



2019	SL03
Cours	Absorbance

Introduction

Nous avons vu, dans la turbidimétrie, que les **particules** peuvent **interférer avec la lumière** (comme des grains de poussières devant un rai de soleil). Cette interférence avec la lumière est mesurable, grâce à un spectrophotomètre, et cela se nomme la **densité optique**.

Il est également possible **de mesurer les interférences** entre **des molécules solubles** (et donc, qui ne sont pas des particules), et cela correspond à **l'absorbance**.

La composition de la lumière

La **lumière blanche** est un **assemblage d'ondes** (de longueurs variables), comprises entre 380 et 750 nm (voir spectre de la lumière blanche, CP01 – document 03) : on dit qu'elle est **polychromatique** = assemblage de plusieurs couleurs. Cet assemblage est visible dans un cas particulier : lors de la diffraction de la lumière du soleil par l'eau, on observe un **arc-en-ciel** = éclatement de la lumière blanche dans ses différentes composantes chromatiques.

Il existe également de la lumière **monochromatique** = composée d'une **seule longueur d'onde**. Elle est générée par des filtres, qui bloquent toutes les longueurs d'onde, sauf celle qui est désirée. La lumière monochromatique est colorée = sa couleur correspond à la longueur d'onde choisie (voir spectre de la lumière blanche).

La notion de couleur

La couleur apparente de la matière est liée à une interaction entre la matière et la lumière. Les molécules qui composent la matière, ou présentes dans une solution, ont la capacité d'interagir avec la lumière = elles absorbent une partie du spectre lumineux, et réfléchissent le reste.

La matière, ou une solution, **apparaissent donc de la couleur de la partie du spectre qui est réfléchi**.

Ex – 1 : les feuilles d'arbre apparaissent en vert, parce que la chlorophylle absorbe tout le spectre de la lumière blanche, sauf les longueurs d'onde situées dans le vert.

Ex – 2 : l'encre rouge est composée d'un pigment qui absorbe tout le spectre de la lumière blanche, sauf les longueurs d'onde situées dans le rouge.

La couleur est donc avant toute chose, une question de **pigment** : **toute molécule capable d'absorber une partie du spectre de la lumière blanche et d'en réfléchir une autre, est un pigment**.

Mais le pigment est aussi une molécule soluble !

Mesurer la couleur

De la même façon que la turbidimétrie, plus il y a de pigments pour interagir avec la lumière, plus il y a d'ondes réfléchies, plus il y a de couleur : **une solution très colorée est donc plus concentrée en pigments qu'une solution « pastel »** (de même couleur).

Dans le spectrophotomètre, plus il y aura de pigment dans la cuve et plus le rayon lumineux, issu de la source, sera atténué à son arrivée sur le détecteur.

La loi mathématique est identique à celle de la turbidimétrie. Si I_0 correspond à l'intensité du rayon émis et I correspond à l'intensité du rayon reçu, alors :

$$Abs = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

La conversion en concentration

L'absorbance correspond à la réduction d'un rayon lumineux, elle est donc assez éloignée de la notion de concentration, même si l'absorbance va dépendre de la concentration de départ (en pigment).

En revanche, il est possible d'établir une corrélation entre **l'absorbance et la concentration en pigment d'une solution**, si on introduit une méthode d'étalonnage :

1. Je prépare une solution à une concentration connue de pigment = $Spig$;
2. Je réalise des dilutions successives de $Spig$;
3. Je mesure l'absorbance de chacune des dilutions de $Spig$;
4. Je trace : $Abs = f(\text{concentration en pigment}) =$ courbe d'étalonnage ;
5. Je mesure l'absorbance de mon échantillon ;
6. Je replace l'absorbance de mon échantillon sur la courbe d'étalonnage ;
7. J'obtiens la concentration en pigment dans mon échantillon.

Il existe une loi mathématique qui met en relation la concentration et l'absorbance, elle sera vue après avoir été démontrée par vos soins (SL04).

Comment choisir la bonne couleur ?

La réduction du rayon lumineux par les propriétés spectrales du pigment est d'autant plus efficace si on travaille à la longueur d'onde la moins réfléchiée par le pigment = longueur d'onde optimale.

Déterminer quelle est la longueur d'onde la plus absorbée (et donc la moins réfléchiée), correspond à trouver l'anti-couleur du pigment (sa couleur étant la longueur d'onde la moins absorbée et donc la plus réfléchiée).

Pour cela, on réalise un spectre :

1. Je prépare une solution de pigment, pas trop concentrée ;
2. Je mesure l'absorbance de la solution, en modifiant la longueur d'onde du rayon lumineux (tous les 25 nm), entre 350 et 700 nm (domaine du visible) ;
3. Je trace $Abs = f(\text{longueur d'onde})$;
4. Je détermine, par lecture graphique, la longueur d'onde provoquant l'absorbance la plus élevée ;

5. J'utilise cette longueur d'onde pour toutes les mesures de spectrophotométrie, impliquant ce pigment.

Quels sont les pigments du laboratoire ?

A l'exception des pigments alimentaires que l'on utilise pour faire découvrir la notion d'absorbance, les molécules dosées en laboratoire sont rarement colorées. On les rend colorées, en les associant avec d'autres pigments.

Molécules	Couleur naturelle	Colorant/réaction chimique	Couleur modifiée
Glucides	Incolores	3,5 DNS	Coloration rouge brique
Protéines		Gornall/Biuret	Coloration bleue/violette
Lipides		Rouge Congo	Coloration rouge
ADN		Vert de méthyle acétique	Coloration verte

Note 1 : la longueur d'onde se nomme λ ;

Note 2 : la relation entre concentration et couleur est linéaire jusqu'à une certaine valeur de concentration, à ne pas dépasser. Sinon, il faut diluer ;

Note 3 : Lambert aime bien se prendre une bonne bière.

