

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira
Béjaïa



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة عبد الرحمان ميرة
بجاية

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

L3 BPC -TAB : Chapitre 3 : Spectroscopie UV-Visible



INTRODUCTION

Initialement le terme spectroscopie se référait à une branche scientifique où la lumière (en fait le rayonnement visible) étant composée selon ses différentes longueurs d'onde pour engendrer des spectres, c'est-à-dire des graphiques d'une intensité en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. Au cours du temps, la signification du terme spectroscopie s'est élargie pour inclure des études relatives non seulement à la lumière, mais également aux autres types de rayonnement électromagnétique, tels que les rayons X, le rayonnement ultraviolet, le rayonnement infrarouge, les micro-ondes et les ondes radios.

La spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible est surtout employée en analyse quantitative et est probablement plus utilisée que toute autre méthode dans les laboratoires d'analyses chimiques et médicales du monde entier.

Spectroscopie UV-Visible

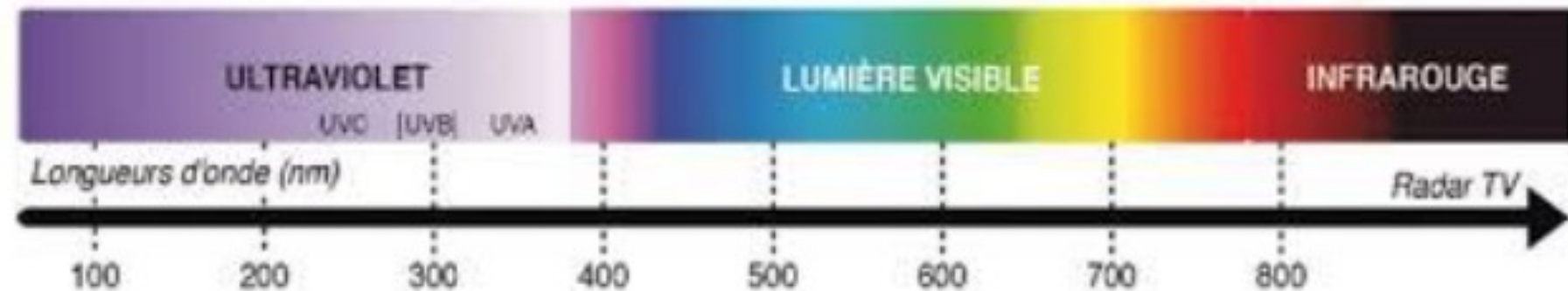
La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

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.

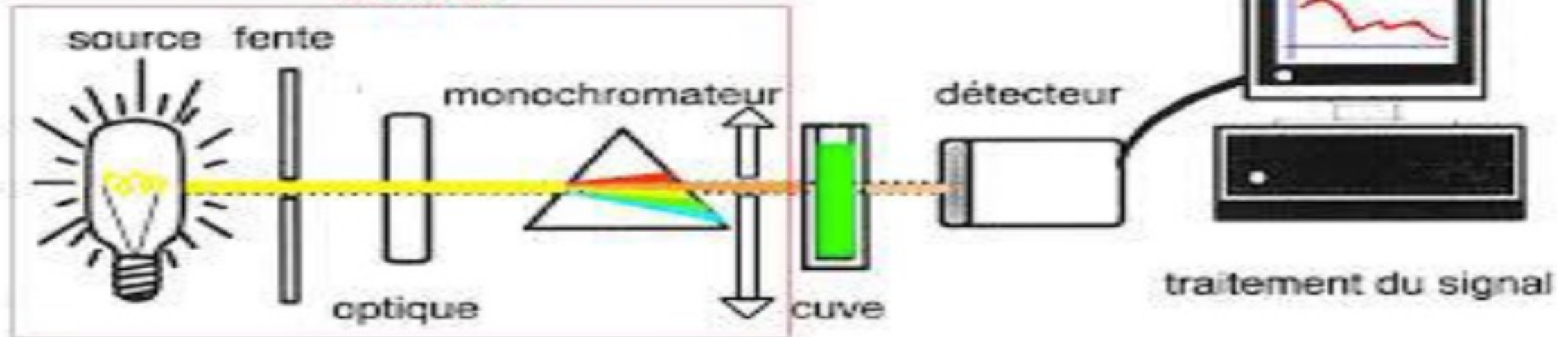
- Visible : 400 nm -800 nm.
- Proche-UV : 200 nm -400 nm.
- UV-lointain : 10 nm- 200 nm .

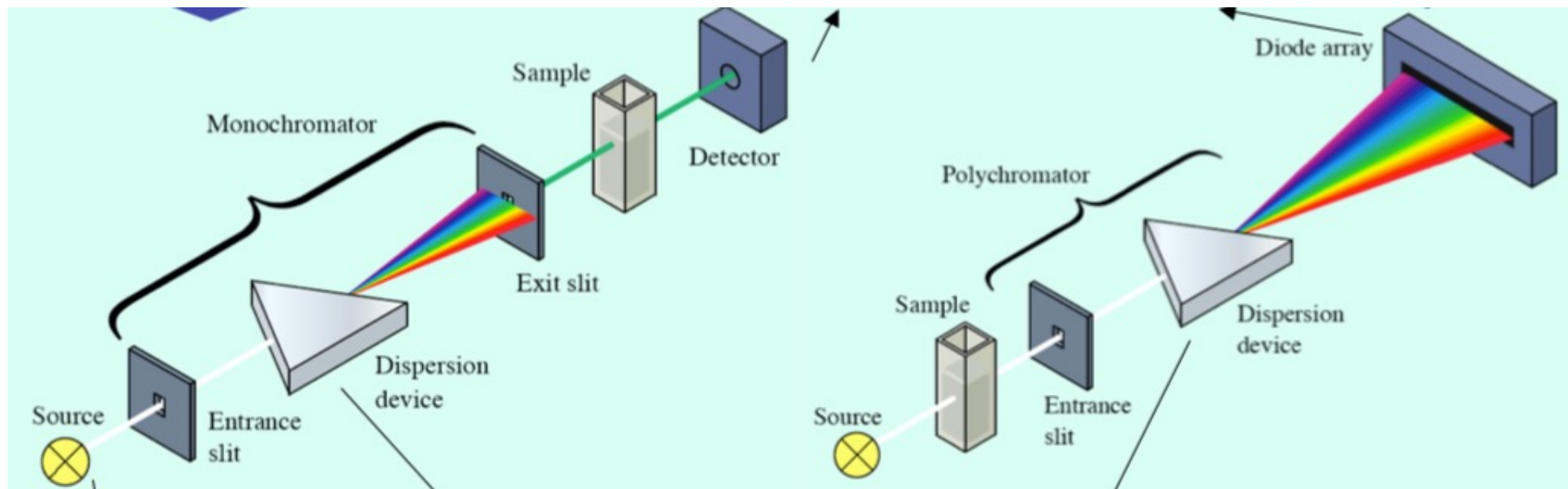


Pour les appareils usuels, les domaines utiles de longueur d'onde dans les domaines UV-Visible sont :

UV	Visible
$200 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$	$400 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$

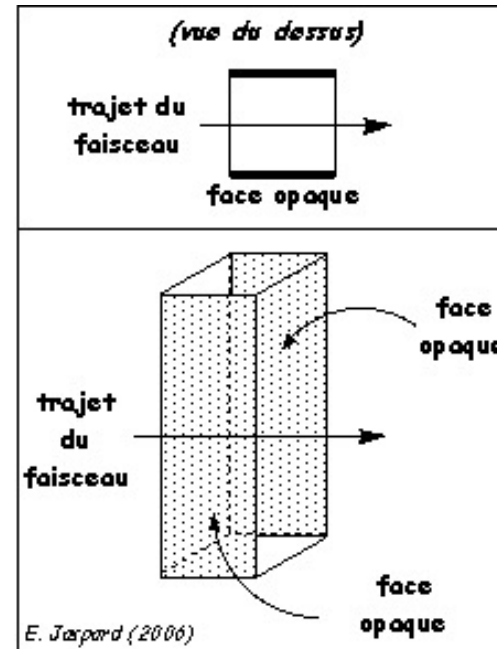
Source de lumière monochromatique variable





Le spectrophotomètre UV-visible est constitué des éléments suivants :

- Source de lumière monochromatique :
 - o 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)
 - o Prisme
 - Réseau
- Cuve
 - o Visible : Verre
 - UV : Quartz
- Détecteur = Photomultiplicateur ou photopiles



Les cuves pour les mesures

Précautions d'usage :

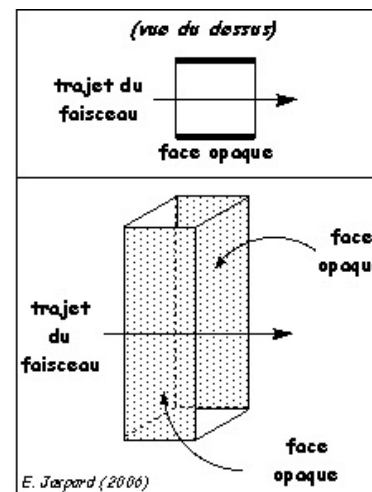
Il faut choisir le type de cuve adaptée à la longueur d'onde :

- Quartz pour les ultra-violet (190 - 400 nm)
- Verre ou polystyrène pour le visible (400 nm - 800 nm)

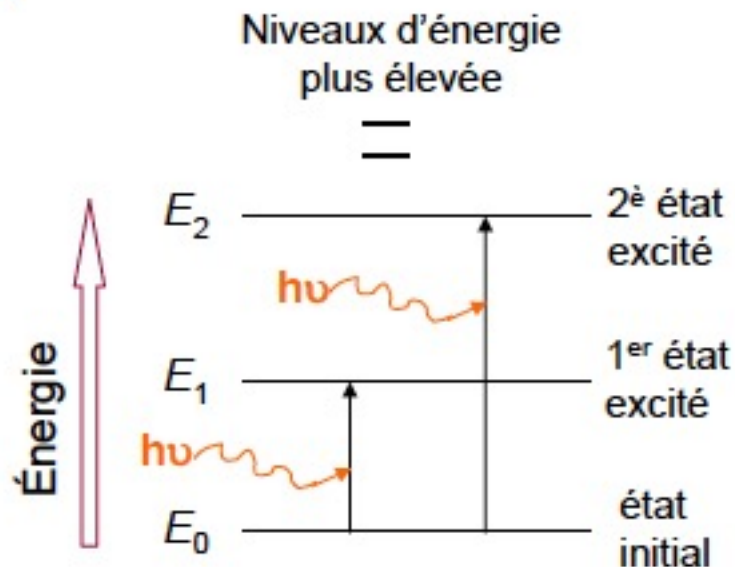
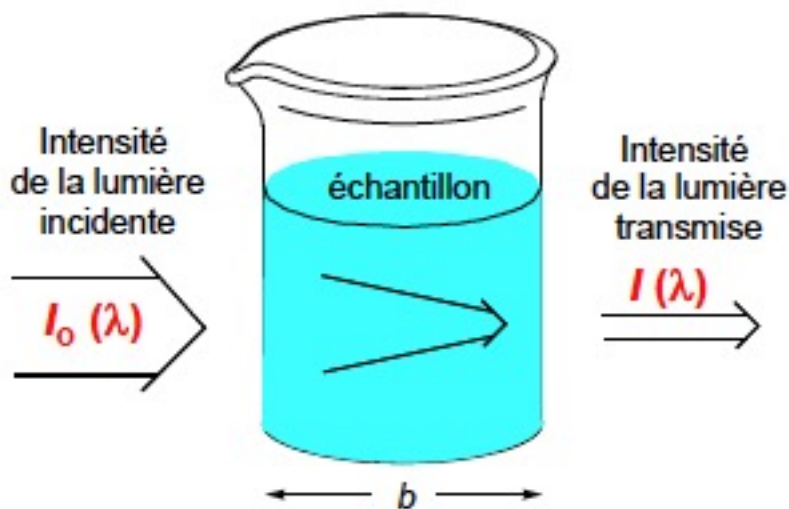
Ne pas mettre les doigts sur les faces dépolies des cuves

Bien orienter la cuve par rapport à l'axe du faisceau lumineux

Supprimer les bulles d'air



❖ La spectrophotométrie d'absorption consiste à mesurer l'atténuation de la lumière traversant un milieu pour en tirer les concentrations des substances absorbantes (chromophores).



La loi de Beer-Lambert :
 $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$.

❖ Longueurs d'onde balayées: ~200 à 800 nm (UV-vis)

La spectroscopie UV-Visible se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre. Lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectroscope, elle reçoit un rayonnement d'intensité I_0 . une partie de cette lumière incidente notée I_0 est absorbée par le milieu et le reste, noté I , est transmis. L'intensité du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I_0). 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 : $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$.

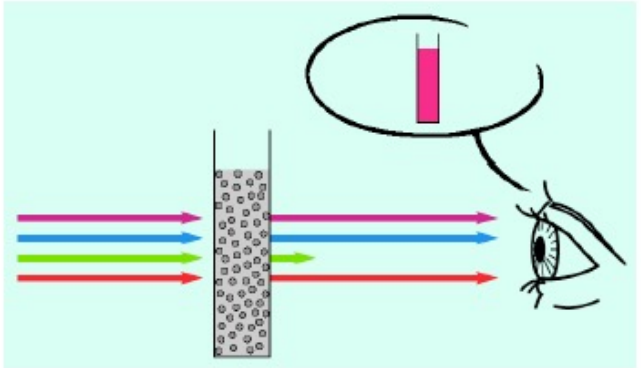
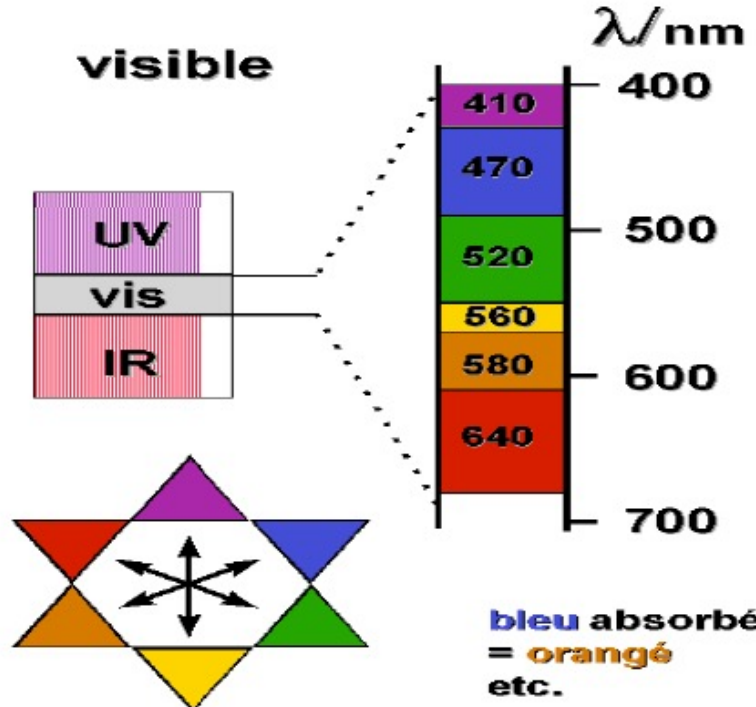


Figure : spectrophotomètre

Loi de Beer - Lambert

L'absorbance est fonction de la concentration du soluté comme le montre la loi de Beer Lambert $A = \log (I_0/I) = \epsilon \lambda C$

A = absorbance sans unité

I_0 = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté)

I = intensité lumineuse transmise

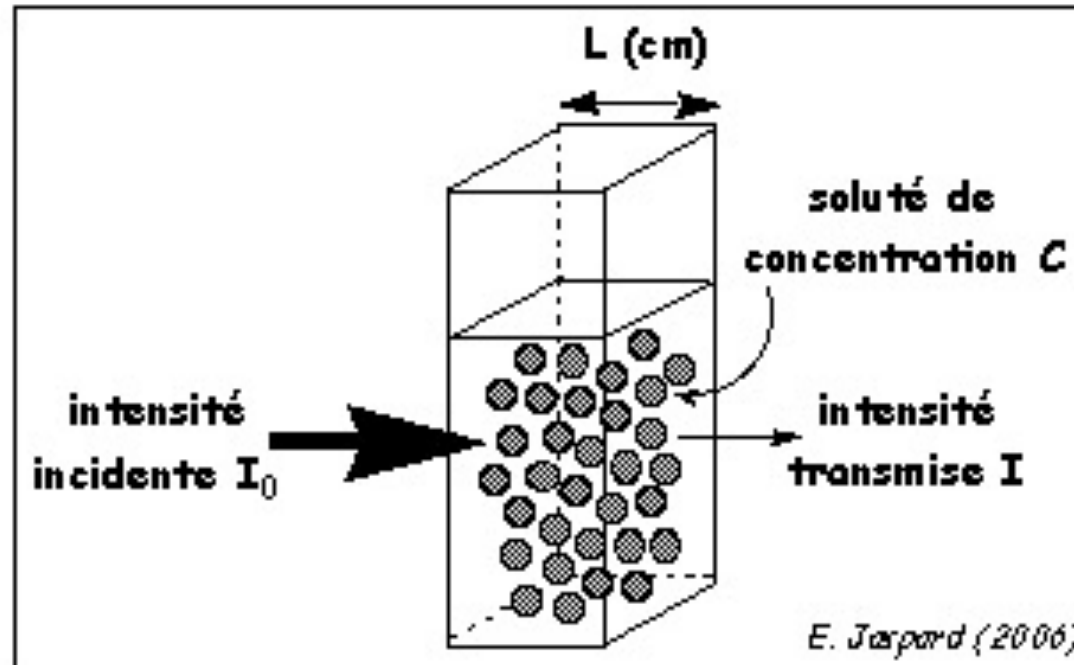
ϵ = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde) :

Si la concentration du soluté est en M (ou mol.L⁻¹), ϵ est en M⁻¹.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction molaire : ϵM

Si la concentration du soluté est en % (masse/volume), ϵ est en g⁻¹.L.cm⁻¹, c'est le coefficient d'extinction pondéral : $\epsilon 1\%$

λ = longueur du trajet optique (en cm)

C = concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction)



Loi de Beer-Lambert

❖ Loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)cb$$

- ❖ Si c est exprimée en concentration molaire, ε est l'**absorptivité molaire** (en $M^{-1}cm^{-1}$).
- ❖ Si c est exprimée en mg/mL, ε est l'**absorptivité massique** (en $mL/(mg \cdot cm)$).

Courbe d'étalonnage

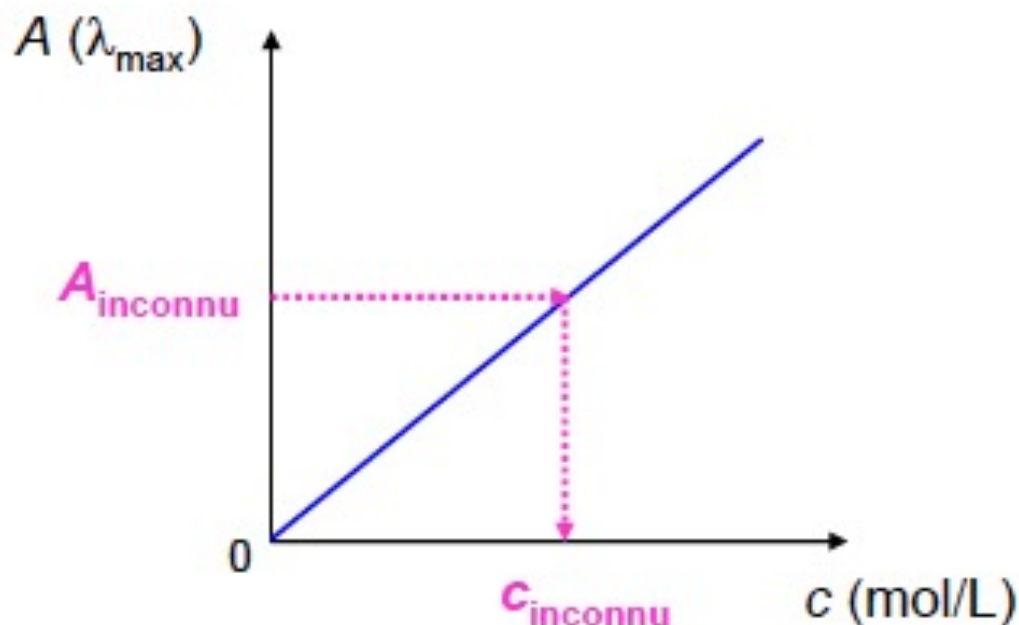
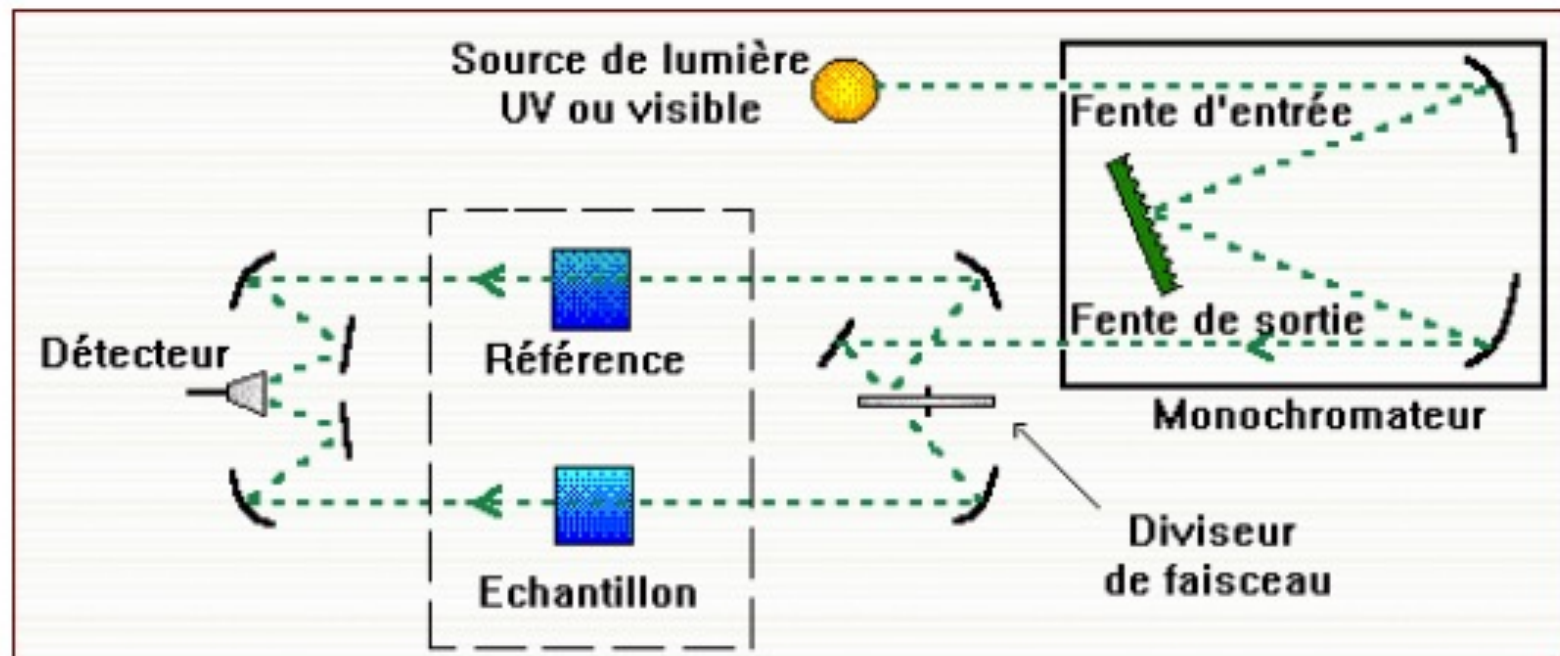
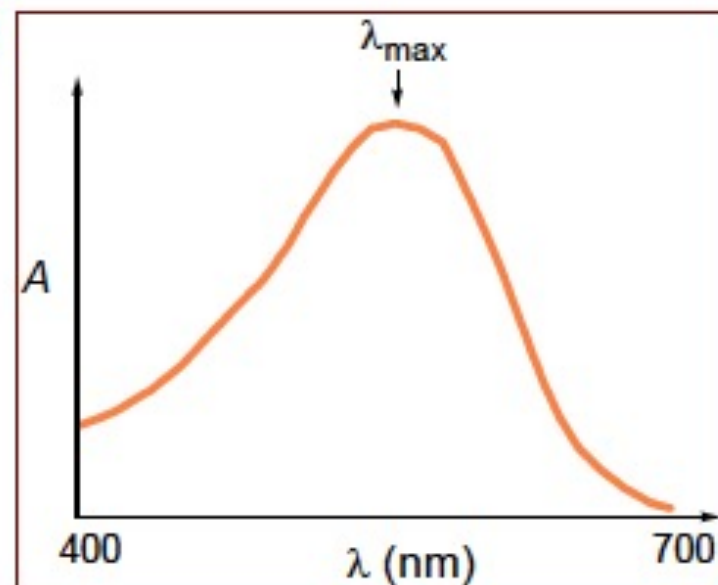


Schéma d'un spectrophotomètre UV/vis à double faisceau



(www.chez.com/dalmeyda/cours/spectro/UV-spectro.htm)

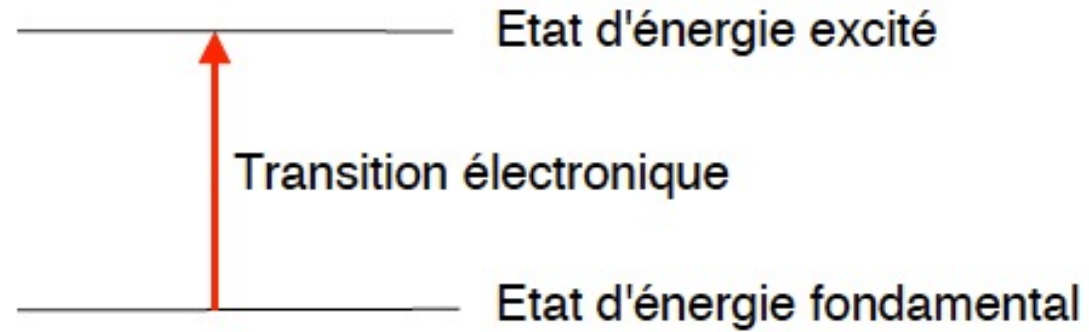
Spectre absorption: $A = f(\lambda)$ 



-II. Absorption moléculaire, spectre de bandes

- dans un atome :

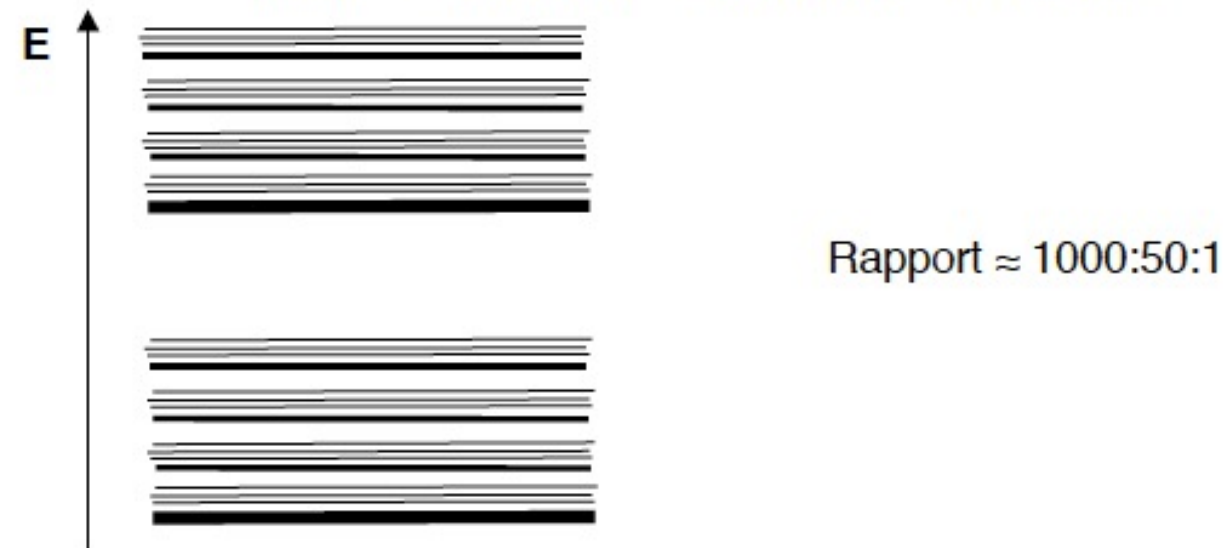
l'absorption du rayonnement donne naissance à une seule raie spectrale



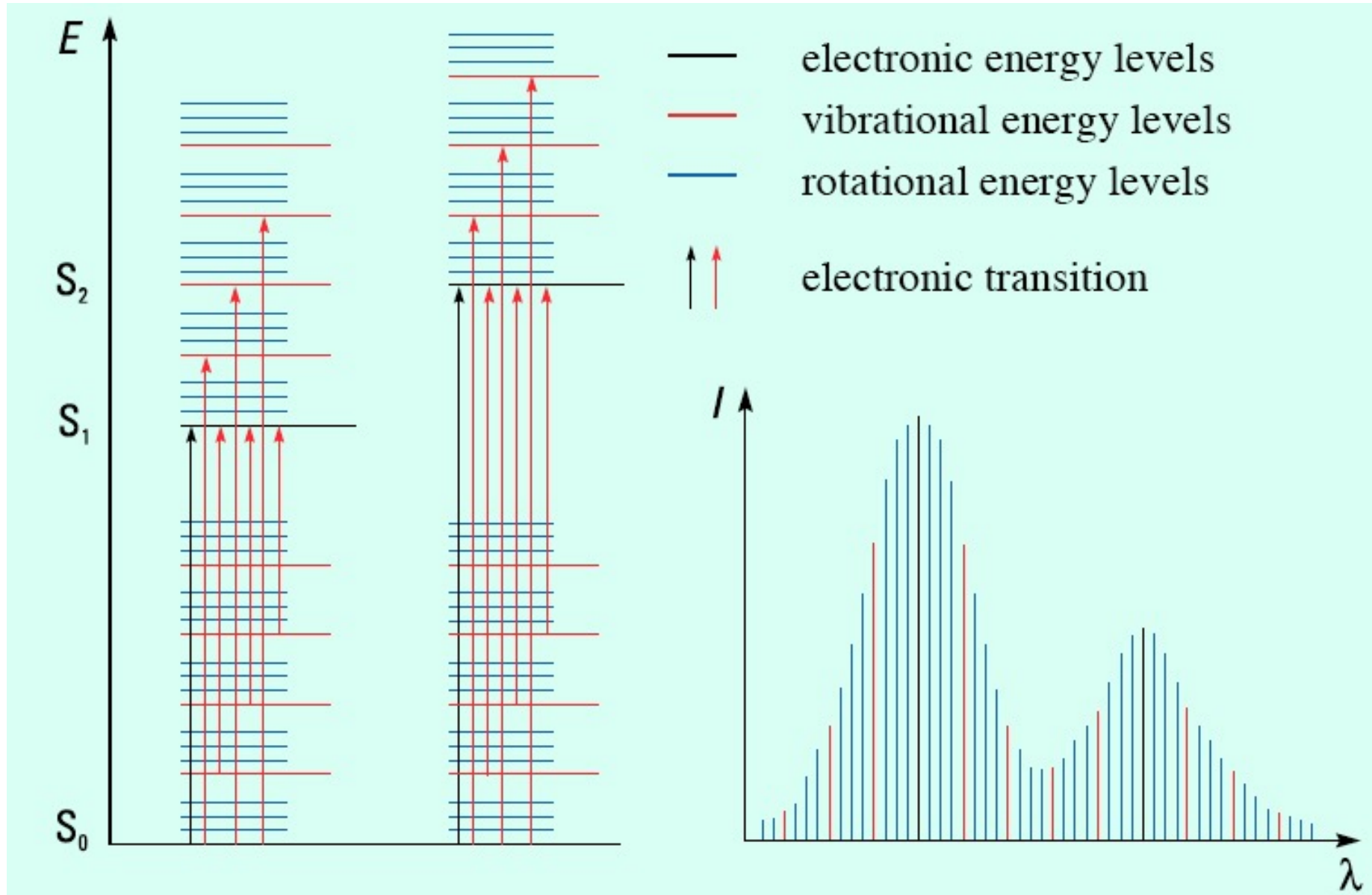
- dans une molécule :

les \neq états électroniques ont des domaines énergétiques larges, dus aux niveaux

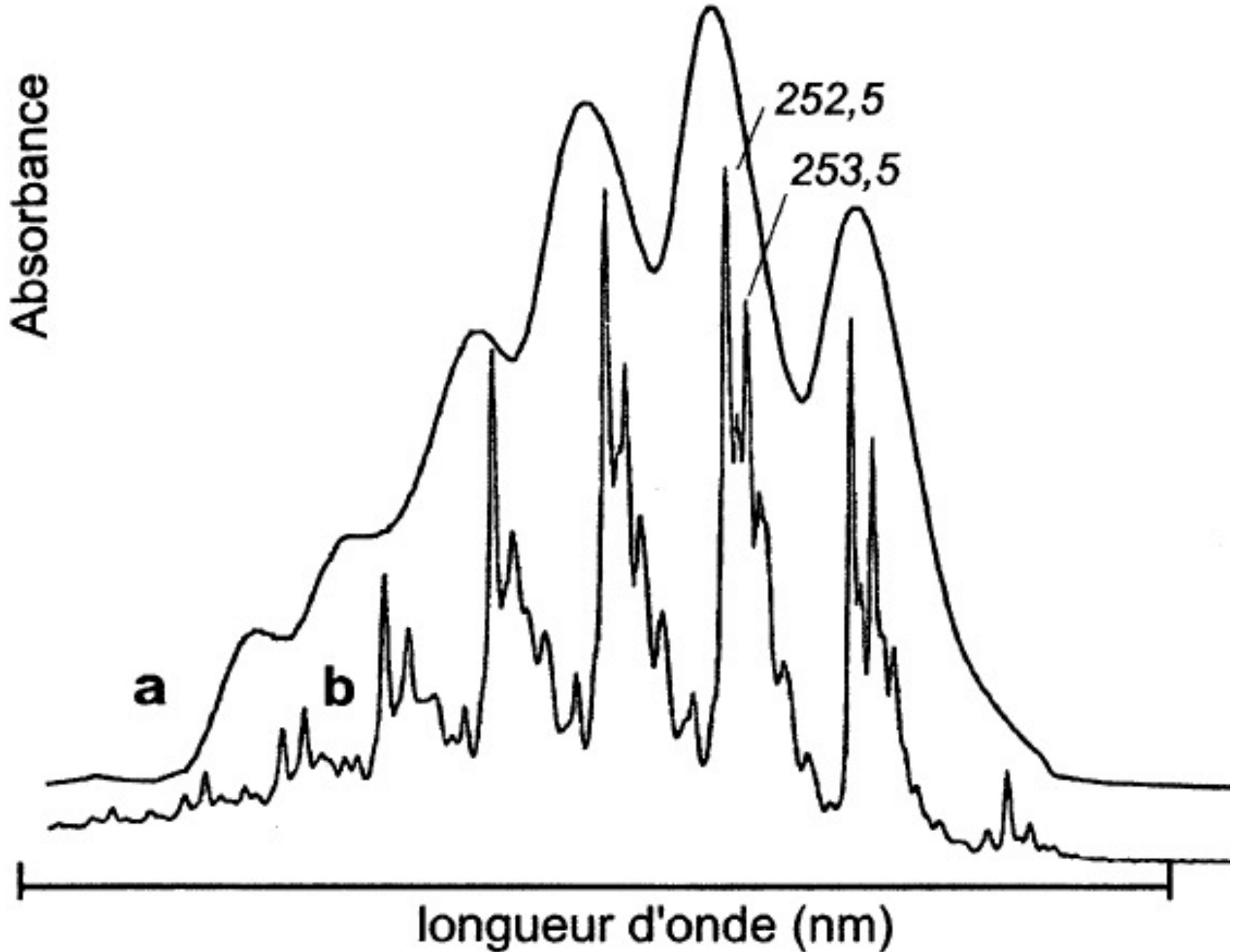
vibrationnels et rotationnels : $E_{\text{totale}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibrationnelle}} + E_{\text{rotationnelle}}$



□ spectre de **bandes**



Ex : spectre du benzène a) en solution , b) à l'état de vapeur (structure fine)



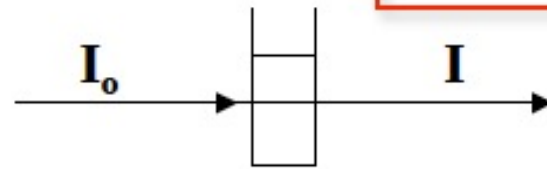
Le spectre UV-Visible est le tracé de **A (absorbance)** en fonction de λ (en nm)

Bande d'absorption caractérisée par :

sa position λ_{\max} (nm) et son intensité ϵ_{\max} (L.mol⁻¹.cm⁻¹) ou **coefficient d'absorption molaire**

Loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l c = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$



T : transmittance

l : parcours optique (cm)
échantillon concentration c (mol.L⁻¹)

Intérêts de la spectroscopie UV-Visible :

- large domaine d'applications (Chimie minérale, organique, biochimie),
90% des analyses médicales
- analyses **quantitatives** (loi de Beer-Lambert)
- grande sensibilité : limite de détection $\approx 10^{-5}$ M
- précision : 1 - 5% erreur
- simplicité, rapidité.

Les différents types de transitions

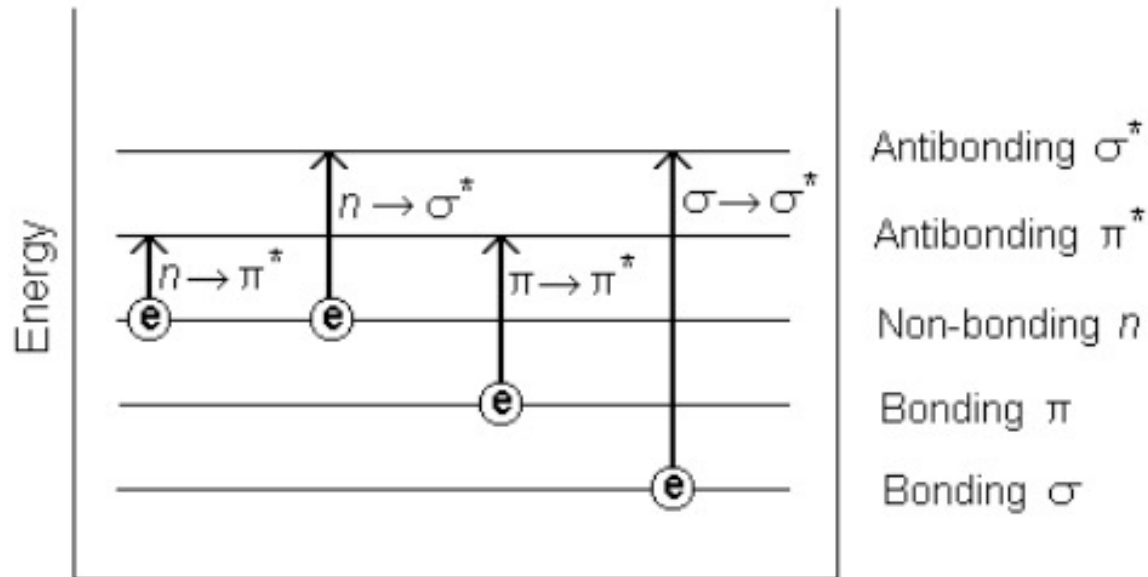
A. Dans les composés organiques

-transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$: $\lambda_{\max} < 150$ nm (UV lointain)

-transitions $n \rightarrow \sigma^*$: 150 nm $< \lambda_{\max} < 250$ nm, intensité moyenne ($50 < \epsilon < 2000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹)

-transitions $\pi \rightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} > 190$ nm (> 400 nm pour systèmes très conjugués), forte intensité ($1000 < \epsilon < 10000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹)

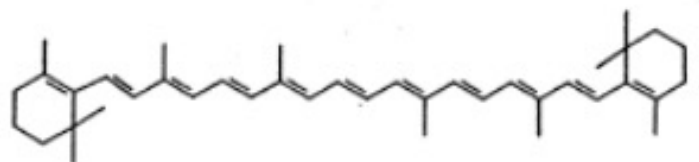
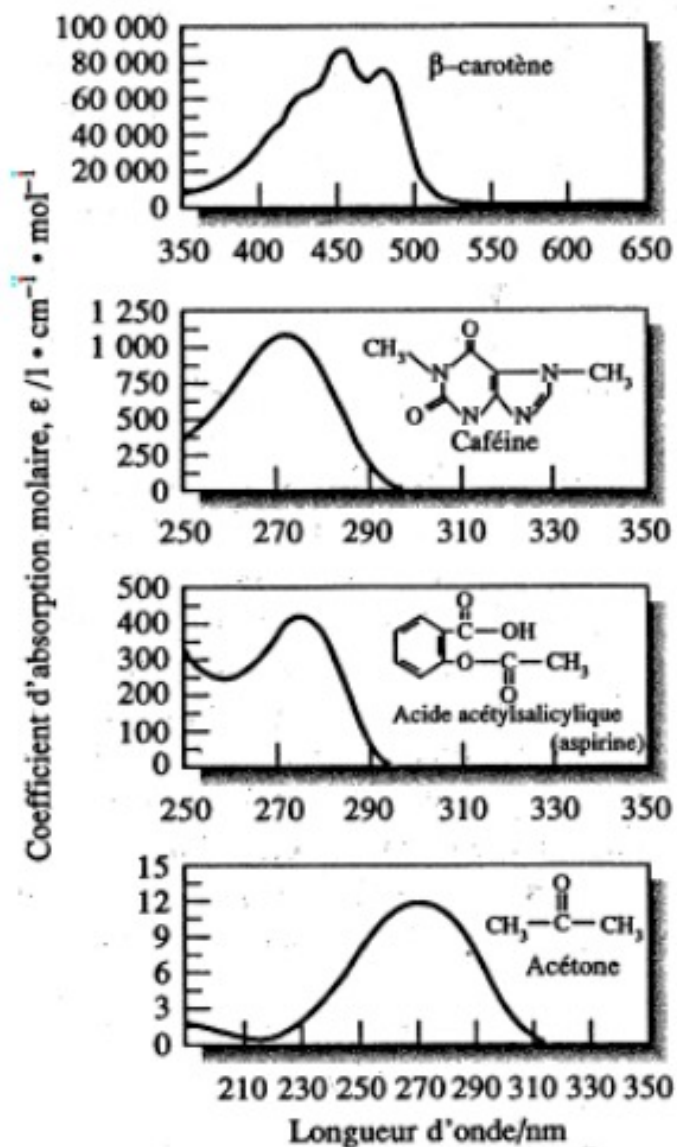
-transitions $n \rightarrow \pi^*$: $\lambda_{\max} > 190$ nm, faible intensité ($10 < \epsilon < 100$ L.mol⁻¹.cm⁻¹)



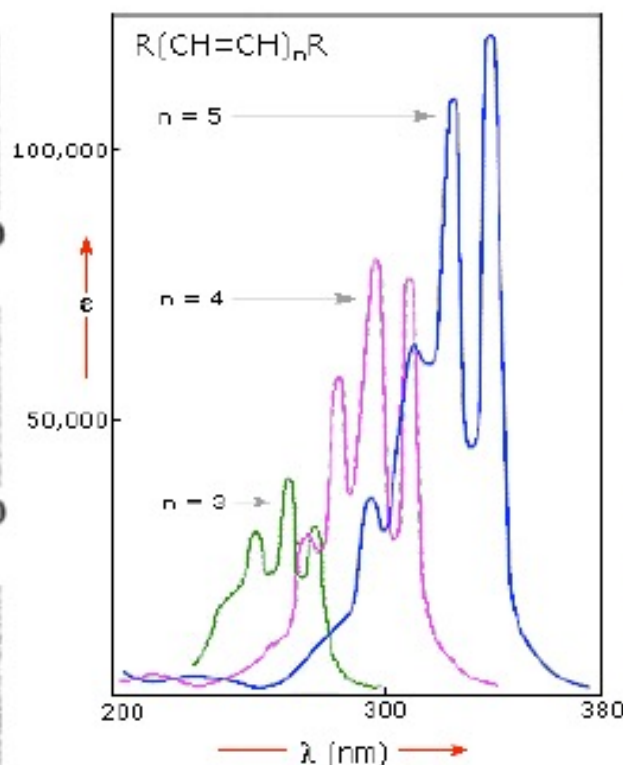
Chromophore : groupement présentant une absorption caractéristique dans l'UV ou le visible

<i>Chromophore</i>	<i>Transition</i>	λ_{\max}	$\log(\epsilon)$
nitrile	η to π^*	160	< 1.0
alkyne	π to π^*	170	3.0
alkene	π to π^*	175	3.0
alcohol	η to σ^*	180	2.5
ether	η to σ^*	180	3.5
ketone	π to π^*	180	3.0
	η to π^*	280	1.5
aldehyde	π to π^*	190	2.0
	η to π^*	290	1.0
amine	η to σ^*	190	3.5
acid	η to π^*	205	1.5
ester	η to π^*	205	1.5
amide	η to π^*	210	1.5
thiol	η to σ^*	210	3.0
nitro	η to π^*	271	< 1.0
azo	η to π^*	340	< 1.0

Exemples de spectres de composés organiques



Conjugaison : rapprochement des orbitales π et π^* : $\lambda \nearrow$



$\lambda \nearrow$: effet bathochrome

$\lambda \searrow$: effet hypsochrome

$\epsilon \nearrow$: effet hyperchrome

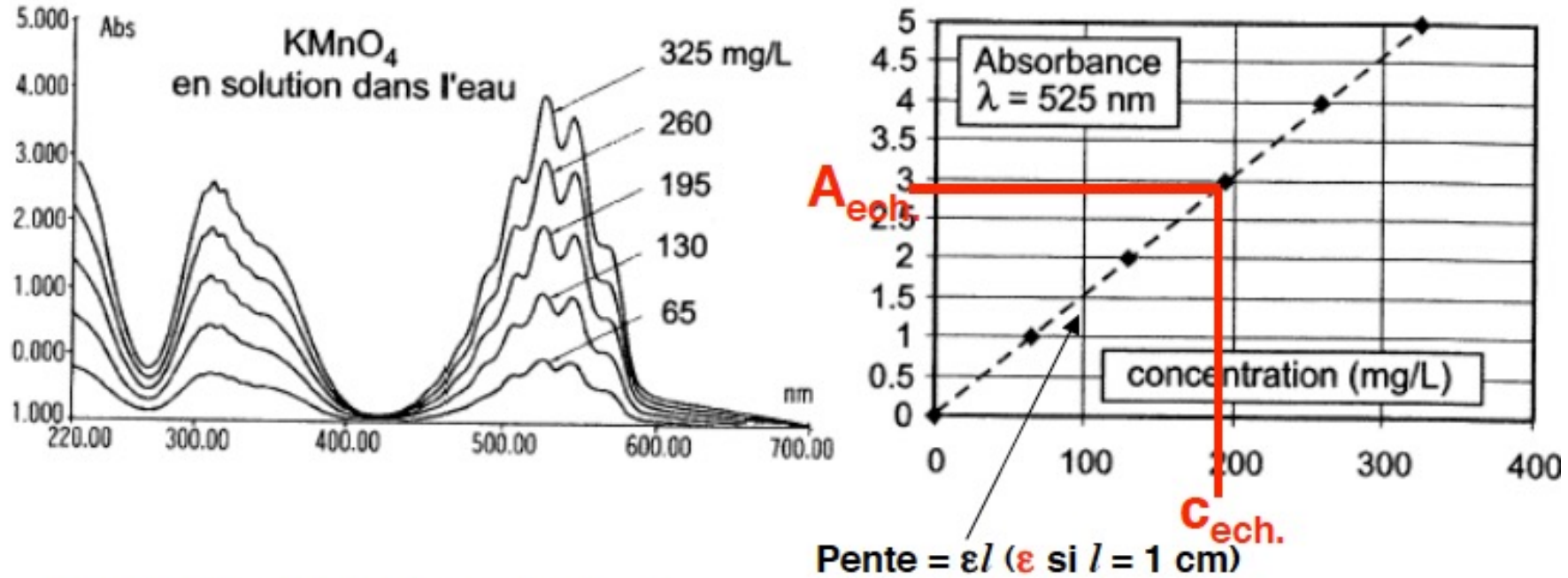
$\epsilon \searrow$: effet hypochrome

Conjugaison; mais aussi :
effets de substituants (NR_2 ,
 OH , OR , X_1, \dots),
effets de solvant (polarité),...

Règles de Woodward-Fieser \rightarrow estimation de λ_{max}

IV. Analyses quantitatives

Loi de Beer-Lambert :
$$A = \epsilon l c = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$



- **Additivité** de la loi de Beer-Lambert :

Ex: mélange de 2 constituants

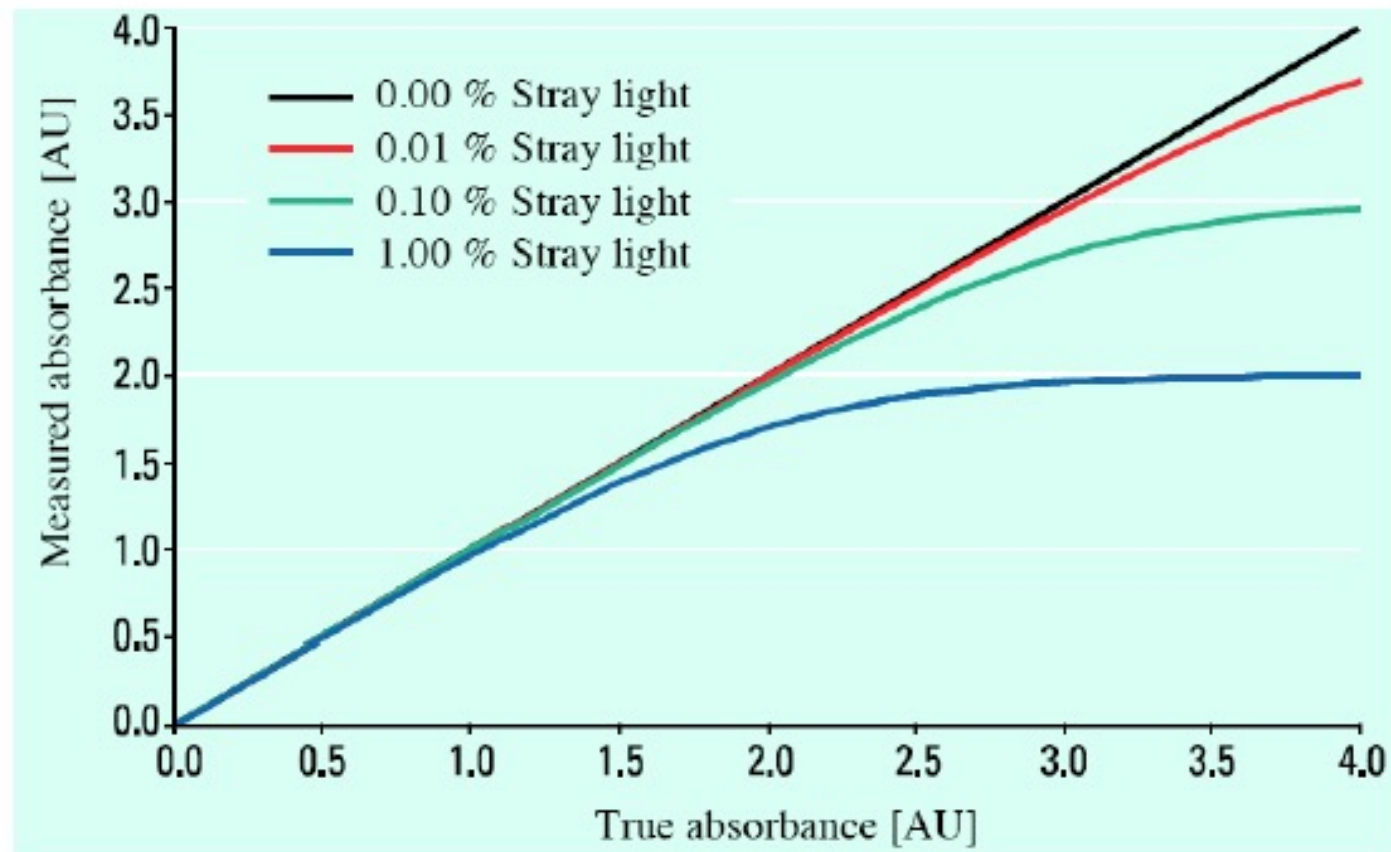
$$A = A_1 + A_2 = \epsilon_1 l c_1 + \epsilon_2 l c_2 = l(\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2)$$

- Analyse multicomposants :

mesure de A à autant de $\lambda \neq$ que de constituants dans le mélange

Limites de validité de la loi de Beer-Lambert :

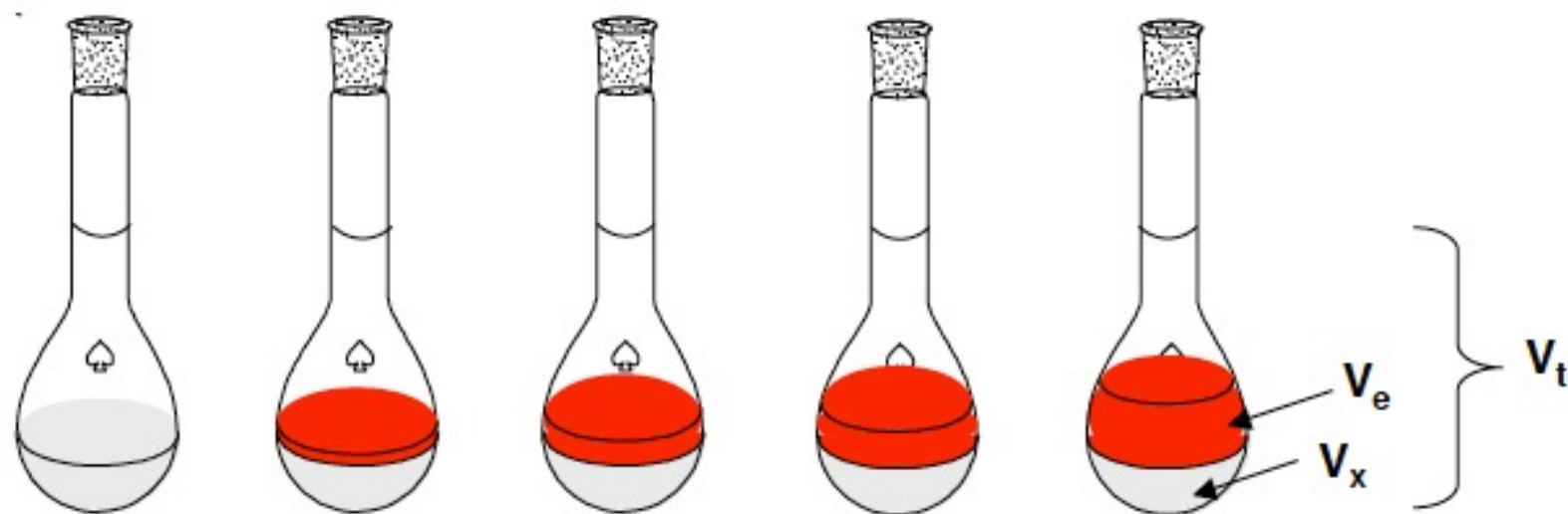
- solutions diluées ($c < 0,01 \text{ M}$)
- absence d'interactions soluté-solvant
- lumière monochromatique (impossible dans l'absolu)
- influence de la lumière parasite, **éviter de travailler à $A > 1,5$**



Les solutions étalons doivent avoir une composition voisine de celle des échantillons afin de minimiser les effets des divers constituants (**effet de matrice**)

→ Parfois difficile → **Méthode des ajouts dosés** :

On prélève plusieurs fois un volume V_x d'une solution d'un échantillon de [] c_x inconnue, on ajoute un volume croissant V_e d'une solution étalon de [] c_e



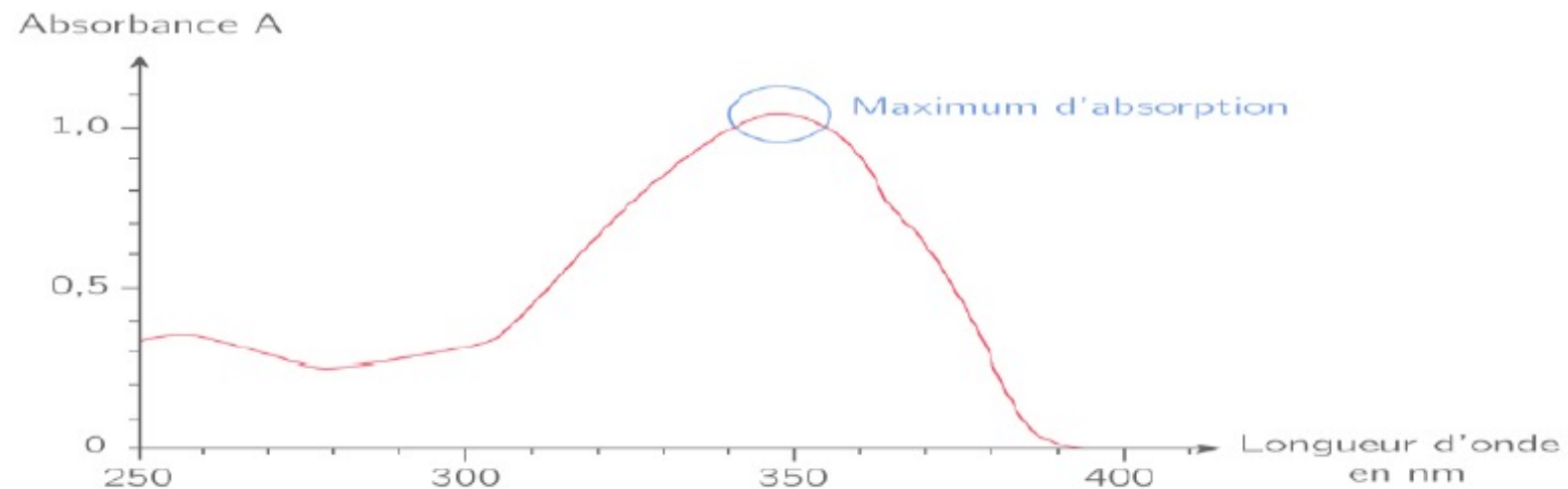
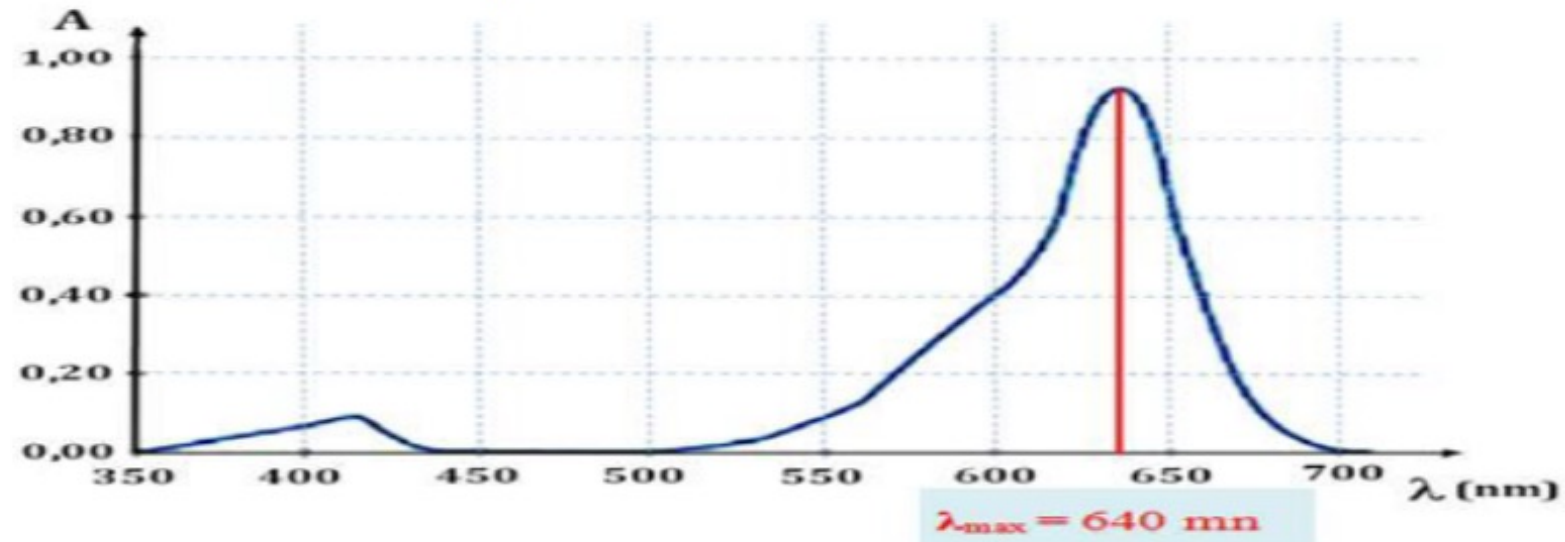
$$A = \epsilon l c_e V_e / V_t + \epsilon l c_x V_x / V_t = \epsilon l / V_t c_e V_e + \epsilon l / V_t c_x V_x = a V_e + b \quad \text{avec } a = \epsilon l / V_t c_e \text{ et } b = \epsilon l / V_t c_x V_x$$

$$c_x = \frac{b c_e}{a V_x}$$

Allure du spectre d'absorption UV-visible : $A = f(\lambda)$

- Spectre UV-visible : tracé de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (usuellement exprimée en nm).
- Bande caractérisée par position λ_{\max} , son intensité liée au coefficient d'extinction molaire

ϵ_{\max}



Qui absorbe ?

L'absorbance provient de groupements chimiques appelés chromophores. Les chromophores sont des molécules chimiques contenant dans leur structure des doubles liaisons conjuguées. un chromophore est un groupement fonctionnel qui peut donner une transition électronique. Les systèmes conjugués sont définis par une alternance de liaisons simples et de liaisons doubles ou par un système constitué d'une liaison double suivi d'une liaison simple lié à un atome portant un doublet d'électrons non lié.

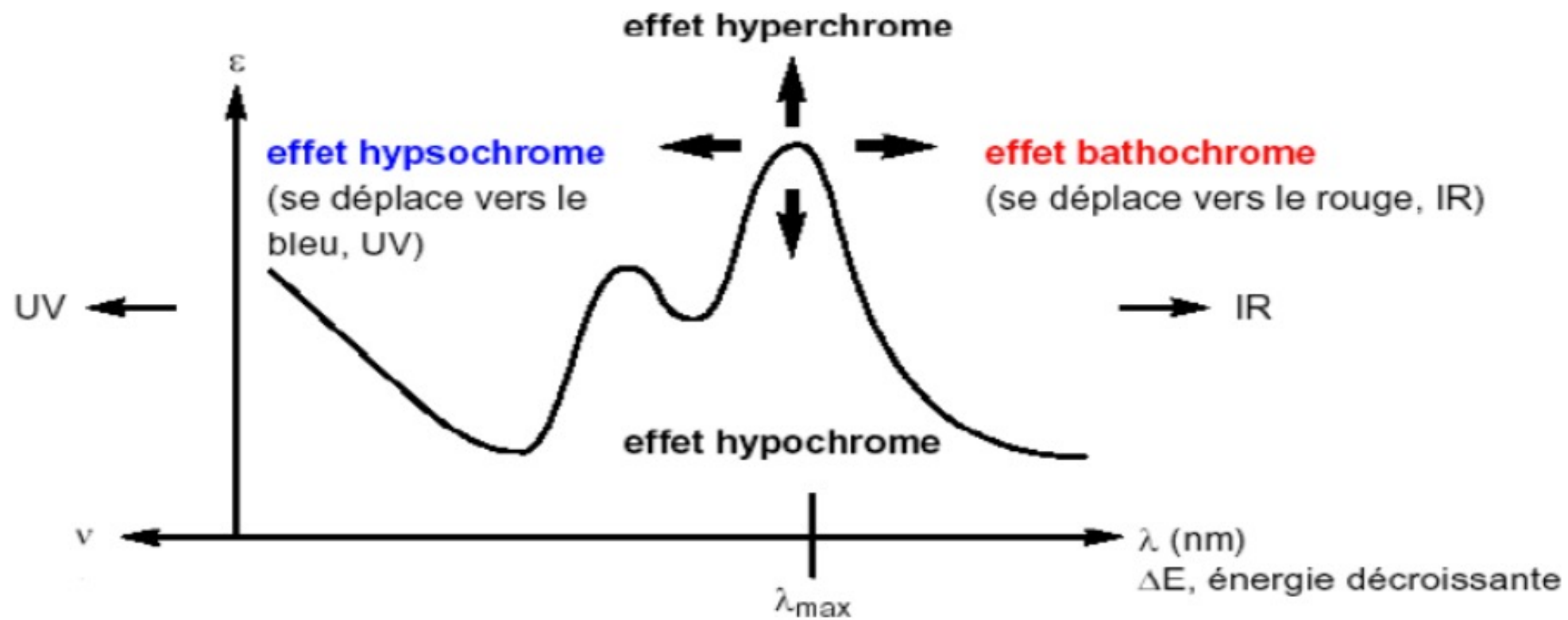
Les électrons des doubles liaisons sont délocalisés à l'ensemble du chromophore et ils peuvent se déplacer le long de la molécule. La conséquence directe de cet effet est que le chromophore peut absorber des photons de certaines longueurs d'onde. Plus le nombre de doubles liaisons conjuguées est grand, plus la longueur d'onde d'absorption est décalée vers les grandes longueurs d'onde (vers le domaine de visible).

Les auxochromes:

Un auxochrome est constitué d'un groupement d'atomes situés au voisinage direct du chromophore, et qui intervient alors sur la délocalisation électronique de celui-ci. Les auxochromes sont capables de modifier la longueur d'onde λ_{\max} absorbée par le chromophore, ainsi que la valeur de l'absorbance correspondante.

On peut citer plusieurs effets :

- Effet bathochrome : Augmentation de λ_{\max}
- Effet hypsochrome : Diminution de λ_{\max}
- Effet hyperchrome : Augmentation de l'absorbance.
- Effet hypochrome : Diminution de l'absorbance.



Remarque :

- ✓ Une substance incolore, comme l'eau, n'absorbe aucune radiation visible: son absorbance est nulle quelque soit λ .
- ✓ les molécules organiques possédant au moins 7 doubles liaisons conjuguées sont visibles car elles absorbent des radiations visibles ($400 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$).
- ✓ les molécules organiques possédant entre 1 et 6 doubles liaisons conjuguées absorbent des radiations dans le domaine de l'ultraviolet ($\lambda < 400 \text{ nm}$)

Application de la spectroscopie UV/Visible

- Analyse qualitative

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR et RMN. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

- Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- Le dosage d'impureté dont l'identité est connue
- Le dosage d'un principe actif d'un médicament.
- Le dosage des métaux de transition par complexométrie.

Autres applications

D'autres applications sont connues pour le Contrôle Qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires...

Exercice 01

- 1) Calculez le ϵ_{\max} d'un composé dont l'absorption maximale (A) est de 1,2. La longueur de la cellule l est 1 cm, la concentration est 1,9 mg par 25 ml de solution et la masse moléculaire du composé est de 100 g/mol.
- 2) Calculer le coefficient d'absorption molaire d'une solution de concentration 10^{-4} M, placée dans une cuve de 2 cm, avec $I_0 = 85,4$ et $I = 20,3$.

Correction:

- 1) On applique la loi de Beer Lambert, $\epsilon = 1578,94 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- 2) $\epsilon = 3119,8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exercice 02

On veut déterminer la concentration de deux sels A et B dans un échantillon inconnu en solution aqueuse.

On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris séparément en 7

solution aqueuse, ainsi que la solution échantillon à analyser.

Le trajet

Exercice 02

On veut déterminer la concentration de deux sels A et B dans un échantillon inconnu en solution aqueuse.

On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris séparément en solution aqueuse, ainsi que la solution échantillon à analyser.

Le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm.

Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes :

510 nm 575 nm

Composé A (C = 0,15M) A = 0,714 A = 0,0097

Composé B (C = 0,06M) A = 0,298 A = 0,757

Solution échantillon A = 0,4 A = 0,577

- 1) Calculer les 4 coefficients d'absorption molaires $\epsilon_A(510)$, $\epsilon_A(575)$, $\epsilon_B(510)$, $\epsilon_B(575)$.
- 2) Calculer les concentrations molaires de A et de B dans la solution échantillon.

Correction:

1) On applique la loi de Beer Lambert :

Sel A	510 nm	575 nm
ϵ (mol ⁻¹ .l.cm ⁻¹)	4,76	0,064
Sel B	510 nm	575 nm
ϵ (mol ⁻¹ .l.cm ⁻¹)	4,96	12,61

2) On appliqué la d'additivité des absorbances :

$$C_A = 1,2 \cdot 10^{-1} \text{M.}$$

$$C_B = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

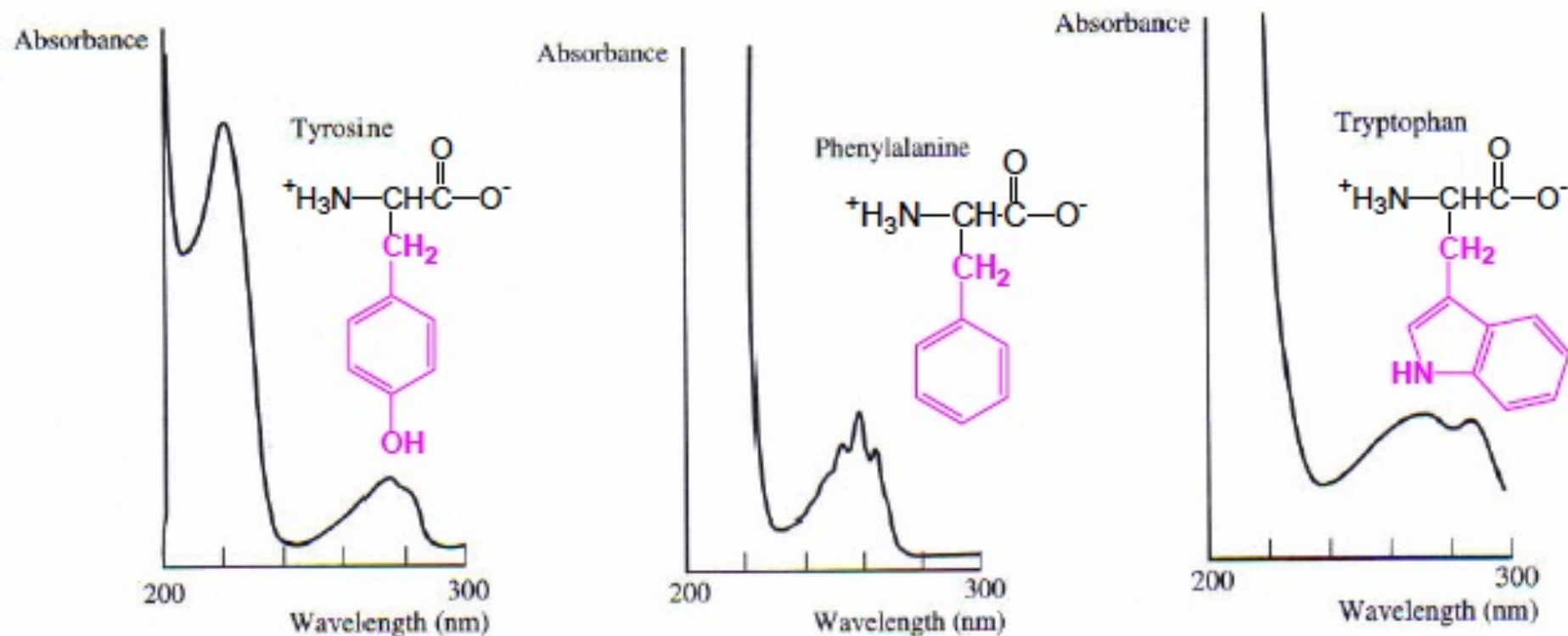
Quantification des protéines et acides nucléiques par spectrophotométrie

- ❖ Les acides aminés et les nucléotides n'absorbent pas dans la région visible (de 400 à 800 nm) du spectre électromagnétique.
- ❖ Par contre, les protéines et les acides nucléiques ont des bandes d'absorption dans la région de l'UV proche (de 200 à 400 nm). Ces biomolécules peuvent donc être analysées par la spectrophotométrie d'absorption.
- ❖ L'absorption dans l'UV proche permet la quantification des protéines et acides nucléiques et fournit de l'information à propos de la conformation (ou structure tridimensionnelle) des molécules en solution.

Dosage spectrophotométrique des protéines

- ❖ Dans l'analyse des protéines, il est soit nécessaire d'identifier les fractions contenant des protéines ou de déterminer la concentration de protéine dans un échantillon purifié.
- ❖ L'absorbance à la longueur d'onde caractéristique de 280 nm (i.e. $A_{280\text{nm}}$) est communément utilisée pour estimer la concentration totale de protéines dans un échantillon.
- ❖ $A_{280\text{nm}}$ est proportionnel à:
 - la quantité des acides aminés aromatiques (Trp, Tyr) et des résidus Cys dans une protéine (ou polypeptide)
 - la concentration de la protéine en solution.
- ❖ $A_{280\text{nm}}$ ne peut être utilisée pour fins d'analyse quantitative sans posséder une information supplémentaire puisque la composition des acides aminés varie d'une protéine à une autre. C'est-à-dire, des variations dans la composition des acides aminés donnent des absorptivités molaires ($\epsilon_{280\text{nm}}$) qui varient d'une protéine à une autre.

Spectres absorption des α -acides aminés aromatiques



(D'après D.J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3^e éd., 1998)

Dosage:

Le dosage se fait:

Par comparaison à un étalon:

Étalon est une substance dont la concentration est connue.

X : est un échantillon avec une concentration inconnue.

$$\frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{(\epsilon \cdot C \cdot l)_X}{(\epsilon \cdot C \cdot l)_{\text{étal}}} \Rightarrow \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{C_X}{C_{\text{étal}}} \Rightarrow C_X = \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} \times C_{\text{étal}}$$

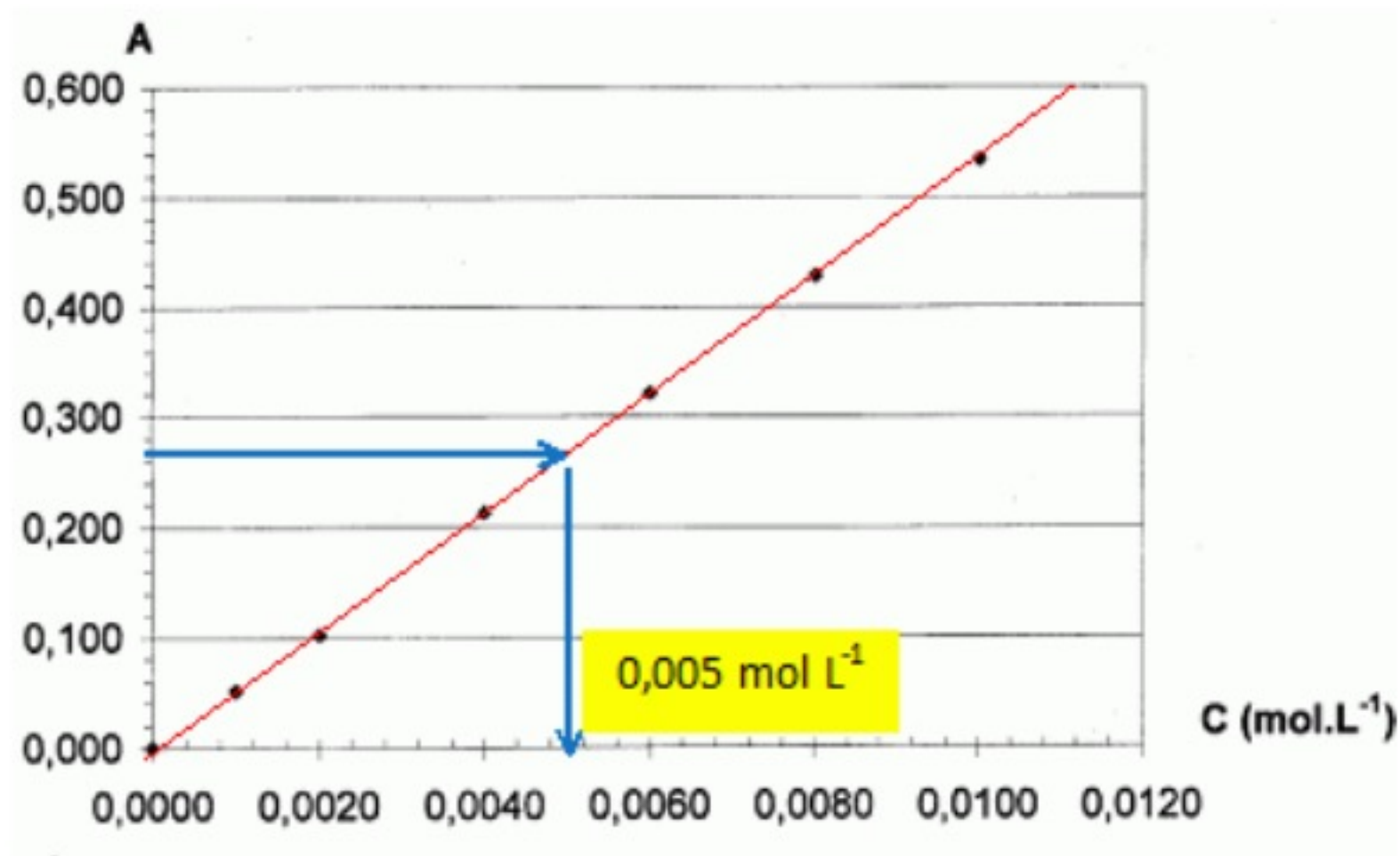
Par comparaison à plusieurs étalons:

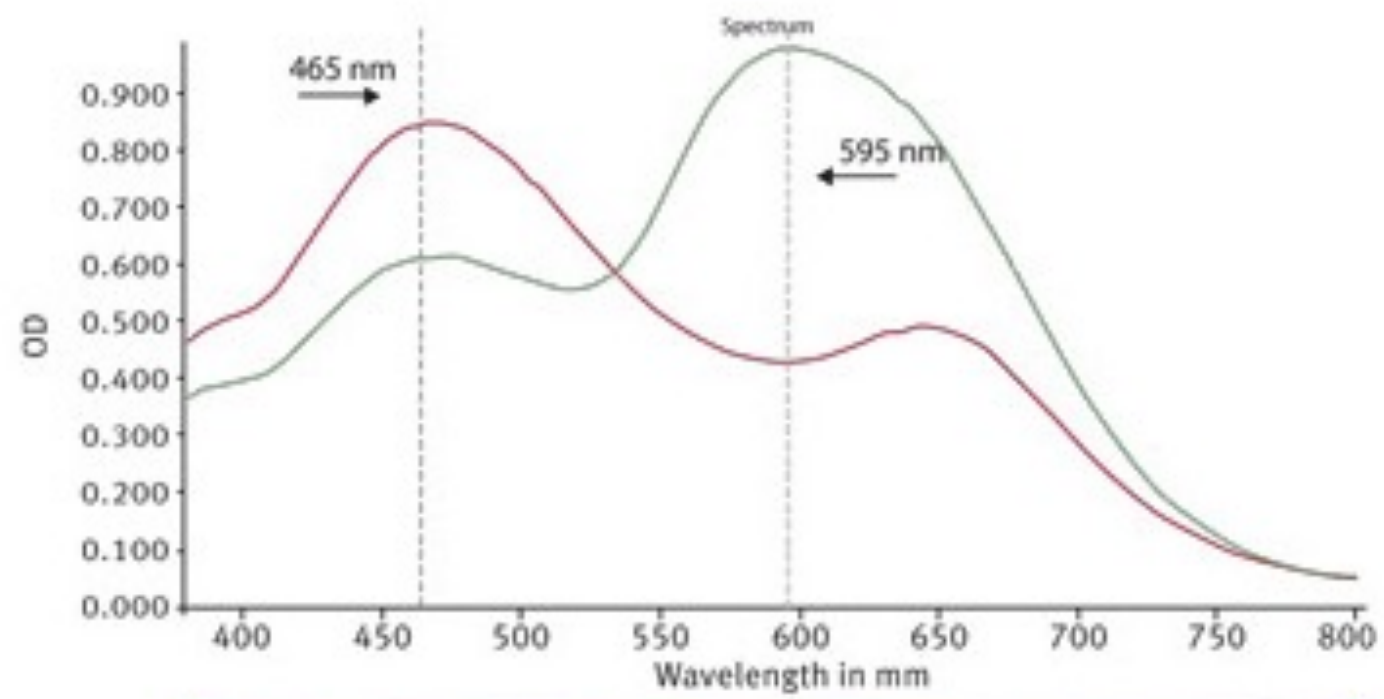
Il suffit de mesurer l'absorbance A de plusieurs étalons:

1. Préparer la solution mère de concentration connue.
2. Préparer les solutions filles (étalons).
3. Mesurer l'absorbance de chaque solution filles.
4. Tracer la courbe: $A=DO=f(C)$. (Une droite passant par l'origine).

La concentration C_x est obtenue par interpolation graphique.

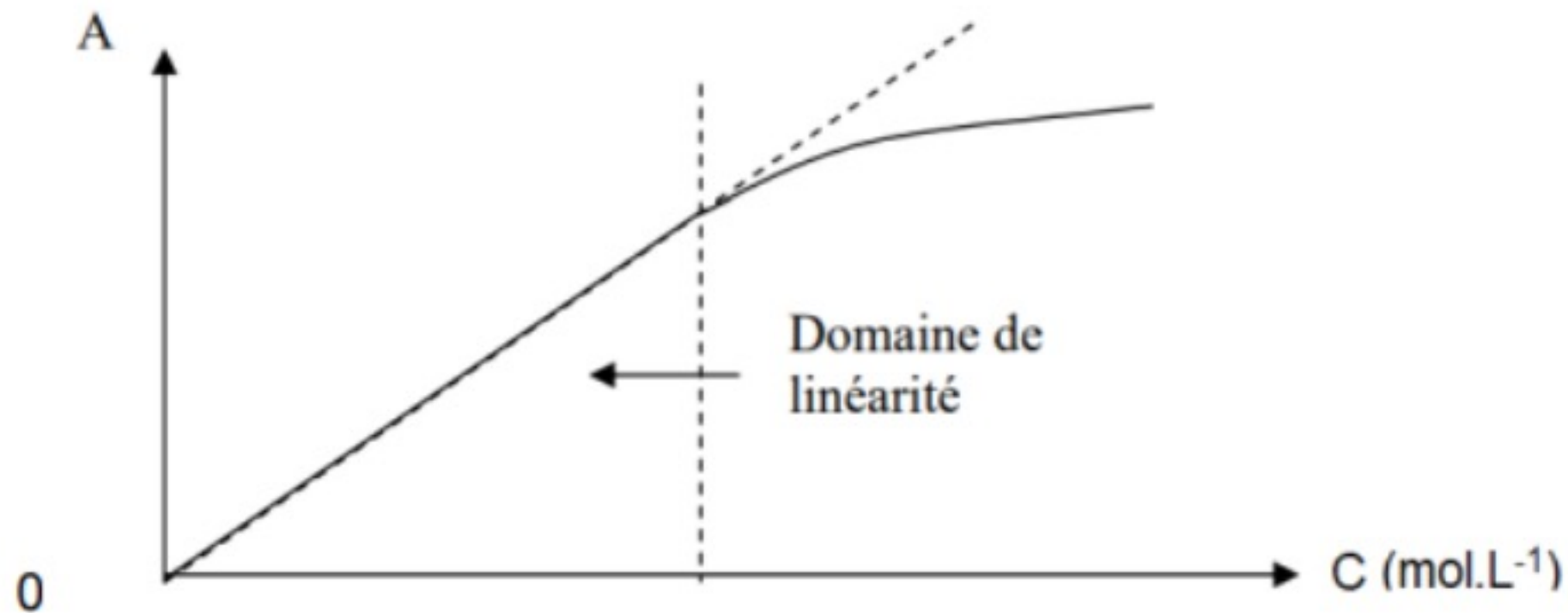
Pour ce dosage, on doit choisir une longueur d'onde maximum qui correspond à la plus forte absorption.





Remarque:

-Si l'allure du graphe $A=DO=f(C)$ est de la forme suivante :



Ne prendre en considération que la partie linéaire car $A=DO=f(C)$ est toujours linéaire.

Spectrophotomètre

Analyse quantitative ADN /ARNm : mesure de la concentration



Spectrophotomètre



Nanodrop

/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT
CCC CCT TTT CCC

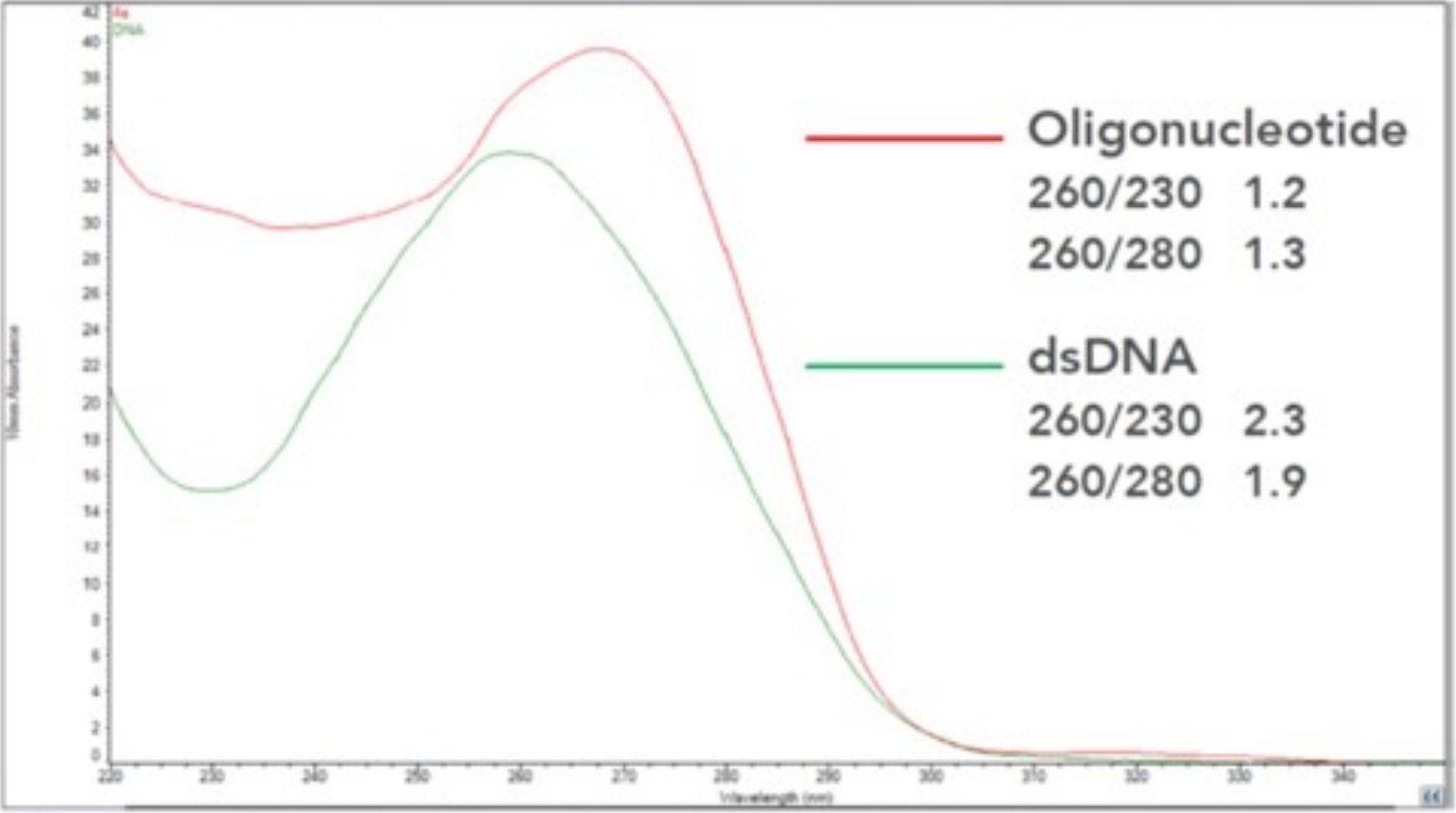


Figure 3. Le spectre d'UV d'un oligonucléotide pur.

Pour effectuer par spectrophotométrie directe le dosage d'une solution pure d'acides nucléiques, on utilise l'absorbance des rayons ultraviolets à 260 nm. On considère dans les calculs qu'une mole de nucléotides polycondensés représente 309 grammes. Il faut se placer autant que possible dans des conditions standard de mesure : cuve de 1 cm, solution 1 M (309 mg/mL), température ambiante, $[Na^+] 0,3 M$, rapport $A_{260}/A_{280} \geq 1,80$.

Dans ces conditions le coefficient d'extinction de l'ADN double brin est de $6200 A_{260} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$, c'est à dire qu'une unité d'absorbance à 260 nm (A_{260}) représente 50 $\mu g/mL$.

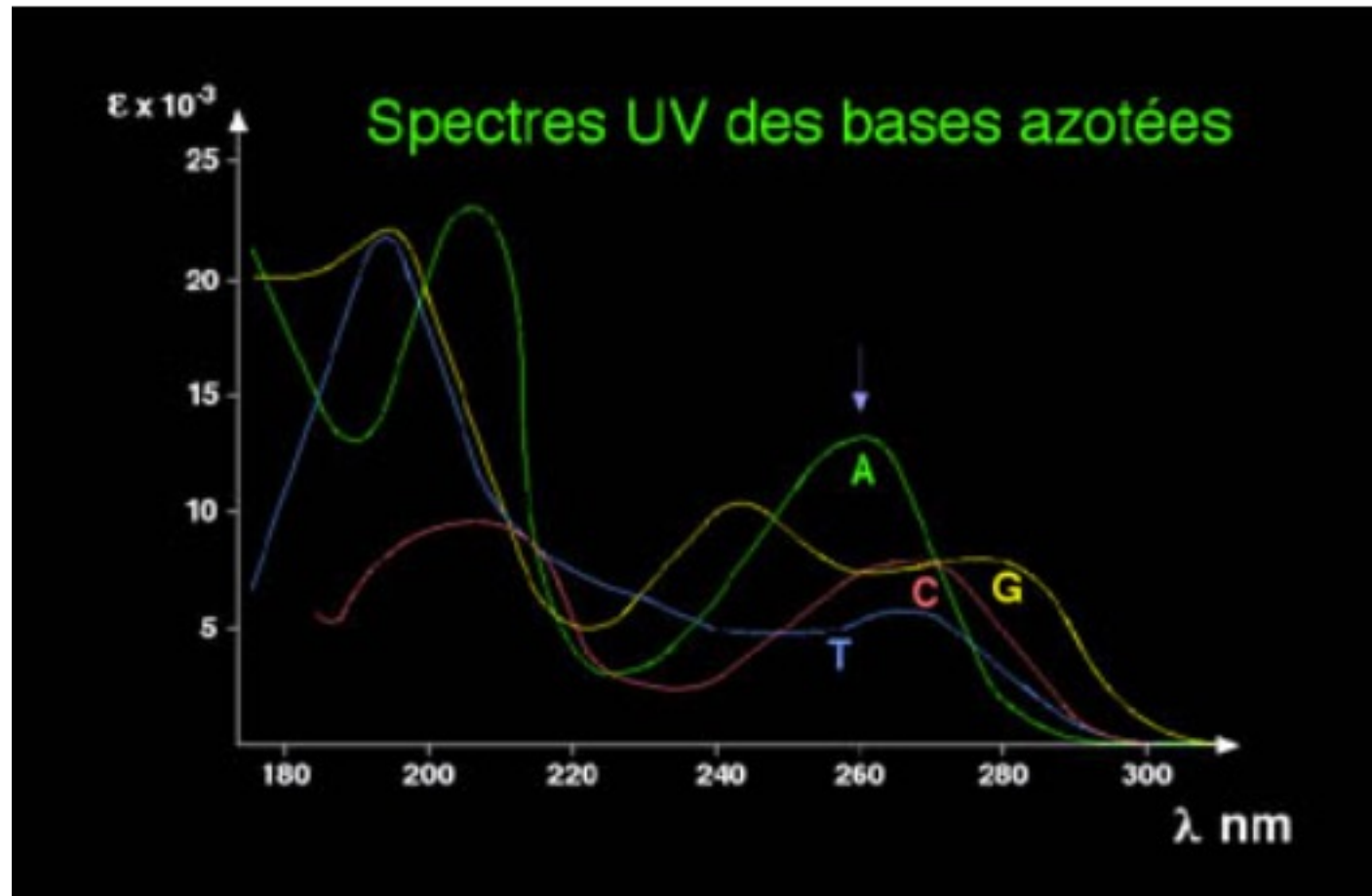
Au cours de la fusion de l'ADN, le coefficient d'extinction de la solution s'élève (hyperchromicité).

Dans ces conditions le coefficient d'extinction de l'ADN simple brin est de $8350 A_{260} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$, c'est à dire qu'une unité d'absorbance à 260 nm (A_{260}) représente 37 $\mu g/mL$.

Dans ces conditions le coefficient d'extinction de l'ARN est de $7700 A_{260} \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$, c'est à dire qu'une unité d'absorbance à 260 nm (A_{260}) représente 40 $\mu g/mL$.

Dosage spectrophotométrique d'un ADN purifié

Longueur d'onde (nm)	Absorbance	A_{260}/A_{280}
325	0	-
280	0,28	-
260	0,56	2
230	0,30	-



La plupart des molécules biologiques contenant des noyaux aromatiques absorbent les rayons ultraviolets à différentes longueurs d'onde. Dans l'ultraviolet de très courte longueur d'onde presque toutes les solutions de molécules biologiques sont opaques. Dans la région d'émission des lampes à vapeur de mercure (254 nm) les bases puriques et pyrimidiques ont des pics d'absorption spécifiques qu'on utilise pour comparer avec les spectres d'absorption des acides aminés aromatiques dans la même région. Sur ce graphe les ordonnées représentent l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentées en abscisse. Les zones d'absorption des quatre bases s'étalent de 240 à 280 nm de sorte que les acides nucléiques formés de ces quatre types de nucléotides ont un maximum d'absorption à 260 nm.

Dosage spectrophotométrique d'un ADN purifié

Longueur d'onde (nm)	Absorbance	A260/A280
325	0	-
280	0,28	-
260	0,56	2
230	0,30	-

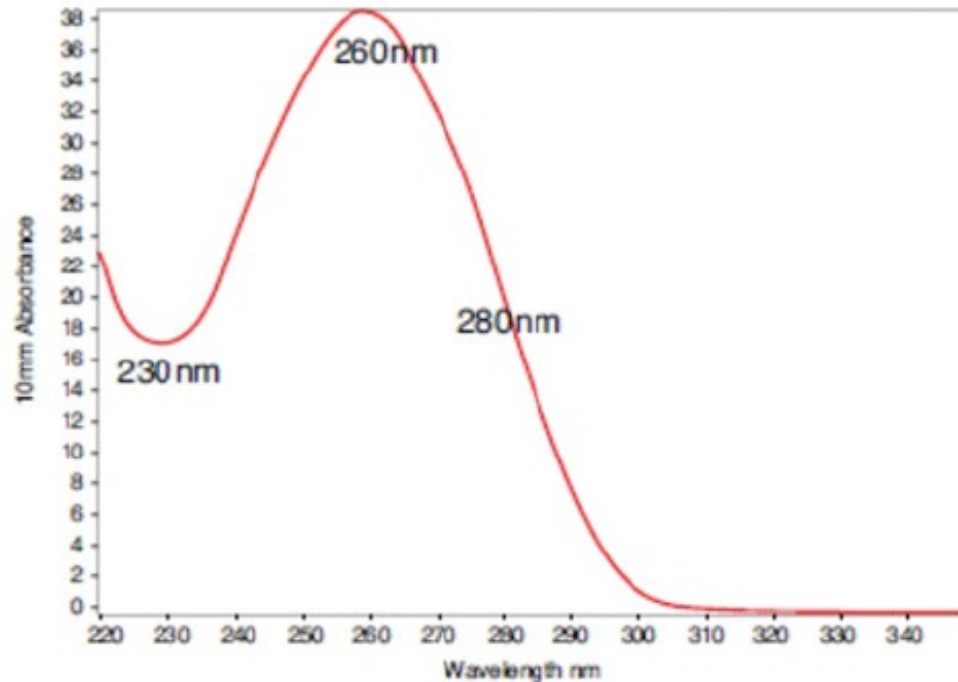


Figure 1. le spectre d'absorption caractéristique d'AND pur

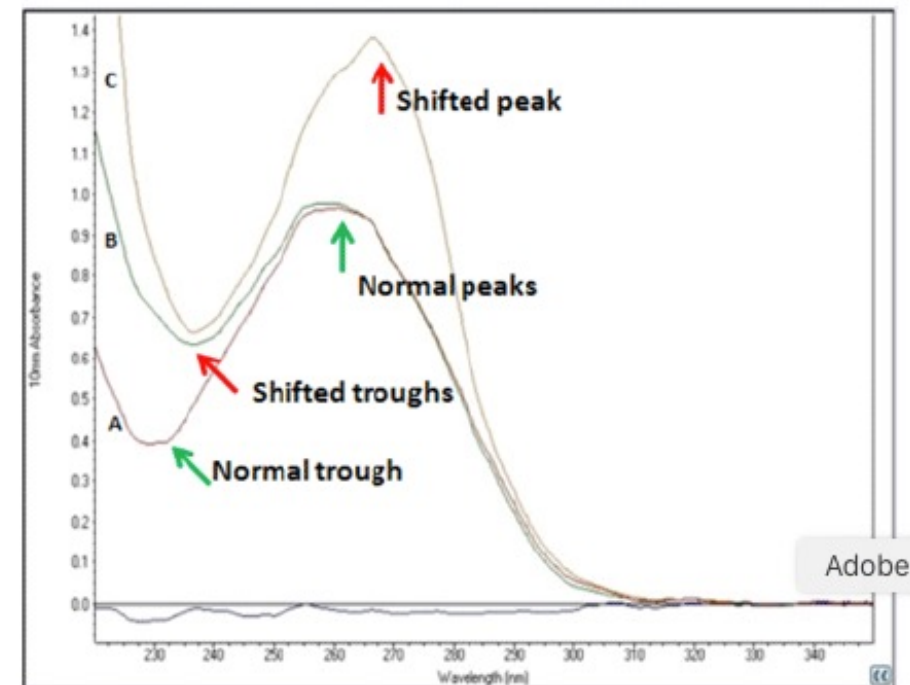


Figure 2. Spectre d'absorption d'ADN purifié.
A : sans contamination. B: le même ADN avec de la guanidine. C: le même AND avec du phénol.