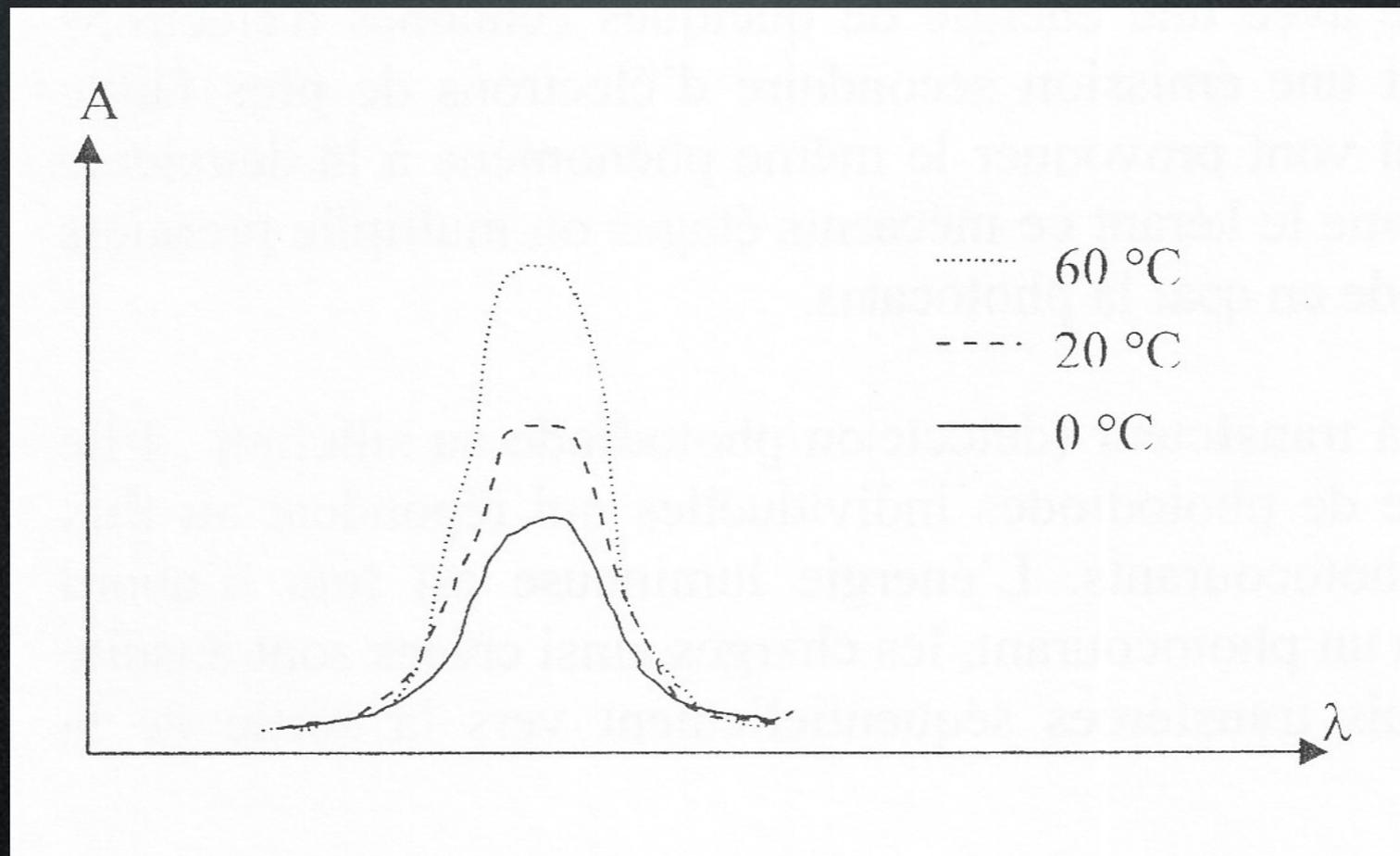
Q/ Que dire de l'état fondamental par rapport à l'état ionisé ?



2.5 Facteur modifiant l'absorption des chromophores : la température

⇒ La température intervient dans l'orientation des groupements chromophores. En ↗ la température, les bases deviennent désordonnées et les transitions sont plus nombreuses : l'absorbance est plus forte.

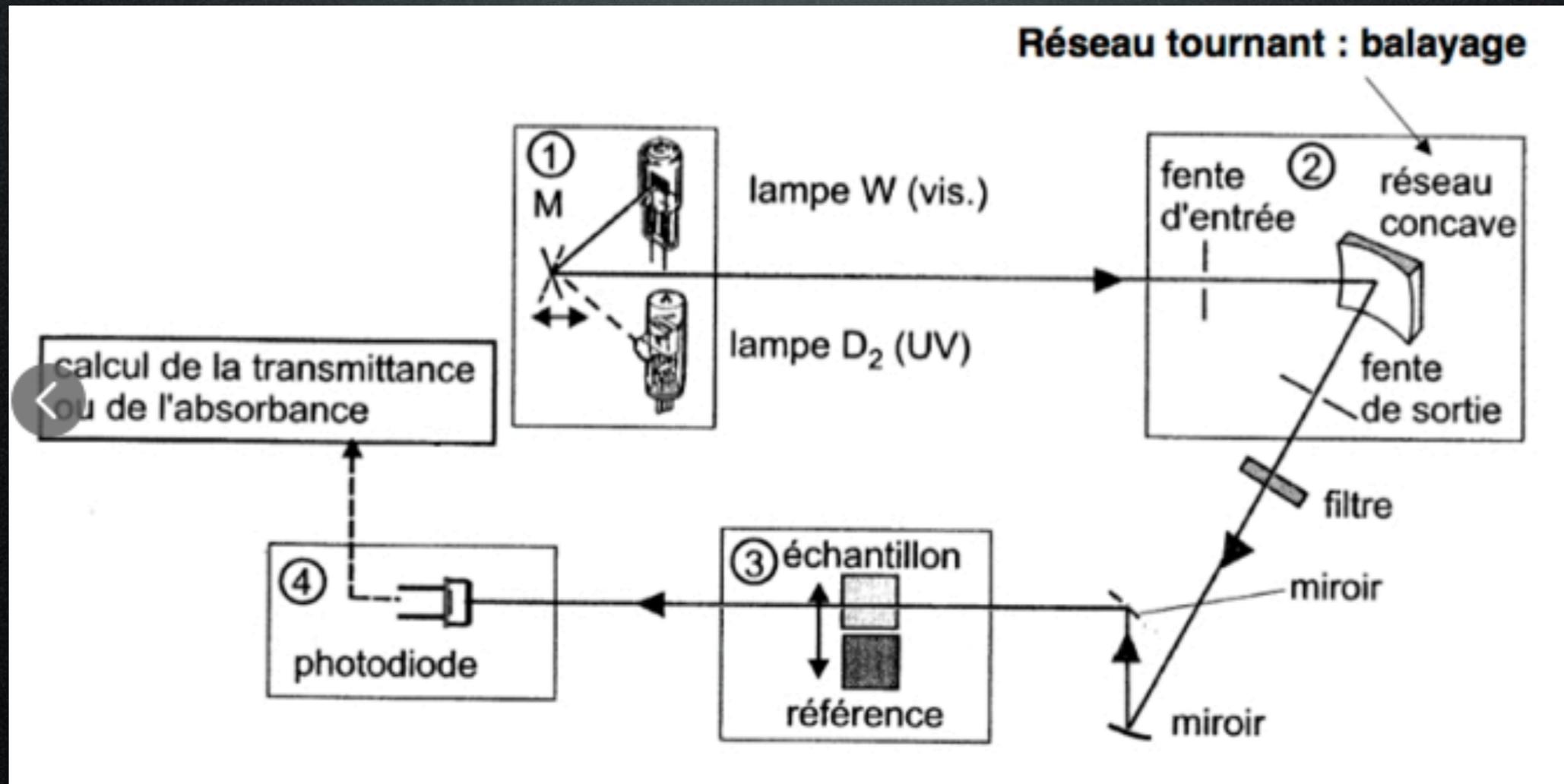
Q/ Quel effet provoque une augmentation de la température ?



II - Les appareils de mesure

1) Appareils mono-faisceau

Le document ci-dessous montre un spectrophotomètre mono-faisceau, le Libra S12 :

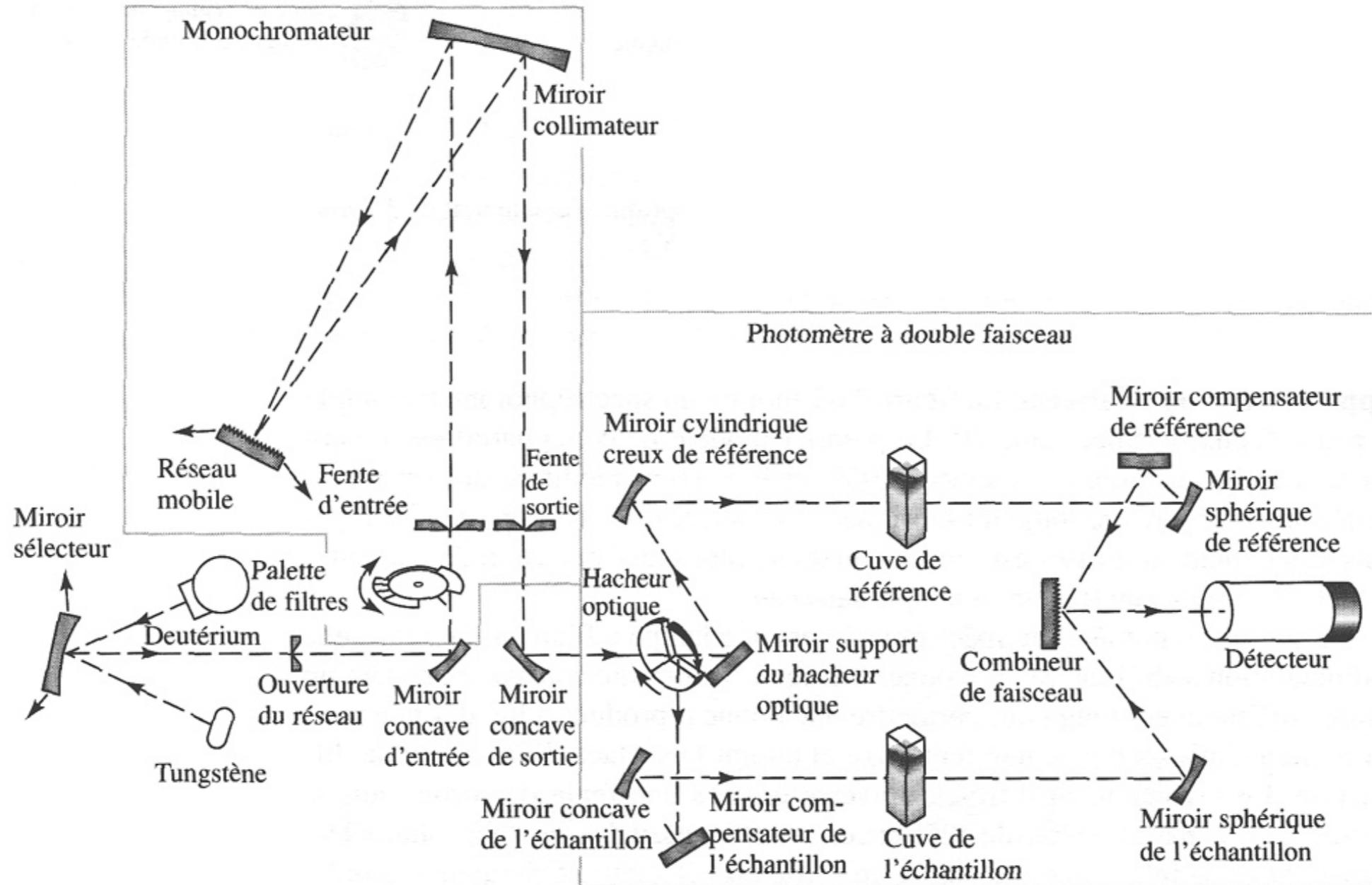


1/ Quelle type de source est utilisée (dans le visible, dans l'UV) ?

2/ Comment nomme-t-on le compartiment 2 et quel est son rôle ?

⇒ Le rayonnement diffracté après avoir traversé la fente de sortie, puis la cuve de l'échantillon ou de référence, atteint le détecteur (ici une photodiode). Après amplification, le signal de sortie du détecteur est affiché en transmittance ou en absorbance.

2) Appareils double faisceaux



Un spectrophotomètre enregistreur à double faisceau pour l'ultraviolet et le visible ; modèle Perkin-Elmer. (Document de *Coleman Instruments Division*, Oak Brook, IL 50421.)

1/ Indiquer les 3 éléments essentiels du spectrophotomètre ?

2/ Le diviseur de faisceau est un disque tournant ou hacheur (chopper en anglais) entraîné par un moteur. Ce disque est divisé en 3 secteurs, l'un transparent, le 2nd réfléchissant et le 3^{ème} opaque.

A quoi servent chacun de ces secteurs ?

3) Appareils multicanaux

Les spectrophotomètres multicanaux, ou à barrette de diodes, sont des produits de la technologie optoélectronique moderne qui permettent d'enregistrer rapidement un spectre UV ou visible complet.

La figure ci-après donne un schéma du système optique d'un spectrophotomètre multicanaux UV-Visible :

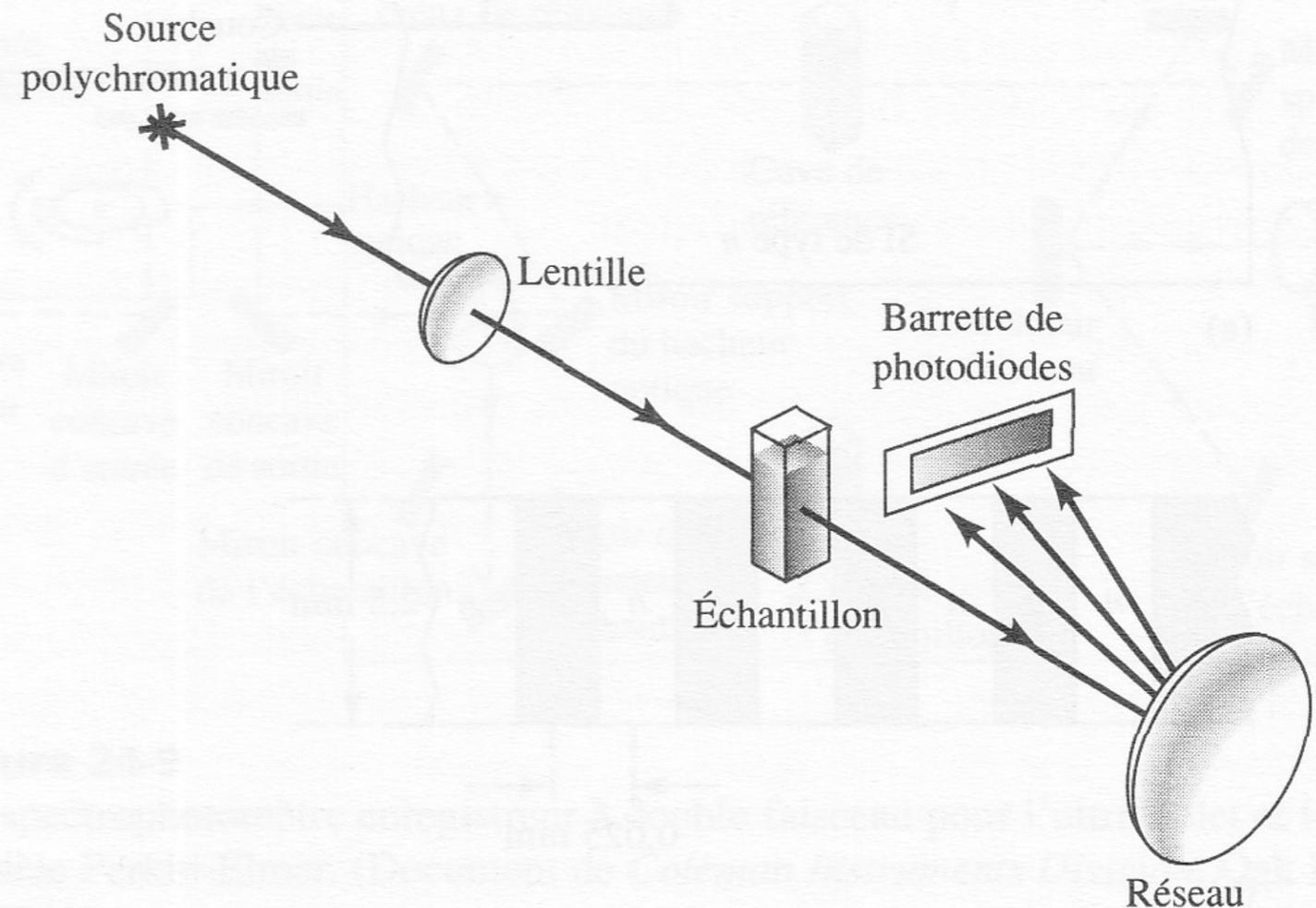


Schéma d'un spectrophotomètre multicanal équipé d'un réseau et d'un détecteur à photodiodes.

⇒ Après avoir traversé le blanc ou la solution d'analyte, le rayonnement est focalisé sur une fente d'entrée et atteint la surface d'un réseau réfléchissant. Le détecteur est une barrette de diode.

Q/ Quelles sont les différences avec un spectrophotomètre monocanal ?

III - Applications quantitatives

⇒ La spectroscopie d'absorption UV-Visible est un des outils les plus utilisés par les chimistes en analyse quantitative. Les caractéristiques les plus importantes des méthodes spectrophotométriques sont les suivantes :

① Un vaste champ d'application :

Un très grand nombre d'espèces inorganiques, organiques et biochimiques absorbent le rayonnement UV ou visible et peuvent donc faire l'objet d'une analyse quantitative directe. De nombreuses espèces non absorbantes peuvent également être dosés après transformation chimique en composés absorbants.

② Une grande sensibilité :

Les limites de détection en spectroscopie d'absorption sont comprises entre 10^{-4} et 10^{-5} mol.L⁻¹. Ce domaine peut s'étendre jusqu'à 10^{-7} mol.L⁻¹ en modifiant certaines procédures.

③ Une sélectivité moyenne à grande :

Si l'on trouve une l.o où l'analyte est le seul absorbant, il n'est pas nécessaire d'effectuer de séparation préliminaire. De plus, lorsqu'il y a recouvrement de bandes d'absorption, des mesures complémentaires à d'autres l.o éliminent parfois la nécessité d'une étape de séparation préalable.

④ Une bonne exactitude :

Lors d'un dosage, les erreurs relatives sur la concentration sont généralement de l'ordre de 1 à 5 %. Elles peuvent être réduite à quelques dixièmes de % en prenant des précautions particulières.

⑤ La facilité de mise en oeuvre

1) Application aux espèces absorbantes

⇒ Le dosage spectrophotométrique de composés organiques contenant un ou plusieurs groupements chromophores est réalisable ; de nombreuses applications de ce type sont décrites dans la littérature.

⇒ Beaucoup d'espèces inorganiques sont aussi absorbantes. Plusieurs autres espèces, telles que les ions nitrite, nitrate et chromate, les oxydes d'azote, l'ozone et les halogènes sous forme de corps simples, présentent des pics d'absorption caractéristiques.

2) Application aux espèces non absorbantes

⇒ De nombreux analytes non absorbants peuvent être dosés par photométrie si on les fait réagir avec des réactifs chromophores pour former des produits absorbants dans l'UV ou le visible.

⇒ On utilise par exemple, la méthode du Biuret pour les protéines ou encore on effectue un couplage de réactions (NAD^+/NADH).

Pour que ce dosage soit quantitatif, il faut que la réaction entre l'analyte et le réactif soit totale.

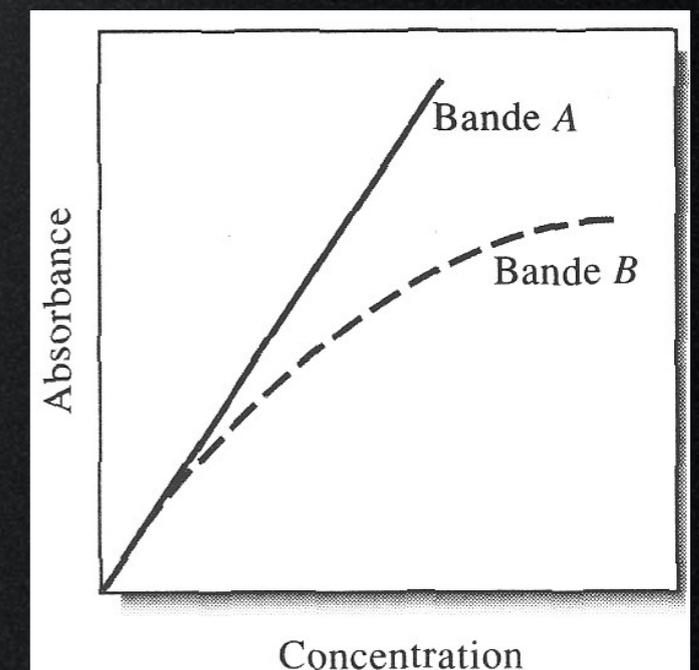
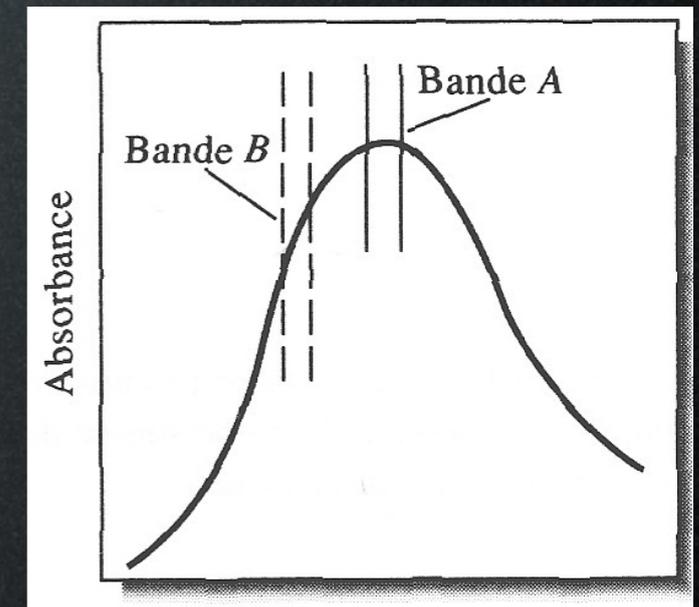
3) Détails expérimentaux

⇒ La première étape d'une analyse spectrophotométrique consiste à déterminer les conditions qui conduisent à une relation satisfaisante (linéaire de préférence) entre l'absorbance et la concentration de l'analyte.

3.1 Choix de la l.o

⇒ Pour obtenir un maximum de sensibilité, les mesures d'absorbance s'effectuent habituellement à la l.o d'un pic d'absorption parce que la variation d'absorbance par unité de concentration y est la plus grande.

⇒ De plus, le maximum de la courbe d'absorption est souvent aplati, ce qui limite les écarts à la loi de Beer et réduit les incertitudes liées à la difficulté de reproduire exactement la même l.o.



3.2 Paramètres qui influencent l'absorbance

⇒ Les paramètres qui peuvent agir sur le spectre d'absorption d'une substance comprennent la nature du solvant, le pH, la température, la concentration en électrolyte et la présence de substances interférentes.

⇒ Les effets de ces paramètres doivent être connus et les conditions de l'analyse choisies pour que l'absorbance ne soit pas affectée par de petites variations incontrôlées de leur valeur.

3.3 Nettoyage et manipulation des cellules ou cuves

⇒ Les porte-échantillons, qui sont usuellement appelés **cellules ou cuves** doivent être fabriquées dans un matériau transparent au domaine spectral étudié.

⇒ Le quartz ou la silice fondue doivent être employés dans l'UV (en dessous de 350 nm) et peuvent être utilisés dans le visible, et dans l'IR jusqu'à environ 3000 nm. En raison de son moindre coût, le verre est habituellement employé entre 375 et 2000 nm.

4) Relation entre absorbance et concentration

4.1 Dosage direct

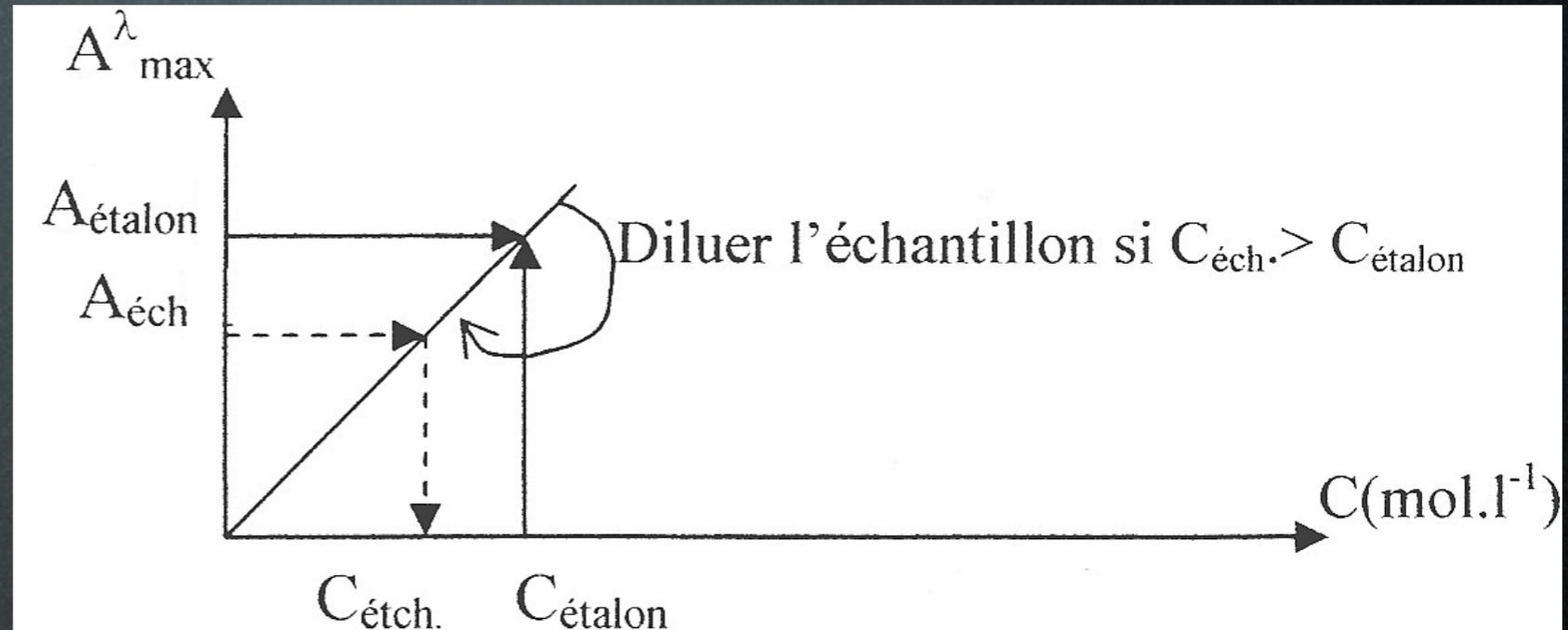
⇒ L'absorbance A de l'échantillon à doser est mesurée. La concentration C est ensuite déterminée en utilisant le coefficient d'absorption molaire ϵ donné par la littérature.

1/ Écrire l'expression littérale de la concentration C :

2/ Pourquoi cette méthode est-elle dangereuse et à éviter ?

4.2 Dosage avec étalon externe

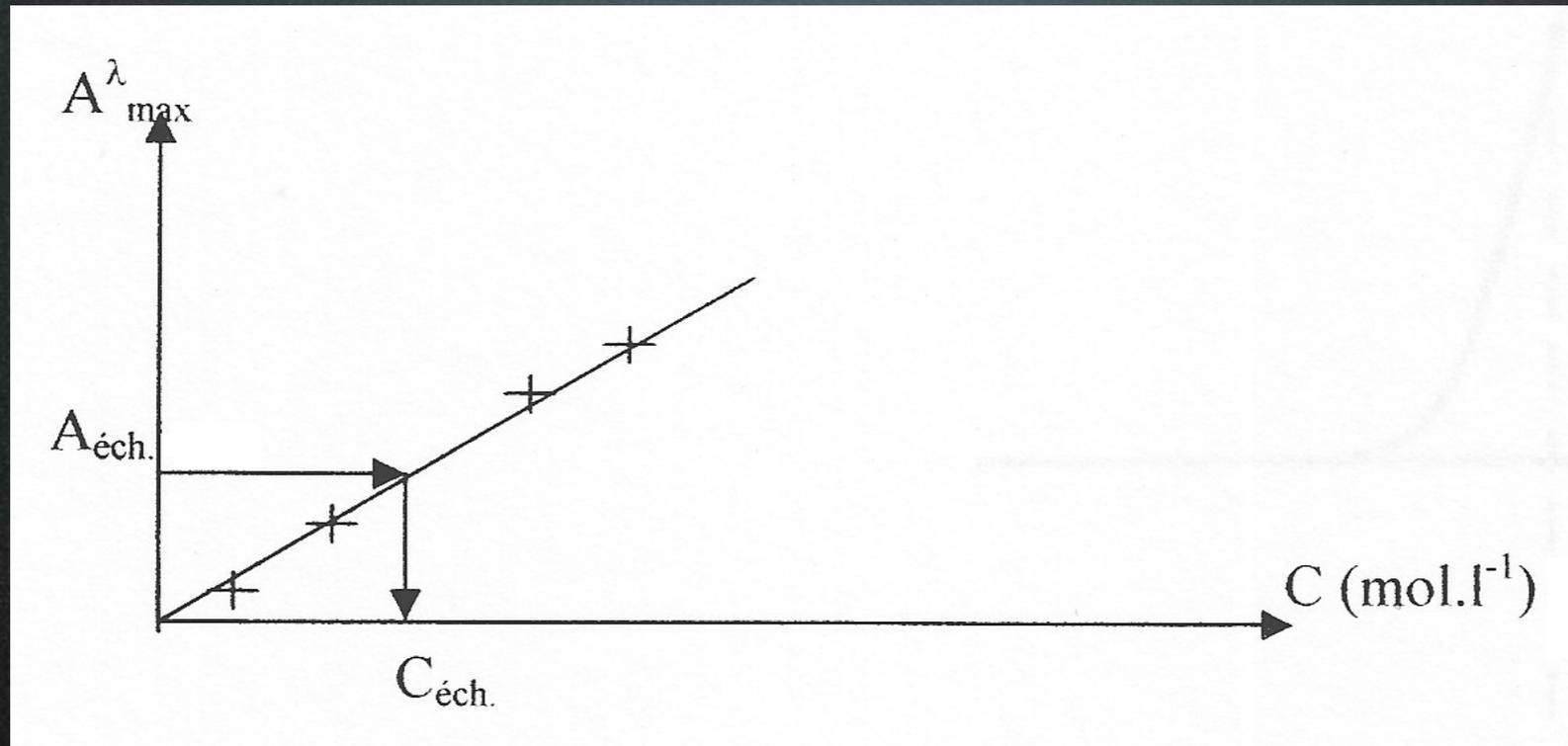
⇒ Un étalon est une solution de même composition que l'échantillon et dont la concentration est parfaitement connue. Les absorbances de l'étalon et de l'échantillon sont mesurées.



1/ Donner l'expression littérale de la concentration $C_{\text{éch}}$ de l'échantillon en fonction de $C_{\text{étalon}}$ et des absorbances correspondantes :

2/ Cette méthode présente 3 inconvénients majeurs, pouvez-vous indiquer lesquels ?

4.3 Dosage avec gamme d'étalonnage



⇒ Cette méthode consiste à réaliser une gamme de concentration encadrant la concentration de l'échantillon. Les points de gamme doivent être régulièrement espacés et doivent être préparés en même temps que l'échantillon. L'échantillon est mesuré au milieu de la gamme.

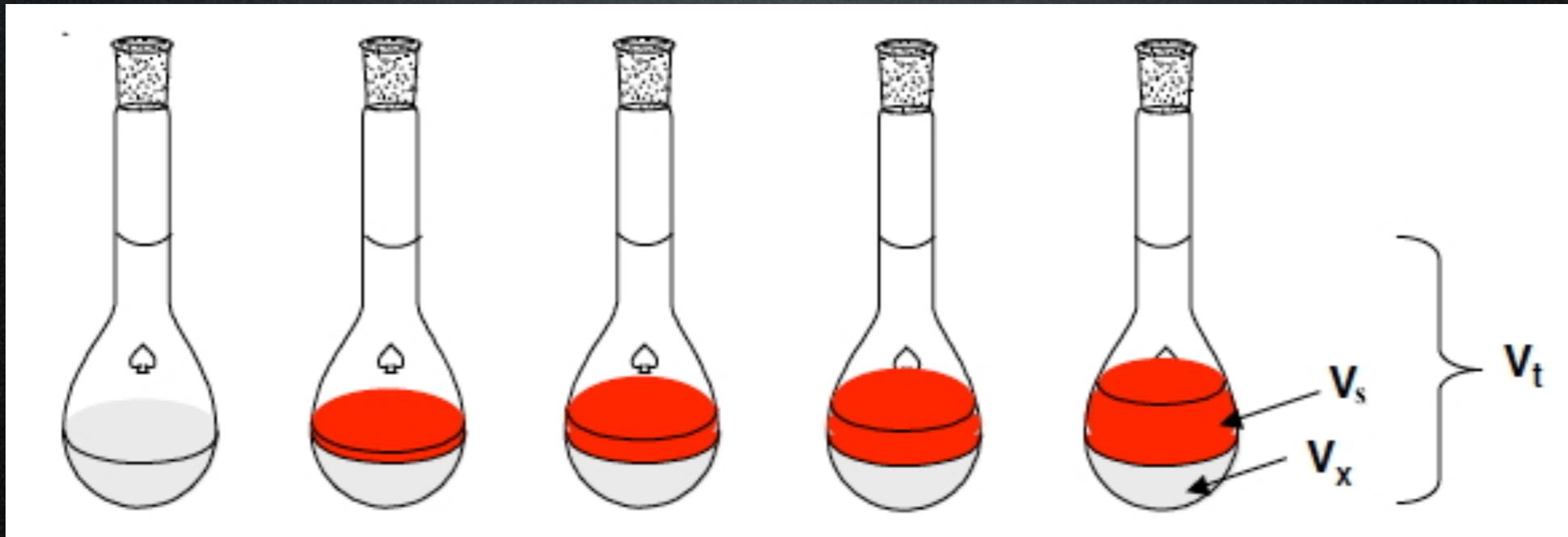
Remarque : la méthode de la gamme d'étalonnage permet de vérifier si la zone de validité est respectée et de déterminer le coefficient d'absorption.

4.4 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_s sont négligeables par rapport à celles sur m et p .

Dès lors, on admet que la variance relative du résultat $(S_{C_x}/C_x)^2$ 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 :

4.5 Analyse d'un mélange

⇒ Soit un mélange des substances A et B ayant respectivement pour l.o d'absorption maximales λ_A et λ_B . D'après le principe d'additivité : $A(\lambda_A) = A_A(\lambda_A) + A_B(\lambda_A)$ et $A(\lambda_B) = A_A(\lambda_B) + A_B(\lambda_B)$

d'où le système de 2 équations à 2 inconnues à résoudre :

$$A(\lambda_A) = a_A(\lambda_A).b.C_A + a_B(\lambda_A).b.C_B \quad \text{et} \quad A(\lambda_B) = a_A(\lambda_B).b.C_A + a_B(\lambda_B).b.C_B$$