



UE5C : Sciences Analytiques – Techniques spectrales

Spectrophotométrie électronique

Spectrométrie moléculaire dans l'UV/Visible

université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

Ali TFAYLI

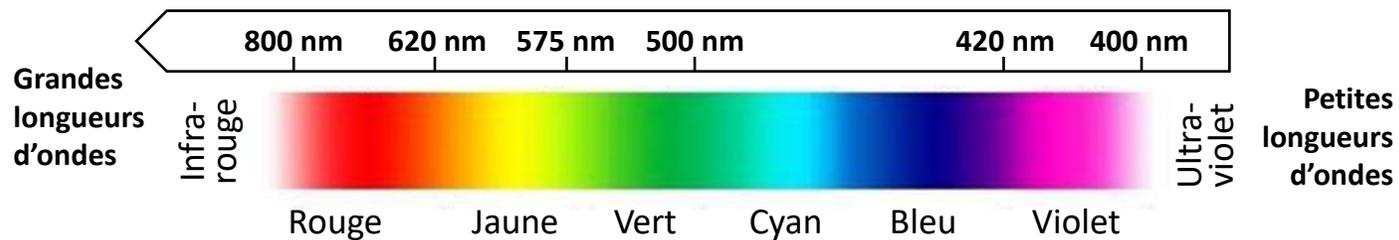
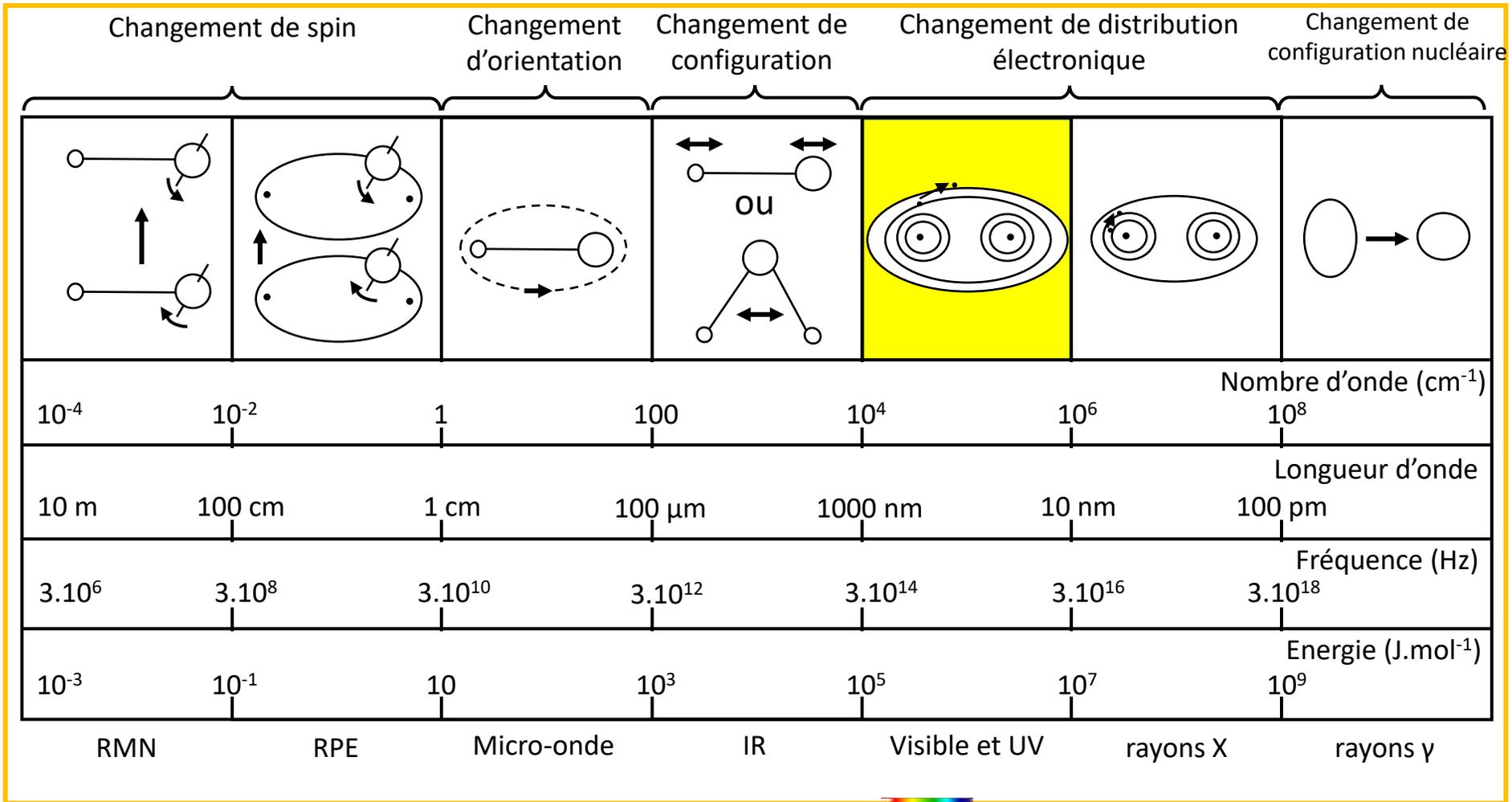
ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

cours 1

Plan

- Introduction
 - Spectroscopies optiques moléculaires
 - Principe général
- Loi de Beer-Lambert
- Instrumentation
- L'origine des absorptions
 - Les transitions électroniques
- Applications
 - Qualitatives
 - Quantitatives

Spectroscopies optiques moléculaires dans l'uv-visible



Spectrophotométrie uv-visible

Principe général

- S'adresse principalement aux molécules en solution*
 - Doivent présenter des groupements (**chromophores**) qui absorbent dans le domaine de l'UV/Visible (200-400 nm et 400-800 nm)
 - Le solvant doit être transparent
- Technique largement utilisée en analyses pharmaceutiques
 - Principalement en analyses quantitatives: dosage de solutions simples (1 ou 2 composés)
 - À un niveau moindre: pour l'identification de certaines molécules (P.E.)
 - Utilisée comme détecteur en chromatographie en phase liquide et en électrophorèse capillaire

* Les spectres d'absorption Uv/Visible peuvent être également obtenus pour des milieux gazeux ou solides

Spectrophotométrie uv-visible

Principe général

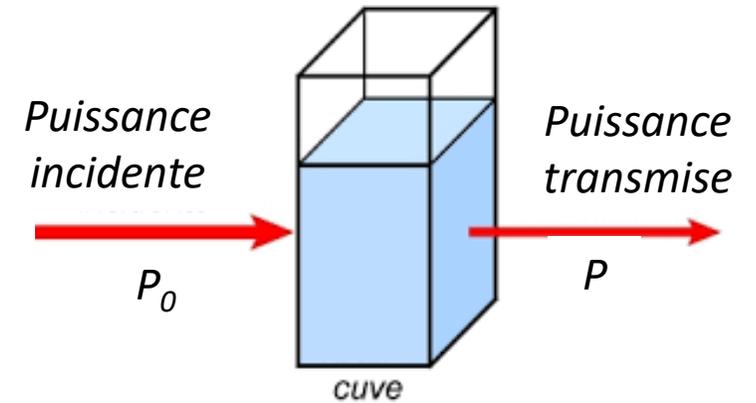
- On mesure l'atténuation d'un faisceau lumineux lorsqu'il traverse la solution
- Cuves en quartz pour l'analyse dans l'UV et en verre pour le visible

Transmittance*

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

Absorbance

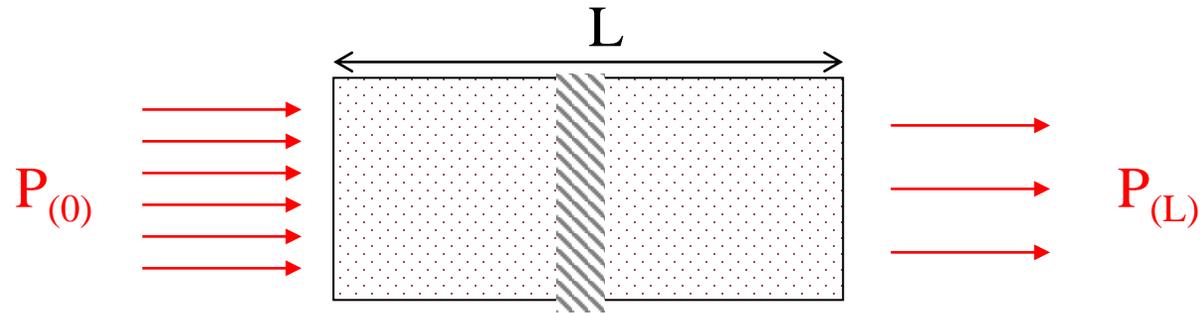
$$A = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = \log \left(\frac{1}{T} \right)$$



* Pour la terminologie voir Annexe I en fin du cours 1

Spectrophotométrie uv-visible

Loi de Beer-Lambert:



Hypothèse de Lambert:

Diminution (dP) de l'intensité d'une radiation **monochromatique** traversant un matériau d'épaisseur dx dont le coefficient d'absorption est k

$$dP = -K \cdot P_x \cdot dx \quad \Rightarrow \quad \int_{P_0}^P \frac{dP}{P_x} = - \int_0^x K dx \quad \Rightarrow \quad \ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = -Kx$$

Spectrophotométrie uv-visible

Loi de Beer-Lambert:

Beer a montré que cette relation pouvait être utilisée pour une solution diluée d'un composé dissous dans un milieu transparent et que k est proportionnel à la concentration molaire

$$dP = -k' \cdot c \cdot P_x \cdot dx \quad \Rightarrow \quad \ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = -k' c x$$
$$\Rightarrow -\log \left(\frac{P}{P_0} \right) = \frac{k'}{2,303} c x$$

$$\mathbf{A = \epsilon \cdot l \cdot c}$$

- ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$) est le coefficient d'absorption*
- l (cm) et c en mol/L

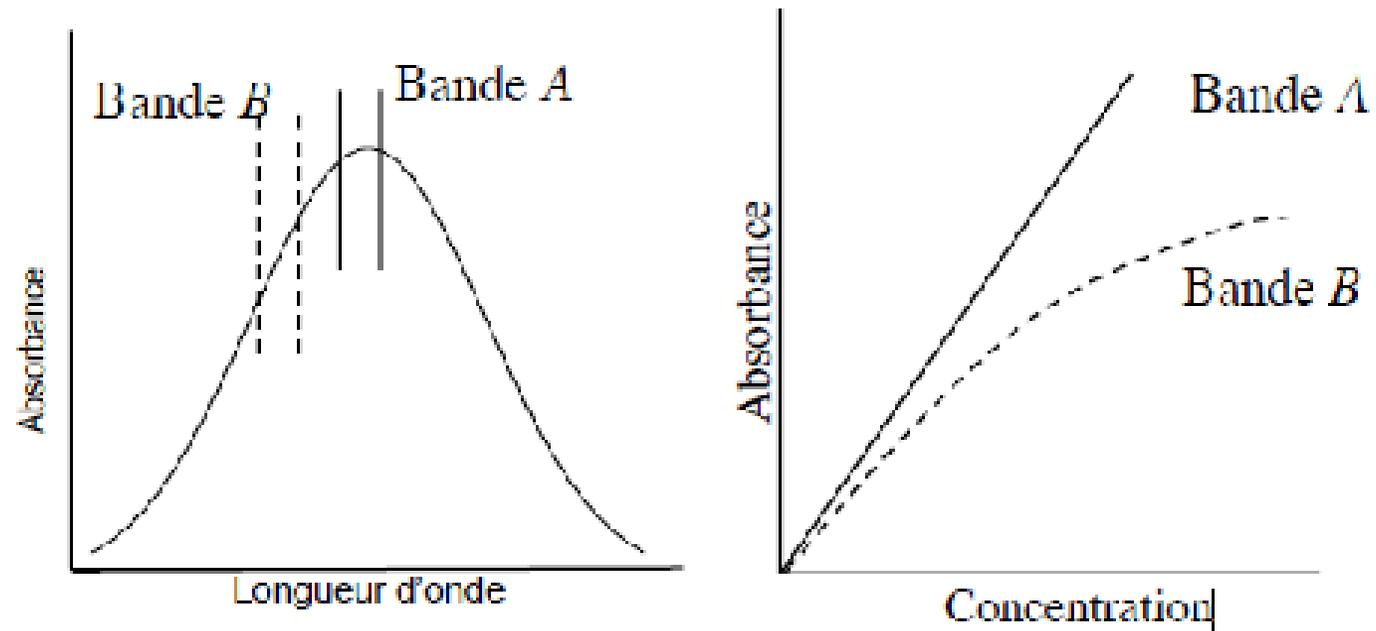
* Pour la terminologie voir Annexe I en fin du cours 1

Spectrophotométrie uv-visible

Loi de Beer-Lambert:

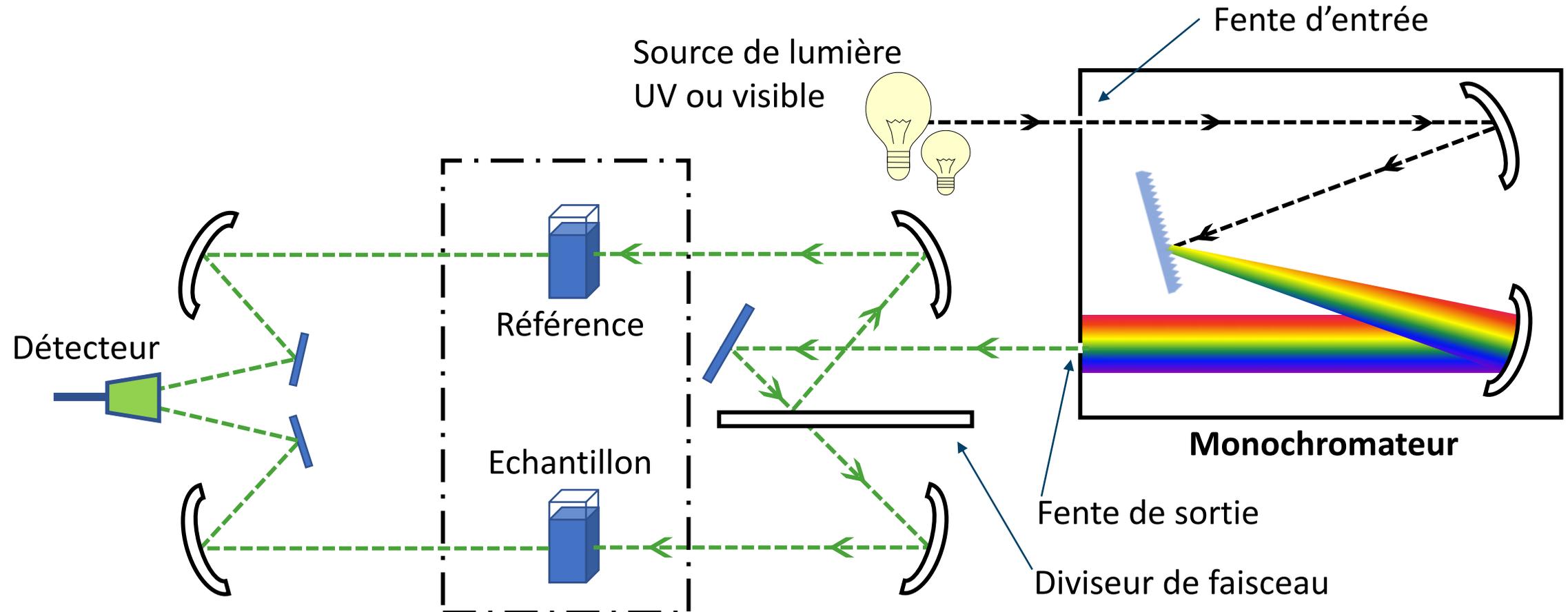
Elle peut être vérifiée si:

- La lumière utilisée doit être monochromatique
- Les concentrations du chromophore doivent être faibles $\approx 1 \text{ mg/ 100mL}$
- Les concentrations des autres espèces ne doivent pas être élevées (surtout les électrolytes)



Spectrophotométrie uv-visible

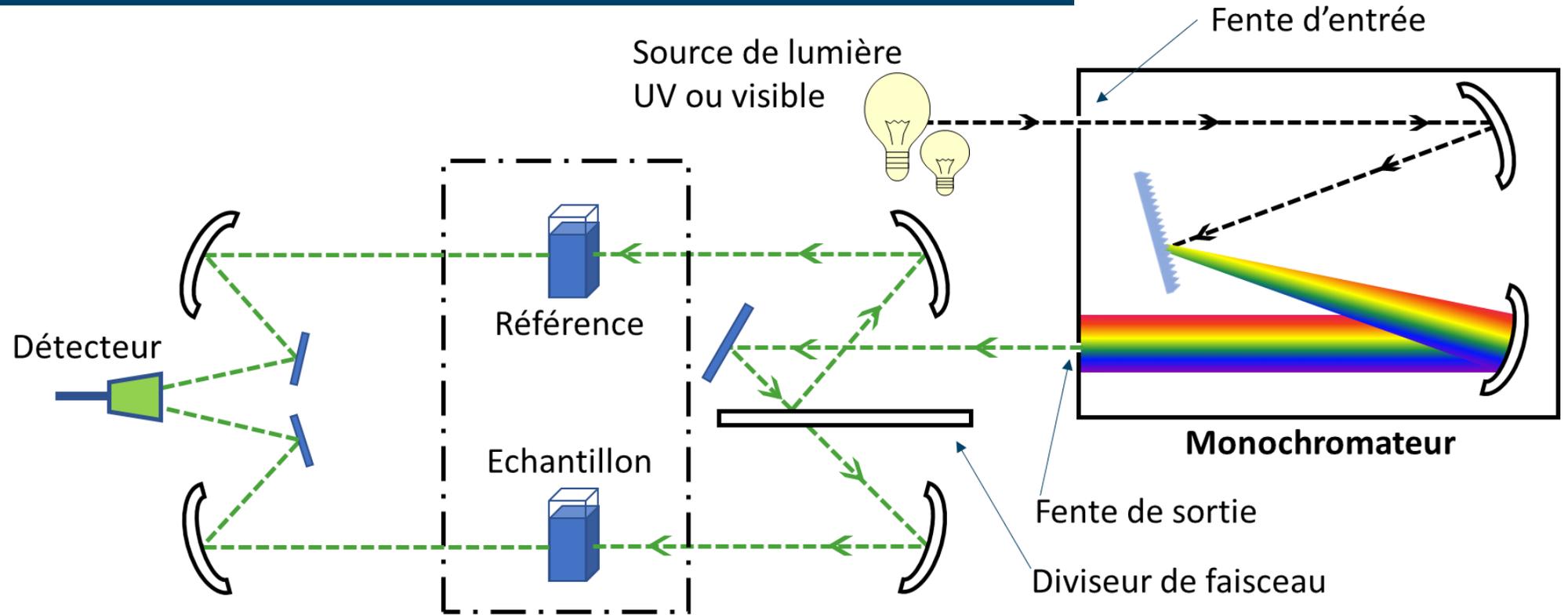
Instrumentation: Spectrophotomètre à double faisceau



permet de s'affranchir de l'absorption de la lumière monochromatique par le solvant.

Spectrophotométrie uv-visible

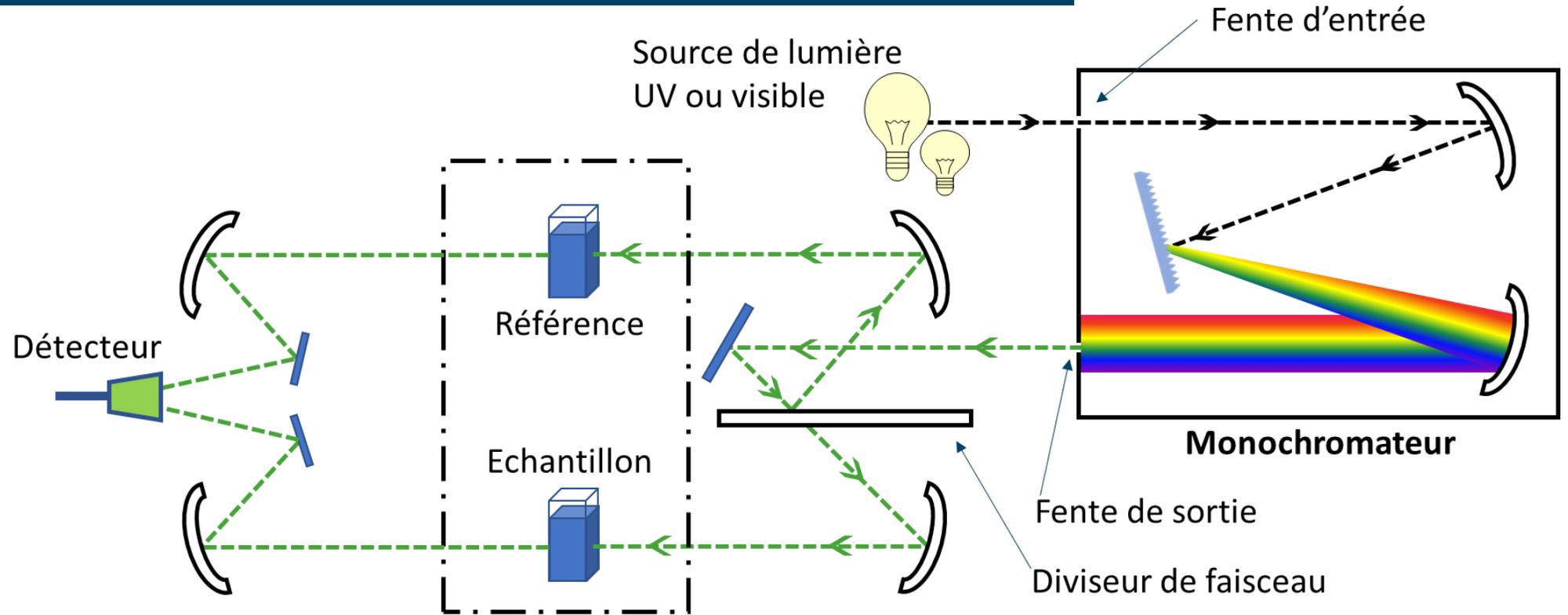
Instrumentation: Spectrophotomètre à double faisceau



- Source polychromatique: lampe deutérium (190-400nm) pour l'UV ou tungstène-halogène pour le visible (400-800 nm)
- Monochromateur:
 - prisme ou réseau permet de séparer les longueurs d'ondes de la source,
 - fentes d'entrée et sortie déterminent la largeur du faisceau lumineux

Spectrophotométrie uv-visible

Instrumentation: Spectrophotomètre à double faisceau



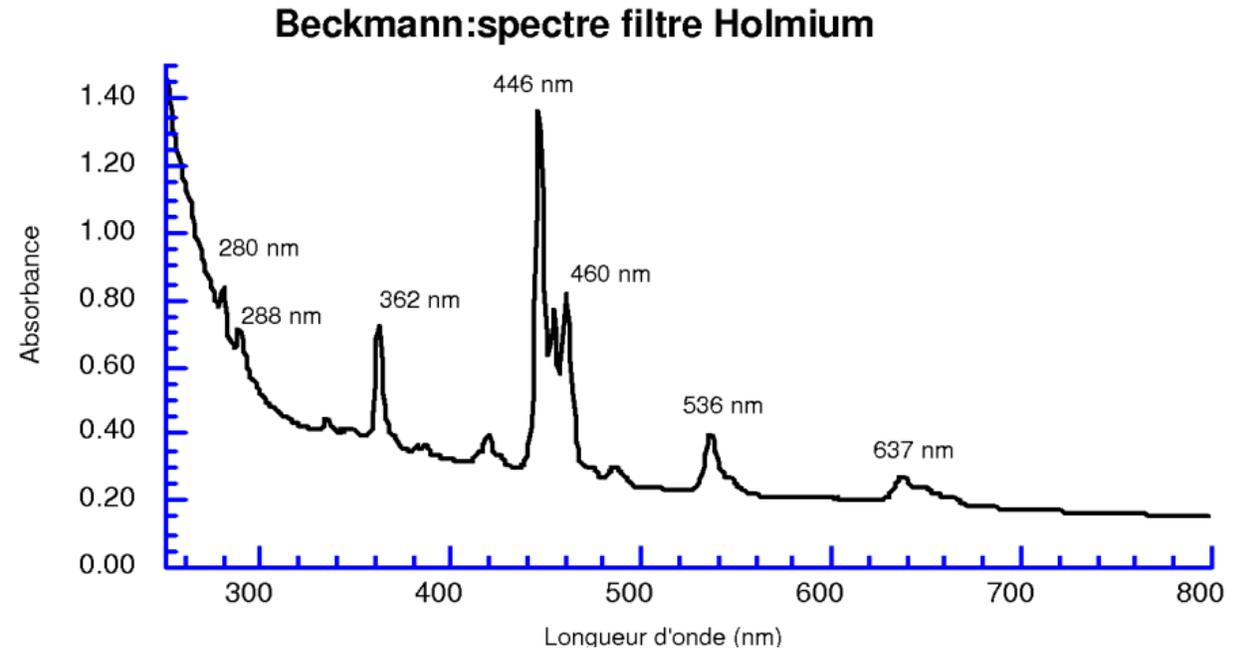
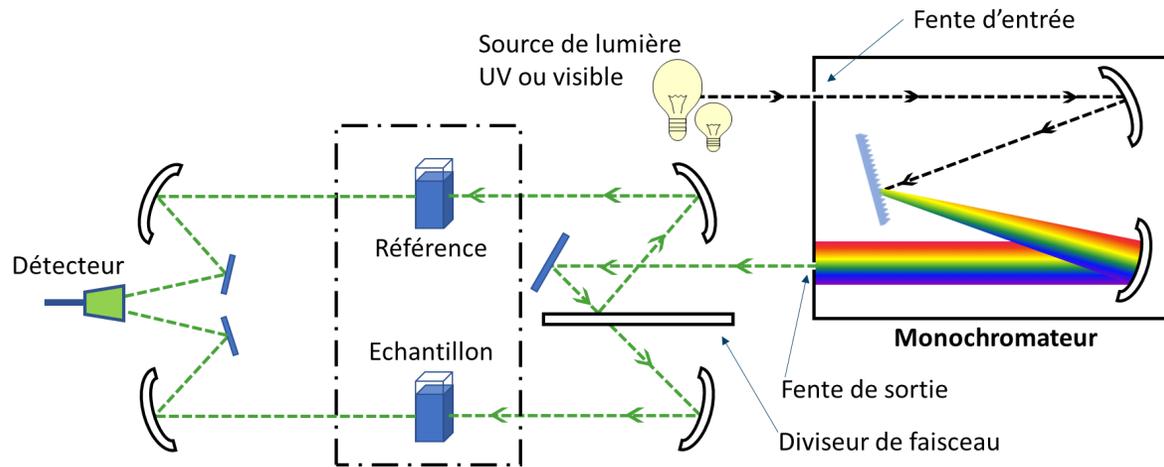
- **Diviseur:** permet de séparer la lumière monochromatique en deux faisceaux
 - L'un traverse la cuve « référence » qui contient le solvant
 - L'autre traverse la cuve « échantillon » qui contient le composé à analyser en solution dans le solvant
- **Détecteur:** enregistre l'intensité lumineuse transmise à travers les deux cuves.

Spectrophotométrie uv-visible

Instrumentation: Spectrophotomètre à double faisceau

Enregistrement d'un spectre

- Le réseau pivote sur un axe et permet de sélectionner les différentes longueurs d'onde de la lumière émise par la source
- Le tracé de l'absorbance obtenue pour chaque longueur d'onde permet d'obtenir le spectre d'absorbance du composé

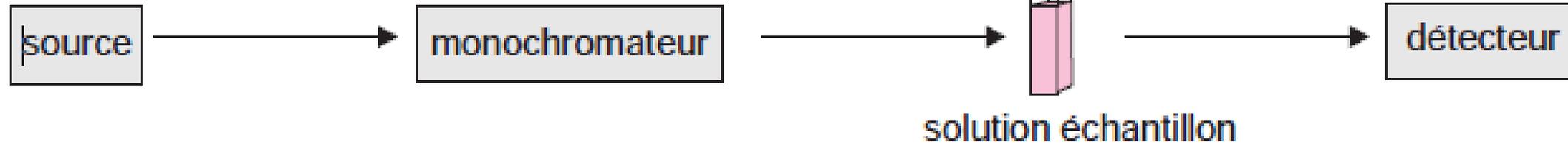


Filtre d'holmium utilisé pour vérifier l'exactitude des longueurs d'ondes des appareils (P.E. 2.2.25)

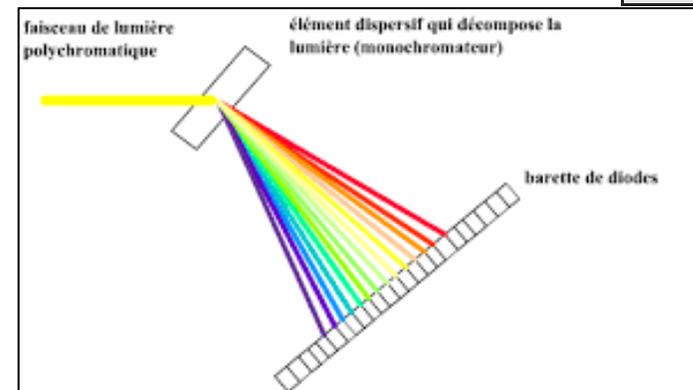
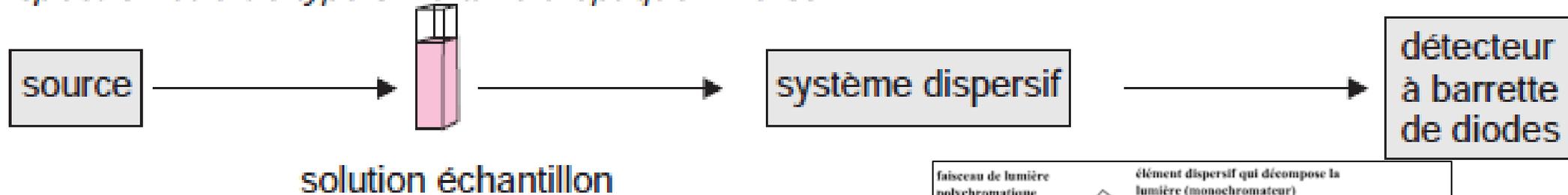
Spectrophotométrie uv-visible

Instrumentation: Spectrophotomètre à simple faisceau

spectromètre de type séquentiel à optique normale



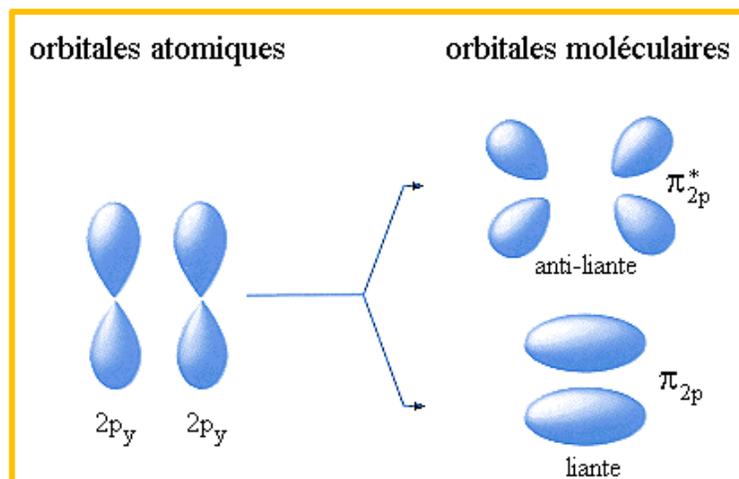
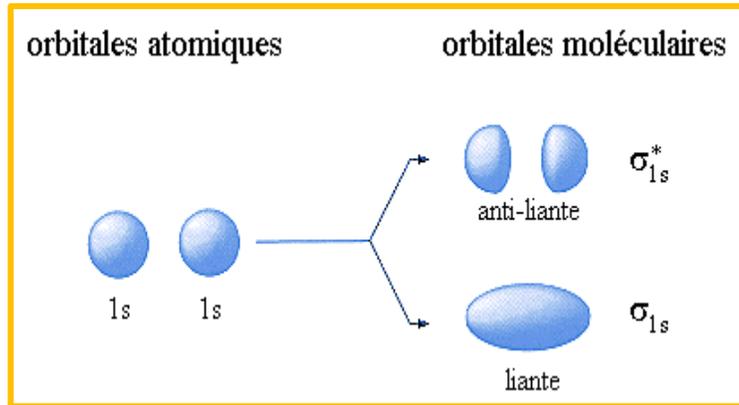
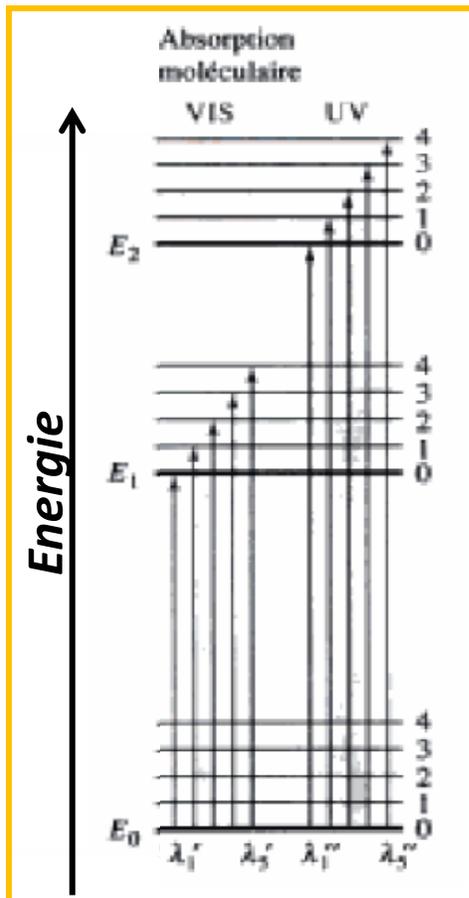
spectromètre de type simultané à optique inverse



Spectrophotométrie uv-visible: origine de l'absorption

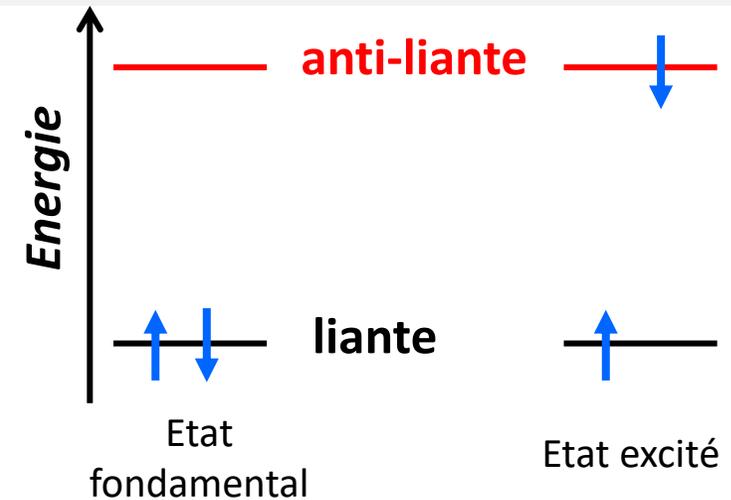
Transitions électroniques

Interactions des photons avec les électrons qui participent directement à la formation de la liaison (associés à plus qu'un atome) ou avec ceux qui sont localisés sur des atomes tels que O, S, N et les halogènes **



** les électrons de valence en périphérie des atomes, sont répartis par paires dans les orbitales moléculaires liantes (dites σ et π) et non liantes (dites n)

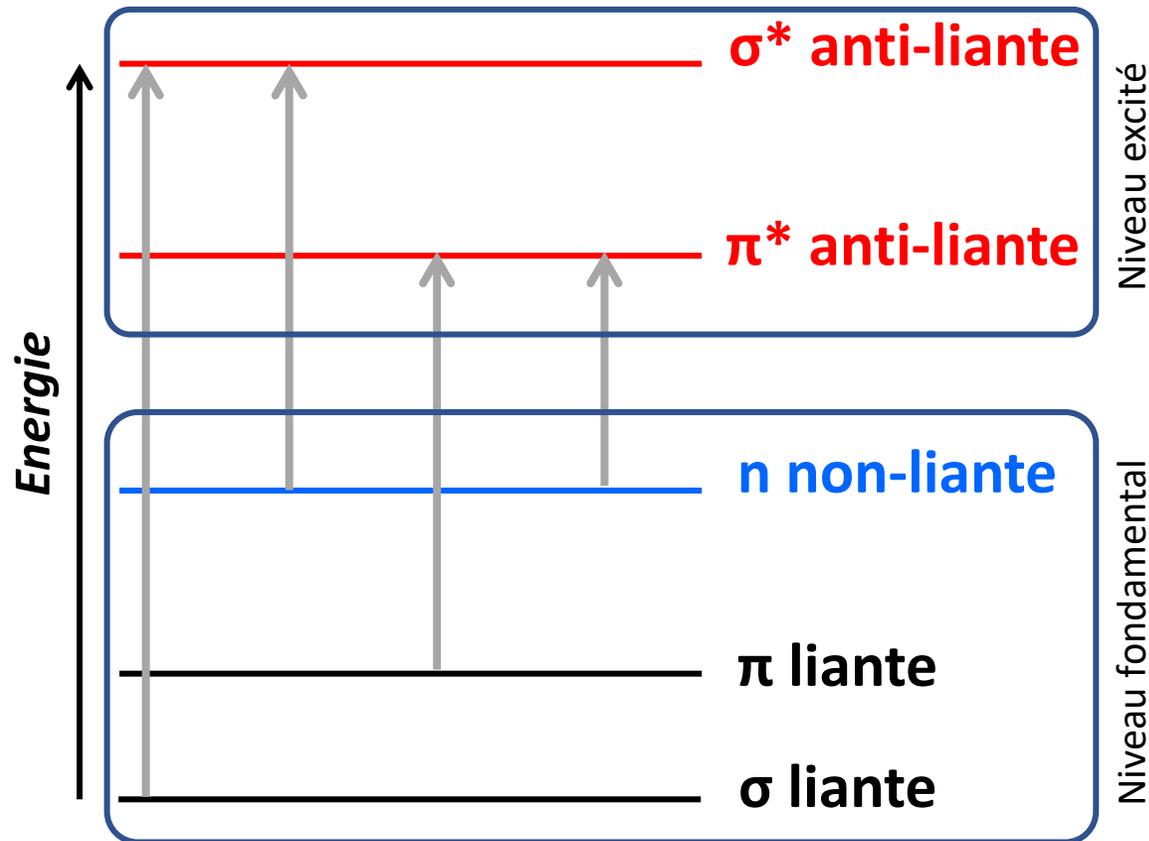
transitions des électrons des orbitales moléculaires liantes ou non liantes remplies vers des orbitaux anti-liants non remplis



Les transitions électroniques (10^{-15} s) plus rapides que les vibrations atomiques (10^{-12} s)

Spectrophotométrie uv-visible: origine de l'absorption

Transitions électroniques



Pour les molécules organiques, transition électronique vers les orbitales anti-liantes σ^* et π^*

4 transitions possibles

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (toute liaison simple)
- $\pi \rightarrow \pi^*$ (composés insaturés)
- $n \rightarrow \sigma^*$ (composés à doublet libre)
- $n \rightarrow \pi^*$ (doublet libre et insaturation)

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

1- Transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$

ΔE élevée

Excitation dans l'uv lointain < 150 nm

Intensité importante

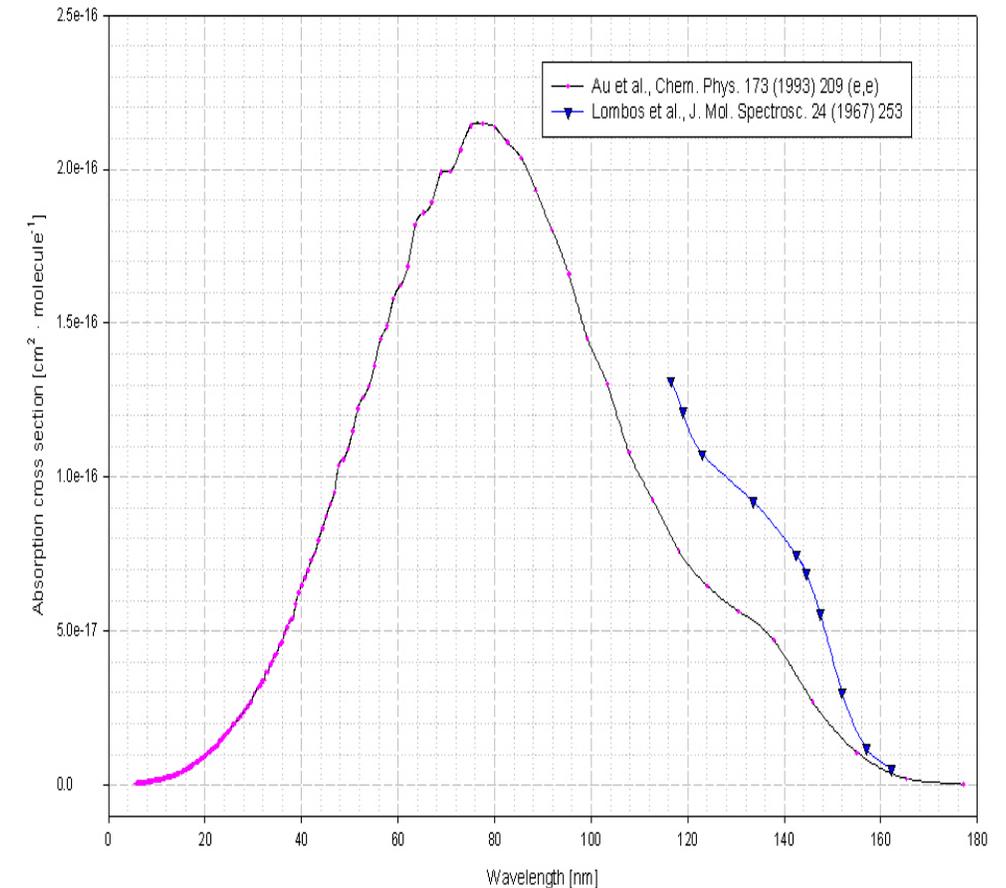
Exemple Hexane $\epsilon = 10000 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$ à $\lambda=135$ nm

Les électrons impliqués dans les liaisons simples sont si fortement liés que leur excitation nécessite une énergie correspondant à l'ultraviolet lointain

Le quartz et les composantes atmosphériques absorbent dans cette région

Dans la pratique les appareils classiques ne travaillent pas en dessous de 190 nm.

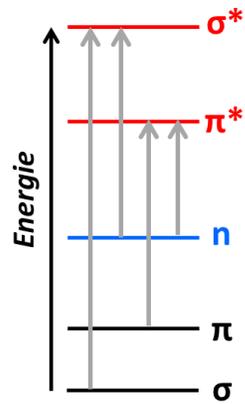
L'hexane est un solvant transparent dans l'uv proche et le visible



VUV absorption cross sections of n-hexane $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ at room temperature
(converted from (e,e) photoabsorption oscillator strengths and from optical measurements)

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

2- Transitions $n \rightarrow \sigma^*$



Electron d'un doublet n des atomes O, N, S, Cl vers σ^*

ΔE moins élevée

Excitation possible de 150 nm à 200 nm

Intensité moyenne

Alcools

$\lambda_{\max} \approx 180$ nm

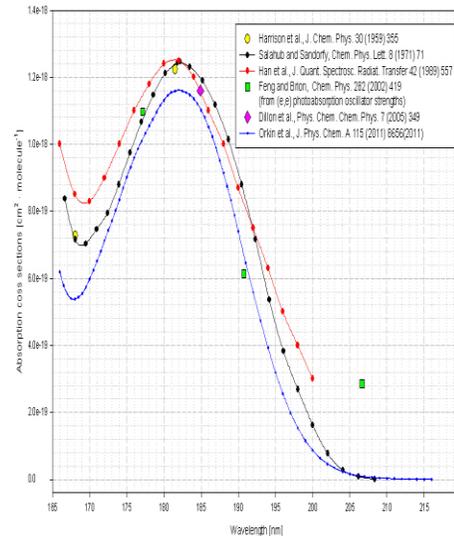
Ethers, solvants chlorés

$\lambda_{\max} \approx 190$ nm

Amines

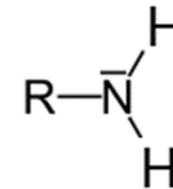
$\lambda_{\max} \approx 220$ nm

Les alcools comme le méthanol sont des solvants utilisables au dessus de 200 nm ($\lambda_{\max} = 183$ nm $\epsilon = 50$).

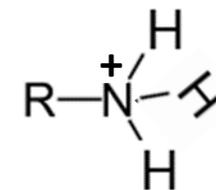


Absorption cross sections of ethanol C₂H₅OH at room temperature above 166 nm

Exemple: amine primaire

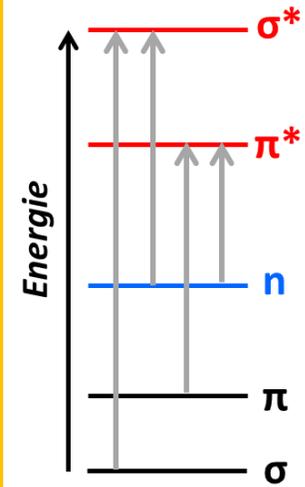


Note: l'ionisation engage le doublet et bloque la transition: disparition de la bande d'absorption



Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

3- Transitions $n \rightarrow \pi^*$



Passage d'un électron d'une OM non liante de type n à une OM anti-liante π^*

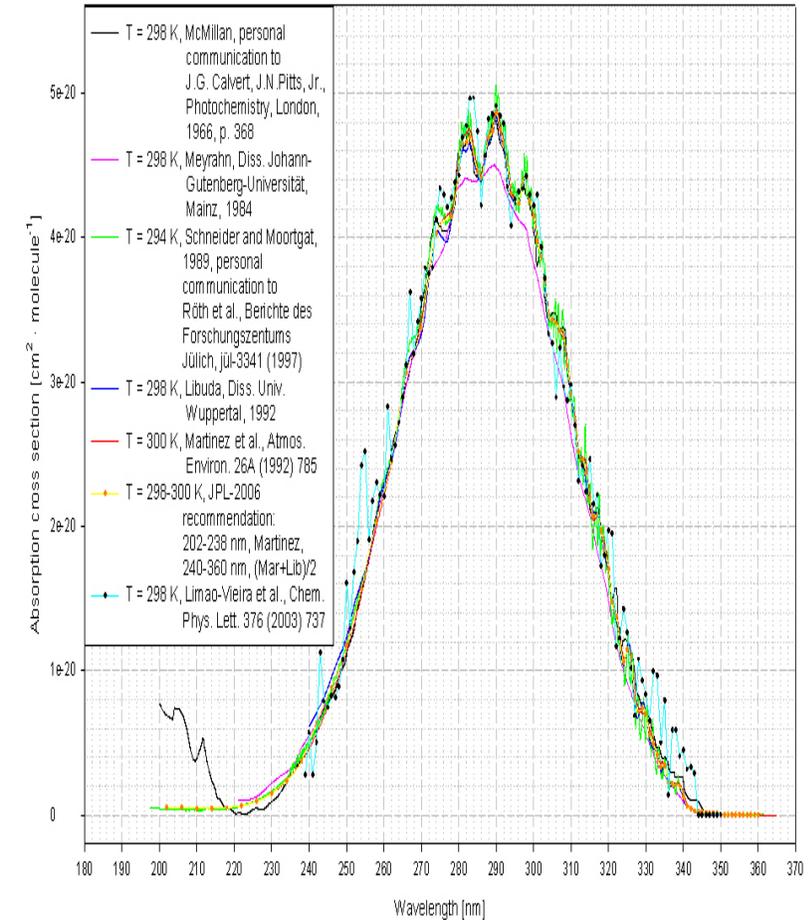
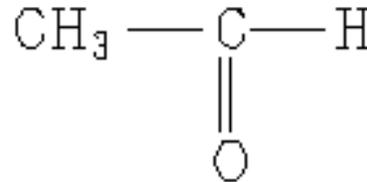
Molécules porteuses d'un hétéroatome porteur d'un doublet électronique et appartenant à un système insaturé

ΔE plus faible

Intensité peu intense

bande carbonyle entre 270 et 295 nm

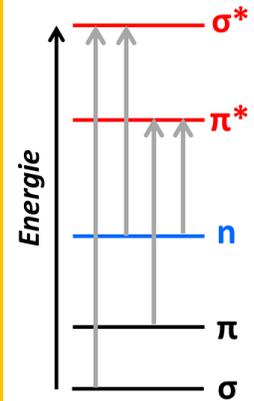
Exemple acétaldéhyde $\lambda=293$ nm et $\epsilon=12$



Absorption cross sections of acetaldehyde CH_3CHO at room temperature

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

4- Transitions $\pi \rightarrow \pi^*$



Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm

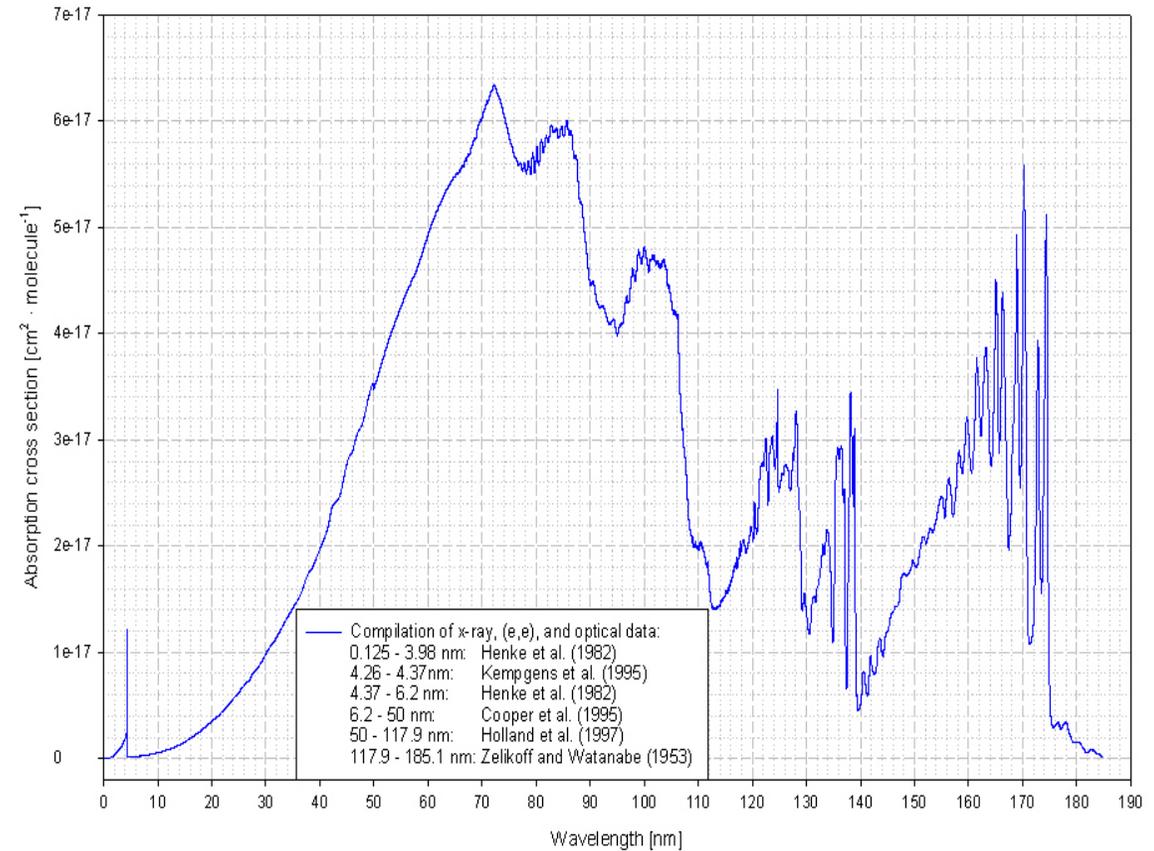
ΔE faible

Intensité importante

Ex. :

éthylène : $\lambda_{\max} = 165 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16000 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$)

la position dépend de la présence de substituants hétéro-atomiques



VUV absorption cross sections of ethylene $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ at room temperature, compilation of x-ray, (e,e), and UV data by Holland et al., Chem. Phys. 219 (1997) 91

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

Influence de la conjugaison

La conjugaison de deux chromophores (ou plus) tend à **déplacer** les maxima des pics vers des **longueurs d'ondes supérieures (effet bathochrome (red shift))** avec une **augmentation de l'intensité de l'absorption (effet hyperchrome)**

Ex. butadiène: 2 molécules d'éthylène.

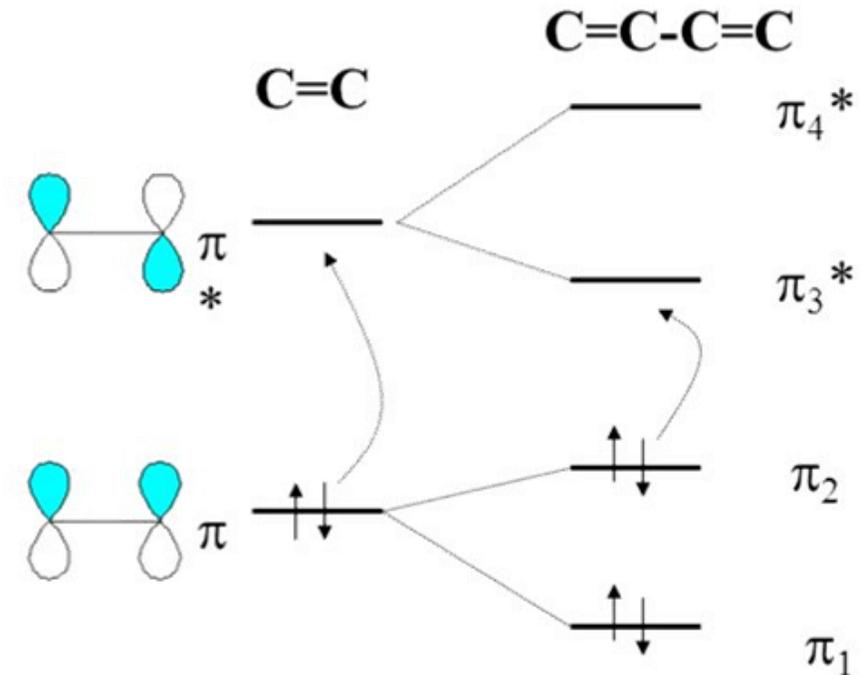
2 doubles liaisons auxquelles s'associent les électrons π et par conséquent deux niveaux fondamentaux π et deux niveaux excités π^* .

La distance entre le niveau fondamental π_2 le plus élevé et le niveau excité π_3^* le plus bas est plus faible que la distance entre les niveaux π et π^* de l'éthylène.

Effet bathochrome important

Environ 30 à 50 nm

Butadiène: $\lambda_{\max} = 217$ nm, Ethylène, $\lambda_{\max} = 165$ nm



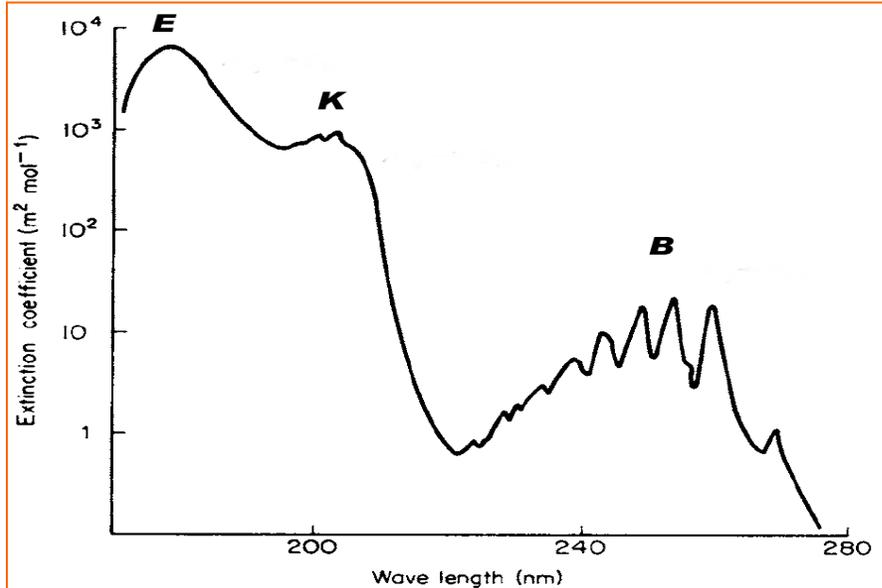
Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

Influence de la conjugaison

Dérivés aromatiques:

Dans le benzène il existe 3 double liaisons conjuguées donc 6 orbitales π possibles, 3 à l'état fondamental et 3 excité

Benzène : deux bandes $\pi \rightarrow \pi^*$ à 215 et 254 nm



Si le nombre de double liaisons est suffisant, l'absorption peut se faire dans le visible. Ainsi le carotène est orange



β -carotène absorbe à 452 nm.

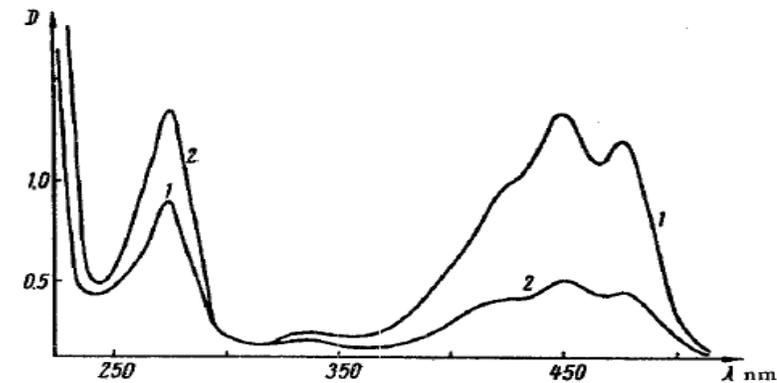


Fig. 1. Spectra of β -carotene in n-hexane out of contact with air: 1) freshly prepared, 2) after 10 days in the light.

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

Principaux groupements chromophores

Chromophore	Transition	λ_{\max}	$\log(\epsilon)$
nitrile	$n \rightarrow \pi^*$	160	<1.0
alcyne	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	3
alcène	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	3
alcool	$n \rightarrow \sigma^*$	180	2.5
éther	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3.5
cétone	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	3
	$n \rightarrow \pi^*$	280	1.5
aldéhyde	$\pi \rightarrow \pi^*$	190	2
	$n \rightarrow \pi^*$	290	1
amine	$n \rightarrow \sigma^*$	190	3.5
acide	$n \rightarrow \pi^*$	205	1.5
ester	$n \rightarrow \pi^*$	205	1.5
amide	$n \rightarrow \pi^*$	210	1.5
thiol	$n \rightarrow \sigma^*$	210	3
nitro	$n \rightarrow \pi^*$	271	<1.0
azo (-N=N-)	$n \rightarrow \pi^*$	340	<1.0

Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

Substituants auxochromes

Un auxochrome est un groupement d'atomes ionisables pouvant changer la fréquence d'absorption d'un chromophore.

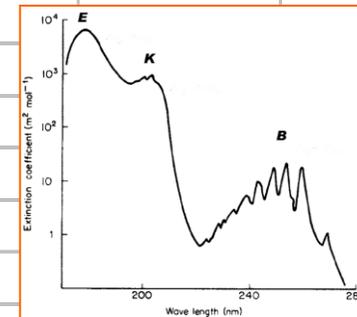
Ces groupes auxochromes augmentent la délocalisation électronique, modifiant ainsi les énergies d'absorption donc les coefficients d'extinction molaires et les fréquences d'absorption

Effet bathochrome (red shift): déplacement du maximum de la bande vers des longueurs d'ondes supérieures. L'inverse est hypsochrome (blue shift)

Effet hyperchrome: augmentation du coefficient d'absorption au maximum d'absorption. L'effet inverse est hypochrome

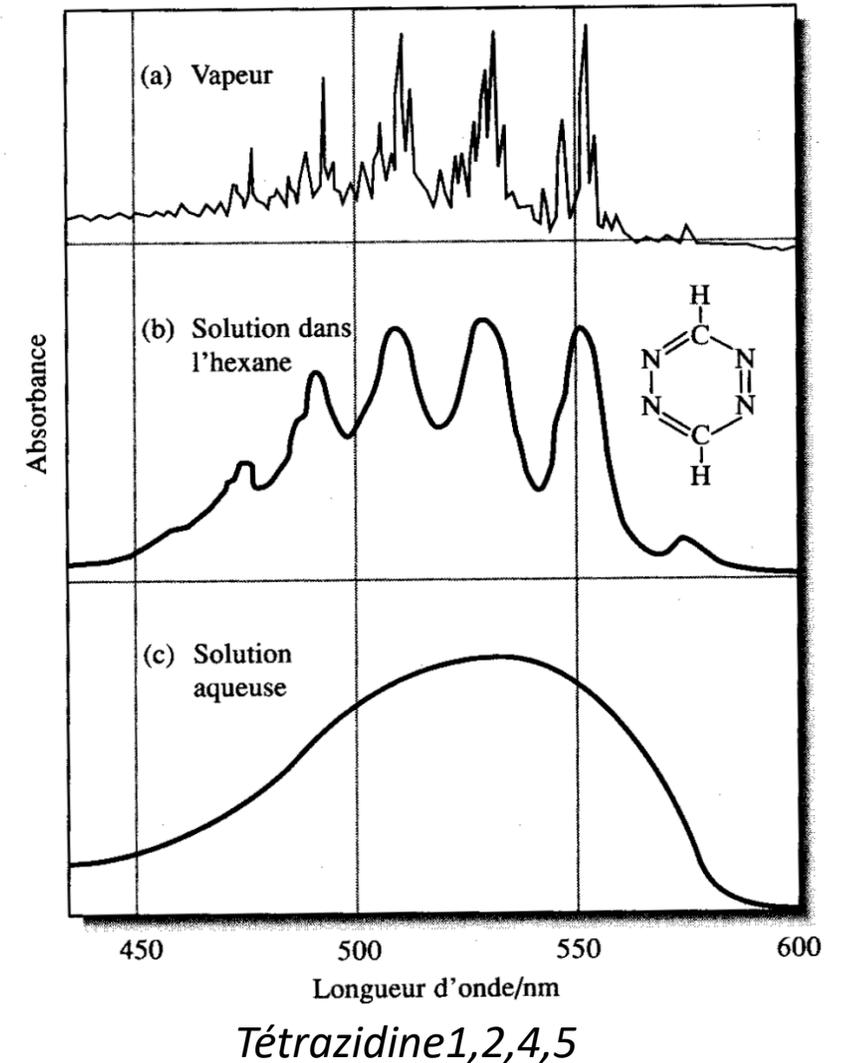
cas du benzène

	Bande	E ($\epsilon > 30000$)	K ($\epsilon \sim 10000$)	B ($\epsilon \sim 300$)	R ($\epsilon \sim 50$)	
	aucun	184	204	254		
Electrodonneurs						
	R	189	208	262		
	OH		211	270		
	NH ₂		230	280		
Electroattracteurs						
	F			204	254	
	Cl			210	257	
	NH ₃ ⁺			203	254	
liaisons π						
	-C=CH ₂			248	282	
	alcyne	202	248	278		
	CHO			242	280	328
	-C(O)R			238	276	320
	COOH			226	272	
	CN			224	271	
	NO ₂			252	280	330



Effets du solvant

- La structure fine liée aux états de vibration et rotation n'est observable qu'à l'état gazeux.
- **En solution:**
 - la rotation est contrainte
 - les énergies des différents niveaux vibrationnels est affectée de façon variable selon la polarité des solvants (plus prononcée



Effets du solvant

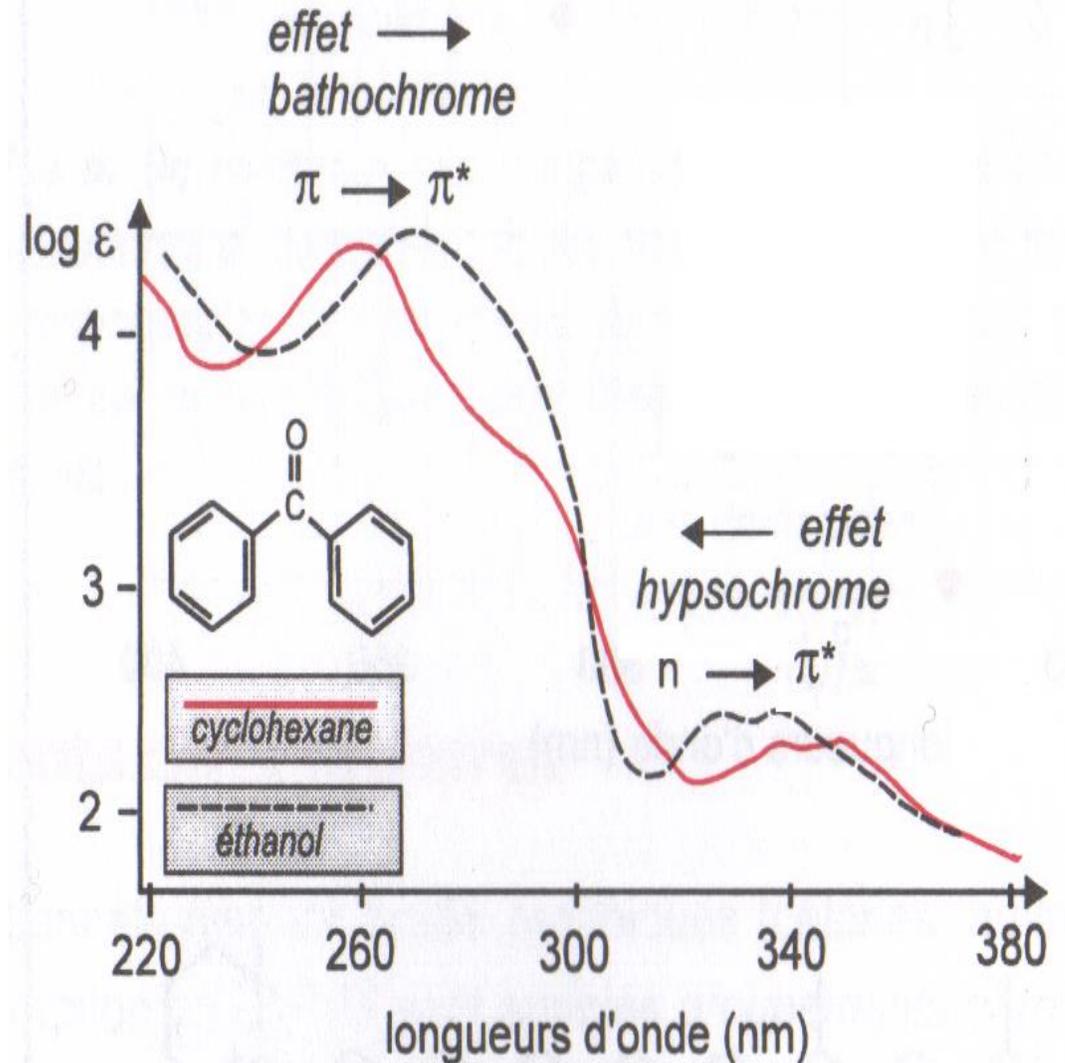
- Dans les solvants polaires

- Le niveau π^* est abaissé, la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ demande moins d'énergie, la bande est déplacée vers les fortes longueurs d'ondes

- **Effet bathochrome**

- Le niveau n est abaissé, la transition $n \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \sigma^*$ demandent plus d'énergie, la bande est déplacée vers les faibles longueurs d'ondes

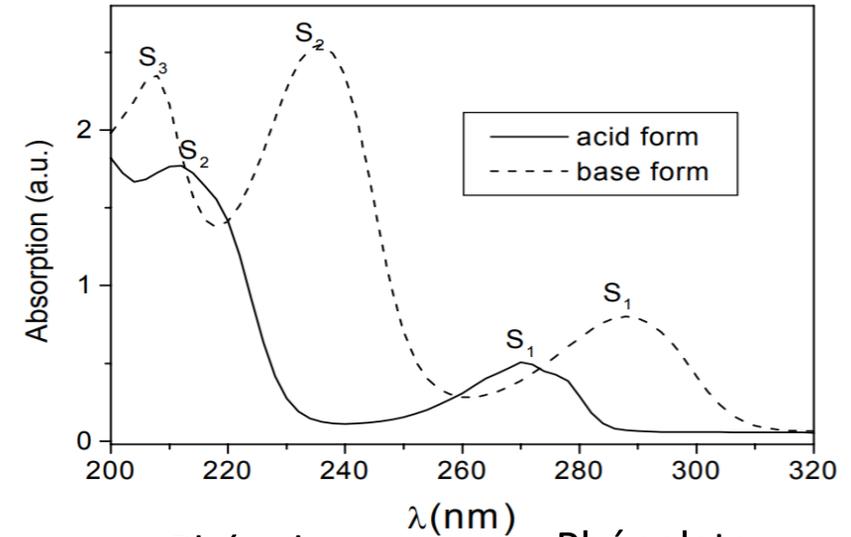
- **Effet hypsochrome**



Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

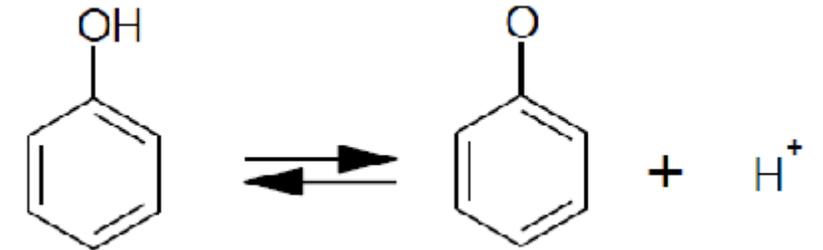
Influence du pH du solvant

- Le spectre des acides et des bases faibles varie en fonction de leur état d'ionisation



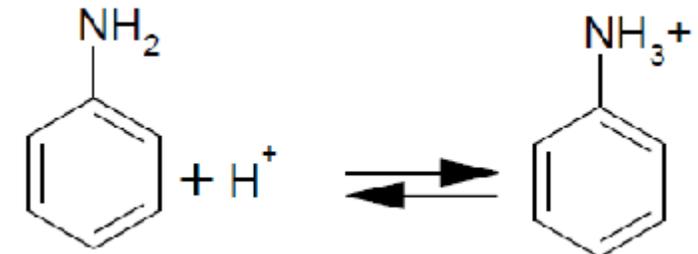
- Exemple: phénol:**

- La forme ionisée possède 3 doublets non liants susceptibles d'être engagés dans les transitions $n \rightarrow \pi^*$. Il y a en outre augmentation de la mésomériel
- **Effet bathochrome et hyperchrome à $pH > pKa$**



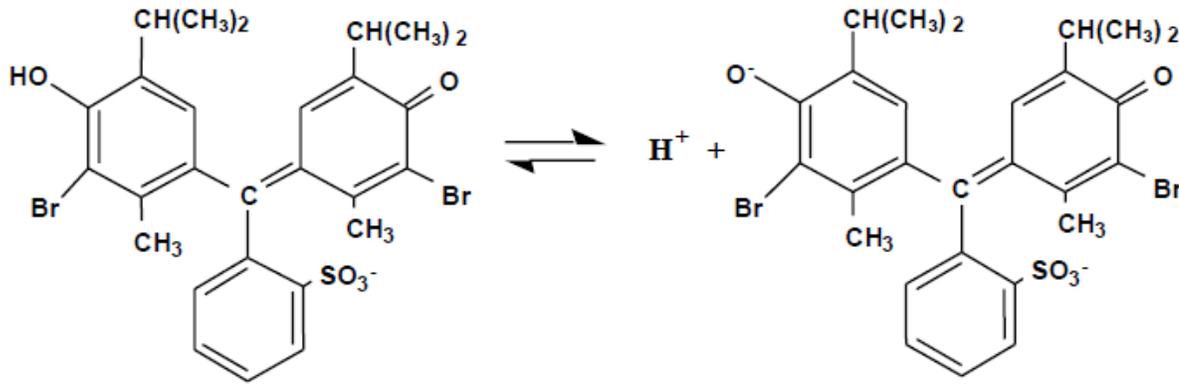
- Exemple: amine aromatique:**

- Le doublet libre de l'azote est engagé avec le proton. La mésomériel de l'ensemble diminue
- **Effet hypsochrome**

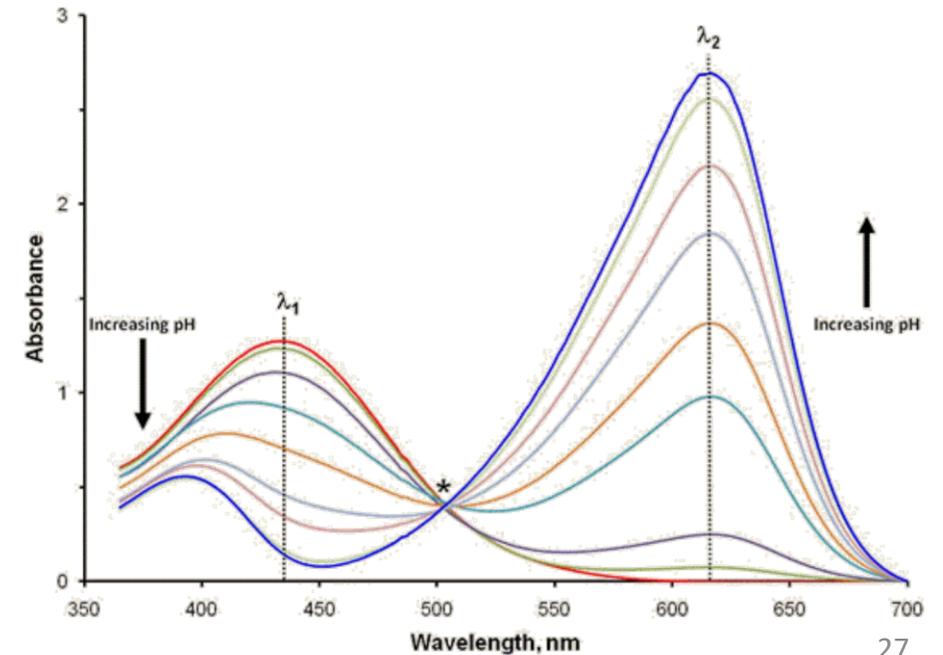
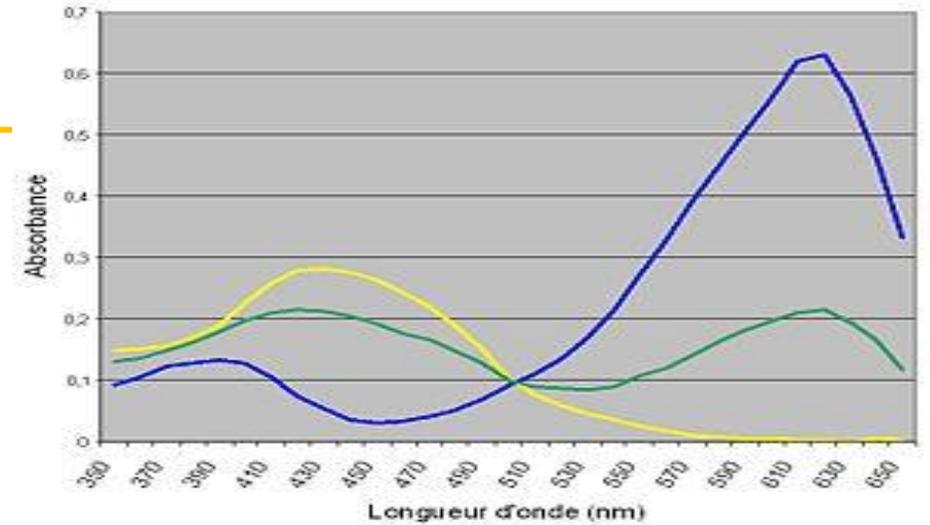


Spectrophotométrie uv-visible: transitions électroniques

pH du solvant: indicateurs colorés



2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



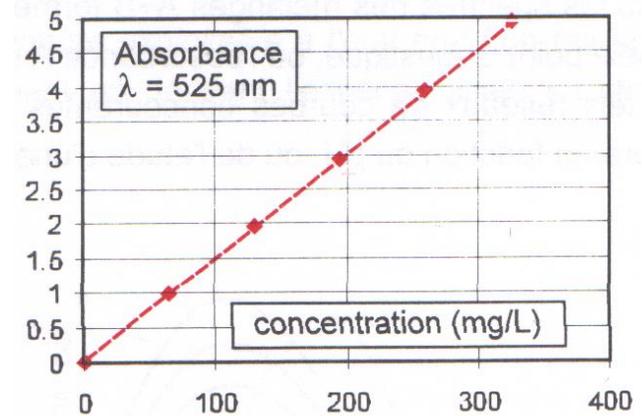
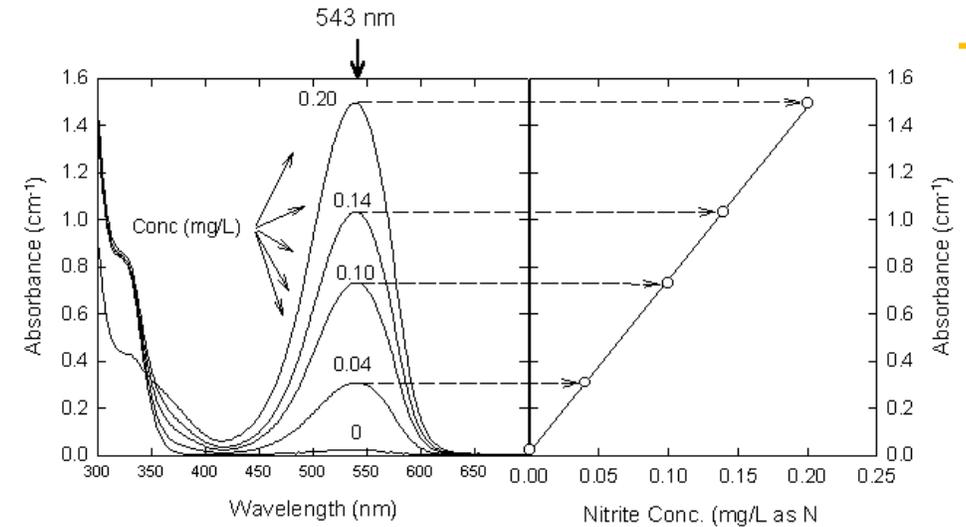
Spectrophotométrie uv-visible: Applications

Analyses quantitatives:

- Très largement utilisée en analyses pharmaceutiques
- Méthode rapide et précise

Pour un composé unique:

- Choisir une longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance
- Étalonner en vérifiant la linéarité de la réponse
 - Dosage direct
 - Etalon interne
 - Ajouts dosés
 - ...
- La concentration de solutions de titre inconnu peut être déterminée une fois la proportionnalité ou la linéarité $A=f(c)$ établie



Spectrophotométrie uv-visible: Applications

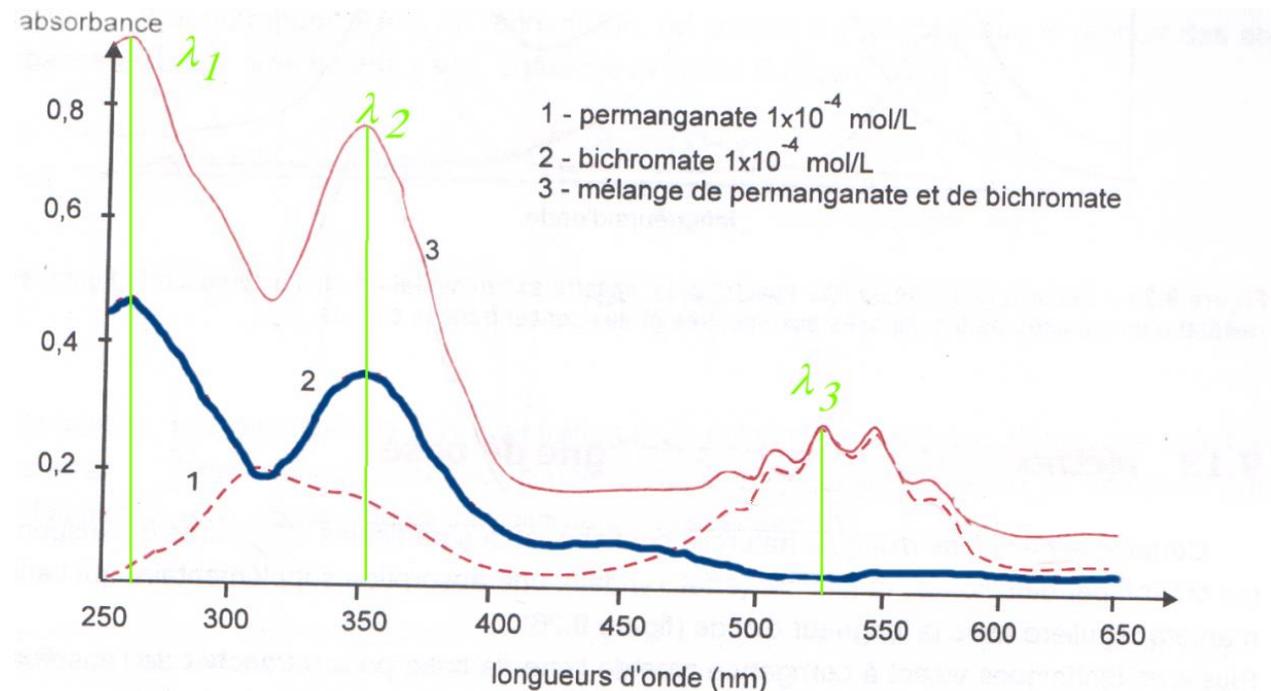
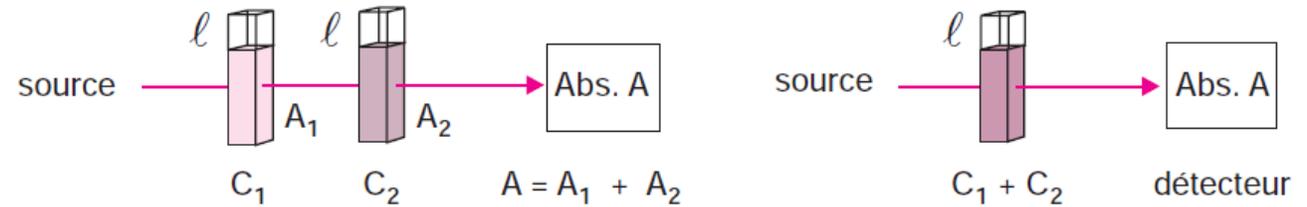
Analyses quantitatives:

La loi de Beer-Lambert est additive:

Dans le cas d'un mélange

$$A = \epsilon_1 \cdot l \cdot c_1 + \epsilon_2 \cdot l \cdot c_2$$

à λ_1 dosage spécifique du bichromate
à λ_2 , dosage spécifique du permanganate
à λ_3 Absorbance due aux deux



Spectrophotométrie uv-visible: Applications

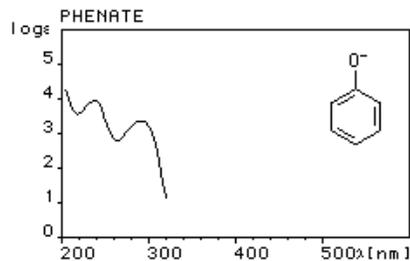
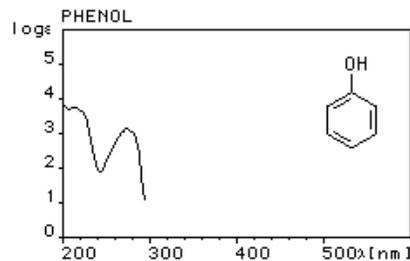
Analyses qualitatives:

Identification

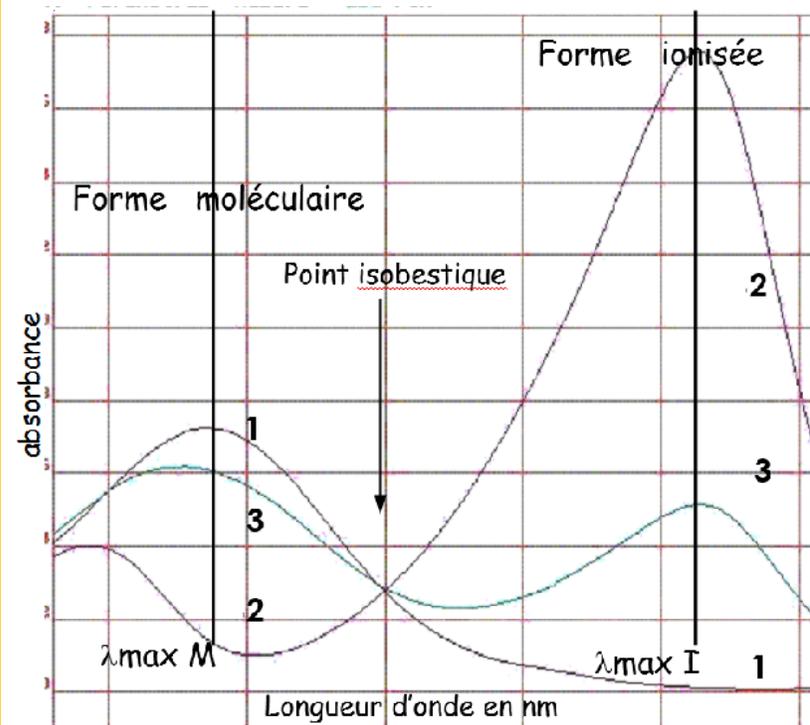
- Dans certaines monographies de la P.E.
- Par position du maximum et épaulement
- **Technique peu précise**

Détermination du pKa

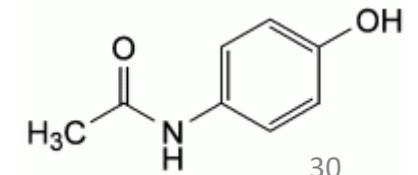
- Le spectre des acides et des bases faibles varie en fonction de leur état d'ionisation



$$pK_A' = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_M}$$



PARACETAMOL



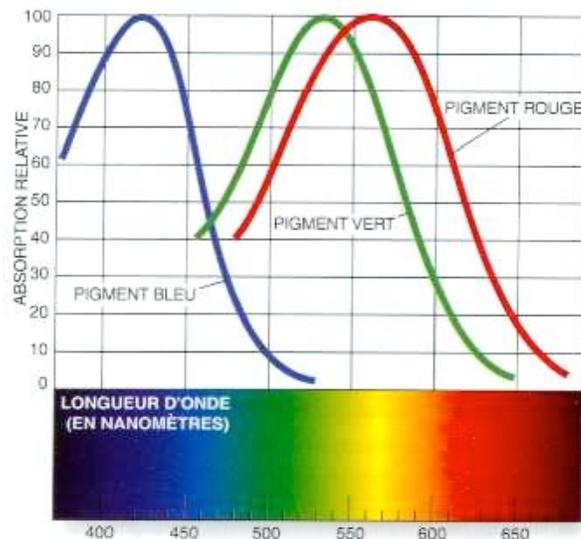
Spectrophotométrie uv-visible: Applications

Analyses qualitatives:

Photoréception

Les iodopsines sont des pigments visuels imbriqués dans la membrane des cônes qui interagissent avec la lumière

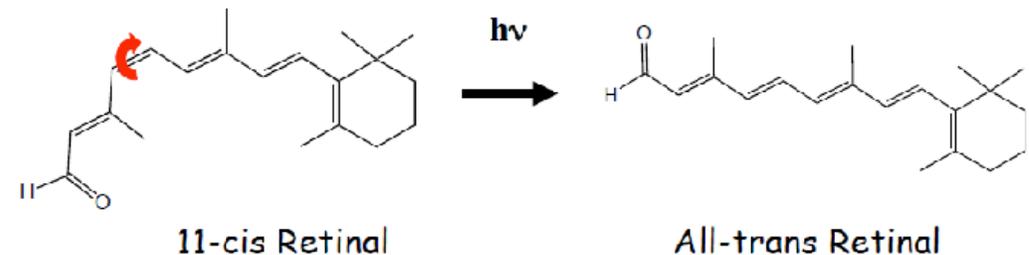
Il existe trois iodopsines de structures similaires sensibles au **bleu (S)**, au **vert (M)** et au **rouge (L)**



Spectre d'absorption des iodopsines

La molécule d'iodopsine M est constituée 7 hélices α d'opsine avec au centre le rétinal

Photoréception : transformation du 11-cis-rétinal en trans-rétinal sous l'effet d'un photon



Le trans-rétinal n'est plus lié à l'opsine qui transmet alors un message nerveux au cerveau : c'est la **transduction** du signal assurée par la cellule avec transmission d'un message nerveux au cerveau

Spectrophotométrie UV-Visible

- Chimie analytique: Skoog, West, Holler, Crouch. De BOECK, 3^{ème} édition, ISBN: 9782804190712, Juin 2015
- Techniques de l'ingénieur, Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, Dominique DI BENEDETTO, Philippe BREUIL, Réf : P2795 v2
- Pharmacopée Européenne 7.0 (Tomes 1 & 2)
- Chimie analytique, méthodes spectrales et analyse organique. M. Hamon, F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahusier, Masson, 2^{ème} édition, ISBN 2-225-83507
- Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales, F. Rouessac, A. Rouessac, 8^{ème} édition. ISBN 978-2-10-074688-0
- Chimie générale, John W. Hill et al. 2^{ème} édition, ERPI, ISBN 978-2-7613-2434-2

Annexe I: Termes dans la littérature et anciennes terminologies:

Termes et symboles importants utilisés dans les mesures d'absorption

Terme et symbole*	Définition	Autre nom et symbole
Puissance incidente P_0	Puissance du rayonnement incident sur l'échantillon	Intensité incidente I_0
Puissance transmise P	Puissance du rayonnement transmis par l'échantillon	Intensité incidente I
Absorbance A	$\text{Log}(P_0/P)$	Densité optique $D, D.O.$
Transmittance T	P_0/P	Extinction E Transmission T
Longueur du trajet d'absorption l	Distance d'atténuation	Chemin optique, d
Coefficient d'absorption ϵ	$A/l.c$	Coefficient d'extinction

* Terminologie suivant les recommandations de l'UICPA (Compendium de la nomenclature en chimie analytique, Société Chimique de France, 250, rue Saint-Jacques, Paris) et par l'American Chemical Society et la Society for Applied spectroscopy.