

# Chimie analytique



# Spectrophotométrie

*Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes*

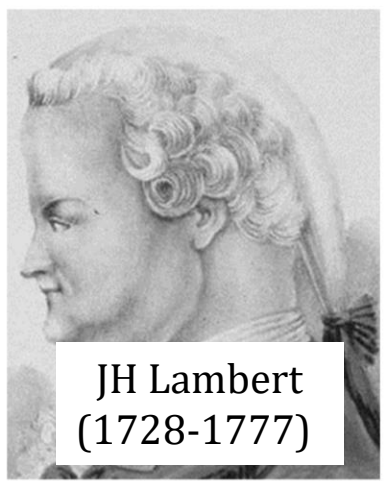
*Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes*

# Acidimétrie

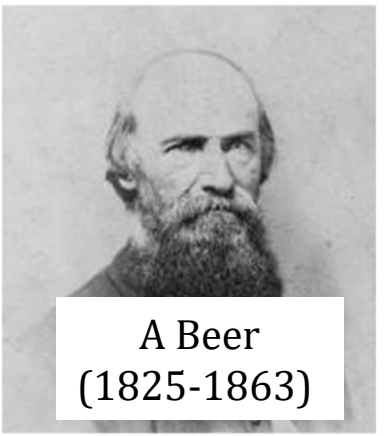
*Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes*

*Dr Marylène CHOLLET-KRUGLER / UFR Pharmacie / Rennes*





JH Lambert  
(1728-1777)

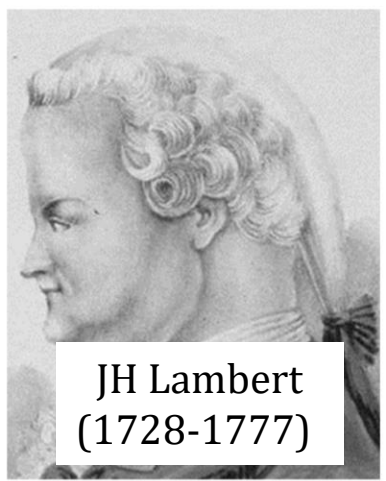


A Beer  
(1825-1863)

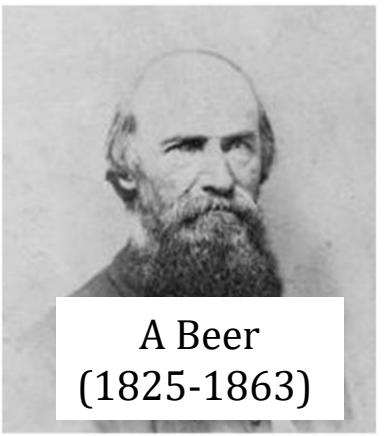
# Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

- Introduction
- Phénomène d'absorption
- Absorption moléculaire
- Absorption atomique



JH Lambert  
(1728-1777)



A Beer  
(1825-1863)

# Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

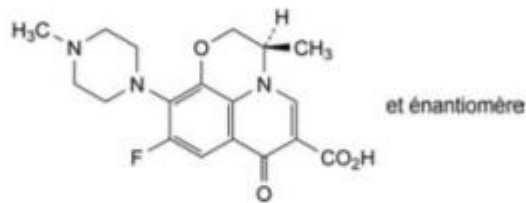
- **Introduction**
- Phénomène d'absorption
- Absorption moléculaire
- Absorption atomique

# Spectrophotométrie dans la pharmacopée



## OFLOXACINE

Ofloxacinum



$C_{18}H_{20}FN_3O_4$   
[82419-36-1]

$M_r$  361,4

### DÉFINITION

Acide (3*RS*)-9-fluoro-3-méthyl-10-(4-méthylpiperazin-1-yl)-7-oxo-2,3-dihydro-7*H*-pyrido[1,2,3-*de*][1,4]benzoxazine-6-carboxylique.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

### CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline jaune pâle ou jaune vif.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acide acétique glacial, peu soluble ou soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans le méthanol.

### IDENTIFICATION

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

01/2021:1455 examiner, puis complétez à 50 mL avec le mélange de solvants. Prélevez 1 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec le mélange de solvants.

Colonne :

- dimensions :  $l = 0,15$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm,
- phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R (3  $\mu$ m),
- température : 38 °C.

Phase mobile :

- phase mobile A : acétonitrile pour chromatographie R, solution tampon (16:84 V/V),
- phase mobile B : méthanol R1, acétonitrile pour chromatographie R, solution tampon (20:30:50 V/V/V),

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0 - 5	100	0
5 - 10	100 → 82	0 → 18
10 - 15	82 → 40	18 → 60
15 - 30	40	60

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 294 nm et, pour l'impureté A, à 240 nm.

Injection : 10  $\mu$ L.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier le pic dû à l'impureté A ; utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier les pics dus aux impuretés D et E.

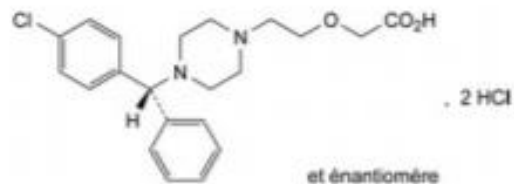
Rétention relative par rapport à l'ofloxacin (temps de rétention = environ 10 min) : impureté D = environ 0,7 ;

Pharmacopée :  
IR : analyse qualitative (identification)  
UV : analyse quantitative (dosage)



## CÉTIRIZINE (DICHLORHYDRATE DE)

Cetirizini dihydrochloridum



$C_{21}H_{27}Cl_2N_2O_3$   
[83881-52-1]

$M_r$  461,8

### DÉFINITION

Dichlorhydrate d'acide (RS)-2-[2-[4-[(4-chlorophényl)phényl-méthyl]pipérazin-1-yl]éthoxy]acétique.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

## PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 10.0

## Cétirizine (dichlorhydrate de)

### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche.

*Solubilité* : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.

### IDENTIFICATION

*Première identification* : B, D.

*Seconde identification* : A, C, D.

**A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25).**

*Solution à examiner.* Dissolvez 20,0 mg de dichlorhydrate de cétirizine dans 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique R à 10,3 g/L et complétez à 100,0 mL avec le même acide. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec une solution d'acide chlorhydrique R à 10,3 g/L.

*Région spectrale* : 210-350 nm.

*Maximum d'absorption* : à 231 nm.

*Absorbance spécifique au maximum d'absorption* : 359 à 381.

**B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).**

*Comparaison* : dichlorhydrate de cétirizine SCR.

*Solution témoin (b).* Prélevez 1,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (c).* Dissolvez le contenu d'un flacon de cétirizine pour identification des pics SCR (contenant les impuretés B, C, D, E et F) dans 5,0 mL de phase mobile.

*Colonne* :

– *dimensions* :  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm,

– *phase stationnaire* : gel de silice pour chromatographie R (5  $\mu$ m).

*Phase mobile* : acide sulfurique dilué R, eau R, acétonitrile R (0,4:6,6:93 V/V/V).

*Débit* : 1 mL/min.

*Détection* : spectrophotomètre à 230 nm.

*Injection* : 20  $\mu$ L.

*Enregistrement* : 3 fois le temps de rétention de la cétirizine.

*Identification des impuretés* : utilisez le chromatogramme fourni avec la cétirizine pour identification des pics SCR et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier les pics dus aux impuretés B, C, D, E et F, utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour identifier le pic dû à l'impureté A.

Pharmacopée :

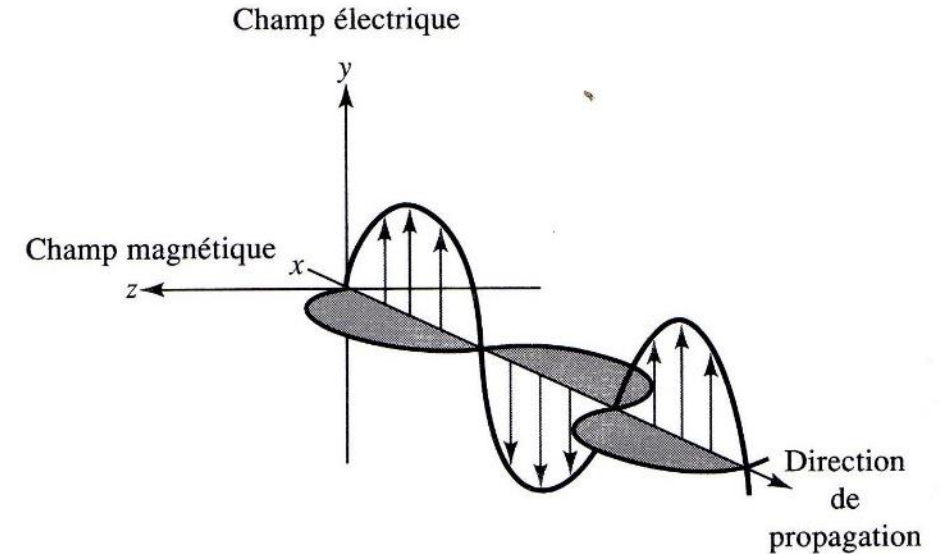
IR et UV : analyse qualitative

Molécule caractérisée par  $\lambda_{max}$  et  $\epsilon$

# A propos du rayonnement électromagnétique

## Onde électromagnétique

- une composante magnétique  $\Rightarrow$  RMN
- une composante électrique  $\Rightarrow$  phénomènes de transmission, réflexion, réfraction et absorption.



Permet de transporter de l'énergie dans le vide

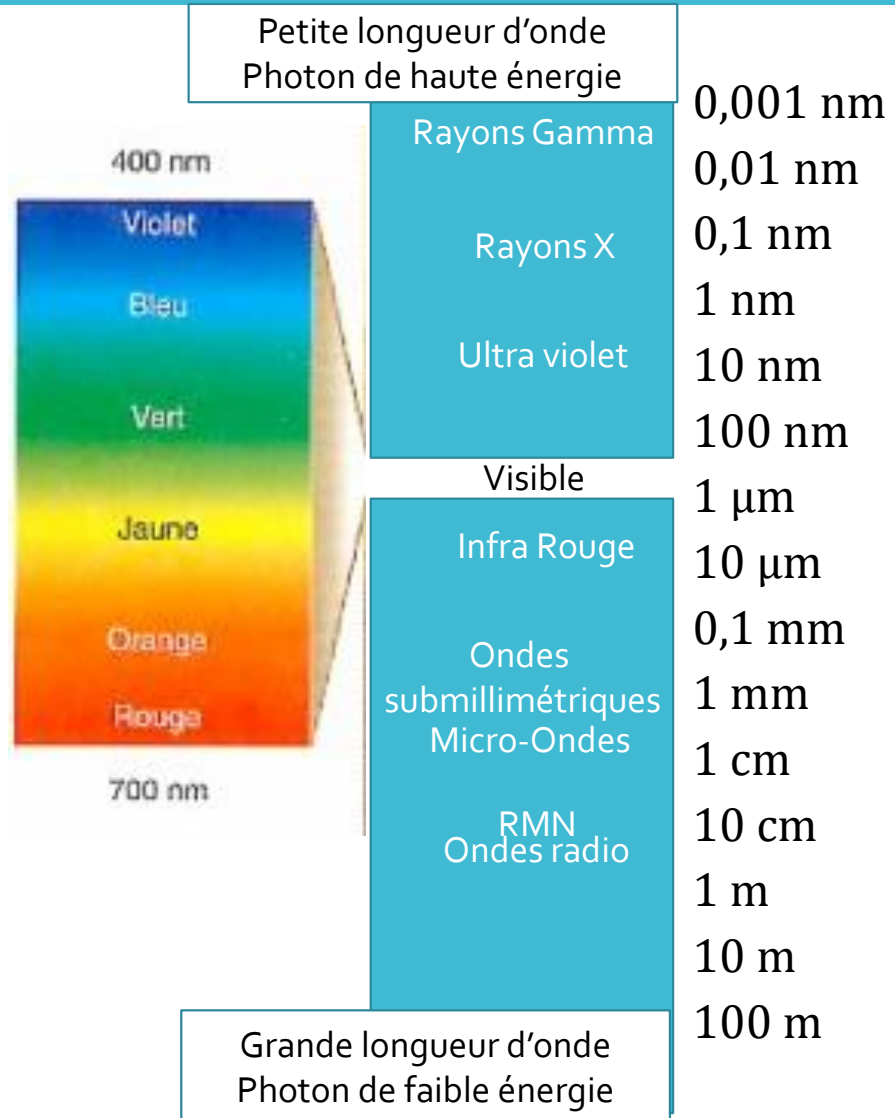
$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

$h$  = constante de Planck =  $6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s

$c$  = vitesse de la lumière =  $3 \cdot 10^8$  m.s<sup>-1</sup>

$\lambda$  = longueur d'onde en m

# Spectre électromagnétique



Le rayonnement est classé dans différents domaines en fonction des longueurs d'onde ou niveau d'énergie

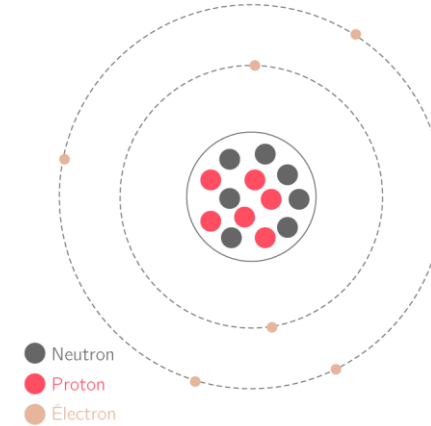
Ex : Ultra violet domaine de longueur d'onde entre 200 et 400 nm.



# A propos de l'énergie à l'échelle atomique

Matière = assemblage de particules élémentaires = non continue

⇒ énergie non continue = valeurs discrètes.



L'énergie totale d'un édifice atomique peut se mettre sous la forme de la somme suivante :

$$E = E_{\text{élec}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{trans}}$$

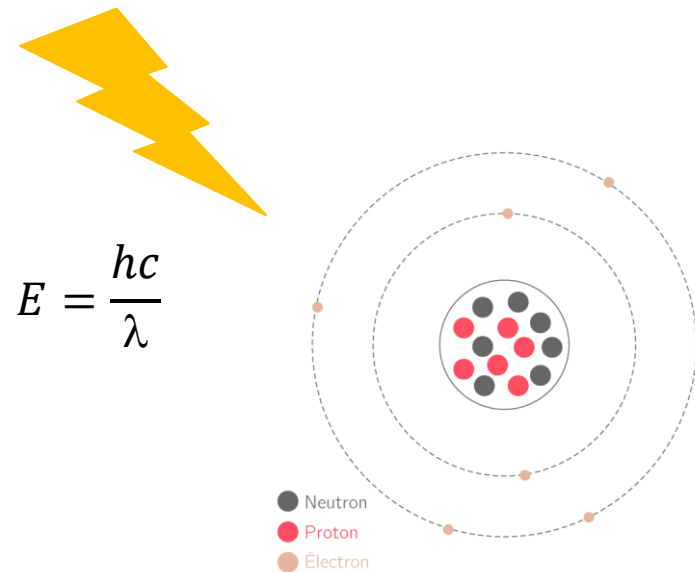
Avec  $E_{\text{élec}}$  représente l'énergie électronique  
 $E_{\text{vib}}$  l'énergie vibrationnelle  
 $E_{\text{rot}}$  l'énergie rotationnelle

Energie quantique = niveaux quantifiés

$$E_{\text{élec}} = 10 E_{\text{vib}} = 100 E_{\text{rot}}$$

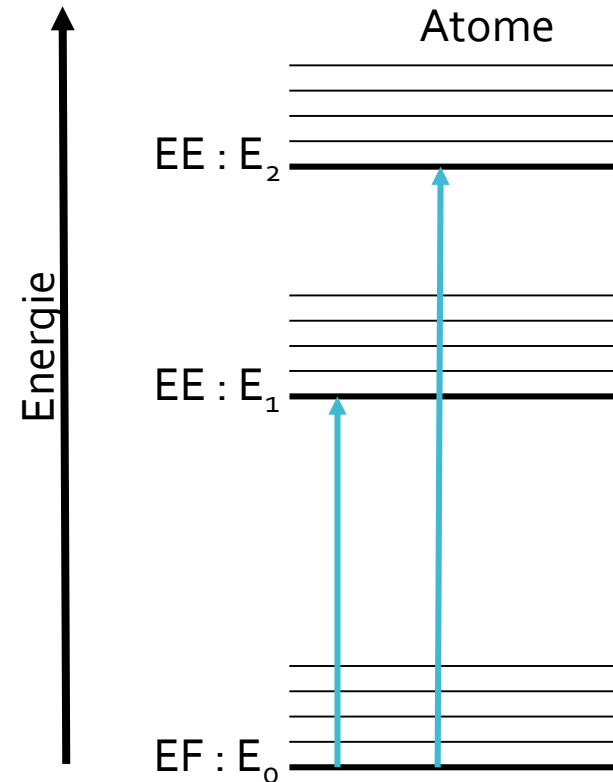
$E_{\text{trans}}$  l'énergie de translation du système

# Effet d'une onde électromagnétique sur l'atome



Réaction de l'atome face à l'apport d'énergie ?

Modification de l'énergie de l'édifice  
⇒ Excitation des électrons : Niveau d'énergie fondamental (EF) à niveau d'état excité (EE)



# Absorption de l'énergie

L'énergie apportée par la radiation  $E = \frac{hc}{\lambda}$  permet de passer d'un  $E_1$  à un niveau  $E_2$

$$E_2 - E_1 = \Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

A une longueur d'onde absorbée correspond une transition énergétique

A un atome ou une molécule ne correspondent que des niveaux d'énergies donnés donc des transitions données donc des longueurs d'onde données  $\Leftrightarrow$  domaine spectral

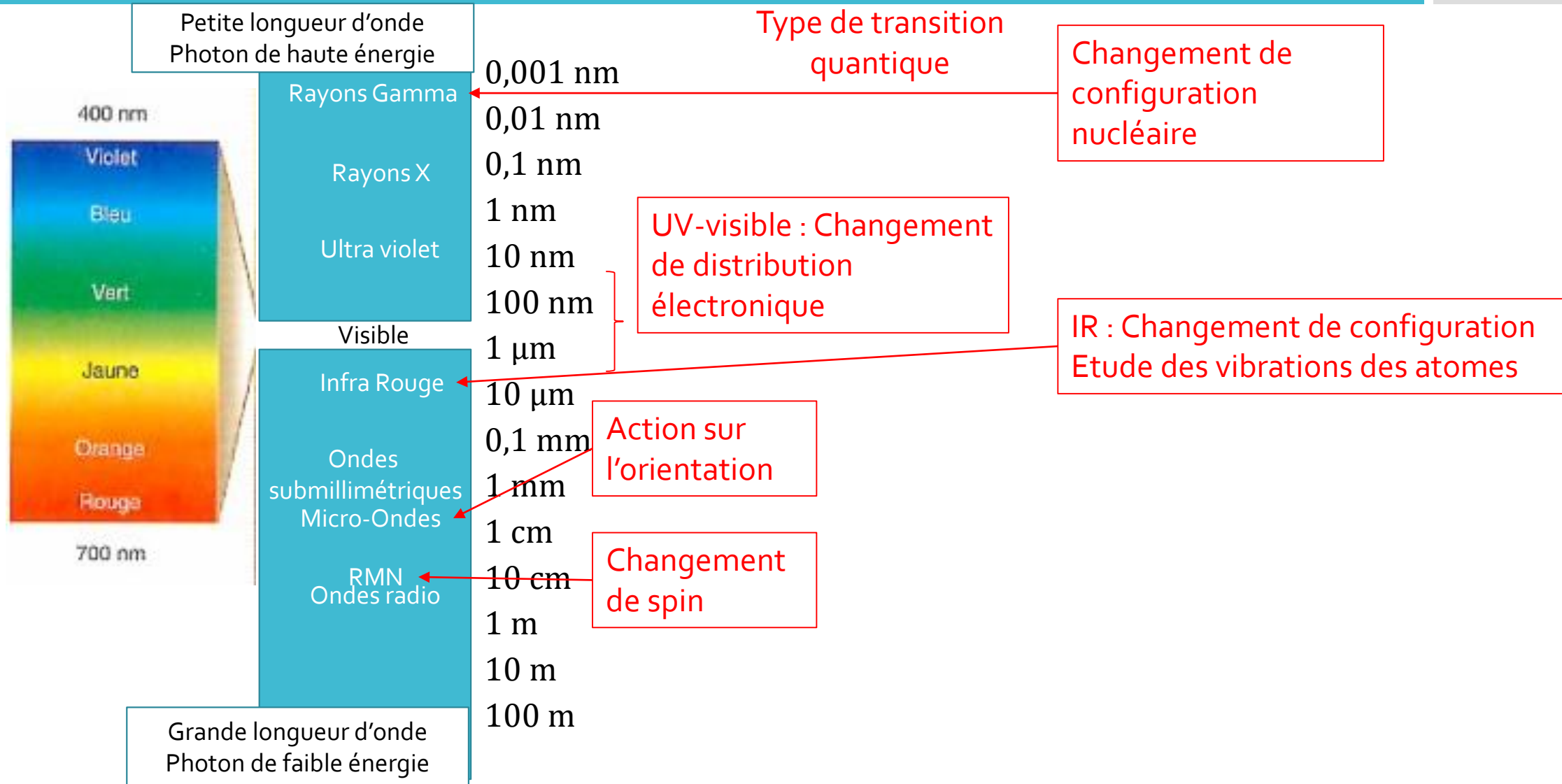
**Définition :** Phénomène au cours duquel une espèce chimique atténue sélectivement la puissance  $P_0$  (l'intensité  $I_0$ ) du rayonnement électromagnétique incident.

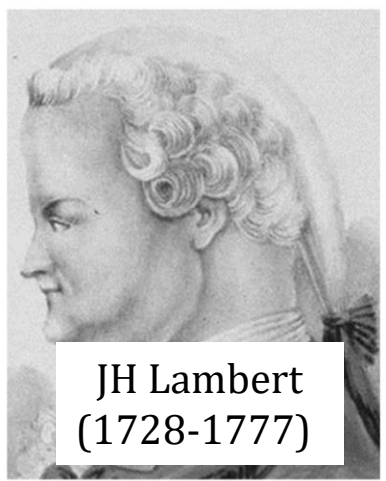
# Spectrophotométrie

La spectrophotométrie optique a pour objet l'analyse des modifications spectrales (longueur d'onde et intensité) de la lumière incidente, le plus souvent monochromatique, après son interaction avec la matière (atomes, molécules à l'état gazeux, liquide ou solide).

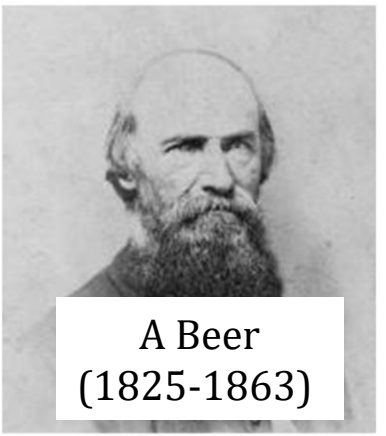
	Transition électronique	Transition vibrationnelle
Ordre de grandeur de $\Delta E$ (en eV)	1 - 10	0,1 - 1
Ordre de grandeur de $\Delta E$ (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	100 - 1000	10 - 100
Longueur d'onde du rayonnement	200 - 800 nm	1 $\mu\text{m}$
Domaine spectral	UV - Visible	Infrarouge

# Spectre électromagnétique et spectrophotométrie





JH Lambert  
(1728-1777)



A Beer  
(1825-1863)

# Spectrophotométrie

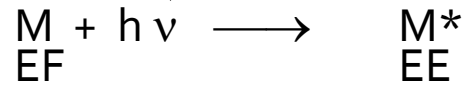
Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

- Introduction
- **Phénomène d'absorption**
- Absorption moléculaire
- Absorption atomique

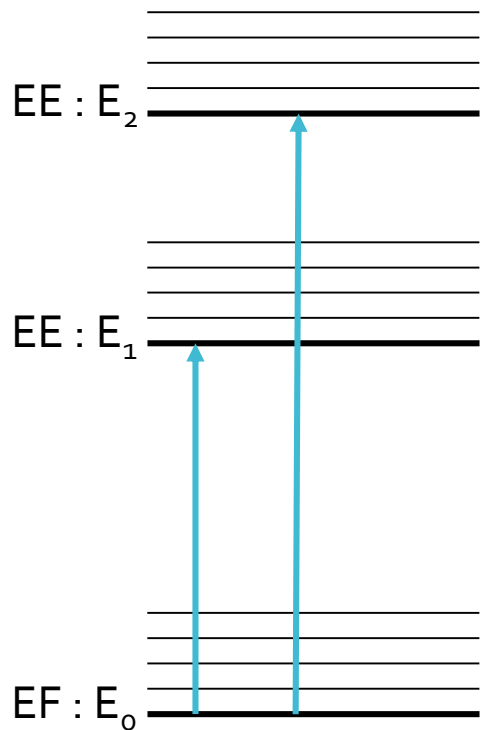


# Absorption : point de vue énergétique

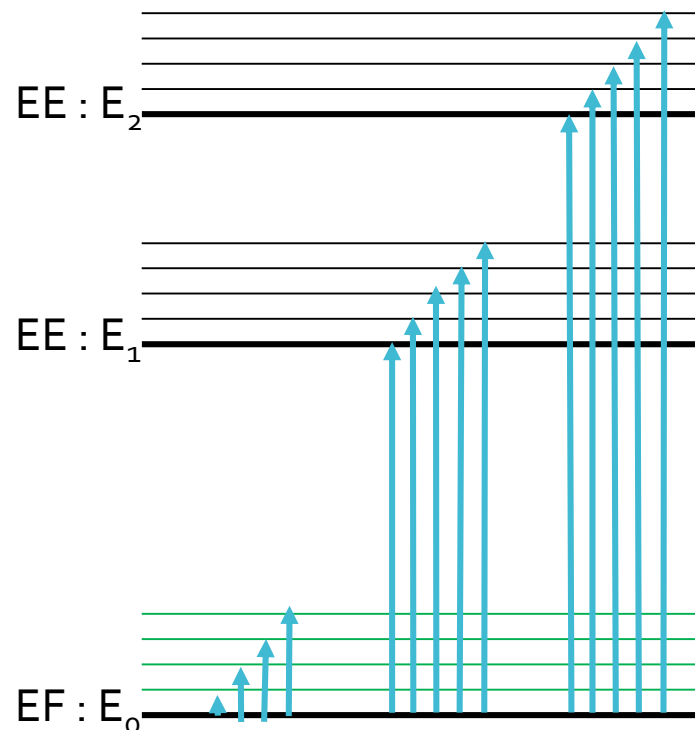
Absorption de l'énergie du photon  
⇒ passage de l'état fondamental EF  
à l'état excité EE



## Atome



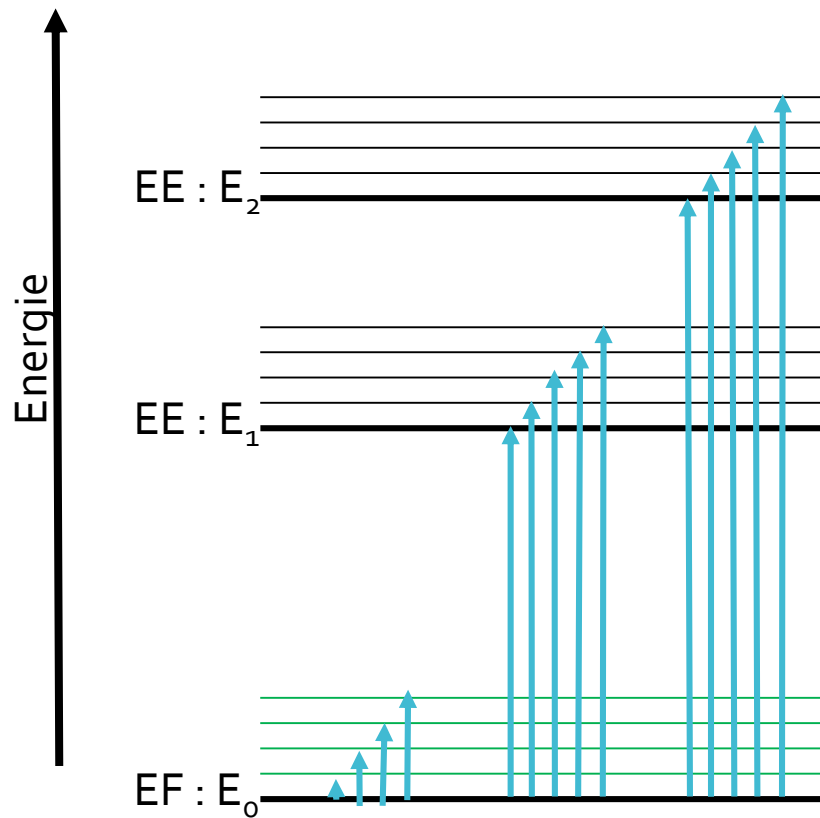
## Molécule



- ✓ Concerne les électrons de valence ou les électrons externes ⇔ niveaux énergétiques occupés de plus haute énergie
- ✓ Seules certaines transitions sont permises ⇔ niveaux discrets d'énergie ⇔ règles de sélection
- ✓ Les échanges de chaleur sont peu intenses : pas de perturbation du milieu, méthode non destructrice

# Absorption : point de vue énergétique

## Molécule

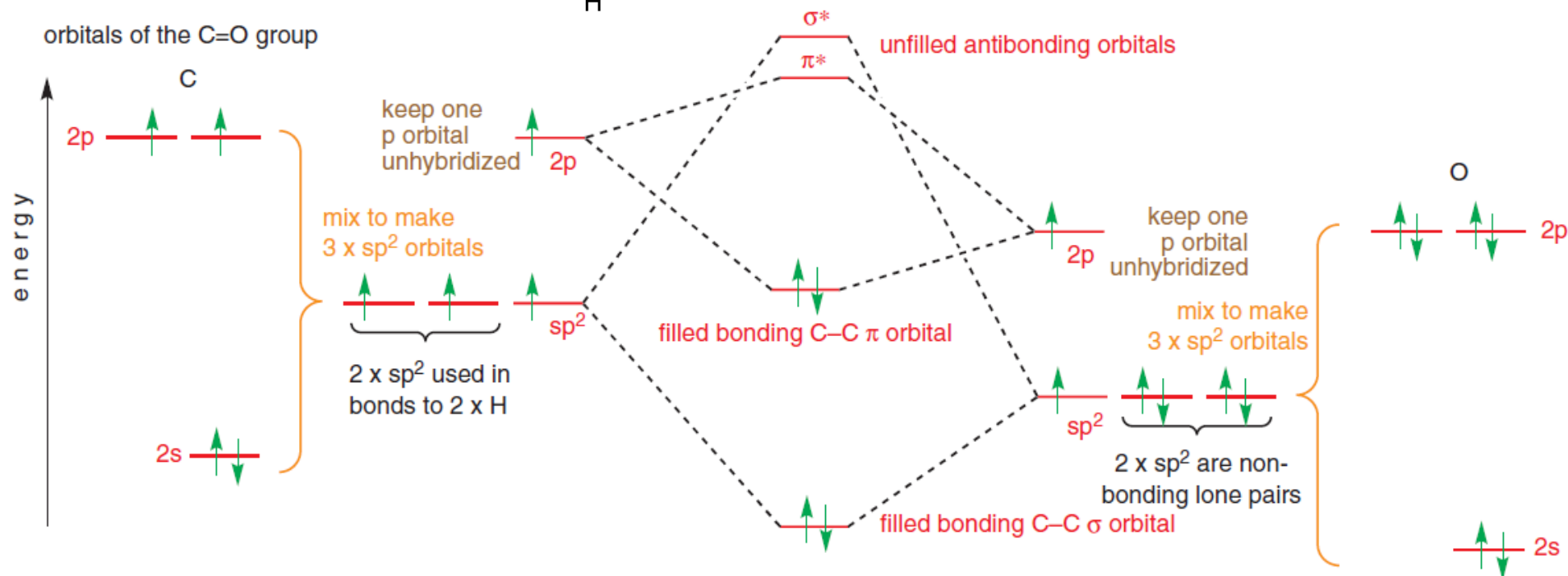
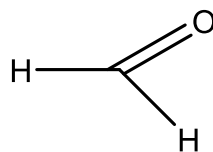


- ✓ Concerne les électrons de valence ou les électrons externes
- ✓ Seules certaines transitions sont permises ⇔ niveaux discrets d'énergie
- ✓ Seules certaines transitions sont permises ⇔ diagramme orbitalaire

# Diagramme orbitalaire HCHO

Cas de la fonction CO

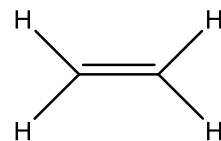
Exemple : **formaldéhyde HCHO**



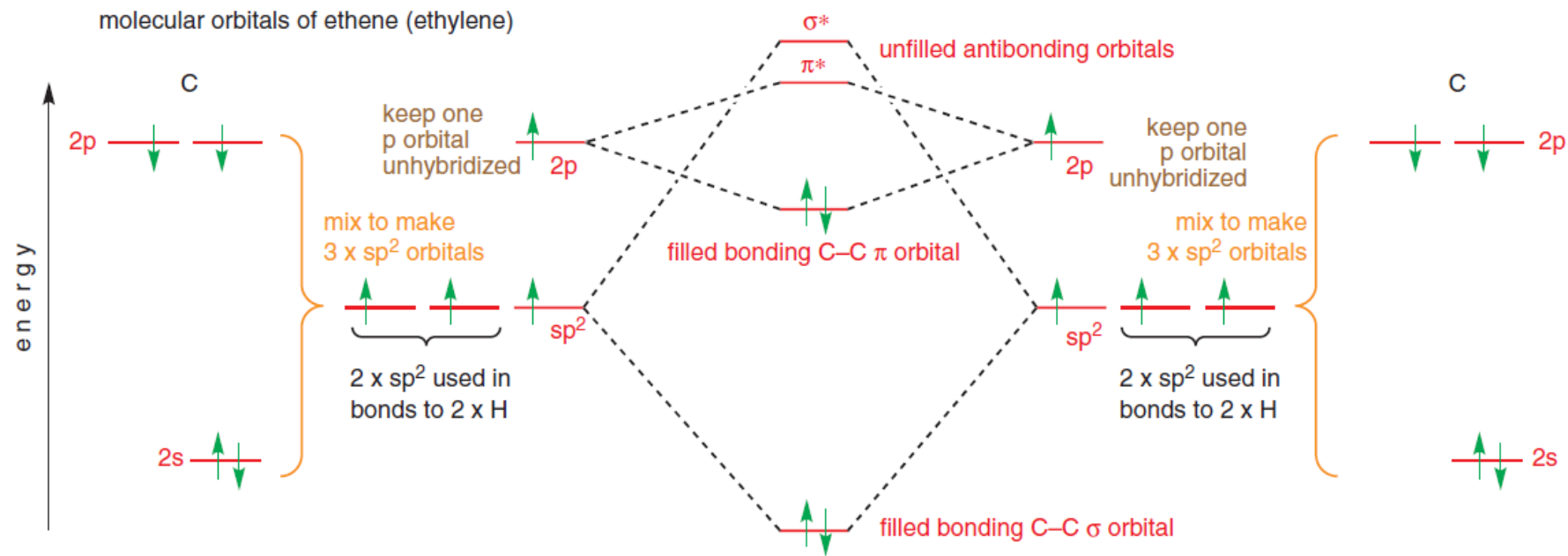
# Chapitre 1 : Carbone et hybridation

Cas des orbitales (2)s et 2p

Exemple 4 : **éthylène** C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>



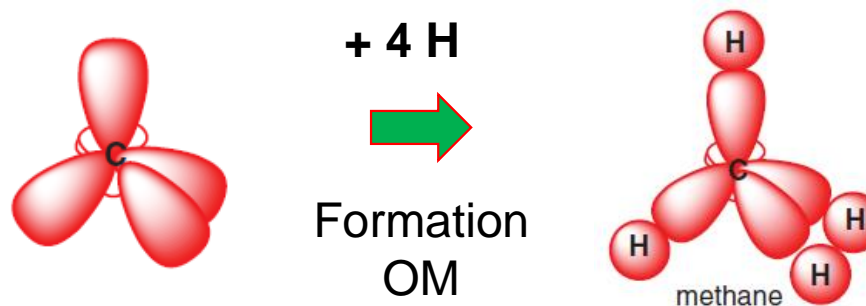
$$1s + 2p = sp^2$$



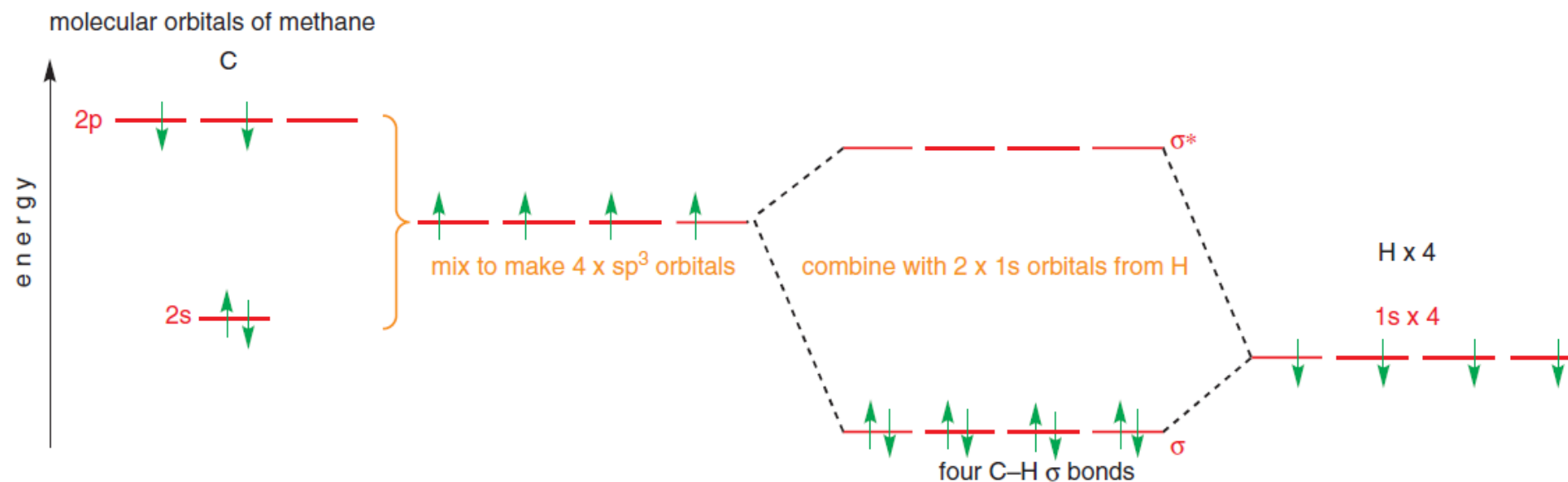
# Diagramme orbitalaire CH<sub>4</sub>

Cas des orbitales (2)s et 2p

Exemple 2 : CH<sub>4</sub>



Hybridation  $sp^3$   
=> tétraèdre  
pyramidal,  
angle  $109,5^\circ$

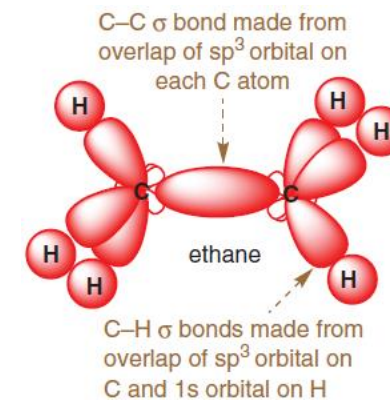


# Diagramme orbitalaire $C_2H_6$

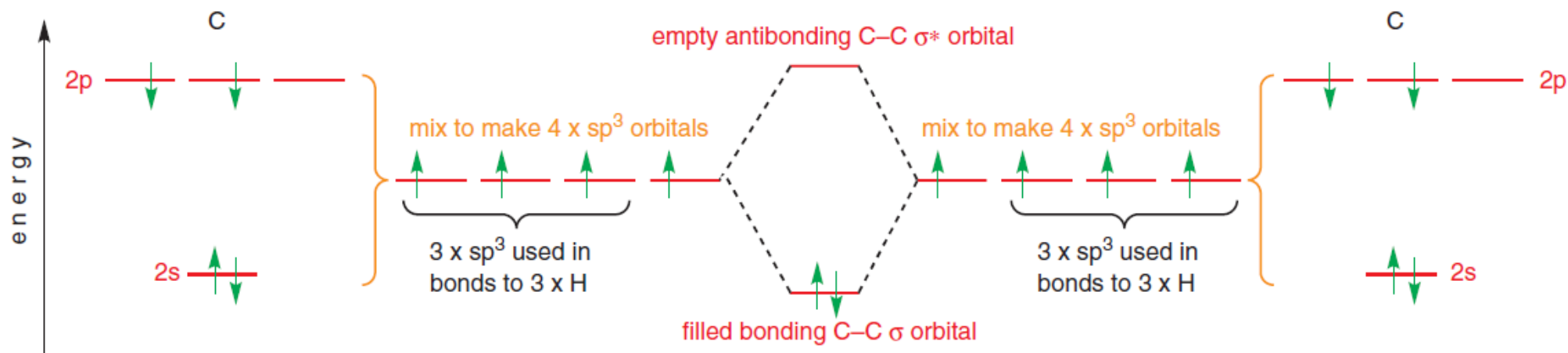
Cas des orbitales (2)s et 2p

Exemple 3 : **éthane**  $C_2H_6$

➔ Hybridation  $sp^3$  (tétraèdre)



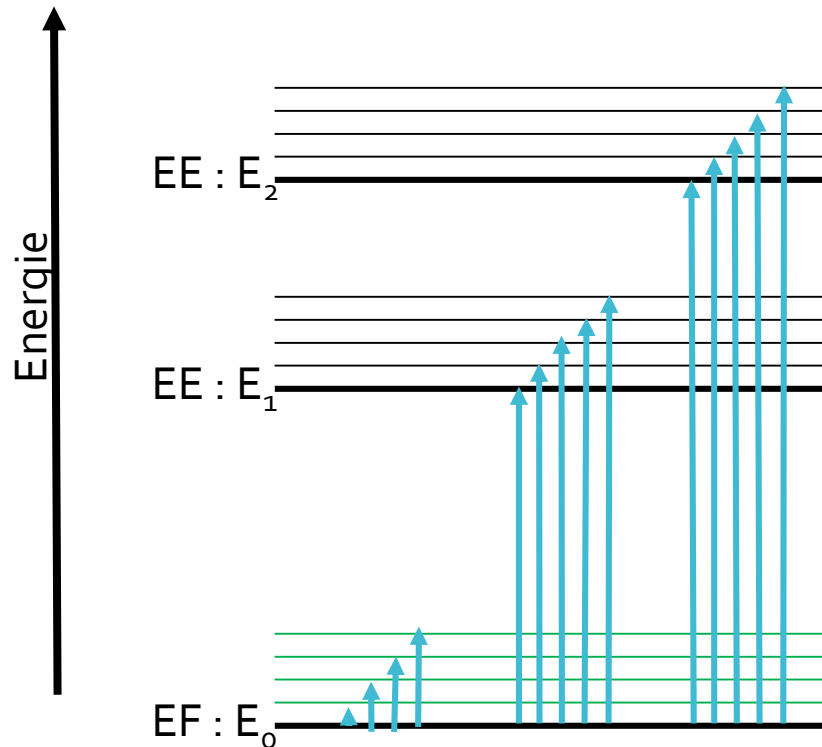
molecular orbitals of ethane (just C–C bond shown)





# Absorption : point de vue énergétique

## Molécule



- ✓ Concerne les électrons de valence ou les électrons externes
- ✓ Seules certaines transitions sont permises :  
Transitions de la HO vers BV:
  - $\sigma \longrightarrow \sigma^*$  : pour molécules n'ayant que ces OM
  - $n \longrightarrow \sigma^*$  :
    - molécule saturée avec paire d'électrons non liantes (N, O) : alcools, amines, halogénés
    - $150 \leq \lambda \leq 250$  nm
  - $n \longrightarrow \pi^*$  :
    - Molécules insaturées avec paires libres (aldéhydes, cétones, esters, acides)
    - $200 \leq \lambda \leq 300$  nm
  - $\pi \longrightarrow \pi^*$  :
    - Molécules insaturées sans paires libres (alcènes, aromatiques, alcynes)
    - $180 \leq \lambda \leq 700$  nm

# Quelques Chromophores

Chromophore : groupement fonctionnel sur une molécule permettant l'absorption

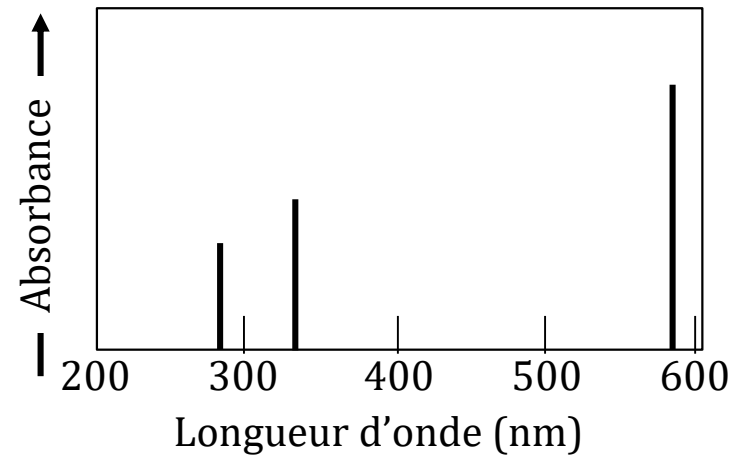
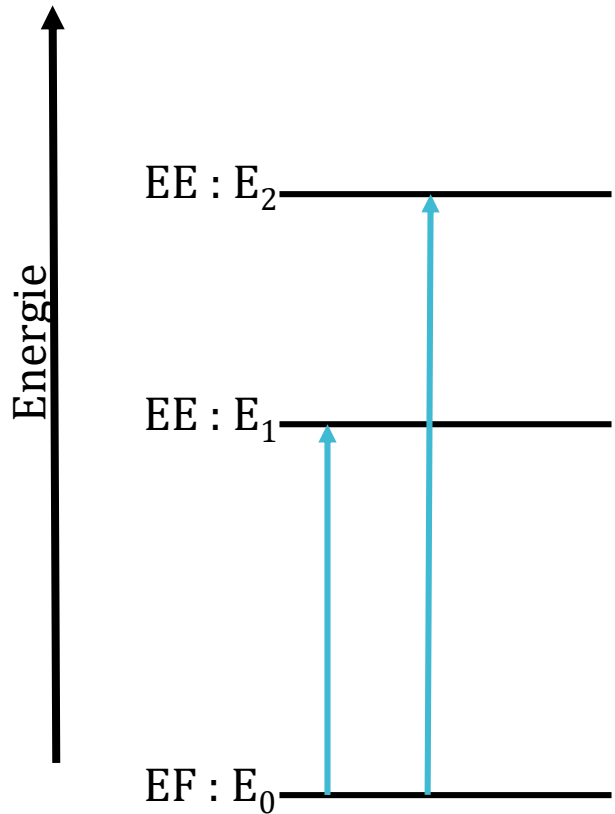
Molécules conjuguées, aromatiques, comprenant des hétéroatomes

Chromophore	Exemple	Solvant	transition	$\lambda_{\max}$ (nm)
Alcène	$C_6H_{13}CH=CH_2$	n-heptane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	177
Alcène conjugué	$CH_2=CHCH=CH_2$	n-heptane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	217
Carbonyle	$CH_3(C=O)CH_3$	n-hexane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	186
			$n \longrightarrow \pi^*$	280
	$CH_3CH=O$	n-hexane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	180
			$n \longrightarrow \pi^*$	293
Carboxyle	$CH_3CO_2H$	Éthanol	$n \longrightarrow \pi^*$	204
Nitro	$CH_3NO_2$	Iso-octane	$n \longrightarrow \pi^*$	214

# Absorption : point de vue spectral

## Atome

Des transitions permises sur un seul niveau d'énergie  $\Rightarrow$  spectre de raies



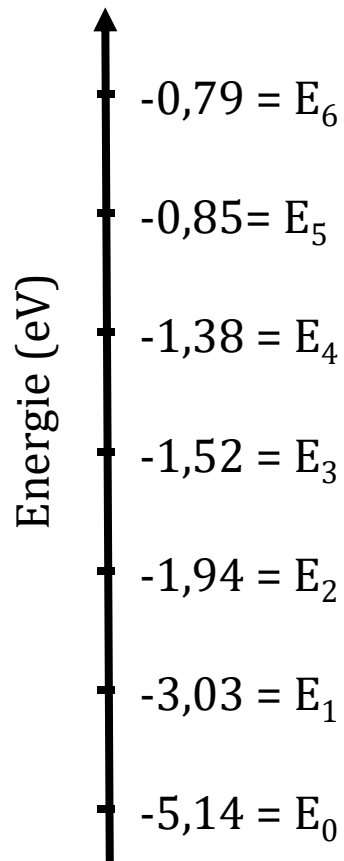
Cas du sodium : 1 seul électron périphérique  
Niveau externe  $\Leftrightarrow$  HO : 3s  
Transition :

3s 3p : 590 nm  
3s 4p : 330 nm  
3s 5p : 285 nm

Absorption atomique

## Exercice 1

Niveaux énergétiques du sodium



Cas du sodium : 1 seul électron périphérique

Transition :

$$3s \quad 3p : 590 \text{ nm}$$

$$3s \quad 4p : 330 \text{ nm}$$

$$3s \quad 5p : 285 \text{ nm}$$

Sachant que les électrons externes sont sur le niveau  $E_0$  et que les longueurs d'onde absorbées observées sont 590 nm, 330 nm et 285 nm. Indiquer par des flèches les transitions électroniques correspondantes.

Données :

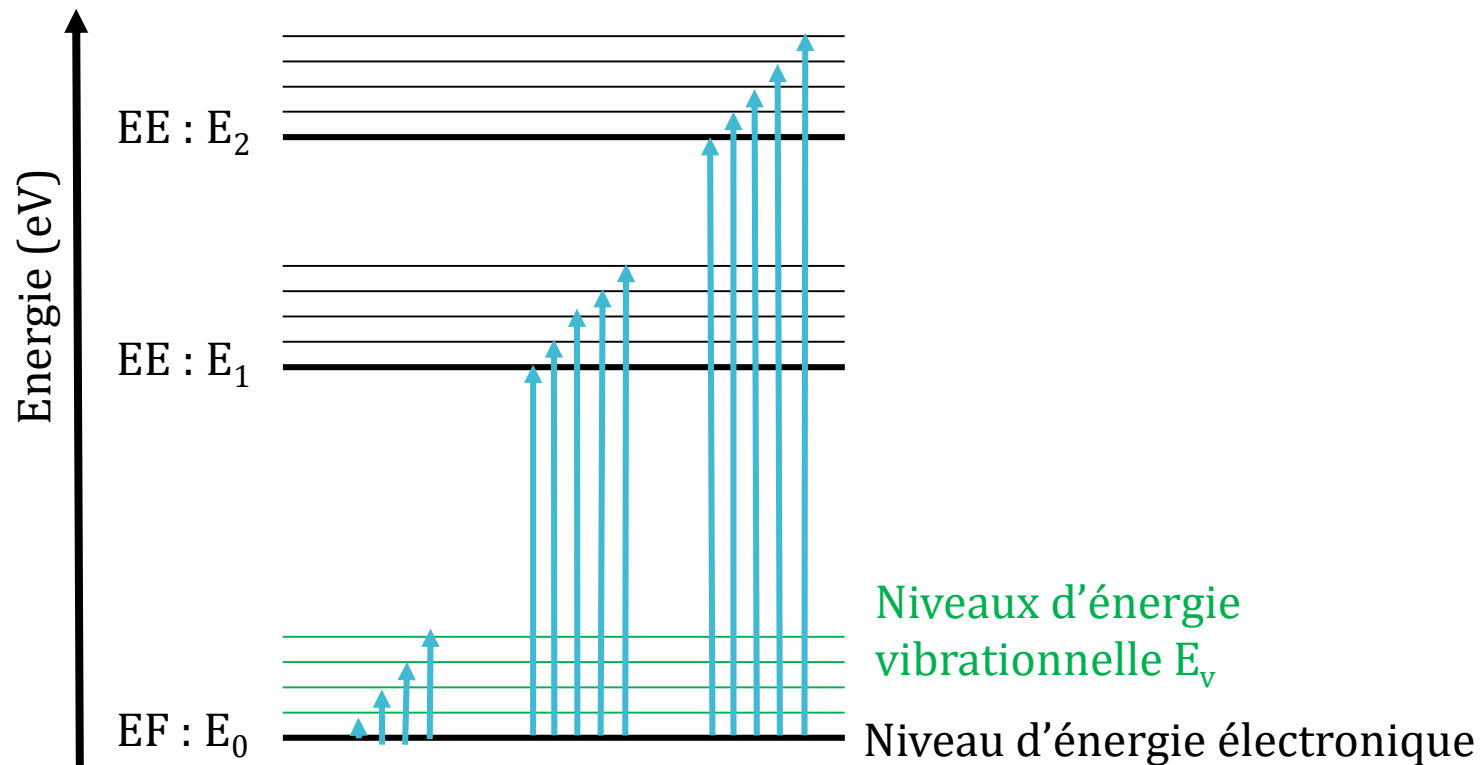
$$h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

$$c = 3,00 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

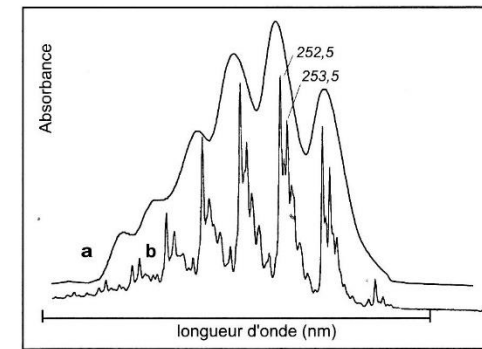
$$1\text{eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

# Absorption : point de vue spectral

## Molécule



## Absorption moléculaire



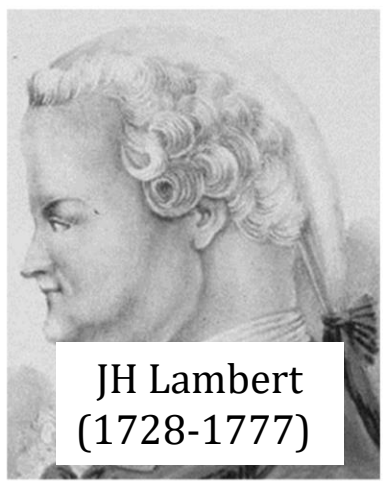
a : benzène en solution

b : benzène état gazeux

Plusieurs niveaux d'énergie accessibles  $\Rightarrow$  **spectre de bande**

Etat gazeux : bandes fines

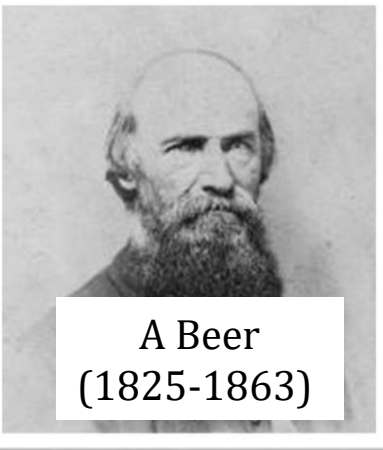
Etats solide et liquide : bandes larges



# Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

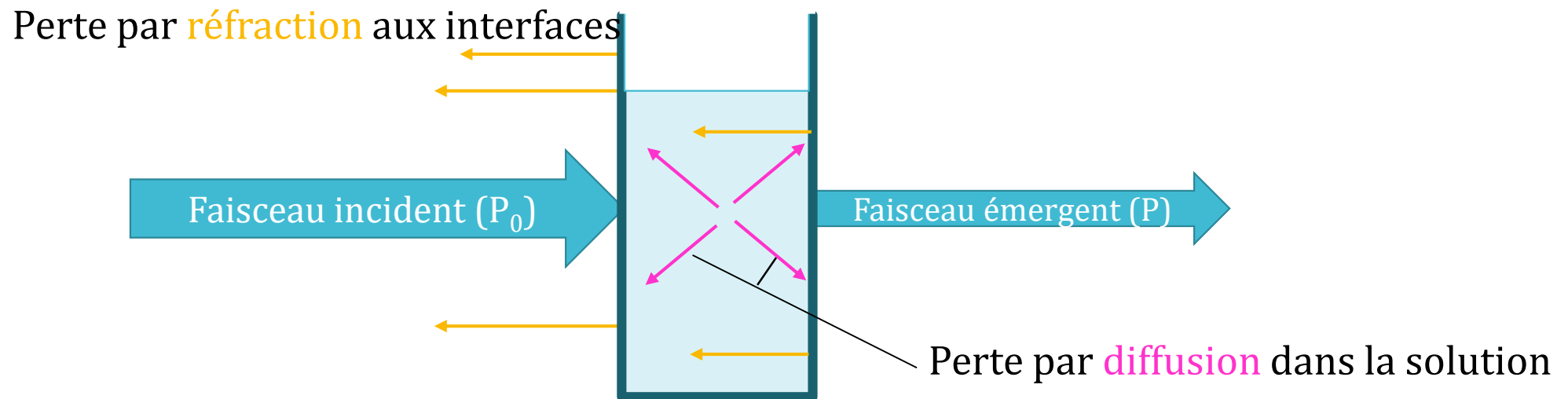
- Introduction
- Phénomène d'absorption
- **Absorption moléculaire**
- Absorption atomique





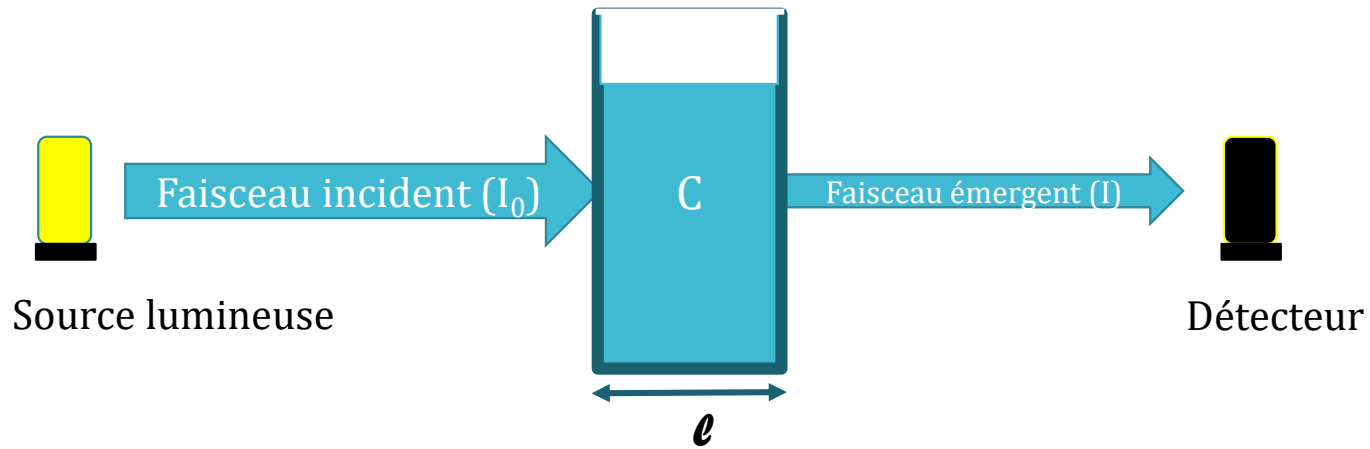
# Absorption moléculaire : Mesure

**Définition :** Phénomène au cours duquel une espèce chimique atténue sélectivement la puissance  $P_0$  (l'intensité  $I_0$ ) du rayonnement électromagnétique incident. La puissance du faisceau incident est donc plus forte que celle du faisceau émergent  $P$  (intensité émergente  $I$ ). Elle mesure donc la capacité de la substance à absorber la lumière qui la traverse.



$P < P_0$  : - effets mineurs : réflexion et diffusion  
- effet majeur : absorption de l'énergie par le soluté présent en solution

# Absorption moléculaire: Mesure



$I_0$  : intensité du faisceau incident  
 $I$  : intensité du faisceau émergent  
 $l$  : largeur de la cuve  
= longueur du trajet optique, en cm  
 $C$  : concentration molaire du soluté

**T** : transmittance :

- fraction du rayonnement incident qui est transmis par le milieu suite aux interactions entre photons et particules absorbantes.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad T\% = \frac{I}{I_0} \times 100$$

- Plus l'atténuation du signal est forte plus la transmittance est faible.
- Comprise entre 0 et 1 ou 0 et 100%.
- Sans unité

**A** : Absorbance

- définie comme  $-\log T$ .
- Plus l'atténuation du signal est forte plus l'absorbance est forte.

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}$$

# Absorption moléculaire : Aspect quantitatif

## ⇒ Loi de Beer-Lambert

A une longueur d'onde  $\lambda$  donnée,  $A^\lambda = \varepsilon^\lambda \ell C$

$\varepsilon^\lambda$ : coefficient d'extinction molaire (L/cm/mol)

C : Concentration soluté (mol/L)

$\ell$  : trajet optique (cm)

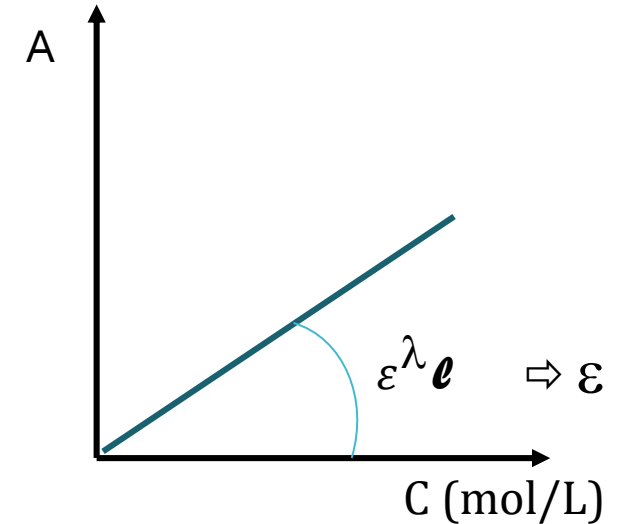
$A^\lambda$  n'a pas d'unité

### $\varepsilon$ : coefficient d'extinction molaire

- Ou absorptivité molaire
- défini à une longueur d'onde donnée, pour un solvant donné et à une T° donnée
- Unité : L.cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>
- Cas particulier : coefficient d'extinction spécifique qd concentration exprimée en g/L.

### $A^{1\%}$ : absorbance spécifique

absorbance de la solution à 1g pour 100 mL ou 10 g/L qd le trajet optique est de 1 cm



### Remarques :

1- pour simplifier l'écriture, on omet  $\lambda \Leftrightarrow A = \varepsilon \ell C$

2- le plus souvent,  $\ell = 1$  cm  $\Rightarrow$  la pente du diagramme  $A=f(C)$  correspond à  $\varepsilon$

**Exercice 2 :** Une solution contenant le complexe formé par la thiourée et le  $\text{Bi}^{\text{III}}$  a un coefficient d'absorption molaire de  $9\,320 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  à  $470 \text{ nm}$

- 1- Quelle est l'absorbance d'une solution à  $6,24\cdot 10^{-5} \text{ M}$  du complexe à  $470 \text{ nm}$  dans une cellule de  $1 \text{ cm}$ ?
- 2- Quelle est la transmittance de la solution?
- 3- Quelle est la concentration du complexe dont la transmittance est le double de celle trouvée en (2)?
- 4- Quelle est la concentration du complexe dans une solution qui a l'absorbance trouvée en (1) dans une cellule de  $5 \text{ cm}$ ?

# Retour sur les chromophores

Chromophore : groupement fonctionnel d'une molécule permettant l'absorption

Molécules conjuguées, aromatiques, comprenant des hétéroatomes

Chromophore	Exemple	Solvant	transition	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon^{\lambda_{\max}}$ (L.cm <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )
Alcène	<chem>C6H13CH=CH2</chem>	n-heptane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	177	13 000
Alcène conjugué	<chem>CH2=CHCH=CH2</chem>	n-heptane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	217	21 000
Carbonyle	<chem>CH3(C=O)CH3</chem>	n-hexane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	186	1000
			$n \longrightarrow \pi^*$	280	16
	<chem>CH3CH=O</chem>	n-hexane	$\pi \longrightarrow \pi^*$	180	> 15 000
			$n \longrightarrow \pi^*$	293	12
Carboxyle	<chem>CH3CO2H</chem>	Éthanol	$n \longrightarrow \pi^*$	204	41
Nitro	<chem>CH3NO2</chem>	Iso-octane	$n \longrightarrow \pi^*$	214	60

$\lambda_{\max}$  et  $\epsilon^{\lambda_{\max}}$  sont des caractéristiques d'une molécule donnée

Les transitions  $\pi \longrightarrow \pi^*$  donne des absorptions plus intenses

Les transitions  $n \longrightarrow \pi^*$  sont permises mais donnent des absorptions peu intenses, très peu visibles sur les spectres

# Entrainement

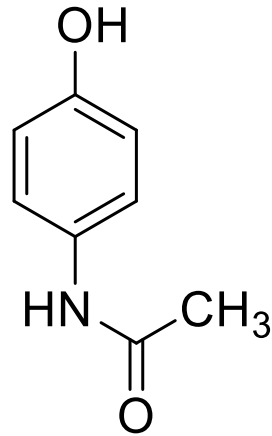
## Exercice 3 : Identifier les molécules présentant un spectre d'absorption dans l'UV-visible

$\text{CH}_3\text{COOH}$   
Acide acétique

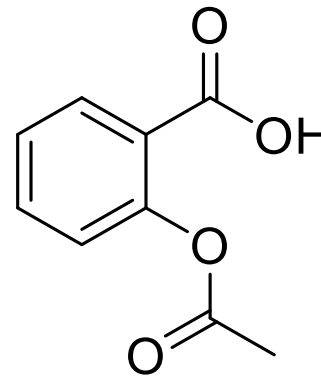
$\text{CO}_3^{2-}$   
Ion carbonate

$\text{H}_2\text{PO}_4^-$   
Ion dihydrogénophosphate

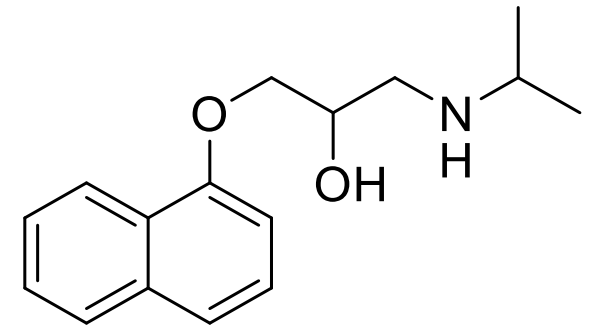
$\text{NH}_4\text{OH}$   
Ammoniaque



Paracétamol

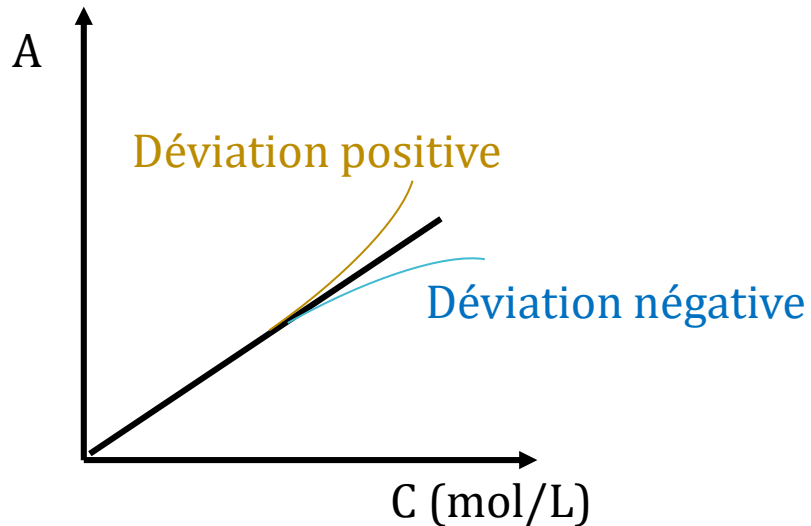


Acétyl  
salicylique  
(Aspirine)



Propranolol  
(bétabloquant)

# Loi de Beer-Lambert : limites d'application



## Erreurs chimiques :

- Instabilité de la solution due
  - au pH : (pp acido basique du soluté ou réactivité du soluté aux acides/bases)
  - à la température
- En cas de complexation nécessaire : excès de complexant nécessaire pour que l'équilibre soit complètement déplacé ⇔ éviter les interférences.
- Effet solvant : spectre diffère dû
  - aux interactions intermoléculaires possibles
  - aux pp acidobasiques éventuelles du soluté dans l'eau  
Ex : acide acétique
  - absorption du solvant (cut-off)

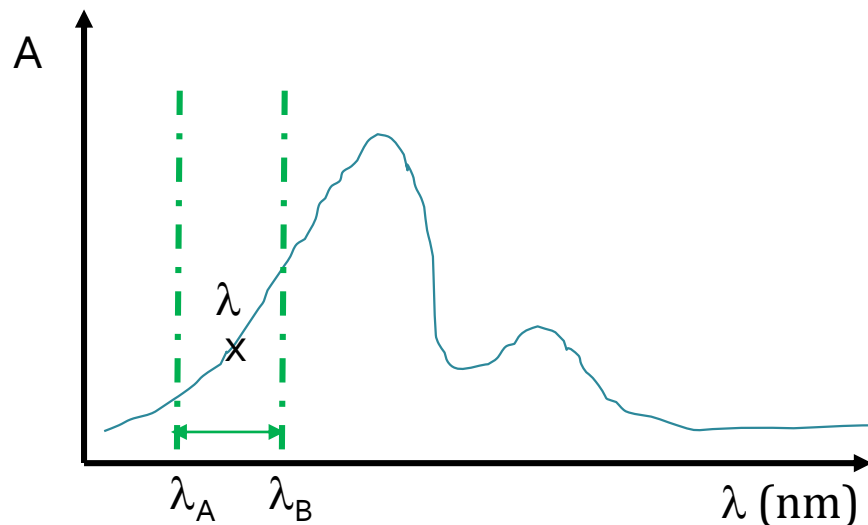
Solvant	Acétone	Toluène	Acétate d'éthyle	CH <sub>3</sub> Cl	Glycérol	EtOH	MeOH	Hexane
λ Cut off (nm)	330	290	260	250	230	220	210	200

# Loi de Beer-Lambert : limites d'application

## Erreurs instrumentales :

- Usure de l'appareillage (cellule photoélectrique, lampe)
- Rayonnement parasite
- Mauvais entretien  $\Leftrightarrow$  Étalonnage des longueurs d'onde et de l'absorption
- Absorption de cuve en verre dans le domaine des UV
- Bande passante trop large

$$A = \log \frac{I_0 + S}{I + S} \quad \text{où } S : \text{ intensité du rayonnement parasite}$$



Bande passante

Transmittance mesurée en  $\lambda =$  moyenne des transmittances mesurées entre  $\lambda_A$  et  $\lambda_B \Rightarrow$  Absorbance calculée à partir de T

Absorbance calculée < Absorbance réelle  $\Rightarrow \Delta A$

$\Delta A$  est d'autant plus gd que solution est concentrée et que la pente du spectre est forte.



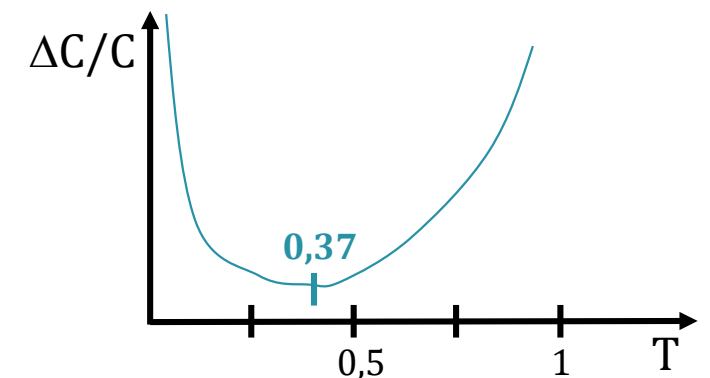
# Loi de Beer-Lambert : limites d'application

## Conditions d'application :

- Lumière monochromatique (Absorbance pour une longueur d'onde donnée)
- Bande passante la plus faible
- Solutions suffisamment diluées. Sauf exception  $C \leq 10^{-2}$  mol/L. (ex : bleu de méthylène ou éosine –  $C \leq 10^{-5}$  mol/L)
- Etre au maximum d'absorption
- Soluté stable en solution et sous l'effet de l'irradiation
- Solution limpide (évite la diffusion)
- Utilisation de cuves transparentes aux UV

## Remarques:

- Erreur minimale sur C si transmission optimale  $\Leftrightarrow T = 0,368 \Leftrightarrow A = 0,434$
- T mesurable =  $10^{-3} \Leftrightarrow A_{\max} = 3$



# Loi de Beer-Lambert : Loi d'additivité

Qd plusieurs espèces absorbent, l'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée est la somme des absorbances de chacune des espèces.

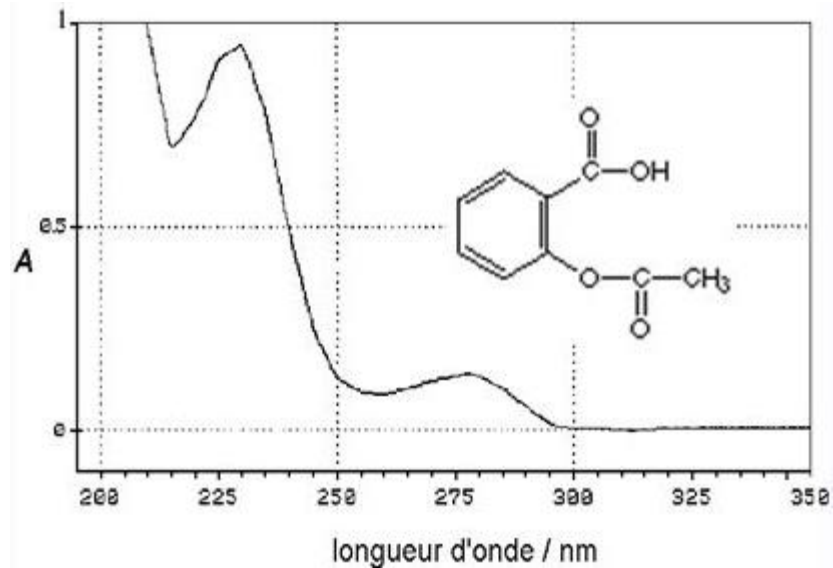
$$A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda$$

Si chacune des espèces suit la loi de Beer-Lambert alors :

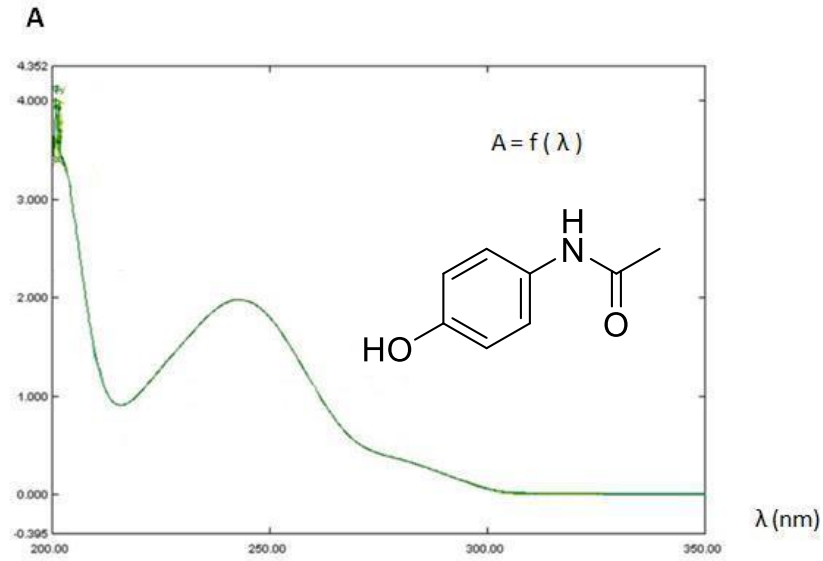
$$A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda = \sum_i (\varepsilon_i^\lambda \cdot C_i)$$

# Espèces moléculaires absorbantes

**Espèces organiques** : excitation des électrons qui participent à la formation des liaisons.  
Les groupements fonctionnels organiques responsables de l'absorbance sont appelés : **chromophores**.



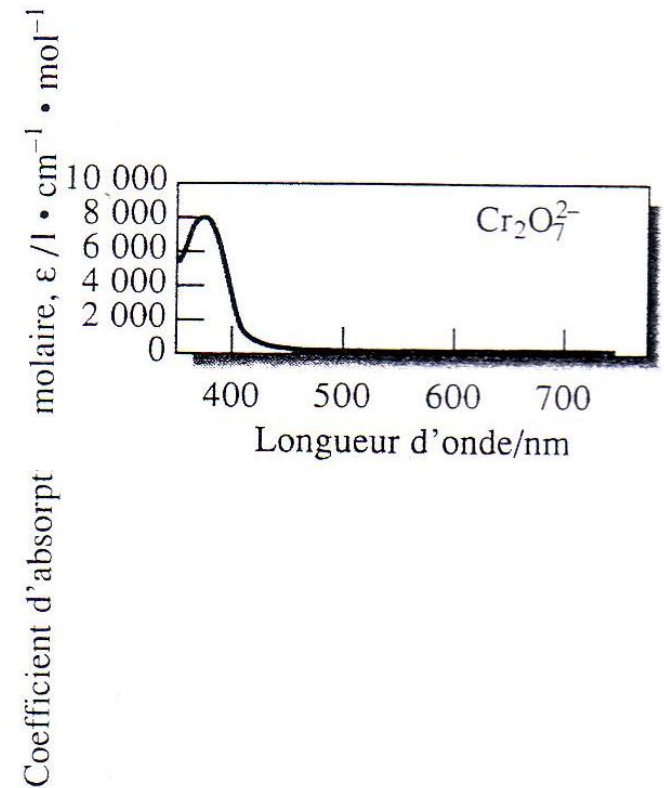
Acide acétylsalicylique



Paracétamol

# Espèces moléculaires absorbantes

**Espèces inorganiques** : pour les ions complexes ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{MnO}_4^-$ ) des 2 premières séries de transitions, excitations des  $e^-$  de la couche d. L'absorption se fait plutôt dans le domaine du visible.

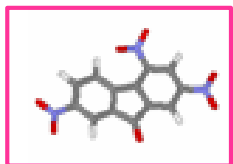
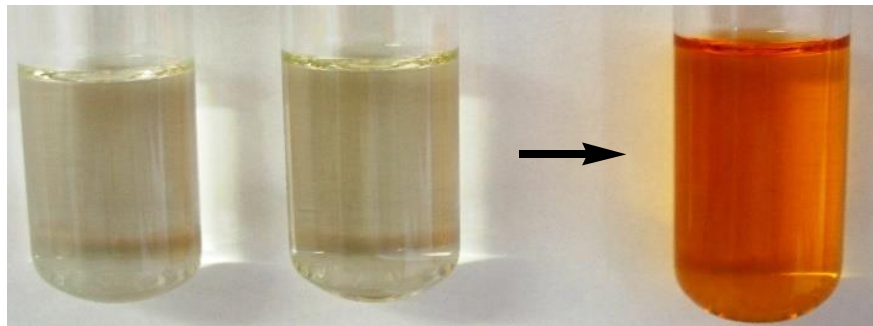


# Espèces moléculaires absorbantes

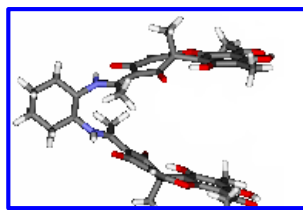
**Complexe à transfert de charge** : entre un groupement donneur d' $e^-$  lié à un groupement accepteur d' $e^-$ . L'électron passe du donneur à une orbitale associée à l'accepteur ( $\approx$  transition électronique intermoléculaire), ce qui diffère de la transition électronique intramoléculaire.

Ex : cas du complexe  $Fe^{2+}$  - ortho-phénantroline

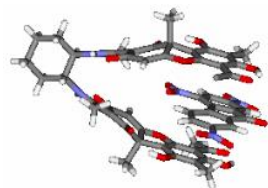
Phénomène de  $\pi$ - $\pi$  stacking



1

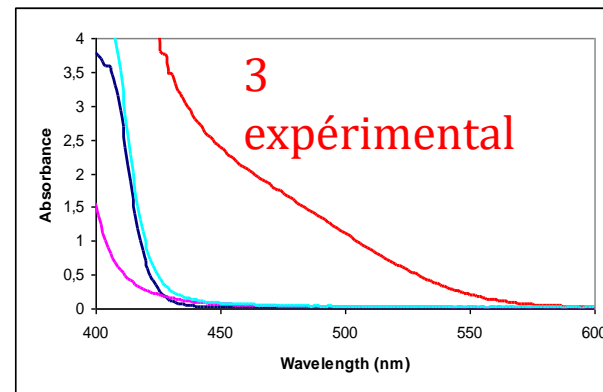


2

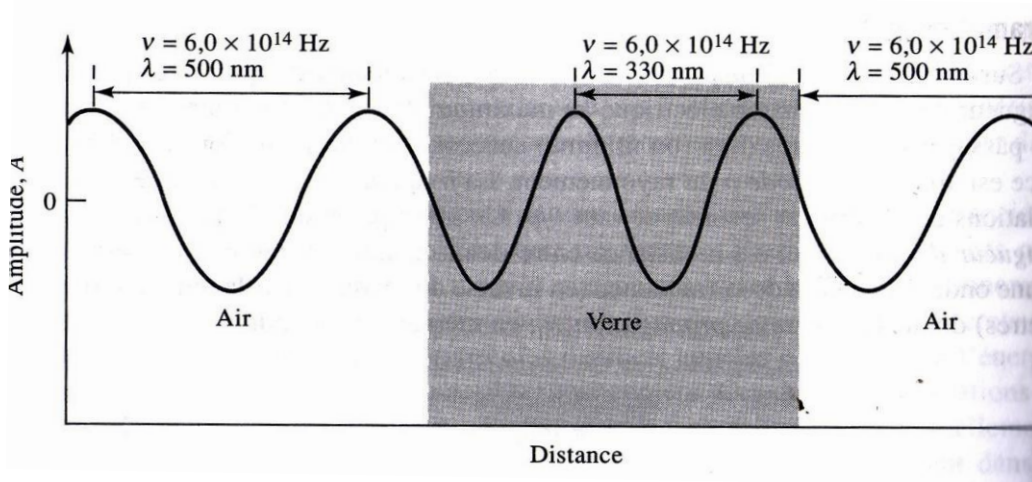


3

3 calcul



$\lambda$  est fonction du milieu et de l'indice de réfraction, une même molécule peut donc avoir des spectres différents en fonction du solvant et de sa polarité (interactions solvant – soluté).



Transition  $n \longrightarrow \pi^*$  :  $\lambda \searrow$  qd polarité  $\nearrow$

Transition  $\pi \longrightarrow \pi^*$  :  $\lambda \nearrow$  qd polarité  $\nearrow$

Le pH du milieu peut entraîner l'ionisation d'un groupement. Spectre diffère si les 2 formes n'absorbent pas de la même façon.

**Point isobestique**  $\Leftrightarrow$  Seules 2 espèces sont en solution et ont le même  $\epsilon$ .

Ici  $A^-$  et  $AH$

Loi d'additivité :

$$A = A_{AH} + A_{A^-}$$

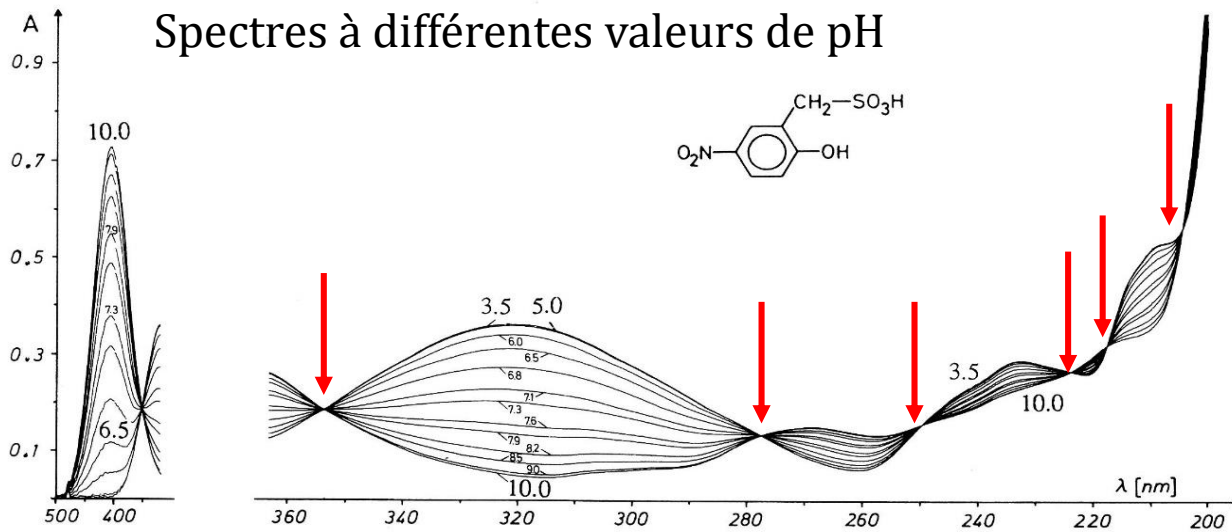
$$A = \epsilon_{AH} \cdot l[AH] + \epsilon_{A^-} \cdot l[A^-]$$

Si  $\epsilon_{AH} = \epsilon_{A^-} = \epsilon$

$$A = \epsilon \cdot l[AH] + \epsilon \cdot l[A^-] = \epsilon \cdot l([AH] + [A^-])$$

En fonction du pH, les proportions de  $A^-$  et  $AH$  varient mais  $[A^-] + [AH] = C = Cte$

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C = cte$$



H.Lachmann, Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 148-149 (1980)


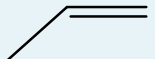

RMQ : substance étalon pour étalonnage  $\lambda$

# Influence de la substitution sur les chromophores

**Auxochrome** : groupement qui n'absorbe pas seul mais qui modifie l'absorption du chromophore auquel il est lié en longueur d'onde et intensité. Ex. : OH, NH<sub>2</sub>, Cl... A différencier des chromophores (groupements insaturés covalents responsables de l'absorption – (C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N, C=S, N=N ...)).

**Substitution des chromophores par groupements donneurs ou accepteurs** : effet sur la longueur d'onde et l'intensité d'absorption


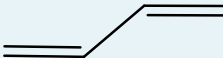
Ex sur transition  $\pi \longrightarrow \pi^*$

Composé	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ (L.cm <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )	Formule
Ethylène	165	15000	
Propène	170	20000	
But-2-ène	174	24000	



**Conjugaison** : l'enchaînement d'insaturations a un effet sur la longueur d'onde : plus le nb est gd plus les niveaux d'énergie sont proches  $\Rightarrow \Delta E \Rightarrow$  faible  $\lambda \nearrow$

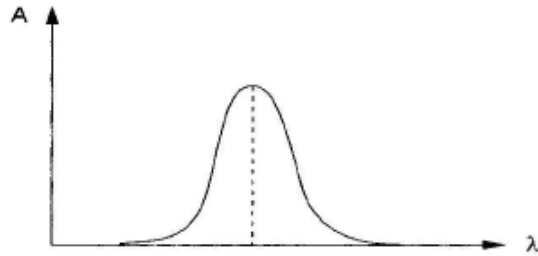
Ex sur transition  $\pi \longrightarrow \pi^*$

Composé	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ (L.cm <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )	Formule
Ethylène	165	15000	
Butadiène	217	20900	

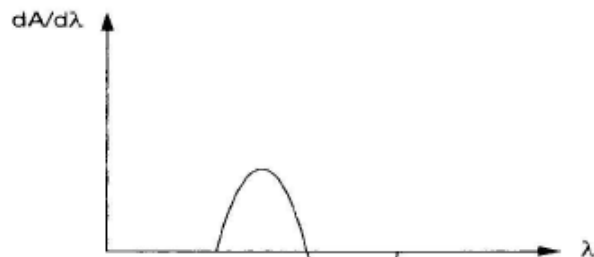
Les différents effets observés sont :

- **effet bathochrome** = glissement vers les plus grandes longueurs d'onde  $\Leftrightarrow$  vers le domaine visible
- **effet hypsochrome** = glissement vers les plus faibles longueurs d'onde  $\Leftrightarrow$  vers le domaine UV
- **effet hyperchrome** = augmentation de l'intensité lumineuse
- **effet hypochrome** = diminution de l'intensité lumineuse

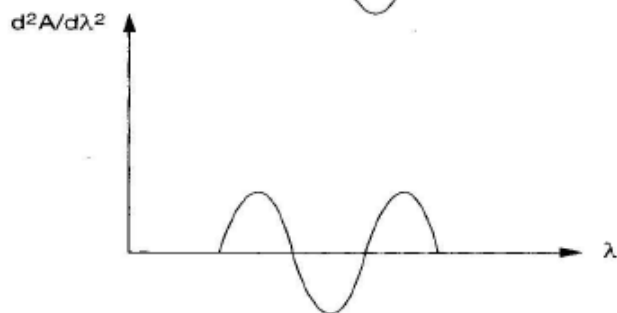
# Spectre dérivé



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



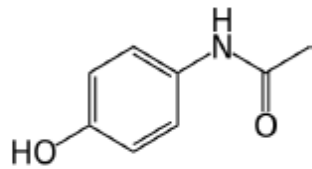
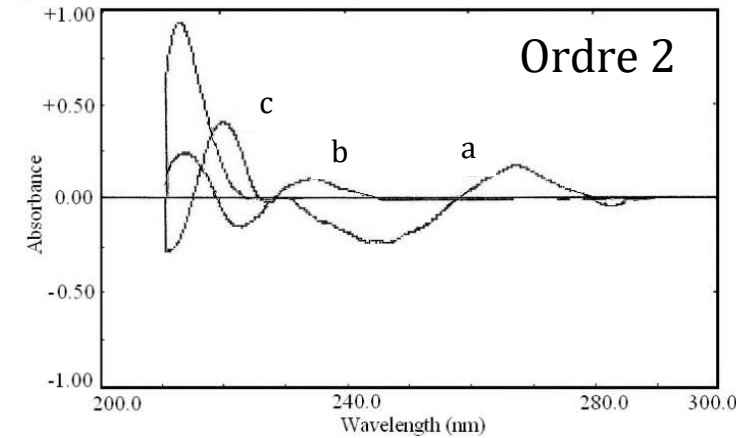
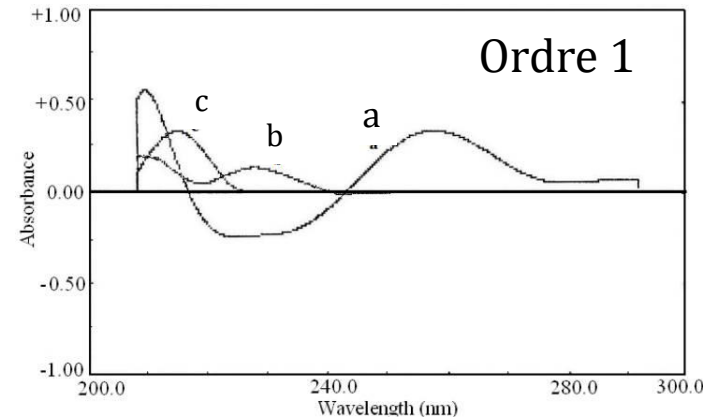
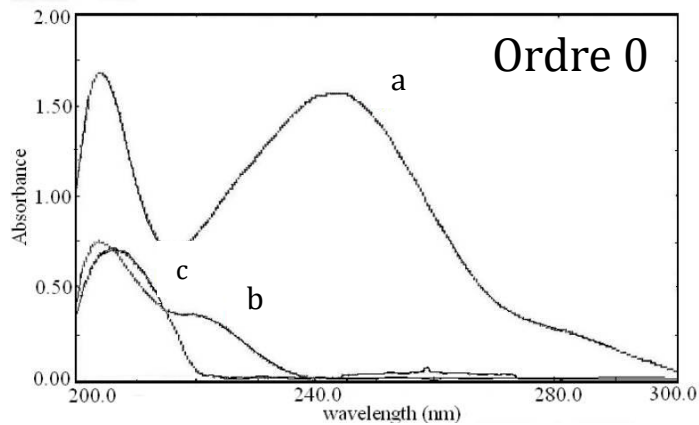
Spectre d'ordre un  
 $dA/d(\lambda) = f(\lambda)$



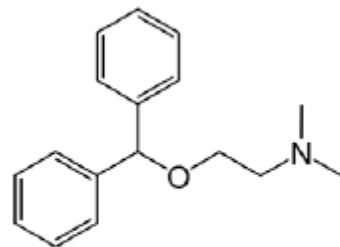
Spectre d'ordre deux  
 $d^2A/d^2(\lambda) = f(\lambda)$

## Development of a Rapid Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Acetaminophen, Diphenhydramine and Pseudoephedrine in Tablets

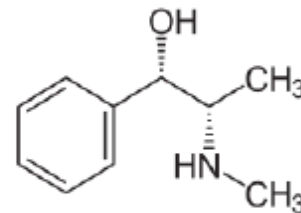
Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2015), 14 (2): 435-442



(a) Acetaminophen

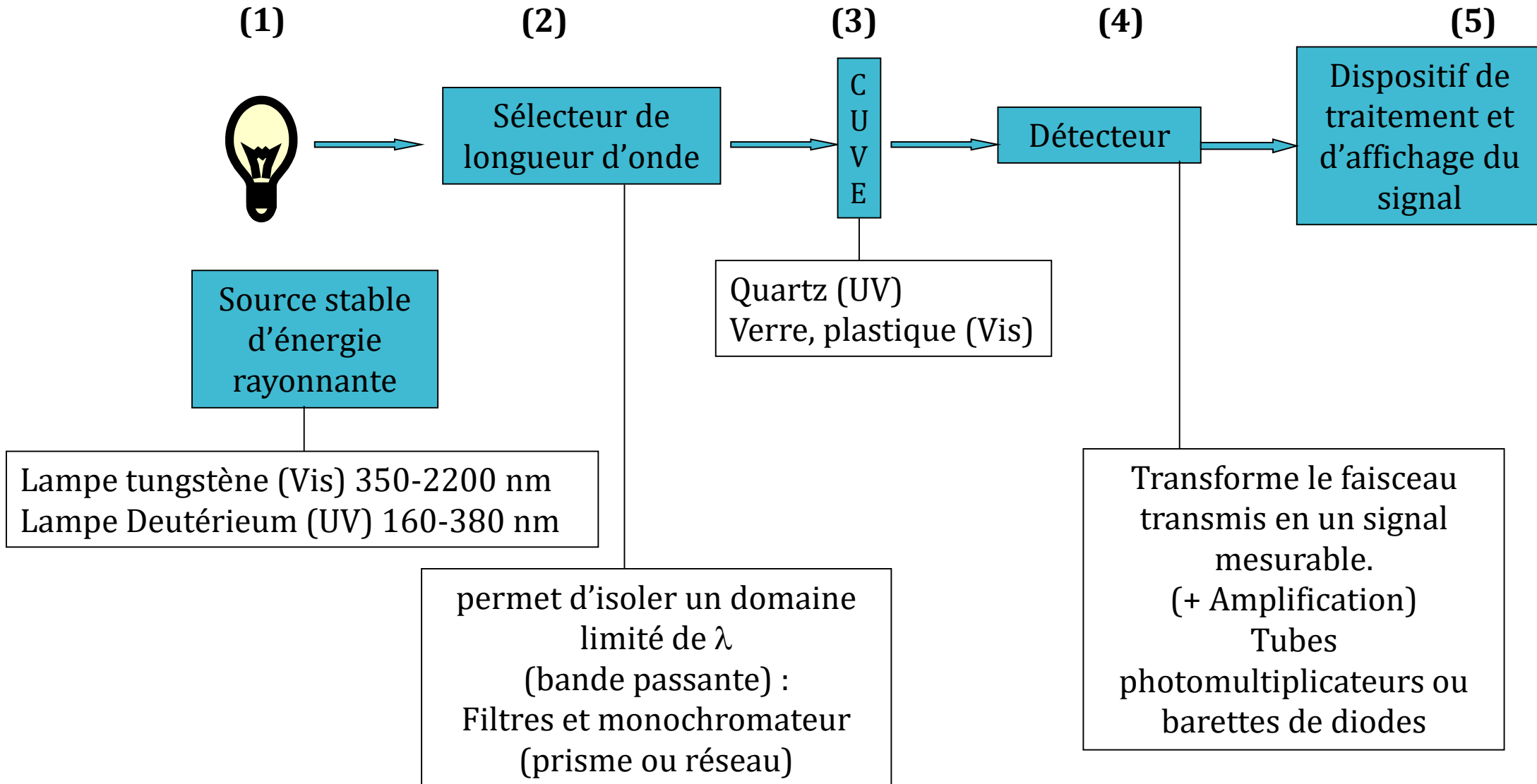


(b) Diphenhydramine



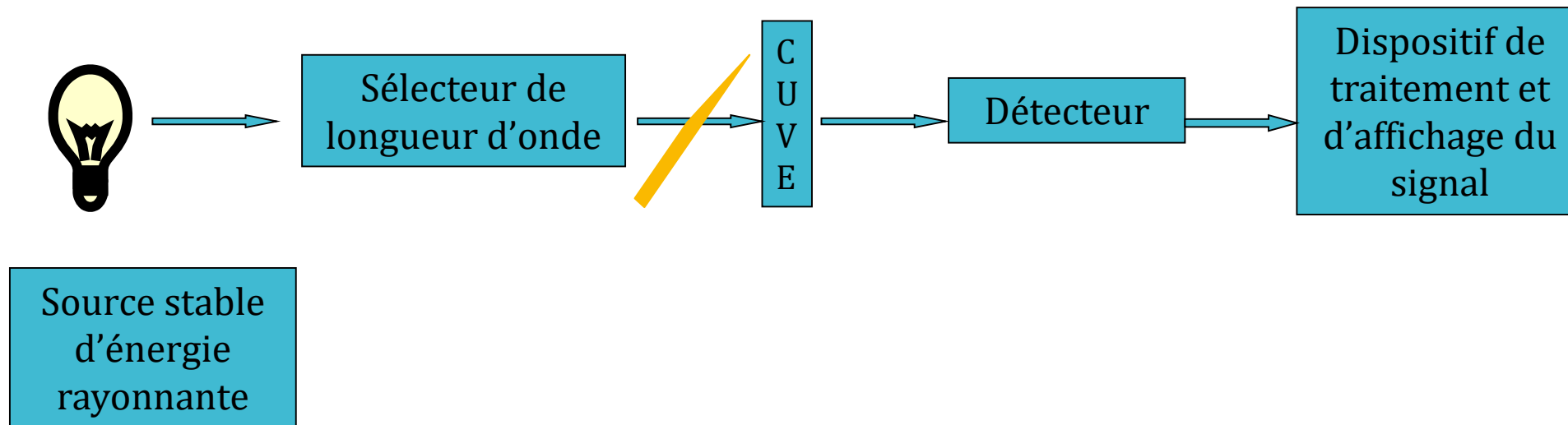
(c) Pseudoephedrine

# Spectrophotomètre : principe



# Spectrophotomètre : monofaisceau

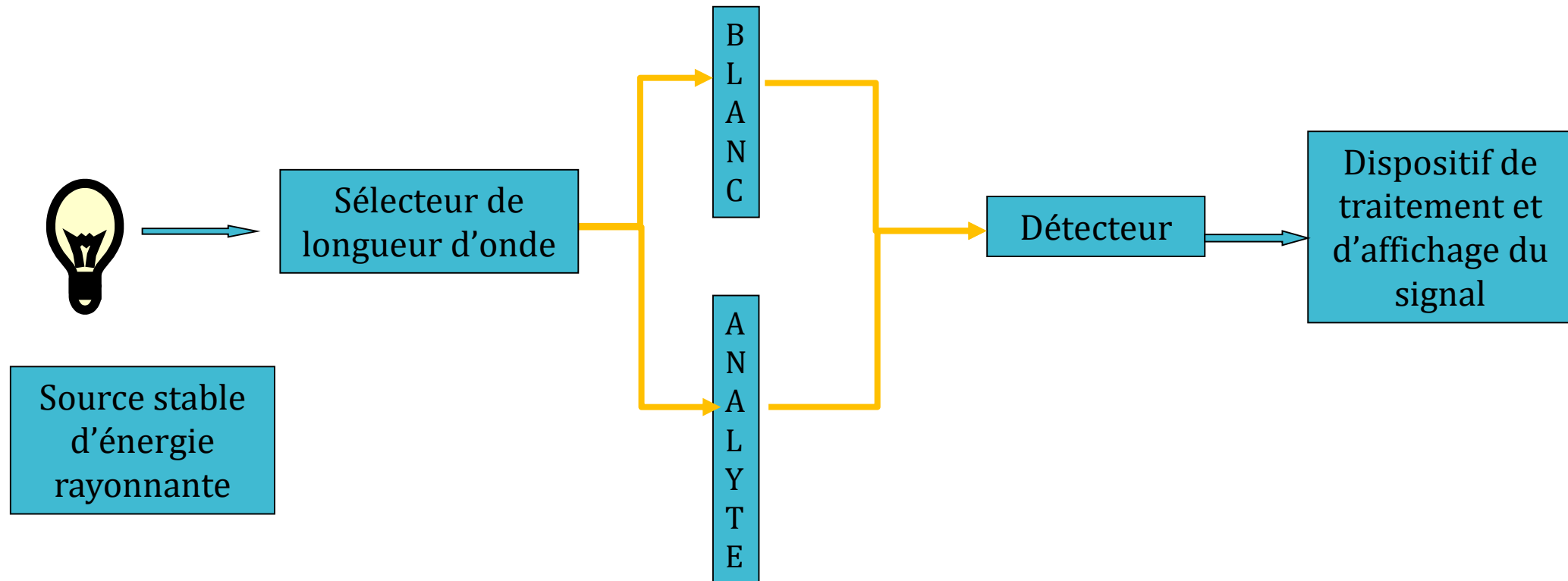
- (1) Obturateur  $\Leftrightarrow$  réglage  $T = 0$
- (2) Cuve contient blanc = matrice sans analyte  $\Leftrightarrow T = 100\%$
- (3) Cuve contient la solution à analyser  $\Leftrightarrow T$  de l'échantillon



- peu coûteux
- pratique pour analyses quantitatives à 1 longueur d'onde. Le réglage de la référence pour chaque longueur d'onde  $\Rightarrow$  lourd qd balayage spectral.

# Spectrophotomètre : double faisceau

- (1) 2 cuves contiennent le blanc
- (2) Cuve contient blanc + Cuve contient la solution à analyser

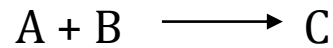


Avantage : compense les fluctuations à court terme du signal rayonnant de la source, la dérive du détecteur et de l'amplificateur ainsi que les variations d'intensité de la source.

# Applications

## Analyse quantitative

- Titration spectrophotométrique : on suit l'apparition ou la disparition de l'absorbance d'une des espèces de la réaction suivie.

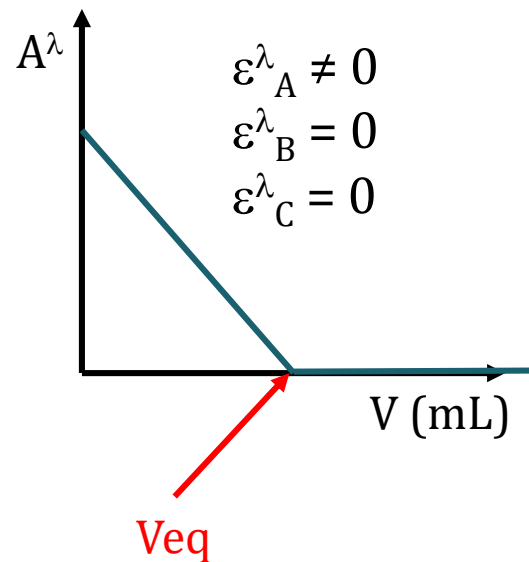


$$A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$$

A : espèce à doser

B : titrant

C : produit de la réaction



**t=0** : seule espèce A en solution :  $A^\lambda = A^\lambda_A = [A]\varepsilon^\lambda_A$        $A^\lambda \neq 0 \Rightarrow \varepsilon^\lambda_A \neq 0$

**t<Eq** :  $[A] \searrow$ ,  $[B] = 0$  et  $[C] \nearrow$  donc  $A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_C$

**t>Eq** :  $[A] = 0$ ,  $[B] \nearrow$  et  $[C] = \text{cte}$  donc  $A^\lambda = A^\lambda_B + A^\lambda_C = [B]\varepsilon^\lambda_B + [C]\varepsilon^\lambda_C = 0 \Rightarrow \varepsilon^\lambda_B = 0$  et  $\varepsilon^\lambda_C = 0$

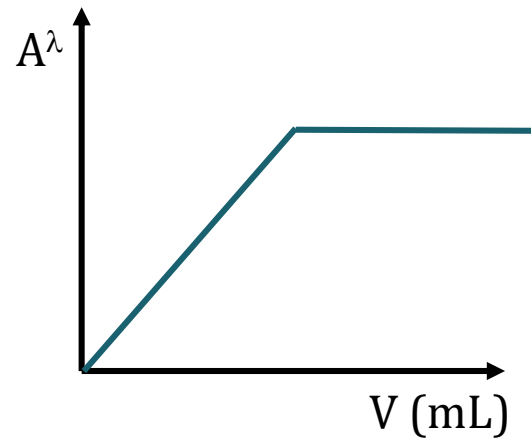
**Exercice 4 :** Au cours d'un titrage spectrophotométrique, on suit la réaction :  $A + B \longrightarrow C$

A : espèce à doser

B : titrant

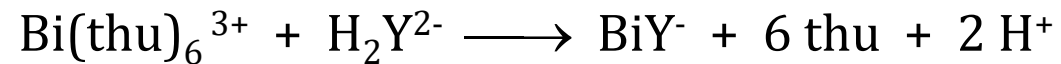
C : produit de la réaction

Sachant que la loi d'additivité est suivie ( $A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$ ) et au vu de la courbe de titrage, indiquer en argumentant si une ou plusieurs espèces possèdent un coefficient d'extinction molaire nul.





**Exercice 5 :** L'acide éthylènediaminetétraacétique ( $H_2Y^{2-}$ ) extrait le bismuth (III) de son complexe avec la thiourée :



Où  $thu$  : thiourée  $(NH_2)_2CS$

Prédire l'allure d'une courbe de titrage photométrique basée sur cette réaction, sachant que le complexe Bi(III)/thiourée est la seule espèce dans le système qui absorbe à 465 nm, la longueur d'onde choisie pour l'analyse.

- Dosage  $\Leftrightarrow$  étalonnage

Ex : dosage du fer  $\text{Fe}^{2+}$  ou dosage enzymatique du glucose ou dosage des nitrites

- Détecteurs en chromatographie

- Utilisation des spectres dérivés

**Détermination de constantes thermodynamiques** Ex pKa, constante de complexation

**Détermination de la stœchiométrie d'un complexe**

**Analyse qualitative** moins utilisée que l'IR

- Facilité de mise en œuvre : bien s'assurer des conditions opératoires et du nettoyage des cuves
- Possibilité d'automatisation (plaque 96 puits), et de flux continu
- Bonne exactitude, entre 1 et 5%
- Bonne sensibilité : concentration entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  mol/L
- Grand champ d'applications
- Dans un mélange, si seul un analyte est absorbant, pas de séparation préalable
- Faible coût pour l'achat et pour l'entretien
- Vérifications des performances peu contraignantes :
  - $\lambda \Leftrightarrow$  oxyde d'holmium ou grâce à la lampe à deutérium
  - $A \Leftrightarrow$  solution étalon de  $K_2Cr_2O_7$  dans  $H_2SO_4$  0,02 mol/L pour  $\lambda = 235$  nm, 257 nm, 313 nm et 350 nm.

Ce document est la propriété exclusive de B Gargadennec-Legouin et ne saurait être utilisé, reproduit, représenté, transmis ou divulgué sans son accord préalable et explicite.

*Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes*

*Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes*



UFR Pharmacie - Rennes

# Une question... Une précision... RDV sur le forum

*Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes*

*Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes*



UFR Pharmacie - Rennes