

Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-visible

1. Notion de chromogène - principe de la colorimétrie

Soit une substance A dans un milieu biologique quelconque (sérum, plasma, urine LCR...). Pour doser A en pratique en milieu liquide des réactions chimiques successives souvent catalysées par des enzymes qui aboutissent à générer un chromophore = substance colorée possédant au moins un système de doubles liaisons conjuguées en quantité proportionnelle à celle de A.

La photométrie consiste à doser ce chromophore selon l'une ou l'autre des méthodes suivantes.

- ✓ Mesure de la quantité formée temps ΔT au terme des réactions génératrices quand tout le substrat est consommé : « **Méthode dite en point terminal** »
- ✓ Mesure de la vitesse de formation pendant ΔT entre t_0 et t_1 : **Méthode dite en cinétique** ».

2. Principe de la spectrophotométrie :

2.1. RAPPELS SUR LES SOLUTIONS COLOREES

2.1. 1. La lumière blanche

La lumière blanche contient toutes les radiations visibles dont les couleurs vont du violet au rouge. Ces radiations sont caractérisées par leur longueur d'onde correspondant à une couleur donnée.

Couleur	violet	bleu	Vert	jaune	orange	rouge
Longeur d'onde (nm)	400-424	424-491	491-575	575-585	585-647	647-780

Pour simplifier, on peut considérer que la lumière blanche est composée essentiellement de trois couleurs dites **couleurs primaires** : bleu, vert et rouge.

NB : Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

Visible: 800 nm (rouge) - 400 nm (indigo)

proche-UV : 400 nm - 200 nm

UV-lointain : 200 nm - 10 nm

2.1.2. Lumières colorées.

La superposition de deux lumières colorées primaires donne des lumières colorées **secondaires : cyan, magenta et jaune**.

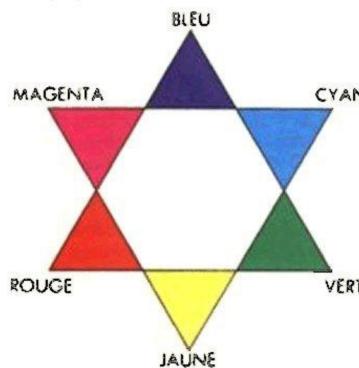
cyan = bleu + vert

magenta = bleu + rouge

jaune = vert + rouge

Deux lumières colorées dont la superposition donne une lumière blanche sont des lumières colorées **complémentaires**.

Ainsi vert et magenta, bleu et jaune, rouge et cyan sont complémentaires.



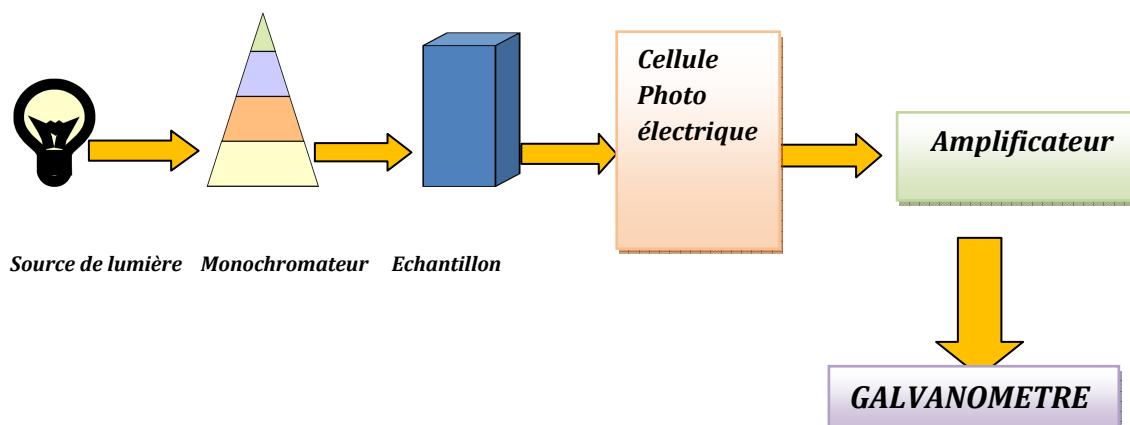
2.2. Principe

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche.

La couleur perçue est la couleur complémentaire de la couleur absorbée.

Exemple : si une solution absorbe du vert, on la perçoit magenta



Toute solution colorée absorbe certaines radiations de la lumière blanche. A l'aide d'un spectrophotomètre, il est possible de mesurer cette absorbance. Cette dernière est un nombre sans unité : si l'absorbance est nulle, la radiation n'est pas absorbée ; plus l'absorbance est grande, plus la radiation est absorbée.

Conclusion : L'absorbance d'une solution caractérise le degré d'absorption d'une radiation lumineuse monochromatique pour une solution colorée.

Loi de Beer-Lambert.

A = k.c avec A : absorbance de la solution (sans unité)

C : concentration molaire de la solution (g.L-1)

K : coefficient de proportionnalité (L.g-1)

A est proportionnelle à la concentration de la solution colorée.