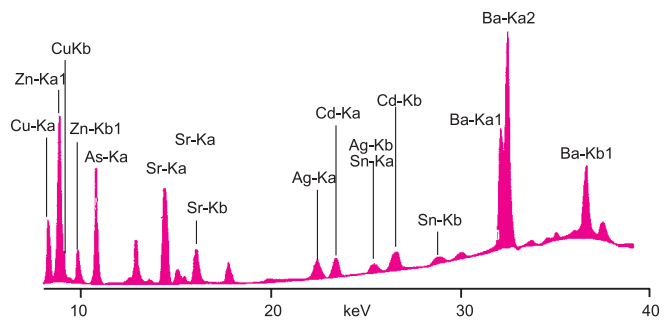

Méthodes spectrométriques



LES INVENTEURS DE LA COLORIMÉTRIE

La colorimétrie visuelle, une des plus anciennes méthodes d'analyse, déjà appliquée au temps des Grecs et des Romains, a commencé à prendre un caractère scientifique quand Pierre Bouguer, en 1729 émit le postulat selon lequel « si une certaine épaisseur d'un verre coloré absorbe la moitié de la lumière issue de la source, une épaisseur de verre double réduit cette lumière au quart de sa valeur initiale. »

Trente années plus tard, Jean-Henri Lambert (1728-1777) en fit la traduction mathématique : « le logarithme de la diminution de lumière (soit l'équivalent de l'inverse de la transmittance) est égal au produit de l'opacité du milieu par son épaisseur ».

Enfin en 1850, Auguste Beer établit la relation entre concentration et densité optique (on dit maintenant absorbance), ce qui a conduit à la forme actuelle de la loi de Lambert et Beer.

Parmi les différents dispositifs imaginés pour effectuer des dosages par colorimétrie visuelle, un des plus originaux fut décrit par Jules Duboscq en 1868.

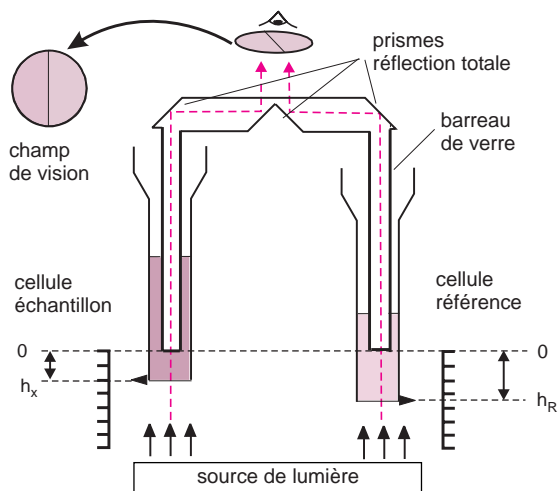
Cet instrument qui a été utilisé jusque vers les années 1960 permet de juxtaposer dans un même champ visuel, grâce à un système de prismes, les intensités lumineuses ayant traversé deux cuves identiques dont l'une contient l'échantillon de concentration C_X et l'autre un témoin connu (concentration C_R). L'expérimentateur ajuste la hauteur h_X de la solution à doser de telle façon qu'il atteigne l'égalité de teinte avec la solution témoin servant de référence (hauteur h_R). Dans ces conditions les absorbances sont égales.

Si $A_R = A_X$, on aura :

$$\varepsilon \cdot h_R \cdot C_R = \varepsilon \cdot h_X \cdot C_X$$

On en déduira C_X , concentration cherchée.

Ce comparateur à pénombre conduit à la concentration de l'espèce cherchée en exploitant la loi de Beer et Lambert par comparaison des épaisseurs traversées. L'observateur peut repérer l'égalité des teintes avec une grande précision.



Comparateur de Duboscq.

L'observateur règle l'égalité des intensités transmises suivant les deux voies, en faisant coulisser les tubes contenant les deux solutions à comparer, le long des deux barreaux fixes en verre. L'éclairage du fond des tubes est réalisé par une surface réfléchissante elle-même éclairée par une source lumineuse annexe.

Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible

*L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1 100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. D'une manière générale elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration qui découlent de la loi de Beer et Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de **colorimétrie**. Cette méthode apparaît comme le cheval de labour de tout laboratoire d'analyses. Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance. Les mesures d'absorption peuvent se faire avec tout un choix d'appareils qui vont des comparateurs de couleurs et autres colorimètres visuels simples, aux spectrophotomètres automatiques adaptés à l'analyse multicomposants. De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV/Visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés.*

9.1 LE DOMAINE SPECTRAL UV-VIS ET L'ORIGINE DES ABSORPTIONS

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées *proche UV* (185-400 nm), *visible* (400-700 nm) et *très proche infrarouge* (700-1 100 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. La limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm. Quelques instruments, à condition d'opérer sous vide, peuvent atteindre 150 nm avec des échantillons pris à l'état gazeux. C'est le domaine de l'*ultraviolet du vide*.

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels. Il y a alors modification de son énergie électronique ($E_{\text{élec.}}$), l'une des trois composantes avec l'énergie de rotation ($E_{\text{rot.}}$) et l'énergie de vibration (E_{vib}) de

l'énergie mécanique totale de la molécule (formule 9.1). Sachant que la modification de $E_{\text{élec.}}$ entraîne des perturbations de $E_{\text{rot.}}$ et $E_{\text{vib.}}$ correspondants, on obtient dans tous les cas un vaste ensemble de transitions possibles (fig. 9.1). Comme les polarités des liaisons sont perturbées ces spectres ont reçu le nom générique imagé de *spectres de transfert de charge*.

$$\Delta E_{\text{tot.}} = \Delta E_{\text{rot.}} + \Delta E_{\text{vib.}} + \Delta E_{\text{élec.}} \quad (9.1)$$

(avec $\Delta E_{\text{élec.}} > \Delta E_{\text{vib.}} > \Delta E_{\text{rot.}}$)

■ Tout spectre réel correspond à un nombre immense de molécules ou autres espèces individuelles qui ne sont pas toutes dans un même état d'énergie. Le graphe résultant correspond donc à une courbe qui enveloppe l'ensemble des transitions individuelles des espèces présentes.

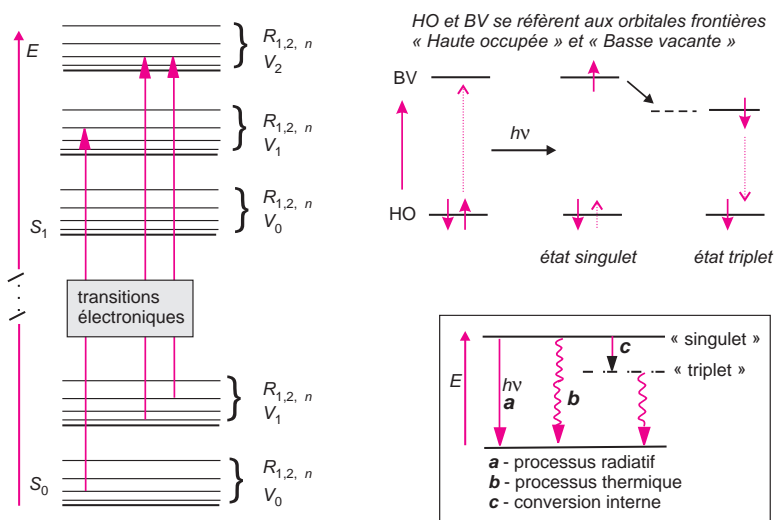


Figure 9.1 Quantification de l'énergie d'une molécule.

Sous la forme d'un diagramme d'état sont réunis les niveaux de rotation, de vibration et électronique d'une même molécule. Chaque trait horizontal correspond à un niveau d'énergie de la molécule. La structure hiérarchique est la suivante : à chaque état électronique S correspond plusieurs états de vibration V qui eux-mêmes comportent plusieurs états de rotation R . À l'échelle de ce dessin, les niveaux de vibration et de rotation devraient être comparativement plus resserrés, les distances étant, environ, entre elles comme les nombres 1 000 :50 :1. Dans les phases condensées, par suite des interactions de proximité d'une molécule à une autre, aucun appareil, aussi bonne que soit sa résolution, ne peut conduire à un spectre faisant apparaître les transitions individuelles. À droite, représentation sous forme d'un diagramme énergétique, de l'absorption d'un photon. Transfert d'un électron d'une orbitale occupée (HO) à une orbitale vacante (BV) avec apparition d'un état singulet évoluant en un état triplet, plus stable. Processus de retour à l'état fondamental d'une espèce excitée. Les transitions étant pratiquement instantanées, la distance entre les atomes n'a pas eu le temps de changer (*Principe de Franck-Condon*).

■ L'énergie captée au cours de l'absorption du photon peut-être restituée par divers processus qui se font avec émission de photons (fig. 9.1c). La *phosphorescence* et la *fluorescence* sont des transformations de ce type exploitées dans d'autres méthodes d'analyse (cf. chapitre 11).

9.2 LE SPECTRE UV-VIS

Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance (voir définitions ci-après), en fonction des longueurs d'onde repérées en abscisses, ici en nanomètres (fig. 9.2).

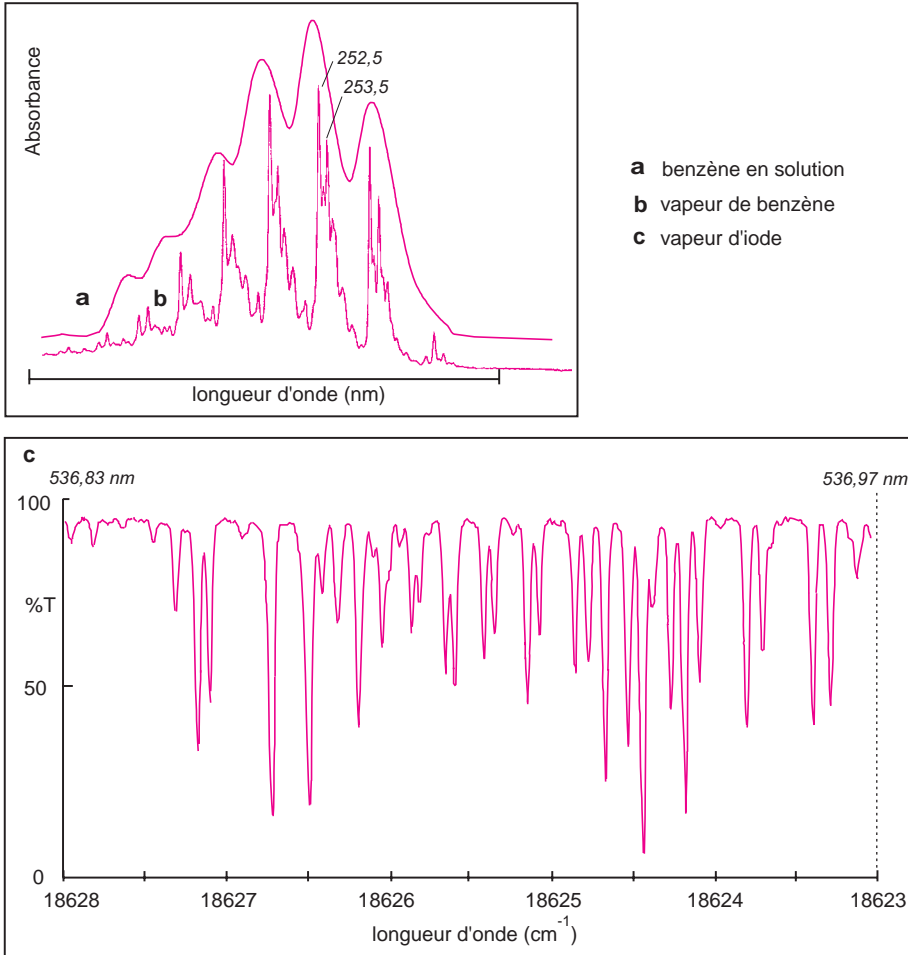


Figure 9.2 Trois aspects différents des spectres rencontrés dans l'UV/Visible. Spectres du benzène a) en solution (spectre de bandes); b) à l'état de vapeur (spectre présentant une structure fine); c) expansion d'une partie du spectre de la vapeur d'iode haute résolution (0,14 nm d'intervalle au total).

En optique, la *transmittance* T est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur. T est exprimée par un nombre fractionnaire ou sous forme de pourcentage :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (9.2)$$

L'absorbance est la grandeur définie par : $A = -\log T$ (9.3)

Les spectres des composés pris en phase condensée, purs ou en solution, présentent généralement des bandes d'absorption larges et peu nombreuses. Mais les spectres obtenus à partir d'échantillons à l'état gazeux et sous faible pression font apparaître une « structure fine » (fig. 9.2). Pour les composés dont la composition atomique est particulièrement simple, les transitions fondamentales apparaissent isolément si le spectromètre possède une très grande résolution. Dans ces situations extrêmes, les positions des absorptions sont repérées en cm^{-1} , unité mieux adaptée que le nm (le calcul montre, par ex., qu'il y a 110 cm^{-1} entre 300 et 301 nm).

9.3 TRANSITIONS ÉLECTRONIQUES DES COMPOSÉS ORGANIQUES

Les composés de la chimie organique forment l'essentiel des études faites en UV/visible. Les transitions observées ont pour origine les électrons des liaisons σ ou π et les doublets non-liants n des atomes tels H, C, N, O. Chaque fois qu'il en est possible, on indique pour toute bande d'absorption sa nature en relation avec les orbitales moléculaires (OM) concernées et le coefficient d'absorption molaire ε ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) calculé au maximum de la bande d'absorption.

9.3.1 Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Elle apparaît dans le lointain UV car le saut d'un électron d'une OM liante σ dans une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. C'est pourquoi les hydrocarbures saturés qui ne présentent que des liaisons de ce type, sont transparents dans le proche UV (fig. 11.4).

Exemple : *hexane* (à l'état gazeux) : $\lambda_{\text{max}} = 135 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 10\,000$).

■ Le cyclohexane et l'heptane sont utilisés comme solvants dans le proche UV. À 200 nm l'absorbance A d'une épaisseur de 1 cm d'heptane est égale à 1. Malheureusement, le pouvoir de solvation de ces solvants est insuffisant pour dissoudre de nombreux composés polaires.

De même, la transparence de l'eau dans le proche UV ($A = 0,01$ pour $\ell = 1 \text{ cm}$, à $\lambda = 190 \text{ nm}$) est due au fait qu'il ne peut y avoir que des transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$.

9.3.2 Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le saut d'un électron d'un doublet n des atomes O, N, S, Cl.. dans une OM σ^* conduit à une transition d'intensité moyenne qui se situe vers 180 nm pour les alcools, vers 190 nm pour les éthers ou les dérivés halogénés et vers 220 nm pour les amines (fig. 9.3).

Exemples : *méthanol* : $\lambda_{\text{max}} = 183 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 50$); *éther* : $\lambda_{\text{max}} = 190 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 2\,000$)

éthylamine : $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 800$); *chloro-1-butane* : $\lambda_{\text{max}} = 179 \text{ nm}$.

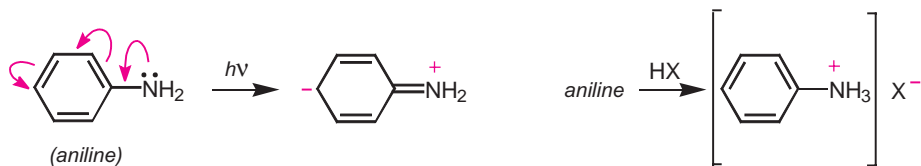


Figure 9.3 Transition $n \rightarrow \sigma^*$ de l'aniline (une amine primaire).

La transition correspond à une augmentation du « poids » de la forme mésomère polaire. L'absorption de l'aniline correspondant à cette transition disparaît si on ajoute un équivalent d'un acide protonique type HX, par suite de la formation d'un sel d'ammonium qui mobilise le doublet libre de l'atome d'azote, nécessaire à cette transition (voir la formule entre crochets).

9.3.3 Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition peu intense résulte du passage d'un électron d'une OM non liante de type n à une OM antiliante π^* . On la rencontre pour les molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé. La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle, facilement observable, située entre 270 et 295 nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible.

Exemple : *éthanal* : $\lambda = 293$ nm ($\epsilon = 12$, dans l'éthanol comme solvant).

9.3.4 Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm, dont la position dépend de la présence de substituants hétéroatomiques.

Exemple : *éthylène* : $\lambda_{\max} = 165$ nm ($\epsilon = 16\,000$).

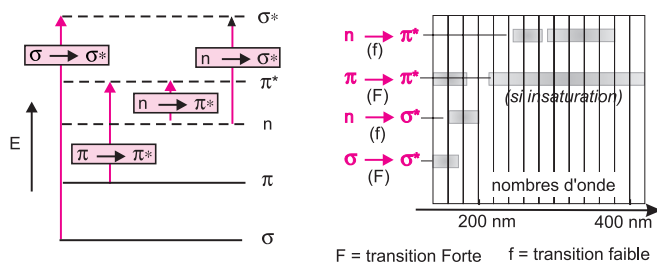


Figure 9.4 Comparatif des transitions les plus souvent rencontrées dans les composés organiques simples.

Les quatre types de transitions sont réunies sur un unique diagramme énergétique pour les situer les unes par rapport aux autres dans le cas général et pour préciser les plages spectrales concernées.

- Un composé transparent dans un domaine spectral, lorsqu'il est pris à l'état isolé, peut devenir absorbant s'il est mis en présence d'une espèce avec laquelle il interagit par un mécanisme du type *donneur-accepteur* (D-A). Ce phénomène est lié au passage d'un électron appartenant à une orbitale liante du donneur (qui devient un cation radicalaire) vers une orbitale vacante de l'accepteur (devenu un anion radicalaire) de niveau énergétique proche

(fig. 9.5). La position de la bande d'absorption sur le spectre est fonction du *potentiel d'ionisation* du donneur et de l'*affinité électronique* de l'accepteur ; la valeur de ϵ est en général très grande.

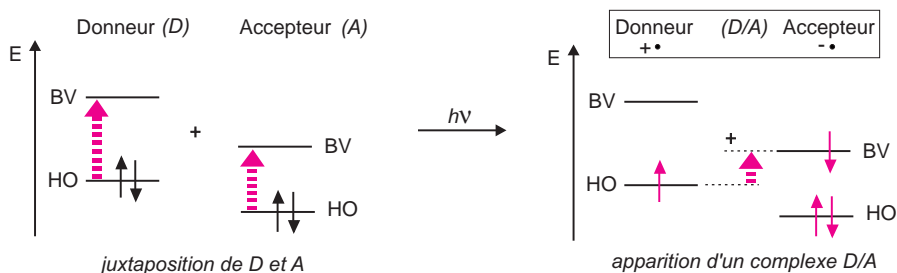


Figure 9.5 Représentation énergétique d'une interaction donneur/accepteur. L'état excité est supposé être essentiellement sous forme ionique.

■ **Transition $d \rightarrow d$.** De nombreux sels inorganiques, comportant des électrons engagés dans des orbitales moléculaires d , conduisent à des transitions de faible absorptivité situées dans le domaine visible, responsables de colorations. Ainsi les solutions des sels métalliques de titane $(\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6)^{+++}$ ou de cuivre $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$ sont bleues, le permanganate de potassium donne des solutions violettes, etc..

9.4 GROUPEMENTS CHROMOPHORES

Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés, etc.) responsables de l'absorption en UV/VIS sont appelés *groupements chromophores* (tab. 9.1). Une espèce formée d'un squelette carboné transparent dans le proche UV et porteur d'un ou de plusieurs chromophores constitue un chromogène.

Tableau 9.1 Chromophores caractéristiques de quelques groupements azotés.

Nom	Chromophore	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
amine	$-\text{NH}_2$	195	3 000
oxime	$=\text{NOH}$	190	5 000
nitro	$-\text{NO}_2$	210	3 000
nitrite	$-\text{ONO}$	230	1 500
nitrate	$-\text{ONO}_2$	270	12
nitroso	$-\text{N}=\text{O}$	300	100

► *Chromophores isolés* : pour une série de molécules possédant le même chromophore, la position et l'intensité des bandes d'absorption restent sensiblement constantes. Si une molécule possède plusieurs chromophores isolés, c'est-à-dire n'interagissant pas l'un sur l'autre parce que séparés par au moins deux liaisons simples, on observe la superposition des effets de chacun des chromophores individuels.

► **Chromophores des systèmes conjugués** : quand les chromophores interagissent l'un sur l'autre, le spectre d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'onde (*effet bathochrome*) avec augmentation de l'intensité d'absorption (*effet hyperchrome*). Un cas particulier est celui des systèmes conjugués, c'est-à-dire des structures organiques comportant plusieurs chromophores insaturés séparés entre eux par une liaison simple. Le spectre est alors fortement perturbé par rapport à la simple superposition des effets produits par les chromophores isolés. Plus le nombre d'atomes de carbone, sur lequel le système conjugué s'étend est élevé, plus l'écart entre le niveau des orbitales frontière diminue (tab. 9.2). Cela se traduit par un effet bathochrome très important (fig. 9.6).

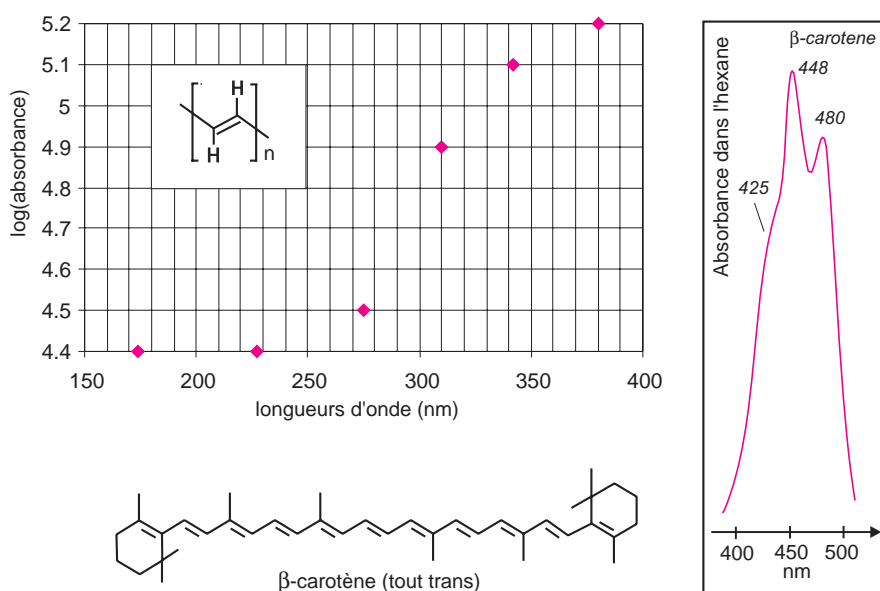


Figure 9.6 Effet de plusieurs doubles liaisons conjuguées sur la position du maximum d'absorption de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ pour quelques polyènes conjugués.

Valeurs des λ_{\max} d'une famille de polyènes *E*-disubstitués conjugués qui diffèrent entre eux par le nombre de doubles liaisons conjuguées. Cet effet est à l'origine de la couleur de nombreux composés naturels dont les formules semi-développées présentent des chromophores conjugués étendus. Ainsi la couleur orangée du β -carotène « tout trans » ci-dessus, provient de la présence de onze doubles liaisons conjuguées ($\lambda_{\max} = 425, 448, \text{ et } 475 \text{ nm}$ dans l'hexane). Plus la délocalisation des électrons est importante, plus grand est l'effet bathochrome. Spectres d'un éthylénique simple et d'un composé présentant deux doubles liaisons conjuguées. Les composés aromatiques conduisent à des spectres plus complexes que les éthyléniques. Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ sont à l'origine d'une « structure fine ». Le spectre de la vapeur de benzène, obtenu à partir d'une goutte déposée au fond d'une cuve en verre de silice de 1 cm de trajet optique, est un excellent test pour évaluer la résolution des appareils du proche UV (fig. 9.1). La substitution du noyau modifie, de façon très importante, l'aspect des bandes d'absorption.

9.5 EFFETS DUS AUX SOLVANTS : SOLVATOCHROMIE

Chaque solvant a une polarité qui lui est propre. Comme on sait que toute transition électronique modifie la répartition de la charge dans le composé en solution, il est évident que la position et l'intensité des bandes d'absorption vont varier quelque peu avec la nature du solvant employé. Les interactions solvant/soluté sont suffisamment nettes pour reconnaître à quel type de transition électronique on est en présence. On distingue deux effets opposés.

9.5.1 Effet hypsochrome (*blue shift*)

Si le chromophore responsable de la transition observée est plus polaire dans son état fondamental que dans son état excité, un solvant polaire stabilisera surtout la forme avant absorption du photon par solvatation. Il faudra donc plus d'énergie pour provoquer la transition électronique concernée, d'où un déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde comparativement à ce qui se passerait dans un solvant non polaire. C'est l'*effet hypsochrome*.

Il en est ainsi pour la transition $n \rightarrow \pi^*$ du carbonyle des cétones en solution. La forme C^+O^- (caractérisée par son moment dipolaire μ) sera d'autant plus stabilisée que le solvant sera plus polaire. L'état excité étant atteint rapidement, la cage de solvant, qui entoure le carbonyle, n'a pas le temps de se réorienter pour stabiliser la situation après absorption du photon. Ce même effet s'observe pour la transition $n \rightarrow \sigma^*$. Il est accompagné d'une variation du coefficient ϵ .

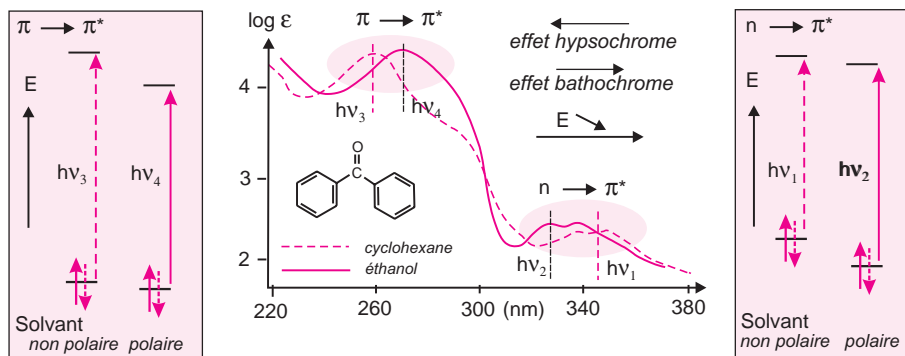


Figure 9.7 Spectres de la benzophénone dans le cyclohexane (1) et dans l'éthanol (2).

On observe ici avec deux solvants différents les effets bathochrome ou hypsochrome, sur les deux types de transitions.

9.5.2 Effet bathochrome (*red shift*)

Pour les composés peu polaires l'effet de solvant est faible. Cependant si le moment dipolaire du chromophore augmente au cours de la transition, l'état final sera plus solvato. Un solvant polaire va ainsi stabiliser la forme excitée, ce qui favorise la transition : on observe un déplacement vers les grandes longueurs d'onde, comparativement au spectre obtenu dans un solvant non polaire. C'est l'*effet bathochrome*. Il en est ainsi de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des hydrocarbures éthyléniques dont la double liaison de départ est peu polaire.

9.5.3 Effet du pH

Le pH du milieu dans lequel est dissous l'analyte peut avoir un effet important sur le spectre. Parmi les composés qui manifestent cet effet de manière spectaculaire, on trouve les indicateurs colorés dont le changement de couleur est mis à profit au cours de dosages acidimétriques (fig. 9.8). C'est ainsi qu'on peut repérer les points d'équivalence.

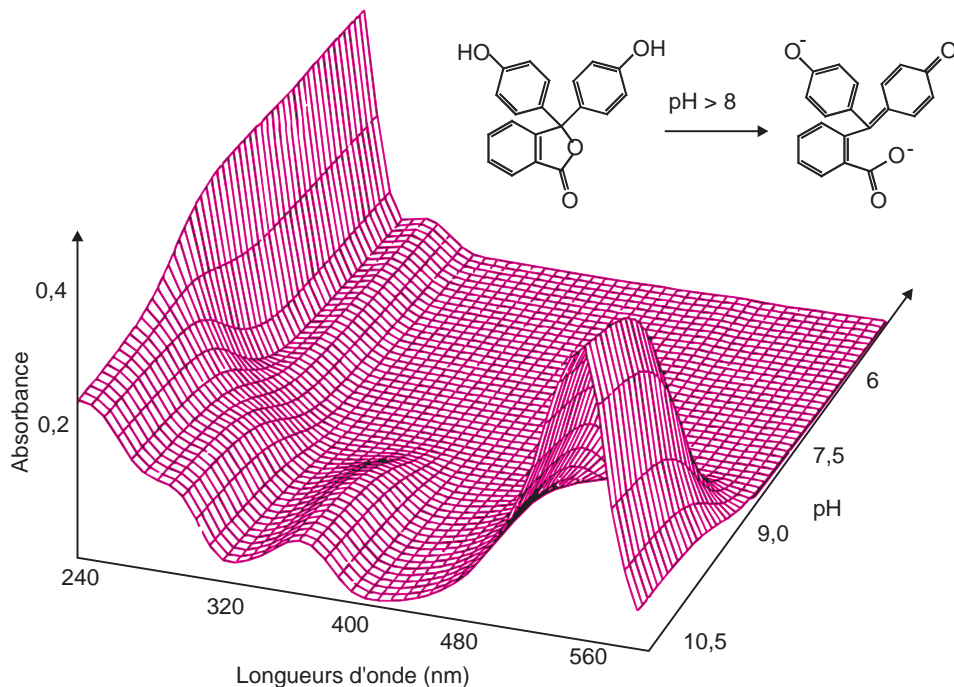


Figure 9.8 Effet du pH sur une solution de phénolphthaléine.

Ce composé est incolore pour des pH inférieurs à 8 et rose vif pour des pH supérieurs à 9,5. Le graphe présenté ici en perspective montre bien que pour des pH acides il n'y a pas d'absorption dans la partie visible du spectre. En revanche, c'est l'absorption vers 500 nm qui apparaît quand le pH devient alcalin, qui est responsable de la couleur bien connue de ce composé. On notera pour cet exemple, la modification des liaisons chimiques selon le pH.

9.6 RÈGLES DE WOODWARD-FIESER

L'analyse structurale à partir des spectres électroniques est assez problématique, dans la mesure où leur relative simplicité a pour corollaire un faible apport d'informations. Il y a une soixantaine d'années cependant, avant l'arrivée des techniques plus puissantes d'identification que nous connaissons maintenant, la spectrométrie UV/Visible a été utilisée dans ce but. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et positions des maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques, dues à Woodward, à Fieser et à Scott, qui concernent les composés carbonylés insaturés, les diènes ou les stéroïdes. À partir de tableaux rassemblant, sous forme d'incréments, divers facteurs et particularités de structure, on peut prévoir la position de la bande

d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de ces systèmes conjugués particuliers (tab. 9.2). La concordance est bonne entre les valeurs calculées et les positions expérimentales comme en témoignent les quatre exemples de la figure 9.9.

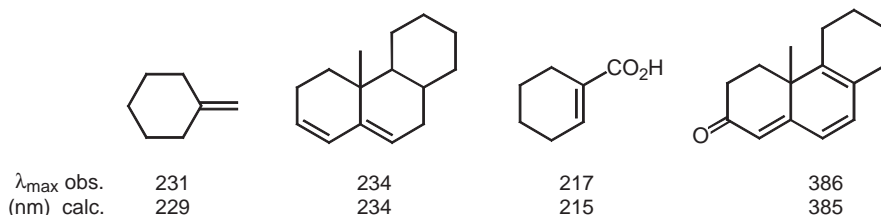
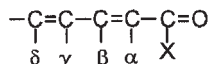


Figure 9.9 Correspondance entre les valeurs calculées et expérimentales pour quelques composés organiques présentant des insaturations. Les calculs sont faits à partir des valeurs du tableau 9.2.

Tableau 9.2 Table de corrélation en spectrométrie UV/visible. Règles de Woodward-Fieser-Scott pour le calcul de la position du maximum d'absorption des énones et diénones (précision 3 nm).

type de structure concernée



solvant : méthanol ou éthanol

Incréments

- chaque double liaison conjuguée additionnelle 30 nm
- caractère exocyclique d'une double liaison C=C 5 nm
- caractère homoannulaire diénique 39 nm
- pour chaque substituant, ajouter (en nm) :

Incrément de solvant

- eau + 8 nm
- chloroforme - 1 nm
- éther - 7 nm
- cyclohexane - 11 nm

structure de base		
	X = H	207 nm
	X = Alkyle	215 nm*
	X = OH, O-Alkyle	193 nm
chaîne ouverte ou cycle à 6 C (cycle à 5 C : 202 nm)		

positions	α	β	γ	δ
Alkyle	10	12	18	18
-Cl	15	12		
-Br	25	30		
-OH	35	30		50
-O-Alkyle	35	30	17	31
-O-Acyle	6	6	6	6
-N(R) ₂		95		

9.7 INSTRUMENTATION DANS L'UV/VISIBLE

Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : ceux de la *source* et du *système dispersif* (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la détection (fig. 9.10). L'ensemble est réuni dans un bâti unique. Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage.

Certains spectromètres sont réservés aux analyses de routine pour lesquelles il n'est pas besoin d'avoir une résolution élevée, sachant qu'en solution la plupart des composés conduisent à des spectres dépourvus de bandes fines. Il est essentiel, en revanche, que ces instruments conduisent à des mesures d'absorbance précises sur une gamme étendue de concentrations.

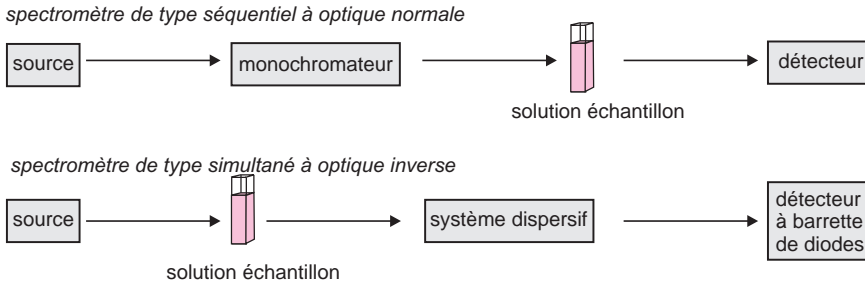


Figure 9.10 Instrumentation dans l'UV/Visible.

Deux approches différentes permettent d'aboutir au spectre. Dans la première le spectre est obtenu de manière séquentielle en fonction du temps (une seule longueur d'onde à la fois). Dans la seconde, le détecteur « voit » toutes les longueurs d'onde simultanément. Ce dernier type d'analyseurs correspond à une simplification notable des spectromètres séquentiels.

9.7.1 Sources lumineuses

On ne connaît pas de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible (fig. 9.11). On trouve généralement réunies :

- Une *lampe à arc au deutérium* sous moyenne pression pour la partie UV (< 350 nm).
- Une *lampe à incandescence* avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) pour la partie visible du spectre et au-delà (à partir de 350 nm). Elle contient une petite quantité d'iode, pour augmenter sa durée (lampe QTH). Cette source est maintenant souvent remplacée par une *lampe à arc xénon*, plus énergétique et qui de ce fait est choisie comme source unique par les constructeurs lorsqu'il s'agit d'un appareil de routine allant de 300 à 1 100 nm.

■ La source à deutérium comporte deux électrodes qui baignent dans une atmosphère de ce gaz (D_2 est préféré au dihydrogène H_2 , pour des raisons techniques) entre lesquelles est placé un écran métallique percé d'un trou circulaire d'environ 1 mm (fig. 9.11). La circulation des électrons vers l'anode crée un courant de décharge qui provoque un arc intense au niveau de l'orifice situé près de l'anode. Soumises à ce bombardement d'électrons, les molécules de dideutérium D_2 se dissocient avec émission de photons qui forment un continuum d'émission dont les longueurs d'onde s'étendent de 160 à 500 nm.

9.7.2 Systèmes dispersifs

- *Appareils séquentiels.* Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau plan ou concave qui fait partie d'un montage appelé monochromateur. Ce dispositif permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission. La longueur d'onde, ou plus exactement la largeur de la bande spectrale qui est fonction de la *largeur de fente*, varie graduellement au cours du temps par pivotement du réseau (fig. 9.12). Les meilleures résolutions sont obtenues avec des montages comportant des monochromateurs de grandes distances focales (0,2 à 0,5 m).

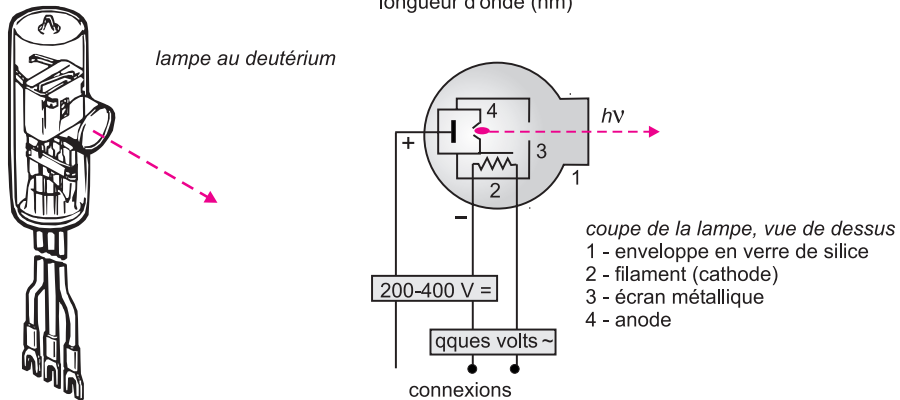
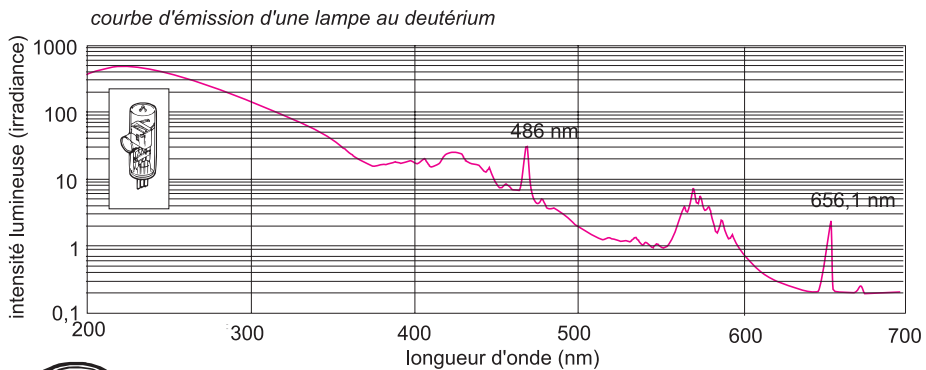
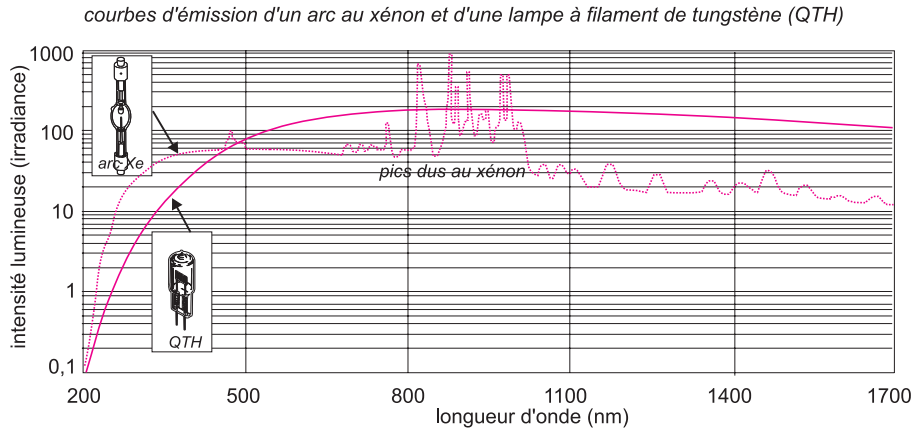


Figure 9.11 Spectres d'émission de différents types de sources dans l'UV-Visible. L'échelle logarithmique rend compte des grandes différences d'intensité lumineuse selon les longueurs d'onde, pour les lampes sans filament. Vue générale et vue de dessus d'une lampe à deutérium (reproduit avec l'autorisation de la société Oriol). La lampe est amorcée avec une tension de 3 à 400 V. L'anode est une plaque de molybdène et la cathode est un filament d'oxydes métalliques émetteur d'électrons, alimenté sous quelques volts. Les pics d'émission du deutérium à 486,0 et 656,1 nm sont souvent utilisés pour régler les échelles de longueur d'onde des spectromètres.

► *Appareils simultanés.* Cette catégorie d'appareils comporte simplement un réseau situé après le compartiment échantillon pour diffracter les radiations transmises. Ils fonctionnent suivant le principe des spectrographes (fig. 9.10).

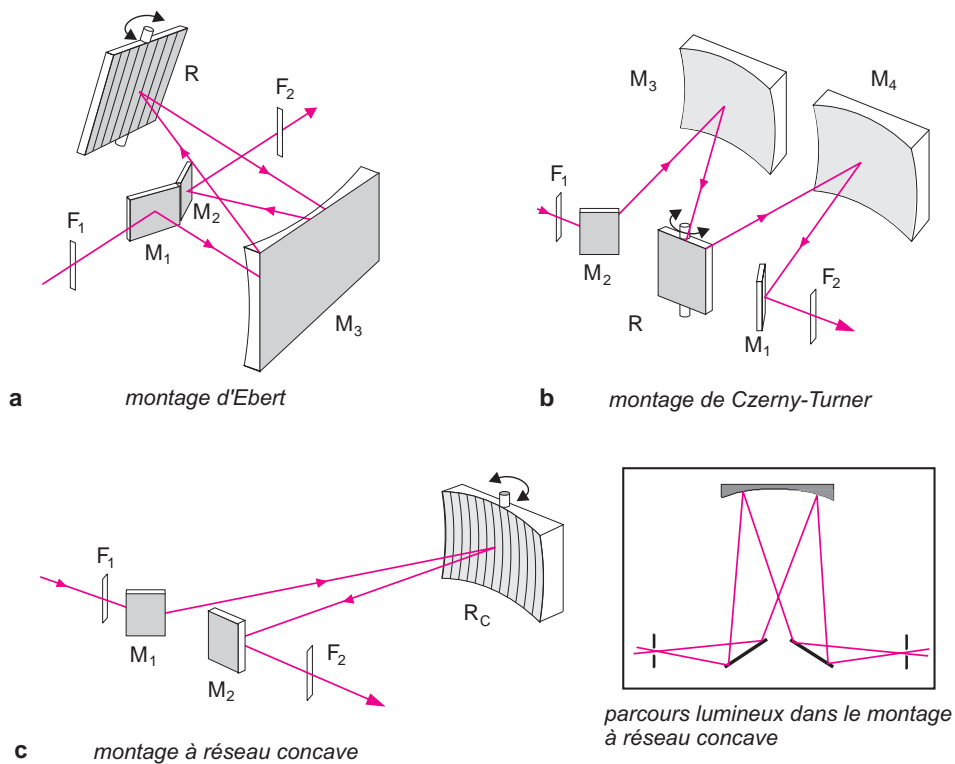


Figure 9.12 Monochromateurs à réseau.

a) Montage d'Ebert comportant un seul miroir sphérique concave M_3 . Il donne une excellente qualité d'image en compensant les aberrations ; b) montage Czerny-Turner, de conception voisine, comportant deux miroirs sphériques M_3 et M_4 ; c) montage avec un réseau concave R_C permettant à la fois dispersion et focalisation du rayonnement. Ces trois monochromateurs sont représentés en configuration latérale. La bande spectrale passante des monochromateurs dépend des largeurs des fentes d'entrée F_1 et de sortie F_2 .

9.7.3 Détecteurs

Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Sa sensibilité dépend de la longueur d'onde. On utilise soit un tube photomultiplicateur soit un semi-conducteur (détecteur à transfert de charge ou photodiode au silicium).

Pour les appareils dits « simultanés » qui ne possèdent pas de monochromateur mais un système dispersif, on mesure les intensités lumineuses à toutes les longueurs d'onde pratiquement au même instant en alignant un grand nombre de détecteurs quasi ponctuels pour former une *barrette de diodes* (fig. 9.13). Le seuil photoélectrique, de l'ordre de 1 eV, permet de prolonger la plage de détection jusqu'à 1,1 μm .

■ L'efficacité d'un tube photomultiplicateur — dispositif très sensible dont la linéarité de la réponse s'étend sur 7 décades — dépend du rendement de la photocathode, qui varie avec la longueur d'onde (par ex. 0,1 e^-/photon à 750 nm), et de l'amplification du signal procuré par la cascade de dynodes (par exemple gain de 6×10^5). Avec ces valeurs, l'impact de 10 000 photons/s produit un courant de 0,1 nA. Il est difficile pour un photomultiplicateur,

comme cela le serait pour l'œil, de comparer avec précision deux intensités lumineuses, en provenance pour l'une, du faisceau de référence et pour l'autre, du faisceau échantillon, lorsqu'elles sont très différentes. C'est pourquoi il est préférable que l'absorbance des solutions ne dépasse pas 1 (voir également § 9.15). Avec un instrument dont la lumière parasite est de 0,01 % (mesurée en % de transmittance), l'augmentation de la concentration de la solution ne produira plus de variations significatives du signal au delà de 4 unités d'absorbance.

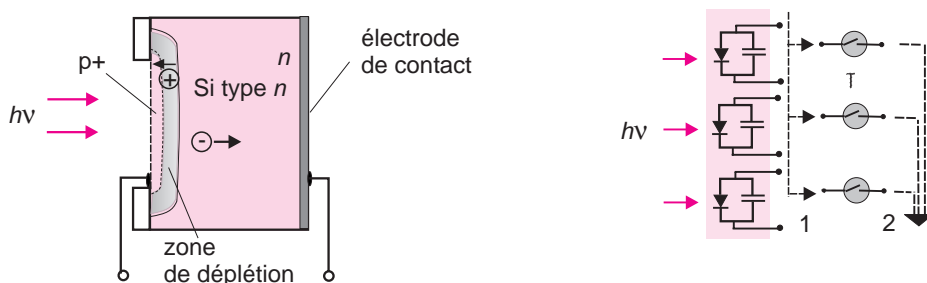


Figure 9.13 Photodiode au silicium et barrette de diodes (détecteurs CCD - charged coupled device).

Chaque diode, de forme rectangulaire ($15 \times 25 \mu\text{m}$), est associée à un condensateur préalablement chargé. Sous l'impact des photons la diode devient conductrice et décharge donc progressivement le condensateur. La valeur de la charge résiduelle de chacun des condensateurs dépend du nombre de photons reçus. Elle est mesurée de façon séquentielle par le circuit électronique (1 et 2). Les condensateurs sont rechargés périodiquement. À la différence du photomultiplicateur qui donne une intensité instantanée en watts, la diode permet de connaître l'énergie émise pendant un intervalle de temps en joules. La sensibilité, la linéarité et la gamme dynamique de réponse sont excellentes.

9.8 LES DIFFÉRENTES CONFIGURATIONS DES SPECTROMÈTRES UV/VIS

9.8.1 Spectromètres à optique monofaisceau, de type monocal

Beaucoup de dosages de routine sont effectués à longueur d'onde fixe avec des photomètres simples munis de filtres interférentiels interchangeable ou de monochromateurs simples. La mesure de transmittance (ou d'absorbance) exige de comparer à la même longueur d'onde le signal de la source avant et après traversée de la solution échantillon. On place donc successivement sur le trajet optique un témoin correspondant au solvant seul ou une solution contenant les réactifs du dosage (mais sans le composé à doser, c'est le *blanc analytique*), puis la solution préparée à partir de l'échantillon de concentration inconnue. Ces appareils peuvent disposer d'une compensation électronique des variations d'intensité de la source (fig. 9.14) connue sous le nom de *split-beam*. Une partie de la lumière est déviée avant qu'elle n'atteigne l'échantillon, ce qui permet de stabiliser l'intensité de la source (il ne s'agit pas à proprement parler d'un faisceau de référence). Ces appareils donnent l'absorbance et calculent le plus souvent la concentration cherchée.

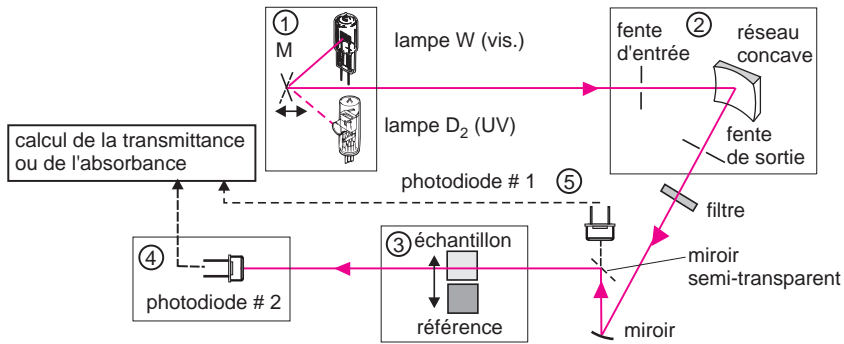


Figure 9.14 Schéma optique simplifié d'un spectrophotomètre simple faisceau de mode séquentiel.

1 : Deux sources coexistent mais une seule est choisie en fonction de la mesure. 2 : le monochromateur sélectionne la longueur d'onde de mesure. 3 : compartiment de mesure où une cellule contenant soit l'échantillon soit un blanc est placée sur le trajet optique. 4-5 : diode détectrice et diode de contrôle.

9.8.2 Appareils à optique inversée, de type multicanaux

Ce type d'appareil est apparenté aux spectrographes dans la mesure où il permet l'observation instantanée de toute l'étendue du spectre par emploi d'un détecteur composé d'un alignement de photodiodes miniaturisées, dont le nombre peut atteindre 2 000 (fig. 9.15). Un tel détecteur réalise une exploration séquentielle très rapide, considérée comme *quasi-simultanée*, de toute une gamme spectrale en $1/10^e$ de seconde, en consultant les signaux envoyés par les diodes dont chacune est dévolue à un petit intervalle de longueur d'onde. Le pouvoir de résolution de ces appareils sans monochromateur (donc plus lumineux) est limité par la taille des diodes.

9.8.3 Spectromètres à optique double faisceau (type séquentiel)

Les meilleurs spectrophotomètres dans ce domaine restent encore les appareils à deux faisceaux dont l'un traverse l'échantillon et l'autre sert de parcours de référence. Deux miroirs tournants en forme de secteurs, synchronisés avec le mouvement *pas à pas* du réseau, permettent au détecteur de comparer exactement pour la même longueur d'onde les intensités transmises par l'une ou l'autre des deux voies (fig. 9.16). L'amplification du seul signal modulé permet d'éliminer en partie la lumière parasite. Le circuit ajuste la sensibilité du photomultiplicateur de façon inverse à l'intensité lumineuse qu'il reçoit. Un montage plus simple consiste à utiliser un miroir semi-transparent et deux photodiodes appariées. Le signal correspond à la tension nécessaire pour maintenir invariable la réponse du détecteur (principe de rétroaction ou *feed-back*). Ces appareils se caractérisent par une vitesse de balayage rapide (30 nm/s) et la possibilité de mesurer des absorbances de plusieurs unités.

- Pour vérifier l'exactitude des longueurs d'onde des spectromètres, on utilise une solution à 4 % m/v d'oxyde d'holmium dans l'acide perchlorique 10 % v/v , dont on connaît la position précise des différents maxima du spectre. Les valeurs dépendent quelque peu du réglage de la largeur de bande spectrale. En effet les bandes d'absorption ne sont pas symétriques si bien que la largeur de la bande spectrale choisie pour le balayage du spectre influe sur

l'énergie qui vient frapper à chaque instant le détecteur, ce qui se répercute sur l'intensité du signal, et finalement sur le tracé du spectre. Ex : en passant d'une largeur de fente de 0,1 nm à 3 nm, le maximum d'absorption à 536,47 nm passe à 537,50 nm.

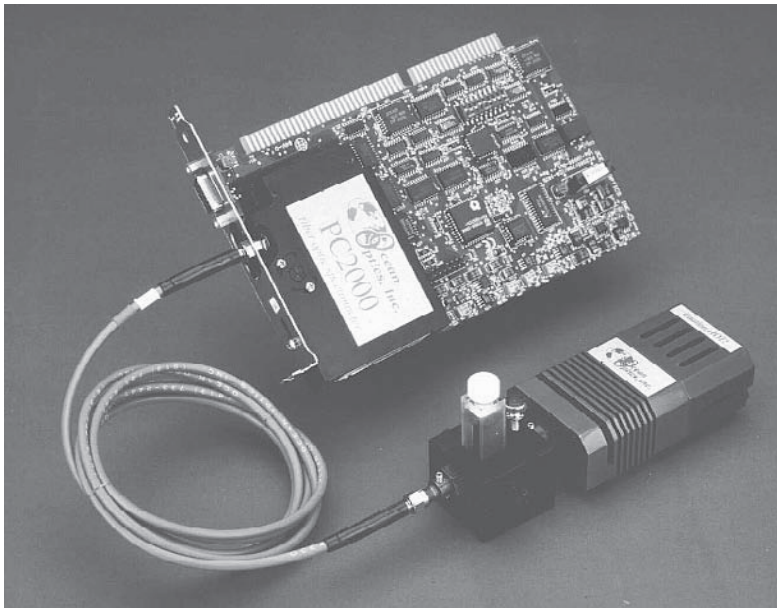
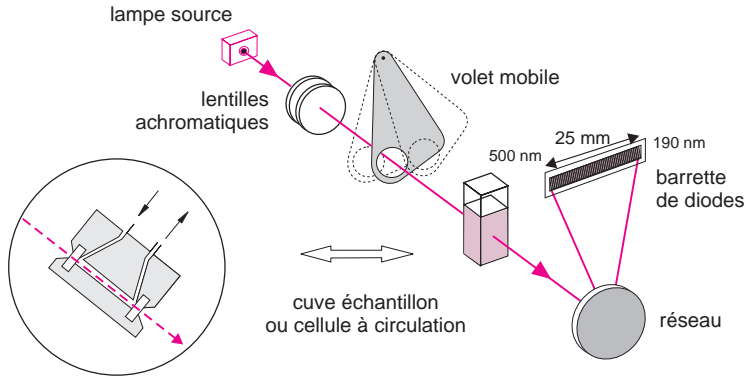


Figure 9.15 Schéma optique d'un spectrophotomètre simple faisceau illustrant le mode simultané (spectromètre à barrette de diodes).

Le volet, seule pièce mobile, permet de soustraire le bruit de fond ou « courant d'obscurité » produit lorsque aucune lumière ne vient frapper les diodes. Le montage à optique inversée permet de travailler avec le compartiment échantillon ouvert à la lumière extérieure. Ces appareils sont largement utilisés, comme détecteurs, en chromatographie liquide (cf. 2.7). En bas : exemple de réalisation d'un spectromètre miniaturisé dont le système dispersif et le détecteur sont intégrés sur une carte enfichable dans un micro ordinateur. Une fibre optique transmet la lumière en provenance de la partie source/cellule-échantillon située à distance (reproduit avec l'autorisation de la société Ocean Optics Europe).

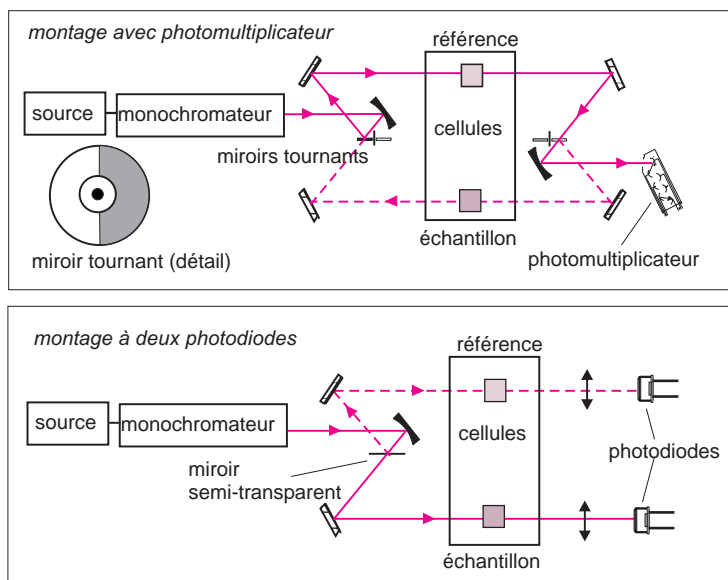


Figure 9.16 Parcours optique de deux appareils à double faisceau, entre la sortie du monochromateur et le détecteur (modèle à miroirs tournants et modèle à miroir semi-transparent). L'agencement des appareils à miroirs tournants est à rapprocher de celui des spectrophotomètres IR, hormis le fait que la lumière issue de la source passe d'abord par l'échantillon. On minimise ainsi les réactions de photolyse qui pourraient survenir par exposition prolongée à la totalité des radiations de la source. L'optique plus compacte des montages à un seul faisceau divisé associé à deux détecteurs est plus simple. Un miroir semi-transparent et fixe remplace le mécanisme délicat des miroirs tournants synchrones.

Les spectrophotomètres à double faisceau permettent de faire des mesures différentielles entre l'échantillon et le blanc analytique. Ils sont préférables aux modèles monofaisceau si les solutions sont troubles. La bande passante des meilleurs appareils peut descendre à 0,01 nm.

Pour permettre des mesures de routine sans avoir à faire de prélèvement, ou pour surveiller la concentration d'un produit sur une ligne de fabrication, à distance du spectrophotomètre, on utilise une sonde à immersion. Il s'agit d'un accessoire placé dans le compartiment échantillon de l'appareil et qui comporte deux fibres optiques pour conduire et récupérer la lumière après absorption dans le milieu étudié. Il en existe deux types : par transmission pour les solutions limpides et par réflexion totale atténuée (ATR) pour les solutions très absorbantes (fig. 9.17).

■ **Les composés fluorescents.** Quand le composé étudié est fluorescent, le spectre d'absorption est moins intense puisque la lumière ré-émise vient se superposer à la lumière absorbée. Observée avec un montage à optique inversée, par exemple, la fluorescence de l'échantillon (soumis à la totalité du rayonnement de la source) diminue donc l'absorbance dans la partie du spectre où se situe l'émission. Par contre, avec un montage optique traditionnel, la fluorescence apparaît quand le monochromateur sélectionne la zone correspondant à l'excitation : l'absorbance sera moins intense dans cette partie du spectre enregistré. Cependant il ne faut pas grossir le problème, car la fluorescence est émise dans toutes les directions et

les photons qui empruntent le trajet optique constituent une très petite partie de la lumière émise.

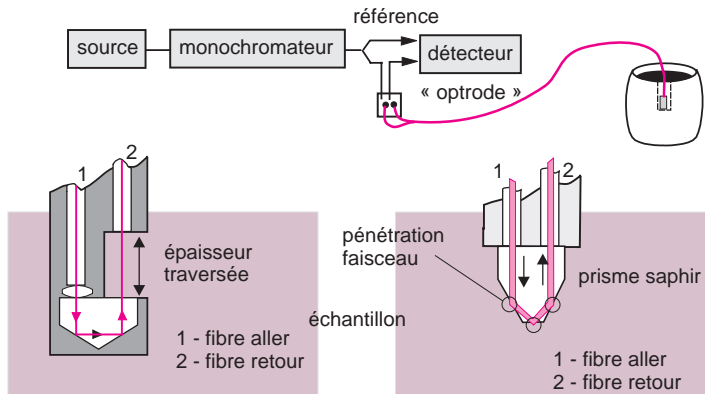


Figure 9.17 Principe d'un spectrophotomètre avec sonde d'immersion.

La lumière monochromatique issue du spectrophotomètre est guidée vers une cellule à immersion puis retourne vers le détecteur. Le trajet de référence est également assuré par une autre fibre optique. À gauche, sonde à transmission. À droite sonde ATR : Le prisme saphir a un indice plus grand que celui de la solution. Le dessin matérialise les trois réflexions du faisceau optique avec pénétration dans la solution (voir explication au § 10.9.3).

9.9 ANALYSE QUANTITATIVE : LOIS DE L'ABSORPTION MOLÉCULAIRE

9.9.1 Loi de Beer et Lambert

L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution.

L'origine de cette loi remonte aux travaux du mathématicien français Lambert qui avait, au XVIII^e siècle, défini les bases de la photométrie. Par la suite Beer, physicien allemand du XIX^e siècle, a posé une loi qui permet de calculer la quantité de lumière transmise après passage à travers une épaisseur donnée d'un composé en solution dans une matrice non absorbante.

Il en est résulté la *loi de Beer et Lambert* présentée ici sous sa forme actuelle :

$$A = \varepsilon_{\lambda} \ell c \quad (9.4)$$

A désigne l'absorbance, paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre, ℓ est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée, c la concentration molaire et ε_{λ} le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle on fait la mesure. Ce coefficient, (également appelé coefficient d'absorbance) propre au composé analysé, dépend en outre de la température et du solvant. Généralement sa valeur est repérée pour la seule longueur d'onde du maximum d'absorption. Elle peut varier sur une large plage allant de quelques unités à plus de 200 000.

À l'origine de cette formule on trouve l'hypothèse de Lambert selon laquelle l'intensité I d'une *radiation monochromatique* a diminué de dI (négatif) après avoir traversé une épaisseur dx d'un matériau dont le *coefficient d'absorption* est k pour la longueur d'onde choisie (fig. 9.18), soit :

$$-\frac{dI}{dx} = k I_x \quad (9.5)$$

En appelant I_0 l'intensité lumineuse de la radiation incidente en amont du milieu traversé d'épaisseur ℓ , l'expression 9.5 s'écrira sous la forme intégrée donnant l'intensité transmise I :

$$[\text{Ln } I_x]_{I_0}^I = -k [x]_0^\ell \quad (9.6)$$

soit
$$\text{Ln } \frac{I}{I_0} = -k \cdot \ell \quad (9.7)$$

ou encore :
$$I = I_0 e^{-k\ell} \quad (9.8)$$

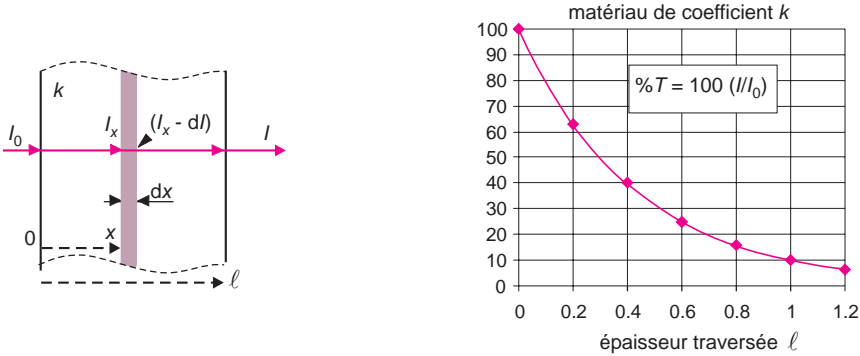


Figure 9.18 Absorption de la lumière par un matériau homogène, et représentation du % de transmittance en fonction de l'épaisseur traversée.

La lumière arrivant sur un échantillon peut être transmise, réfractée, réfléchie, diffusée ou absorbée. Ici on ne prend en compte que la partie absorbée.

Beer, en 1850, généralisa l'expression 9.8 au cas d'une solution faiblement concentrée d'un composé dissous dans un milieu transparent, c'est-à-dire non absorbant, en écrivant que k était proportionnel à la concentration molaire c de ce composé (fig. 9.19).

$$k = k' \cdot c \quad (9.9)$$

En remplaçant k par $k' \cdot c$ dans la relation 9.8, on obtient une expression qui est généralement connue sous la forme 9.4 dans laquelle l'*absorbance* A est représentée par l'une des expressions équivalentes :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{ou} \quad A = \log \frac{1}{T} \quad \text{ou} \quad A = \log \frac{100}{T \%} \quad \text{ou} \quad A = 2 - \log T \% \quad (9.10)$$

■ La loi de Beer et Lambert considérée à l'origine comme un postulat, a fait l'objet par la suite de nombreuses interprétations et démonstrations en partant d'hypothèses statistiques, cinétiques ou simplement logiques.

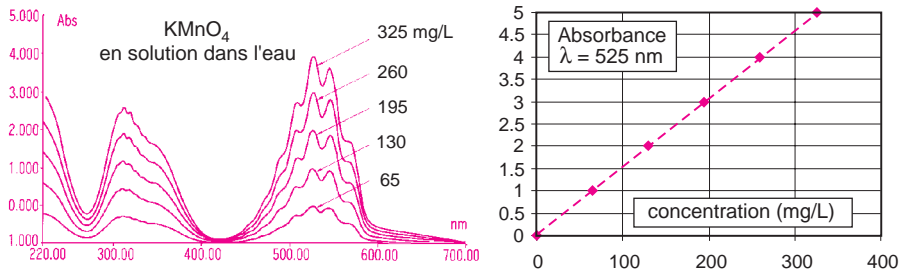


Figure 9.19 Illustration de la loi de Beer et Lambert.

Spectres de solutions aqueuses de concentrations croissantes en permanganate de potassium. Graphé des absorbances correspondantes mesurées à 525 nm montrant la croissance linéaire de ce paramètre.

Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- la lumière utilisée doit être monochromatique ;
- les concentrations doivent être faibles ;
- la solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- le soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

■ Quand, pour un dosage, on se contente de mesurer l'absorbance à une seule longueur d'onde, on choisit, en général, celle qui correspond au maximum d'absorption. D'autre part, pour que l'absorbance reflète correctement la concentration, il faut que la bande spectrale $\Delta\lambda$ qui atteint le détecteur, choisie par le paramètre de l'appareil appelé *largeur de fente* ou *bande passante*, soit beaucoup plus étroite (10 fois) que la largeur de la bande d'absorption mesurée à mi-hauteur.

9.9.2 Additivité des absorbances

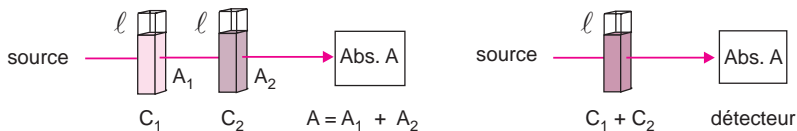


Figure 9.20 Additivité des absorbances.

Pour toute longueur d'onde, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange (pris à la même concentration) pour cette longueur d'onde.

La loi de Beer et Lambert est additive (fig. 9.20). Ceci veut dire que si on mesure l'absorbance A , dans une cuve d'épaisseur ℓ , d'un mélange de deux composés 1 et 2 en solution dans un solvant, on obtiendra la même absorbance totale si la lumière passe successivement à travers deux cuves d'épaisseur ℓ , placées l'une après l'autre, contenant l'une le composé 1 (Abs. A_1) et l'autre le composé 2 (Abs. A_2). Il faut bien sûr que les concentrations et le

solvant soient les mêmes que pour le mélange initial (on donne ici l'indice 1 au composé 1 et l'indice 2 au composé 2) :

$$A = A_1 + A_2 = \ell(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2) \quad (9.11)$$

Ce principe est illustré par l'étude des points isobestiques : considérons un composé A qui se transforme par une réaction du premier ordre en un composé B. Supposons que les spectres d'absorption de A et de B, enregistrés séparément dans un même solvant et à la même concentration, se coupent en un point I lorsqu'on les superpose (fig. 9.21). Pour la longueur d'onde du point I, les absorbances des deux solutions sont les mêmes, et par conséquent les coefficients ε_A et ε_B sont égaux ($\varepsilon_A = \varepsilon_B = \varepsilon$). Or dans ce type de transformation on a initialement A pur et pour finir B pur. Pour tout mélange intermédiaire, la concentration totale des mélanges de A et de B ne varie pas ($c_A + c_B = C_{\text{ste}}$),

$$A_I = \varepsilon_A \ell c_A + \varepsilon_B \ell c_B = \varepsilon \ell (c_A + c_B) \quad (9.12)$$

Tous les spectres des mélanges A + B formés au cours du temps passeront donc par le point I, appelé point isobestique, où l'absorbance A conservera la même valeur.

Ces réseaux de courbes concourantes se rencontrent quand on étudie le virage d'un indicateur coloré en fonction du pH, ou au cours de l'étude des cinétiques de réaction.

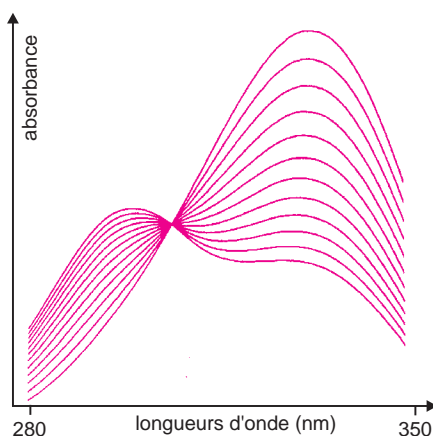


Figure 9.21 Point isobestique.

Hydrolyse alcaline à 25 °C du salicylate de méthyle. Superposition des spectres successifs enregistrés entre 280 et 350 nm à des intervalles de 10 min.

9.10 MÉTHODES UTILISÉES EN ANALYSE QUANTITATIVE

Quand un composé n'absorbe pas la lumière, il peut néanmoins faire l'objet d'un dosage photométrique si on peut le transformer préalablement à la mesure en un dérivé qui, lui, comporte un chromophore exploitable. Par cet artifice, il devient possible de doser toutes sortes d'espèces chimiques dont l'absorption est initialement soit très faible, soit dans une partie du spectre où coexistent d'autres absorptions qui interfèrent. À cette fin, la mesure d'absorbance est précédée d'une transformation chimique qui doit être à la fois spécifique, totale, rapide, reproductible et conduire à un dérivé stable en solution. C'est le principe des *tests colorimétriques*.

■ Le terme de colorimétrie vient de ce que les premiers dosages effectués dans ce domaine, bien avant l'invention des spectrophotomètres, se faisaient avec de la lumière naturelle (lumière blanche) et sans appareil particulier, par comparaison visuelle directe de la coloration de l'échantillon dosé avec celle de témoins de concentrations connues.

Les deux situations qui se présentent le plus souvent sont les suivantes :

- ▶ *Le composé à doser est présent dans une matrice dont certains constituants absorbent dans le même domaine spectral* : la mesure directe de l'absorbance due au seul composé est donc impossible (fig. 9.22a). Pour contourner cette difficulté, on transforme de façon spécifique le composé par une réaction totale en un dérivé dont la courbe d'absorption se situe dans une région libre de toute interférence avec la matrice (fig. 9.22, courbe b).
- ▶ *Le composé à doser n'a pas de chromophore exploitable à l'état brut* : on fait apparaître, ici encore, un chromophore de remplacement en dérivant l'espèce initiale suivant le même principe (fig. 9.22, courbes c et d).

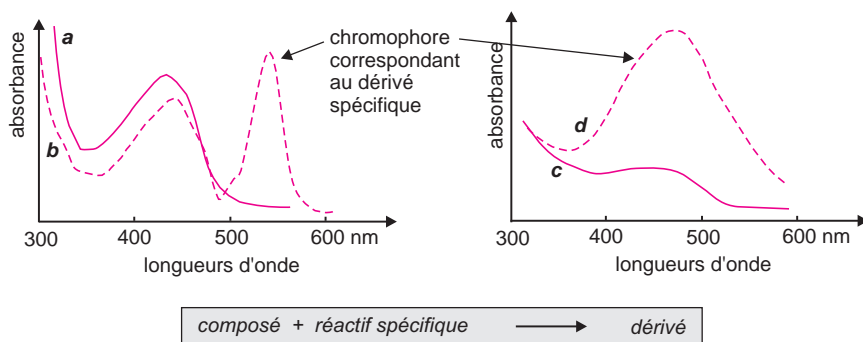


Figure 9.22 Illustration de deux situations fréquemment rencontrées.

Un composé masqué dans un mélange ou bien ne présentant pas d'absorption nette peut néanmoins être dosé par colorimétrie en faisant appel à une transformation chimique qui le transforme en un dérivé exempt d'interférences.

■ En colorimétrie, on préfère baser la mesure d'absorbance sur un chromophore situé vers les grandes longueurs d'onde, car on diminue le risque de superposition des absorptions propres aux différents composés. D'autre part, quand on fait précéder la mesure d'une réaction, il arrive qu'on ne connaisse pas la structure exacte du dérivé coloré dont on mesure l'absorbance ; néanmoins, en supposant que la réaction impliquée est quantitative, son coefficient molaire d'absorption est accessible à partir de la concentration molaire du composé utilisé en référence.

9.11 ANALYSE D'UN SEUL ANALYTE ET CONTRÔLE DE PURETÉ

Pratiquement, on commence par construire une courbe d'étalonnage $A = f(c)$ à partir de solutions de concentrations connues du composé à doser, soumises au même traitement que l'échantillon. Cette courbe, le plus souvent assimilable à une droite pour les solutions diluées, permet de déduire la concentration c_X de la solution inconnue.

On se contente quelquefois de préparer une seule solution étalon. Dans ce cas on prépare une solution de référence dont la concentration c_R est telle que son absorbance A_R est légèrement supérieure à celle que l'on attend de la solution inconnue A_X (fig. 9.23).

On applique alors la formule suivante pour calculer c_X :

$$c_X = c_R \frac{A_X}{A_R} \quad (9.13)$$

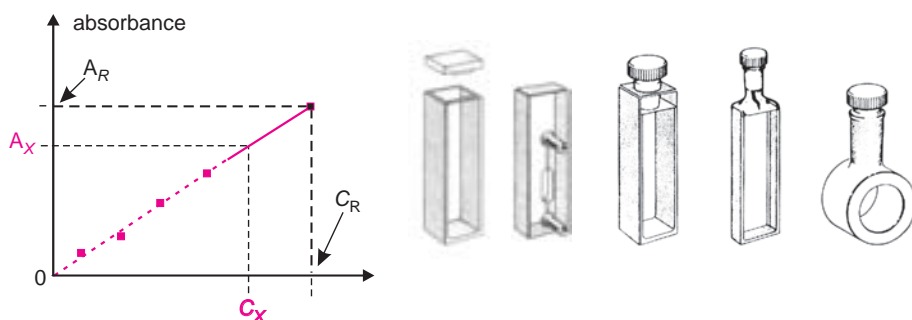


Figure 9.23 Courbe d'étalonnage et cuves classiques en verre optique ou en verre de silice.

Si on se contente de préparer une seule solution de référence, ceci revient à considérer que la courbe d'étalonnage est une droite qui passe par l'origine. La précision du résultat sera d'autant meilleure que la concentration inconnue sera proche de la concentration de référence (le résultat est déterminé par interpolation).

Le calcul classique de la concentration d'un analyte par la relation 9.13 conduit à un résultat erroné si l'échantillon contient une impureté (absente dans la solution de référence) qui absorbe également à la longueur d'onde de mesure. Aussi, fait-on assez souvent appel à une méthode baptisée *analyse de confirmation*.

On part de la constatation que pour tout composé pur, le rapport des coefficients d'absorption, déterminés à deux longueurs d'onde, est constant. Il est caractéristique du composé. Donc, si on effectue une ou deux mesures d'absorbance supplémentaires, décalées de quelques nanomètres par rapport à la mesure originale, on pourra calculer les rapports d'absorbance de la solution échantillon et les comparer à ceux qui auront été établis de la même façon avec un témoin pur. Si ces rapports sont différents, on en déduira qu'il y a une impureté. Le calcul de la concentration sera donc peu fiable dans ce cas.

■ Partant de ce principe, il est possible de contrôler l'homogénéité des pics d'élution en chromatographie liquide, à condition de disposer d'un détecteur UV permettant la mesure simultanée de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde (un détecteur à barrettes de diodes, par exemple). Toute variation, au cours de l'élution d'un constituant, du rapport des absorbances à deux longueurs d'onde, témoigne qu'il s'agit d'un mélange de composés sortant simultanément de la colonne (fig. 9.24). Cette méthode est cependant mise en défaut en cas de coélution parfaite de deux composés.

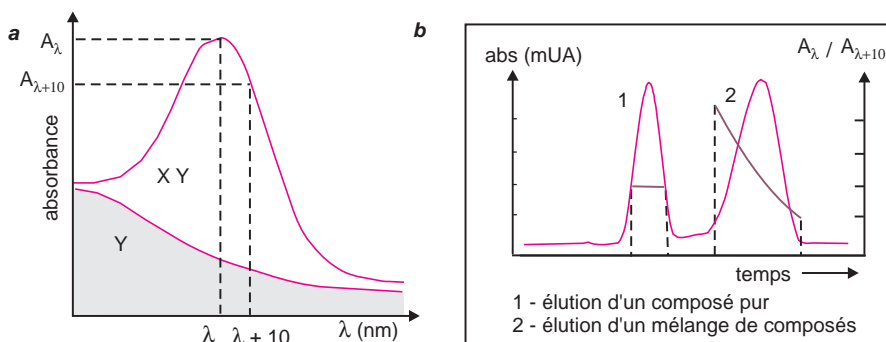


Figure 9.24 Analyse de confirmation.

a) Spectre d'un mélange ($X + Y$) et spectre de Y seul dans le même domaine (partie grisée) ; b) dessin illustrant un chromatogramme qui présente deux pics dont le premier est dû à un composé unique et le second à l'élué de deux composés légèrement décalés dans le temps. L'évolution du rapport des absorbances en cours d'élué permet de contrôler la pureté des composés élués. Ces variations sont habituellement mises en évidence par les logiciels sous forme de plages colorées.

9.12 ANALYSE MULTICOMPOSANTS (MCA)

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de composés dont les spectres d'absorption individuels sont connus, on peut en déterminer la composition. Selon la loi d'additivité (relation 9.11), le spectre du mélange correspond à la somme pondérée des spectres de chacun des constituants. La méthode classique de calcul est rappelée ici pour mémoire. Elle n'est plus utilisée telle quelle, mais au travers des outils logiciels.

9.12.1 Méthode algébrique de base

Soit un mélange de trois composés a , b , c en solution (conc. c_a , c_b , c_c). On mesure les absorbances de cette solution à trois longueurs d'onde λ_1 , λ_2 et λ_3 , soit A_1 , A_2 et A_3 . Connaissant les valeurs des absorbances spécifiques de chacun des trois composés pris isolément pour ces trois longueurs d'onde (9 valeurs au total, de ϵ_a^1 à ϵ_c^3) on écrira, par application de la loi d'additivité des absorbances, le système suivant de trois équations (on suppose que le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm) :

$$\begin{aligned} \text{à } \lambda_1 & \quad A_1 = \epsilon_a^1 c_a + \epsilon_b^1 c_b + \epsilon_c^1 c_c \\ \text{à } \lambda_2 & \quad A_2 = \epsilon_a^2 c_a + \epsilon_b^2 c_b + \epsilon_c^2 c_c \\ \text{à } \lambda_3 & \quad A_3 = \epsilon_a^3 c_a + \epsilon_b^3 c_b + \epsilon_c^3 c_c \end{aligned}$$

La résolution de ce système, qui correspond à une matrice $[3 \times 3]$, permet de trouver les trois concentrations cherchées c_a , c_b et c_c .

$$\begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ A_3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \epsilon_a^1 & \epsilon_b^1 & \epsilon_c^1 \\ \epsilon_a^2 & \epsilon_b^2 & \epsilon_c^2 \\ \epsilon_a^3 & \epsilon_b^3 & \epsilon_c^3 \end{bmatrix}^{-1} \quad (9.14)$$

Cette approche donne de bons résultats quand les composés ont des spectres significativement différents, mais elle devient moins précise quand les spectres sont voisins puisqu'une petite erreur de mesure peut conduire à une variation importante du résultat. Pour cette raison les appareils à barrettes de diodes utilisent plusieurs dizaines de points de données. Le système à résoudre (rel. 9.14) devenu surdéterminé conduit à de meilleurs résultats.

9.12.2 Régression linéaire multilongueurs d'onde (méthode MLRA)

L'analyse des mélanges a donné lieu à diverses méthodes, rendues possibles avec les spectromètres qui enregistrent les données. Les logiciels d'analyse quantitative peuvent utiliser un grand nombre de points extraits des spectres de l'échantillon à doser et des solutions d'étalonnage. À titre d'exemple est décrite, ci-après, une méthode de régression linéaire qui permet de neutraliser le bruit de fond et donc d'améliorer le résultat d'une analyse de deux composés connus, présents dans un échantillon (fig. 9.25).

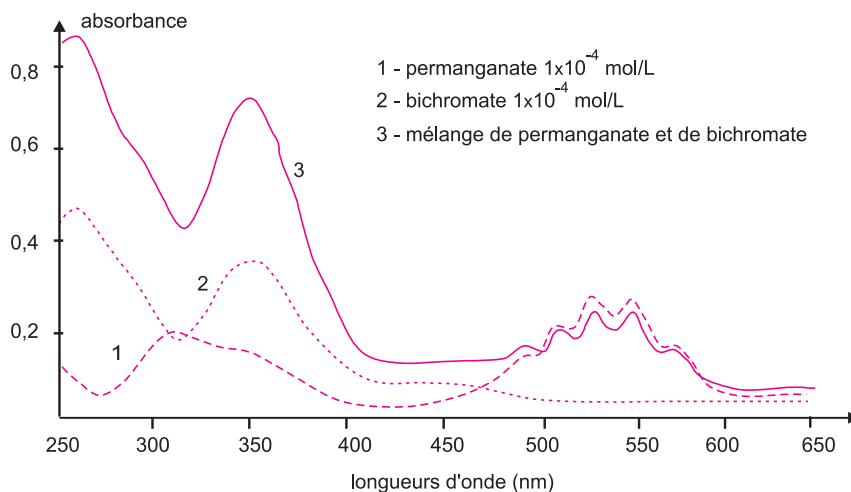


Figure 9.25 Analyse multicomposants.

Spectres d'une solution 1×10^{-4} M en permanganate, d'une solution 1×10^{-4} M de bichromate et d'une solution contenant $0,8 \times 10^{-4}$ M de permanganate et $1,8 \times 10^{-4}$ M de bichromate (d'après Bianco et Coll., *J. Chem Educ.*, 1994, 66(2), p. 178).

L'appareil utilise trois enregistrements mis en mémoire : un spectre de l'échantillon (qui contient le mélange des deux composés dont on veut trouver les concentrations) et deux spectres, dans le même domaine spectral, correspondant chacun à une solution de référence de concentration connue de l'un et de l'autre composé.

Pour chaque longueur d'onde, la loi d'additivité des absorbances permet d'écrire que l'absorbance du mélange considéré des deux composés (notés a et b), supposés n'interagissant pas l'un sur l'autre, est donnée par l'expression :

$$A = \varepsilon_a l c_a + \varepsilon_b l c_b \quad (9.15)$$

Pour chacun des deux spectres de référence, on a, en supposant que l'épaisseur des cellules de mesure est $\ell = 1 \text{ cm}$:

– pour le composé a $A_{\text{réf.a}} = \varepsilon_a \cdot c_{\text{réf.a}}$ (9.16)

– pour le composé b $A_{\text{réf.b}} = \varepsilon_b \cdot c_{\text{réf.b}}$ (9.17)

Ces deux expressions permettent de calculer les coefficients d'absorption ε de chaque constituant pur, à chaque longueur d'onde considérée. On peut donc ré-écrire 9.15 sous la forme :

$$A = \frac{A_{\text{réf.a}}}{c_{\text{réf.a}}} c_a + \frac{A_{\text{réf.b}}}{c_{\text{réf.b}}} c_b$$
 (9.18)

En divisant le premier membre par $A_{\text{réf.a}}$, on aura pour chaque longueur d'onde :

$$\left(\frac{A}{A_{\text{réf.a}}} \right) = \frac{c_a}{c_{\text{réf.a}}} + \frac{c_b}{c_{\text{réf.b}}} \cdot \left(\frac{A_{\text{réf.b}}}{A_{\text{réf.a}}} \right)$$
 (9.19)

Le premier membre de l'expression 9.19 est donc une fonction affine du rapport des absorbances figurant au second membre. Les valeurs calculées sont sur une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent de calculer c_a et c_b .

Le résultat sera d'autant plus précis que le nombre de points utilisés sera grand.

9.12.3 Déconvolution

D'assez nombreux logiciels de traitement de données permettent de trouver la composition de mélanges à partir des spectres. L'une des méthodes les plus connues utilise l'algorithme du filtre de Kalman des moindres carrés. Elle permet de trouver de manière automatique, par approximations successives, le spectre de la solution échantillon par addition des spectres en mémoire de chacun des composés affectés d'un coefficient de pondération (loi d'additivité des absorbances). Ce sont les méthodes connues sous les noms de PLS (*partial least square*), PCR (*principal component regression*), ou MLS (*multiple least squares*) (fig. 9.26).

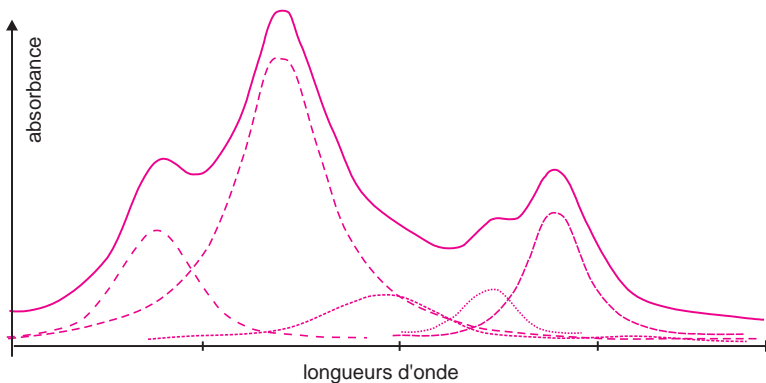


Figure 9.26 Déconvolution de courbe spectrale.

À partir du spectre expérimental d'un mélange de 5 composés (le plus externe sur la figure), le logiciel retrouve la proportion de chacun d'eux (dont les spectres individuels sont connus par ailleurs).

9.13 MÉTHODES DE CORRECTION DE LIGNE DE BASE

Certains échantillons, tels les fluides biologiques, contiennent des particules micellaires en suspension qui créent par diffusion de la lumière (effet Tyndall) une absorption supplémentaire. Celle-ci varie de manière régulière avec la longueur d'onde (fig. 9.27).

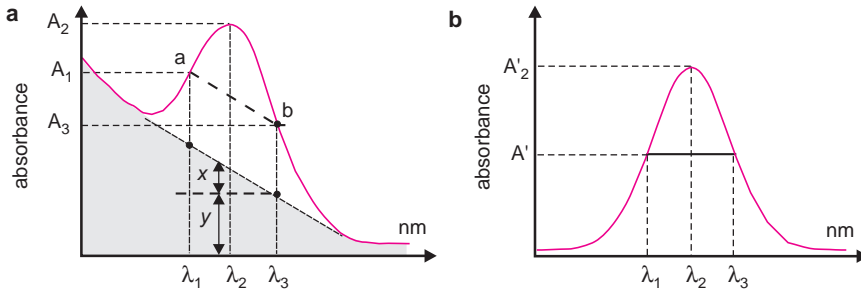


Figure 9.27 Illustration se rapportant aux calculs de la méthode de Morton et Stubbs.

Plusieurs méthodes cherchent à corriger ce phénomène en retranchant de l'absorbance mesurée la part qui n'est pas due à l'analyte. Il s'agit en fait de corrections de la ligne de base faites à partir de mesures réalisées à plusieurs longueurs d'onde.

9.13.1 Modélisation par une fonction polynomiale

On suppose que la variation de la ligne de base est représentable par une fonction $A = k \lambda^n$. Pour trouver k et n , on repère une plage où l'analyte n'absorbe pas afin que le logiciel utilise cette zone de la courbe pour calculer ces coefficients par une méthode des moindres carrés, (sachant que $\log a = \log k + n \log \lambda$). Ensuite quelle que soit la longueur d'onde du dosage, on pourra retrancher l'absorbance due au fond absorbant.

9.13.2 Méthode des trois points (Morton-Stubbs)

La méthode de Morton et Stubbs (ainsi que la méthode faisant appel aux courbes dérivées, cf. 9.16) permet une correction efficace de la ligne de base à condition que l'absorption sous-jacente varie linéairement dans la zone de mesure. Ainsi, dans une situation telle que celle représentée sur la figure 9.27a, il faut, pour quantifier le composé, corriger l'absorbance A_2 lue au maximum λ_2 en retranchant ce qui correspond aux valeurs notées x et y .

Pour cela on va faire un spectre de référence du composé pur, afin de choisir deux longueurs d'onde λ_1 et λ_3 telles que les coefficients d'absorbance soient les mêmes (fig. 9.27b). Ainsi sur la figure, on a pour λ_1 et λ_3 la même absorbance A' et une absorbance A'_2 au maximum λ_2 . On calcule le rapport R entre ces deux valeurs ($R = A'_2/A'$). On effectue ensuite, sur le spectre de l'échantillon à doser, le rapport des absorbances à ces deux mêmes longueurs d'onde. À condition d'assimiler la ligne de base à une droite de même pente que le segment ab , la valeur de x peut alors être déduite par calcul (voir figure) :

$$x = (A_1 - A_3) \frac{(\lambda_3 - \lambda_2)}{(\lambda_3 - \lambda_1)} \quad (9.20)$$

À partir de R et du rapport A_2/A_3 de l'échantillon, on accède à y sachant que le rapport des absorbances, après correction de x et y , conserve la valeur R (fig. 9.26) :

$$R = \frac{A_2 - (x + y)}{A_3 - y}$$

soit :

$$y = \frac{RA_3 - A_2 + x}{R - 1} \quad (9.21)$$

La connaissance de x et y permet de calculer l'absorbance corrigée A selon :

$$A = A_2 - x - y$$

Cette méthode nécessite simplement de disposer d'un spectre du composé pur. Elle est indépendante de la concentration de la solution de référence et fait partie des logiciels de traitement des spectres UV.

9.14 DISTRIBUTION DES ERREURS RELATIVES DUES AUX APPAREILS

Pour beaucoup de spectrophotomètres il est possible de faire des mesures allant jusqu'à 4 ou 5 unités d'absorbance. Sachant que ces valeurs élevées correspondent à des intensités transmises qui sont extrêmement faibles ($I/I_0 = 10^{-5}$ pour $A = 5$), on peut craindre que les résultats soient moins fiables. Il est donc important de considérer les limites techniques du matériel.

On reconnaît trois sources d'erreurs instrumentales sur la transmittance. Il s'agit de causes indépendantes qui peuvent s'ajouter (fig. 9.28) :

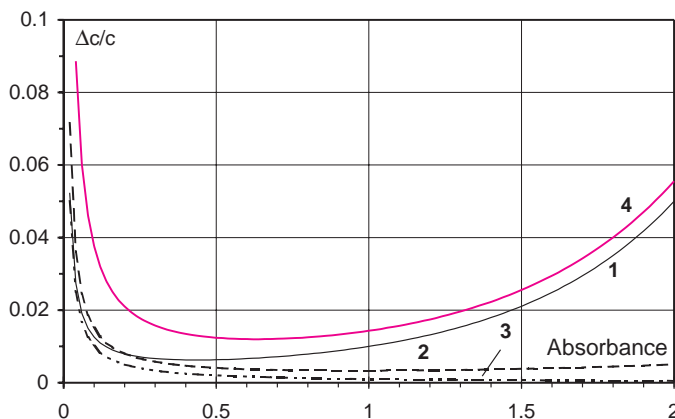


Figure 9.28 Courbes représentatives moyennes de chacune des causes d'erreur dans la mesure de l'absorbance, ainsi que la courbe globale résultant de leur somme (4) (voir texte).

► *le bruit de fond de la source lumineuse.* Ce terme ΔT_1 est considéré comme constant et indépendant de T : $\Delta T_1 = k$ (courbe 1);

- *le bruit de fond du photomultiplicateur*. Ce terme ΔT_2 varie en fonction de T , suivant une expression complexe, traduite par la relation suivante (courbe 2) :

$$\Delta T_2 = k_2 \sqrt{T^2 + T} \quad (9.22)$$

- *les réflexions et diffusions lumineuses* sur le parcours optique de l'instrument. Ce terme est proportionnel à T : $\Delta T_3 = k_3 T$ (courbe 3).

Comme ces causes d'erreur s'ajoutent, l'erreur totale sur la concentration correspond — en admettant les trois expressions ci-dessus — à une courbe résultante dont l'ordonnée en chaque point est la somme des ordonnées des trois autres. Cette courbe passe par un minimum qui se situe généralement pour $A = 0,7$. Pour les dosages il est donc conseillé d'ajuster les dilutions afin que les absorbances se situent dans cette zone optimale.

À partir de la loi de Beer et Lambert il est également possible de relier l'erreur relative, faite sur la concentration c , à l'erreur relative faite sur la transmittance T (courbe 4).

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{1}{\ln T} \cdot \frac{\Delta T}{T} \quad (9.23)$$

9.15 SPECTROMÉTRIE DÉRIVÉE

Le principe consiste à calculer par un procédé mathématique les courbes dérivées des spectres pour améliorer la précision de certains dosages. Ce procédé est appliqué par exemple quand l'analyte se confond dans le spectre global du mélange dans lequel il se trouve. Les tracés des courbes dérivées sont en effet beaucoup plus accidentés que ceux des spectres d'origine (appelés *spectre d'ordre zéro*) dont ils mettent en relief les faibles variations de pente (fig. 3.29). Le processus d'obtention de la courbe *dérivée première*, $dA/d\lambda = (d\varepsilon/d\lambda) \cdot \ell \cdot c$, peut être étendu aux dérivées successives (n^e dérivée).

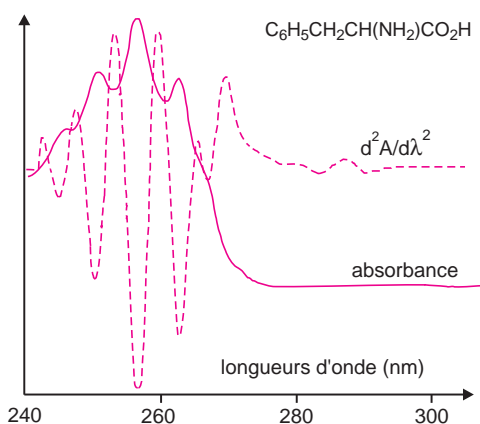


Figure 9.29 Spectre UV de la phénylalanine et courbe de sa dérivée seconde.

Les logiciels des spectromètres conduisent à ces courbes dérivées par calcul, et non plus par des modifications du montage optique comme il en était à l'origine.

La courbe correspondant à la *dérivée seconde*, fait correspondre aux points d'inflexion du spectre d'ordre zéro, des points d'annulation de pente, c'est-à-dire des maxima ou des minima (fig. 9.30). La quatrième dérivée met encore mieux en évidence les faibles variations d'absorbance du spectre initial.

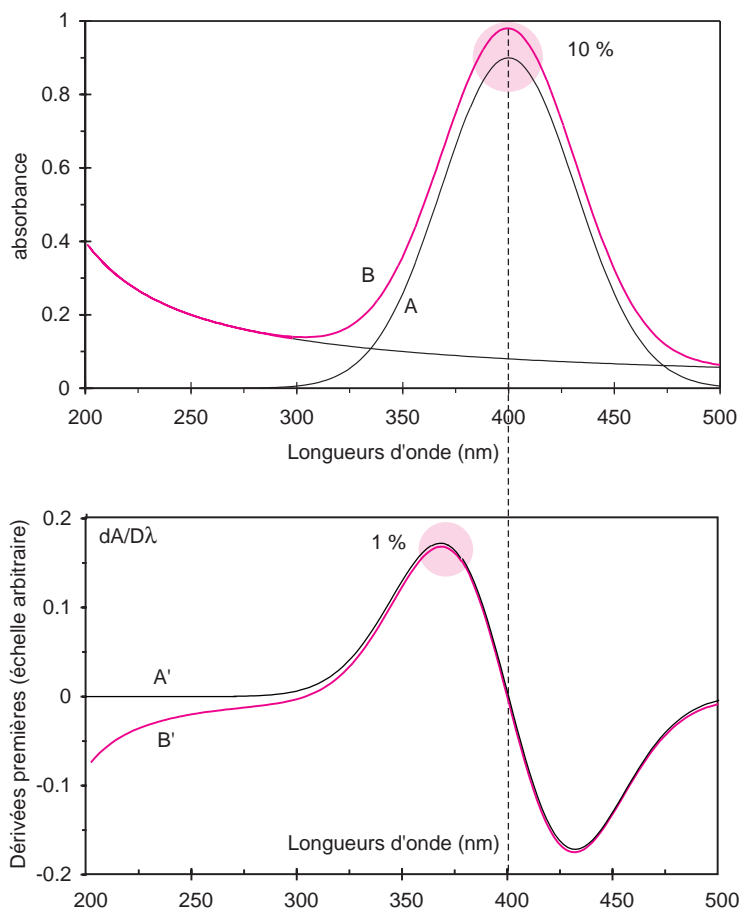


Figure 9.30 Effet d'un phénomène de diffusion sur un spectre enregistré en absorbance et sur sa courbe dérivée.

Comparaison des courbes dérivées correspondant pour A au spectre d'un composé en solution sans phénomène de diffusion et pour B au même spectre en présence de diffusion. On observe que la diffusion perturbe ici de 10 % l'absorbance mais de seulement 1 % environ la valeur de l'amplitude de la courbe dérivée (spectres modélisés à partir de fonctions correspondant à des courbes de Gauss).

De nombreux dosages gagneraient à utiliser ce principe, sachant que la conduite d'un dosage à partir des courbes dérivées n'est pas plus difficile qu'à partir des spectres en absorbance. L'amplitude entre le maximum et le minimum de la courbe dérivée n^e , est proportionnelle à la valeur de l'absorbance de la solution. La courbe d'étalonnage est établie à partir de plusieurs solutions étalons de concentrations différentes auxquelles le même trai-

tement mathématique est appliqué, ainsi qu'à la solution échantillon. L'intérêt du procédé est manifeste dans trois situations où l'absorbance est faussée :

- ▶ si le spectre de la solution échantillon présente un décalage vers le haut par suite d'un fond d'absorption uniforme, la courbe dérivée, qui n'est sensible qu'aux variations de pente de la courbe d'ordre zéro, n'en sera nullement affectée.
- ▶ si on est en présence d'un phénomène de diffusion de la lumière au sein de la solution échantillon, qui se traduit par un fond d'absorption qui croît modérément vers les petites longueurs d'onde, là encore, les courbes dérivées seront peu affectées (fig. 9.30).
- ▶ une absorbance due à l'analyte, quasiment invisible sur le spectre original, parce que noyée dans une absorbance régulière provenant d'un effet de matrice, devient détectable.

9.16 COLORIMÉTRIE VISUELLE PAR TRANSMISSION OU RÉFLEXION

La colorimétrie visuelle, utilisée depuis plus de deux siècles, est une forme simplifiée de la spectrométrie d'absorption instrumentale. Elle se pratique intensément étant donné son faible coût et sa précision bien souvent étonnante.

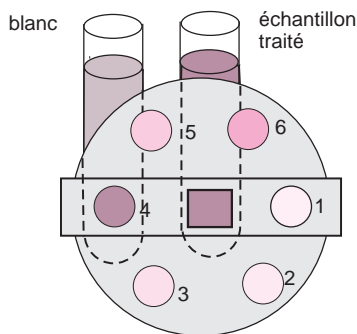


Figure 9.31 Colorimétrie visuelle.

À gauche, comparateur à disque. L'utilisation de cet appareil consiste à choisir, par rotation du porte-filtres, celui qui permet, quand il est superposé au « blanc analytique », d'égaliser au mieux les colorations des deux tubes. L'observation se fait par transparence en lumière blanche. Le tube central contient l'échantillon après traitement. Le disque est étalonné pour un dosage particulier. À droite, un réflectomètre portable qui permet de s'affranchir de l'appréciation de l'œil humain (reproduit avec l'autorisation de la société Merck).

Les colorimètres les plus simples (fig. 9.31), utilisés pour les dosages de routine, sont des comparateurs visuels apparentés aux tubes de Nessler, d'origine bien ancienne. Ces derniers sont constitués par des tubes de verre à fond plat avec trait de jauge, que l'on remplit avec différentes solutions de concentrations étalons et éventuellement d'un agent de dérivation. La solution à analyser, placée dans un tube identique, est intercalée dans la série des témoins précédents. Ces tubes, disposés sur un fond de lumière blanche, sont observés par transparence. La concentration cherchée est intermédiaire entre celles des deux témoins

dont les colorations les plus proches encadrent celle du tube contenant l'échantillon à doser. Ces tests sélectifs, prêts à l'emploi et ne nécessitant aucun appareil, complètent les méthodes établies et aident, par leur mise en œuvre immédiate, à maîtriser le flot des analyses semi-quantitatives en tous genres.

■ Les innombrables tests, présentés sous forme de bandelettes qui se colorent plus ou moins intensément lorsqu'elles sont trempées dans les milieux appropriés, sont autant d'applications courantes de la colorimétrie. Cependant le résultat, issu d'un examen visuel de la lumière réfléchie, est donc à rattacher à la réflectométrie plutôt qu'à la colorimétrie par transmission.

La néphélométrie, technique différente de la colorimétrie, fait cependant également appel à la même loi de Beer et Lambert. La méthode consiste à mettre en jeu la formation d'un précipité et, à partir de la lumière absorbée à une longueur d'onde donnée, à déterminer la concentration du précurseur. Par exemple, pour doser l'ion sulfate, on ajoute un sel de baryum soluble. Il se forme un précipité de sulfate de baryum dont on mesure l'absorbance, après avoir été stabilisé avec un polymère hydrosoluble, tel le Tween®.

EXERCICES

Exercice 9.1

Une eau polluée contient du chrome ($M = 52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) à la concentration massique d'environ 0,1 ppm. On choisit, pour son dosage, le complexe Cr^{VI} avec le diphénylcarbazine ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$, $\varepsilon_{\text{max}} = 41\,700 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Proposer une valeur du trajet optique de la cuve pour que l'absorbance soit de l'ordre de 0,40.

Exercice 9.2

Une solution aqueuse de permanganate de potassium ($c = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a une transmittance de 0,5 à 525 nm, si on utilise une cuve de 10 mm de parcours optique.

a) Calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde ?

b) Si on double la concentration, calculer l'absorbance et la transmittance de la nouvelle solution ?

Exercice 9.3

Les peintures et vernis extérieurs doivent être protégés de l'effet des radiations solaires pour ralentir leur dégradation (photolyse et réactions photochimiques).

Quelle doit être la concentration, en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, d'un additif UV (M) pour que 90 % du rayonnement soit absorbé sur une épaisseur de 0,3 mm ?

Données : $M = 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{max}} = 15\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$.

Exercice 9.4

On veut déterminer la concentration (mol/L) de deux sels A ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) et B ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) dans un échantillon inconnu en solution aqueuse. On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris isolément en solution aqueuse ainsi que de la solution échantillon à analyser. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes : le composé A ($1.5 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,714 à 510 nm et de 0,0097 à 575 nm. Le composé B ($6 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,298 à 510 nm et de 0,757 à 575 nm. La solution à doser présente une absorbance de 0,40 à 510 nm et de 0,577 à 575 nm.

- Calculer les 4 coefficients d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{A}(510)}$, $\varepsilon_{\text{B}(510)}$, $\varepsilon_{\text{A}(575)}$ et $\varepsilon_{\text{B}(575)}$.
- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) des deux sels A et B dans la solution échantillon.

Exercice 9.5

On veut déterminer la concentration (mol/L) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans une solution aqueuse inconnue par la méthode MLRA.

On prépare deux solutions de référence, l'une KMnO_4 ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) et l'autre en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$). Les spectres de la solution inconnue et des deux solutions de référence sont enregistrés entre 250 et 400 nm. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

À partir des résultats, au nombre de 5, rassemblés dans le tableau ci-dessous :

- Trouver l'équation de la droite de régression

$$A_{\text{échant}}/A_{\text{permanganate}} = f(A_{\text{bichromate}}/A_{\text{permanganate}}).$$

- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans la solution échantillon.

λ (nm)	Abs. MnO_4^- (réf.)	Abs. $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.)	échantillon
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672
360	0,056	0,181	0,366

Exercice 9.6

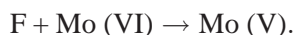
Un indicateur coloré acido-basique se comporte comme un acide faible HA de constante d'acidité K_a .

On prépare diverses solutions de même concentration C_0 de cet indicateur dont on fait varier le pH sans dilution. On mesure, dans les mêmes conditions ($\ell = 1$ cm et $\lambda = 595$ nm) l'absorbance des différentes solutions préparées. On admettra que seule la forme basique absorbe à 595 nm et que la relation de Beer Lambert est utilisable pour les quatre mesures. On obtient les valeurs suivantes :

pH	8,31	8,71	9,09	12
A	0,326	0,642	1,000	1,640

Calculer la valeur de la constante d'acidité de l'indicateur.

Le fructose F réduit le molybdène VI en molybdène V (bleu de molybdène) suivant le schéma :



Afin de déterminer l'ordre partiel « α » de la réaction par rapport au fructose, on ajoute à une solution de fructose un grand excès de molybdate d'ammonium. On suit la cinétique de cette réaction en mesurant, à différents instants, l'absorbance du mélange à 720 nm, longueur d'onde où seul Mo (V) absorbe.

On obtient les résultats suivants :

t (min)	0	10	20	30	50	infini
A	0	0,175	0,302	0,384	0,494	0,600

Vérifier que la réaction est d'ordre 1 par rapport au fructose et calculer la constante de vitesse apparente k' .