

Croyances et expériences : la loi de Beer-Lambert n'est valable que pour une absorbance inférieure à 1

Résumé La loi de Beer-Lambert – loi fondamentale en spectroscopie et en chimie analytique – est enseignée dans de nombreux programmes scolaires et cursus universitaires. Dans la quantité de ressources sur ce sujet très important, il n'est pas rare de voir apparaître une croyance parfois profondément ancrée dans la communauté scientifique stipulant que cette loi n'est plus valable au-delà d'une valeur d'absorbance supérieure à l'unité. Cet article propose ainsi de comprendre les origines de cette croyance et de montrer au moyen de deux expériences facilement réalisables dans un laboratoire d'enseignement que cette croyance est erronée. Les notions de sensibilité de détection du spectrophotomètre, taux de lumière parasite et courant d'obscurité sont introduites afin de rationaliser les résultats issus de celles-ci, et notamment la présence à forte concentration d'un phénomène de « saturation de l'absorbance ». Ceci permet également de mettre en exergue l'importance de la compréhension par les étudiant-es des origines d'une mesure et des limites instrumentales inhérentes à celle-ci.

Mots-clés Enseignement, absorbance, loi de Beer-Lambert, spectroscopie UV-visible.

Abstract **Beliefs and experiments: "Beer-Lambert's law is only valid for an absorbance lower than 1"** Beer-Lambert's law – a fundamental law in spectroscopy and analytical chemistry – is taught in many school and university curricula. Among the large amount of resources on this subject, it is not rare to see appearing a belief sometimes deeply anchored in the scientific community arguing that this law is not valid anymore beyond a value of absorbance higher than the unit. This article proposes to understand the origins of this belief and to show by means of two experiments easily performed in a teaching laboratory that this belief is wrong. The concepts of detection sensitivity of the spectrophotometer, stray light rate and dark current are introduced in order to explain the presence of a "saturation of absorbance" phenomenon at high concentration. All this also allows to emphasize how important it is for students to understand the origins of a measurement and its instrumental limits.

Keywords Teaching, absorbance, Beer-Lambert law, UV-visible spectroscopy.

La loi de Beer-Lambert est une loi fondamentale en spectroscopie et en chimie analytique qui est enseignée dans de nombreux programmes scolaires et cursus universitaires dans le monde entier [1-3]. Il en résulte donc une quantité de ressources sur ce sujet très important (ouvrages, sites web éducatifs, tutoriels vidéo, articles de blog, manuels universitaires, publications scientifiques, conférences, présentations en ligne, etc.). S'il est difficile, voire impossible de donner un chiffre précis du nombre de sites Internet, vidéos ou encore d'articles traitant ou utilisant cette loi, il y en a probablement, selon Chat GPT, des milliers, voire des millions. Dans le système éducatif français, la loi de Beer-Lambert est introduite dès le programme de physique-chimie de première générale [4]. Les élèves doivent être capables de l'exploiter pour déterminer une concentration ou une quantité de matière, ainsi que citer les domaines de validité de cette relation dès l'année suivante (physique-chimie de terminale générale [5]). Cette loi est ensuite présente dans plusieurs référentiels ou programmes dans l'enseignement supérieur (brevet de technicien supérieur - Métiers de la chimie, bachelier universitaire de technologie dans les IUT, classes préparatoires PC, BCPST, licence de chimie, master de chimie...). Dans de nombreuses ressources en lien direct ou non avec ces programmes sont également mentionnées les conditions de validité de cette loi fondamentale. Toutefois, comme indiqué dans un article précédemment publié dans cette revue [6], si la perte de linéarité observée expérimentalement est souvent expliquée par une forte concentration en espèce (ce qui est prouvé dans de nombreuses situations), celle-ci n'est souvent pas la conséquence d'une limite de type fondamentale mais

plutôt instrumentale : ces deux limites étant souvent malheureusement confondues à tort. Ceci conduit à une croyance parfois très ancrée dans la communauté scientifique que la loi de Beer-Lambert n'est plus valable au-delà d'une valeur d'absorbance supérieure à l'unité. Croyance qu'il est possible de battre en brèche en identifiant les origines de la « mesure d'absorbance » et en discutant notamment de l'importance de signaux parasites (lumière parasite et courant d'obscurité) sur la limite instrumentale et... expérimentale.

Cet article propose ainsi de comprendre les origines de cette croyance, mais aussi de montrer par l'expérience qu'elle n'a pas lieu d'être. Ainsi, deux expériences facilement réalisables dans un laboratoire d'enseignement avec des étudiant-es sont décrites et les notions de sensibilité de détection du spectrophotomètre, taux de lumière parasite et courant d'obscurité introduites afin de rationaliser les résultats issus de celles-ci.

Loi de Beer-Lambert

Énoncé

Lorsqu'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde λ et d'intensité incidente I_0 traverse une longueur l d'un milieu transparent (solide, liquide ou gazeux) constitué de n espèces absorbantes (à la longueur d'onde λ) de concentrations respectives C_i et de coefficients d'absorption molaire ϵ_i , l'intensité transmise I_t du rayonnement suit la loi de Beer-Lambert selon laquelle :

$$I_t(\lambda, l) = I_0(\lambda) 10^{-\sum_{i=0}^n \epsilon_i C_i l} \quad (1)$$

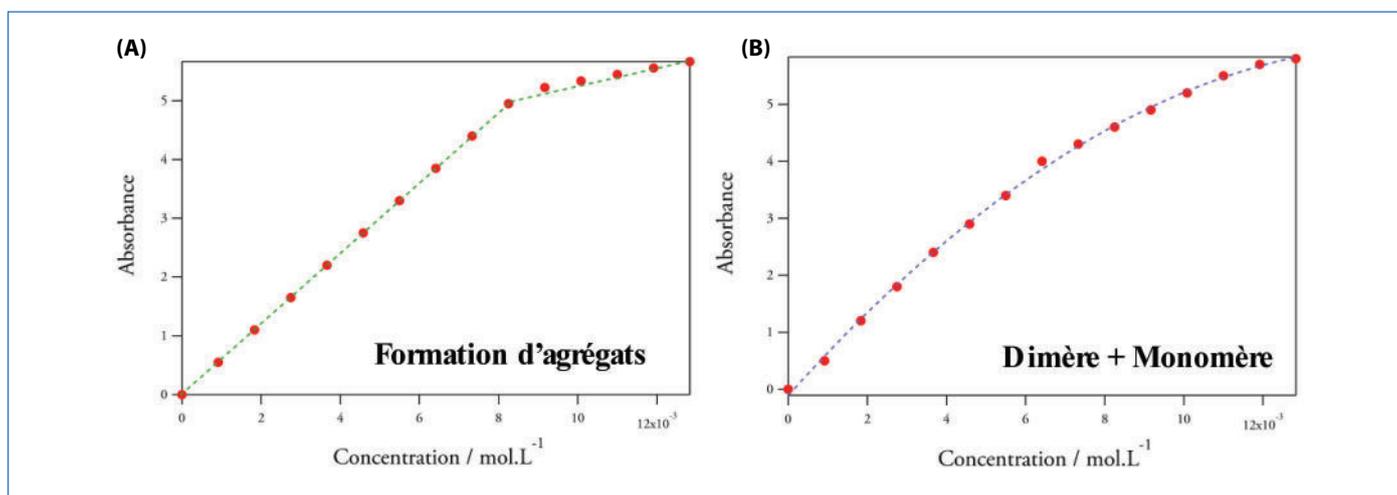


Figure 1 - Cas théoriques : (A) formation d'agrégats à partir d'une certaine concentration ; B) formation de dimère même à très basses concentrations [8].

Cette dernière équation devient si l'on introduit l'absorbance A :

$$A = \sum_{i=0}^n \epsilon_i C_i l \text{ avec } A = \log \left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda, l)} \right) \quad (2)$$

Dans le cas d'un milieu ne contenant qu'une espèce absorbante à la longueur d'onde λ , de concentration C et de coefficient d'absorption molaire ϵ , alors :

$$A = \epsilon l C \quad (3)$$

Même si la loi de Beer-Lambert est souvent utilisée pour des rayonnements UV et visibles (notamment dans l'enseignement), celle-ci s'avère aussi valable pour des rayonnements IR [7] et X, voire gamma et micro-onde. L'absorbance d'un échantillon dépend du coefficient d'absorption molaire ϵ (en mol⁻¹.L.cm⁻¹), du trajet optique l (en cm) et de la concentration en espèce absorbante (en mol.L⁻¹). Les unités détaillées précédemment sont celles généralement utilisées « par commodité »⁽¹⁾, mais d'autres unités sont possibles. Dans les unités SI, le coefficient d'absorption molaire devrait avoir comme unité les mol⁻¹.m⁻².

Conditions de validité

La loi de Beer-Lambert établie précédemment n'est valable que dans un cadre bien strict. En effet, cette relation n'est valide que si :

- le faisceau lumineux est monochromatique (une seule longueur d'onde) ;
- le milieu traversé est homogène ;
- le milieu traversé est isotrope (invariance des propriétés physiques du milieu en fonction de la direction) ;
- le milieu traversé est transparent (*i.e.* pas de phénomènes de diffusion).

Par ailleurs, cette loi met en avant une dépendance linéaire de l'absorbance avec le coefficient d'absorption molaire ϵ . Cette relation dépend donc des paramètres influençant ϵ et n'est donc valable que :

- pour une molécule donnée en solution dans un milieu donné (pH, solvant, force ionique, espèces environnantes⁽²⁾...) ;
- à une longueur d'onde donnée (bien choisie).

Il est également évident que cette loi ne peut s'appliquer que si la concentration des espèces en présence n'évolue pas dans le temps (absence de réaction chimique ou photochimique). Les espèces absorbantes doivent donc être non

photosensibles et ne pas réagir avec le milieu environnant. Finalement, il est souvent évoqué que la loi de Beer-Lambert ne peut être utilisée dans le cas d'espèce fluorescente, ce qui sous-entend que la lumière issue de l'émission vient perturber la mesure. En pratique, l'émission de fluorescence n'a aucune incidence sur le signal mesuré par le détecteur pour plusieurs raisons : le rayon incident I_0 est de faible intensité, la fluorescence est isotrope et l'angle solide sondé par le détecteur est très faible. Il en résulte que très peu de photons issus de l'émission de fluorescence sont détectés en comparaison des photons issus du faisceau transmis, sauf toutefois lorsque la concentration devient élevée, auquel cas le faisceau entrant peut être fortement absorbé et réémettre une grande quantité de photons à une longueur d'onde plus élevée, pouvant être moins absorbés (effet de post filtre) et faisant artificiellement baisser l'absorbance lue.

Déviations de la loi de Beer-Lambert

La formation d'agrégats est parfois évoquée comme cause entraînant une perte de linéarité. Plusieurs cas sont à distinguer. Dans le cas où il y a formation d'agrégats à partir d'une certaine concentration limite, on observe en effet une perte de la linéarité (*figure 1A*) : la concentration limite est propre à une espèce et ne peut donc pas être généralisée. Dans le cas où la formation d'agrégats (respectivement dimère) a lieu pour une concentration limite très faible, on observe alors une relation de linéarité mais le coefficient d'absorption molaire ϵ n'est plus celui de la molécule seule mais des agrégats (respectivement dimère). Ceci implique alors que les conditions d'agrégation n'évoluent pas avec la concentration. Si tel n'est pas le cas et que par exemple la proportion de dimère et monomère évolue avec la concentration, il n'y a alors plus de relation linéaire entre A et C (absence de linéarité). Dans le cas de la *figure 1B*, la proportion de dimère augmente par exemple avec la concentration et celui-ci possède un coefficient d'absorption plus faible que le monomère.

Dans la plupart des cas rencontrés en travaux pratiques, si agrégation il y a, celle-ci s'opère à une concentration limite assez élevée sauf dans des cas particuliers. Ce phénomène d'agrégation n'est donc pas à exclure mais la limite instrumentale que nous évoquerons plus loin (sensibilité de détection du détecteur, taux de lumière parasite, courant d'obscurité du spectrophotomètre) s'avère être généralement atteinte en premier lieu, sauf dans des cas particuliers.

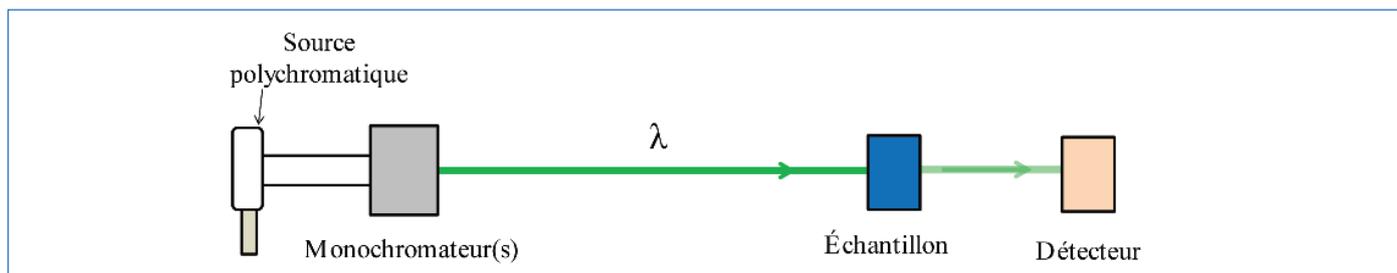


Figure 2 - Schéma général d'un spectrophotomètre UV-visible (cas de la sélection d'une longueur d'onde dans le vert) [8].

Pour certains auteurs, la loi de Beer Lambert n'a pas de limite fondamentale tant que les intensités lumineuses ne sont pas trop grandes pour induire des phénomènes non linéaires ou des déplétions de population (ce qui nécessite des intensités lumineuses bien supérieures à celles utilisées en spectrophotométrie classique) [6]. Pour d'autres, il existe bien une limite fondamentale lorsque la concentration en espèce devient importante ou plus particulièrement la colonne totale (produit de la concentration de l'espèce absorbante par la longueur du chemin d'absorption) [9]. Cela peut notamment s'expliquer par le fait que les molécules n'absorbent alors plus la lumière de manière indépendante. Si en phase gaz cette limite peut être atteinte, celle-ci est totalement inatteignable en solution car elle aurait lieu pour des concentrations extrêmement élevées et des absorbances dépassant largement la dizaine (notamment pour des colorants). Les spectrophotomètres les plus performants peuvent mesurer (dans des conditions très particulières) des absorbances allant jusqu'à 6. Pour toutes ces raisons, il n'est donc pas réaliste d'imaginer qu'une limite fondamentale de la loi de Beer-Lambert puisse être atteinte lors de séances de travaux pratiques.

Fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-visible

Schéma général

La figure 2 présente le schéma général d'un spectrophotomètre UV-visible. Celui est constitué d'une lampe polychromatique dont le faisceau (UV et visible) est dirigé vers un monochromateur (spectrophotomètre à simple monochromateur) ou deux monochromateurs (spectrophotomètre à double monochromateur) qui sélectionnent une longueur d'onde λ (une bande passante autour de λ). Un faisceau (quasi)monochromatique ($\lambda \pm \Delta\lambda$) est ainsi généré. Celui-ci passe ensuite par l'échantillon et interagit ou non avec les espèces le constituant. Le faisceau transmis arrive finalement sur un détecteur puis le signal est traité par informatique.

Mesure de l'absorbance du soluté [6, 10]

La mesure de l'absorbance liée à un soluté s'appuie sur deux mesures d'intensité lumineuse : la mesure dite « de blanc » permet de prendre en compte les pertes optiques liées à la cuve, au solvant et la matrice (I_{blanc}), et la mesure sur l'échantillon qui ajoute aux pertes du blanc les pertes par absorption liées au soluté en solution (I_{ech}). L'absorbance du soluté est obtenue comme :

$$A = \log \left(\frac{I_{\text{blanc}}(\lambda, l)}{I_{\text{ech}}(\lambda, l)} \right) \quad (4)$$

Toute mesure d'un spectre d'absorption nécessite l'enregistrement au préalable du « blanc » (et parfois plusieurs minutes avant). Si des fluctuations d'intensité de la lampe source ont

lieu, celles-ci ne sont pas prises en compte et le spectre est alors faussé. Pour limiter l'influence de ces fluctuations sur le spectre, le faisceau incident est envoyé régulièrement (ou en permanence) à la fois sur l'échantillon mais également sur une référence (le solvant généralement). On parle de spectrophotomètre à double faisceau.

Lumière parasite

Lors du processus de sélection de la longueur d'onde par le(s) monochromateur(s), un recouvrement entre les ordres 1 et 2 du réseau peut avoir lieu, et de la lumière peut aussi être renvoyée par le réseau du fait d'impuretés ou d'imprécisions de fabrication dans ses traits ou facettes. Le faisceau n'est alors pas purement monochromatique et constitué d'autres longueurs d'onde que celle d'intérêt. Cette lumière est qualifiée de parasite car d'intensité relativement faible.

On définit le taux de lumière parasite comme le pourcentage de lumière incidente passant à travers l'échantillon à la longueur d'onde d'étude. Ainsi, s'il y a par exemple 1 % de lumière parasite, lorsque l'échantillon est très concentré et supposé absorber tout le faisceau à la longueur d'onde d'intérêt, seul 99 % du faisceau est réellement absorbé : 1 % du faisceau incident passe à travers l'échantillon sans être absorbé et arrive jusqu'au détecteur. Ce dernier détecte des photons et génère donc un signal électrique indépendamment de la longueur d'intérêt. Il apparaît de plus que tant que la lumière transmise est comprise entre 90 et 100 % du faisceau incident (*i.e.* une concentration en espèce et une absorbance à la longueur d'onde d'intérêt faibles), l'influence de la lumière parasite peut être considérée comme négligeable. Toutefois celle-ci devient importante, voire prépondérante, au fur et à mesure que la concentration augmente.

Dans la plupart des spectrophotomètres UV-visible, les monochromateurs (figure 2) sont des réseaux en réflexion présentant une bonne résolution, une dispersion linéaire (largeur de bande fixe) et un mécanisme de contrôle de rotation facile. Il s'agit plus particulièrement de réseaux à échelottes⁽³⁾ car ils permettent de concentrer la lumière dans un seul ordre (différent de l'ordre 0) et de supprimer les autres ordres pour ne pas avoir de recouvrements entre les ordres et ainsi limiter le taux de lumière parasite. Plusieurs agencements sont possibles afin de conduire à une sélection de longueur d'onde : Littrow, Czerny-Turner, Ebert et Seya Namioka... Dans le cas du dernier cité, un réseau en réflexion concave est utilisé afin de limiter le nombre de miroirs. Pour limiter au maximum le recouvrement entre les différents ordres (1 et 2 notamment), certains spectrophotomètres sont munis de double monochromateur (deux monochromateurs en série). Ce système, bien qu'efficace en termes de sélection spectrale, a pour conséquence une diminution de l'intensité lumineuse envoyée sur l'échantillon car le rendement de

réflexion des réseaux est nettement inférieur à 100 %. L'ajout de réflexion via plusieurs miroirs est aussi préjudiciable afin d'obtenir un faisceau de bonne qualité et intensité dans l'UV. Tout est alors question de compromis.

La valeur de ce pourcentage ou taux de lumière parasite donne donc une information importante sur l'efficacité de la sélection spectrale à l'issue du passage du faisceau polychromatique (faisceau source) par le(s) monochromateur(s). Les spectrophotomètres à double monochromateur présentent naturellement un taux de lumière parasite plus faible que ceux munis d'un simple monochromateur.

Courant d'obscurité

Le courant d'obscurité correspond à la réponse du détecteur en l'absence de lumière, c'est-à-dire lorsque celui-ci est plongé dans le noir. Ce réglage important est généralement effectué en usine sur tous les spectrophotomètres mais certains sont également munis d'une mesure automatique. Ce réglage est important et doit être effectué avec une grande précision. En effet, par exemple si le détecteur mesure 100 mV dans le noir, le spectrophotomètre doit afficher 0 % en transmission. Si le réglage est peu précis et ajusté par exemple à 110 mV au lieu de 100 mV, alors lorsque l'absorbance augmente et que le détecteur baisse pour atteindre 100 mV, le spectrophotomètre interprète un 0 % en transmission alors que ce n'est pas le cas. Il faudrait en réalité une absorbance beaucoup plus élevée pour obtenir le niveau d'absorbance annoncé par l'appareil. La mesure est faussée et cela conduit à des effets de non-linéarité non désirables, pouvant être orientés aussi bien vers le haut que vers le bas.

Sensibilité de détection du détecteur

Dans les spectrophotomètres UV-visible, le détecteur peut être un tube photomultiplicateur (noté PMT), une photodiode, une barrette CCD. Un tube photomultiplicateur consiste en un tube de verre (ou quartz) dans lequel est placée une photocathode, plusieurs électrodes appelées dynodes et une anode. Il s'agit d'un détecteur quantique photoémissif car sous l'action de la lumière, des électrons sont éjectés au niveau de la photocathode. Le faible courant électrique induit par cette éjection est amplifié par la série de dynodes et au contact de l'anode, une impulsion électrique est produite. Le gain est d'environ 10^8 électrons par photon incident. Il s'agit d'un détecteur de sensibilité nettement supérieure à celle d'une photodiode de silicium. Ces derniers sont des détecteurs quantiques photoconducteurs car sous l'action de la lumière, des paires électron-trou sont générées dans le semi-conducteur lorsque l'énergie de photons est supérieure à la largeur de la bande interdite. Ceci engendre une augmentation du courant inverse dans la diode d'autant plus grande (en valeur absolue) que le flux lumineux est important.

Dans certains spectrophotomètres, le détecteur est constitué de capteur CCD. Celui-ci est constitué de plusieurs pixels arrangés sous forme de damier. Chacun d'entre eux est constitué par une électrode conductrice semi-transparente (Si polycristallin) déposée sur une couche de silice isolante. Cette dernière est elle-même située sur un semi-conducteur de type P. Entre la couche de silice et la couche de Si P, est « enterré » un canal de Si dopé N. Sous l'action de la lumière, des paires électron-trou sont générées au niveau de la jonction P-N de chaque pixel, ce qui induit un signal électrique. Les signaux électriques sont analysés pixel par pixel et recombinaison pour donner le signal cumulé de tous.

Les capteurs CCD détaillés juste avant sont généralement présents dans les spectrophotomètres à bas coût alors que les photodiodes sont privilégiées pour des appareils de moyenne et bonne qualité. Pour une détection plus sensible, les PMT sont des détecteurs de choix et sont l'apanage des spectrophotomètres les plus coûteux. Il faut toutefois noter que la sensibilité élevée des PMT ne sert que lorsque les flux lumineux sont extrêmement faibles (typiquement supérieurs à 4A) et qu'en contrepartie, ce sont des composants coûteux et fragiles pouvant induire des frais lorsqu'ils sont exposés à trop de lumière, et qu'en raison de l'hétérogénéité de leur photocathode les PMT peuvent fausser les mesures, ce qui n'est pas le cas des photodiodes qui sont en outre très robustes.

Limite instrumentale de la loi de Beer-Lambert : la preuve par l'expérience

Phénomène de saturation de l'absorbance

Lumière parasite et courant d'obscurité peuvent être considérés comme des signaux parasites et conduire donc à une intensité parasite I_{par} arrivant sur le détecteur. Alors que le courant d'obscurité possède une valeur relativement fixe, le taux de lumière parasite pour sa part une courbe qui évolue selon la longueur d'onde. On peut définir grâce l'expression de l'équation (4) une absorbance dite « mesurée » qui tient compte de cette intensité parasite :

$$A_{mesurée} = \log \left(\frac{I_{blanc}(\lambda, l) + I_{par}}{I_{ech}(\lambda, l) + I_{par}} \right) \quad (5)$$

En introduisant la fraction de lumière parasite totale (issue du faisceau incident et du courant d'obscurité) par rapport à la lumière traversant le blanc f_{par} , l'équation (5) devient :

$$A_{mesurée} = \log \left(\frac{1 + f_{par}}{\frac{I_{ech}(\lambda, l)}{I_{blanc}(\lambda, l)} + f_{par}} \right) = \log \left(\frac{1 + f_{par}}{10^{-A} + f_{par}} \right) \quad (6)$$

avec $f_{par} = \frac{I_{par}(\lambda, l)}{I_{blanc}(\lambda, l)}$

Les courbes donnant l'absorbance mesurée (ou réellement observée) en fonction de l'absorbance du soluté A (en l'absence de prise en compte de la lumière parasite) pour différentes valeurs de f_{par} sont données sur la figure 3.

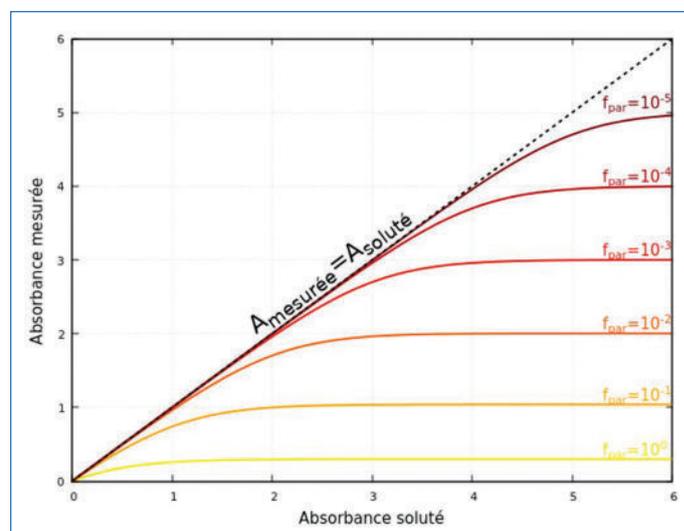


Figure 3 - Écart à la linéarité en présence de lumière parasite pour différents f_{par} . (Figure extraite de [6]).

En présence d'une intensité parasite qui arrive sur le détecteur, les valeurs d'intensité lumineuse sont alors surévaluées. Toutefois, tant que l'intensité de lumière traversant l'échantillon I_{ech} est très grande devant l'intensité de lumière parasite, l'influence de cette dernière peut être considérée comme négligeable et A mesurée se confond avec A (régime linéaire de la *figure 3*). En revanche, lorsque l'absorbance du soluté augmente suite à une augmentation de la concentration, il arrive un moment où cette intensité parasite n'est plus négligeable, ce qui engendre une sous-estimation de la valeur d'absorbance et l'existence pour les hautes absorbances (ou concentrations) d'une valeur seuil que le spectrophotomètre ne peut dépasser. On note sur la *figure 3* la présence d'une asymptote (ou un plateau) pour les hautes concentrations. On parle de phénomène de « saturation de l'absorbance ». En effet, à la limite, pour une absorbance infinie, il n'y a plus d'intensité transmise liée au soluté, mais il reste néanmoins les intensités correspondant à l'intensité parasite (lumière parasite et courant d'obscurité). L'expression de la valeur à la saturation A_{sat} peut s'obtenir à partir de l'équation (6) comme :

$$A_{sat} = \log\left(\frac{1+f_{par}}{f_{par}}\right) \approx -\log(f_{par}) \quad (7)$$

La « saturation de l'absorbance » ne correspond ni à une saturation du détecteur (celui-ci ne reçoit au contraire que très peu de photons) ni à une limite fondamentale de la loi de Beer Lambert, mais à une intensité transmise par l'échantillon trop faible devant l'intensité parasite. La confusion entre limite instrumentale et fondamentale vient certainement que toutes deux sont la conséquence d'une forte concentration en espèce. Toutefois, expérimentalement, on note que la limite instrumentale apparaît pour des concentrations (ou absorbances) nettement plus faibles que pour la limite fondamentale. La présence d'un plateau est de manière prédominante la conséquence d'une intensité parasite. Toutefois, la qualité du détecteur et du traitement du signal peut aussi avoir une influence, notamment pour des fortes absorbances. En effet, le signal électronique de mesure du détecteur possède un bruit photométrique, même en l'absence d'une quelconque transmission. Si un traitement du signal est réalisé par un convertisseur analogique numérique en mettant par exemple à zéro les valeurs négatives, il s'ensuit une moyenne décalée vers le haut car les points négatifs seront remontés à zéro. Par conséquent, même si le taux de lumière parasite est nul et le courant d'obscurité parfaitement réglé à zéro, un plateau lié à la fois au bruit photométrique et au type de traitement du signal peut être observé.

Le phénomène limitant majoritaire est donc souvent l'intensité parasite plus que l'absorption de manière indépendante de la lumière ou l'éventuelle formation d'agrégats. Pour s'en persuader, deux types d'expériences peuvent être réalisés sur plusieurs spectrophotomètres de caractéristiques et qualités différentes (simple ou double monochromateur notamment) : une gamme d'étalonnage avec des concentrations en espèces élevées pour les échantillons les plus concentrés, et un suivi cinétique d'une réaction d'ordre 0 avec une absorbance initiale très élevée. Pour ces études, les spectrophotomètres choisis sont :

- spectrophotomètre 1 monofaisceau (MF), muni d'un simple monochromateur (SM) et d'un détecteur de type CCD ;
- spectrophotomètre 2 et 2' monofaisceau (MF), muni d'un simple monochromateur (SM) et d'un détecteur de type photodiode ;

- spectrophotomètre 3 double-faisceau (DF), muni d'un simple monochromateur (SM) et d'un détecteur de type photodiode ;

- spectrophotomètre 4 double-faisceau (DF), muni d'un double monochromateur (DM) et d'un détecteur de type PMT. Les spectrophotomètres 2 et 2' diffèrent par la nature de leur monochromateur et des différences de sensibilité des photodiodes.

Si les résultats des expériences sont identiques sur les différents spectrophotomètres, alors la perte de linéarité de la loi de Beer-Lambert est imputable à une limite fondamentale. Si tel n'est pas le cas, il s'agit alors d'une limite instrumentale et il est alors intéressant de voir si l'on retrouve les courbes théoriques données sur la *figure 3*. L'étendu des domaines de linéarité peut également être étudié en fonction des appareils et ainsi confirmer ou infirmer la croyance qui veut que la loi de Beer-Lambert n'est plus valable pour une absorbance supérieure à l'unité.

Expérience 1 : gamme d'étalonnage

Une étude a été menée [11], par exemple avec la molécule de bleu brillant dont le spectre d'absorption est donné sur la *figure 4* et présente un maximum à 630 nm. Une gamme de concentration la plus large possible de ce composé a été préparée (0 - 0,10 g.L⁻¹) et les spectres des différentes solutions successivement enregistrés sur les différents spectrophotomètres (1 à 4). L'évolution de l'absorbance à 630 nm en fonction de la concentration pour chacun des appareils est donnée sur la *figure 5*. On note que les résultats diffèrent selon les spectrophotomètres et on retrouve de plus pour la quasi-totalité d'entre eux (sauf le 4) une allure de courbe comme indiquée à la *figure 3* avec la présence d'une asymptote horizontale. Ceci montre bien par l'expérience que la perte de linéarité de la loi de Beer-Lambert est due à une limitation instrumentale et plus précisément l'intensité parasite (lumière parasite + courant d'obscurité).

Seul le spectrophotomètre 4 ne présente pas le comportement prévu car pour des valeurs de concentrations supérieures à 4,5.10⁻² g.L⁻¹, l'appareil indique une absorbance de 10 totalement incohérente avec les autres valeurs d'absorbance et très largement supérieure aux valeurs précédentes. Ce comportement peut être attribué soit à une forte imprécision sur le courant d'obscurité, soit à une correction de non-linéarité.

Comme explicité précédemment, la valeur à la saturation A_{sat} est imputable à l'intensité parasite. À partir des courbes de linéarité de la *figure 5*, il est possible de déterminer la valeur maximale d'absorbance pouvant être atteinte en évaluant grâce à une régression linéaire sur les quatre derniers points correspondant aux concentrations les plus élevées. Connaissant cette valeur, il est alors possible de revenir au taux d'intensité parasite à partir de l'équation (7) :

$$f_{par} = 10^{-A_{sat}} \quad (8)$$

$$f_{par}(\text{en } \%) = 10^{-(A_{sat}-2)} \quad (9)$$

On note alors que le spectrophotomètre 3 est celui qui présente le taux d'intensité parasite le plus faible avec une valeur de 0,0063 %. Cette valeur est très faible car celui-ci est muni d'un monochromateur à très faible taux de lumière parasite, ce qui lui permet ainsi de mesurer des absorbances relativement élevées allant jusqu'à 4,2 à 630 nm. Cette valeur de taux d'intensité parasite est respectivement 24 et 125 fois inférieure à celle obtenue pour les spectrophotomètres 2 et 1.

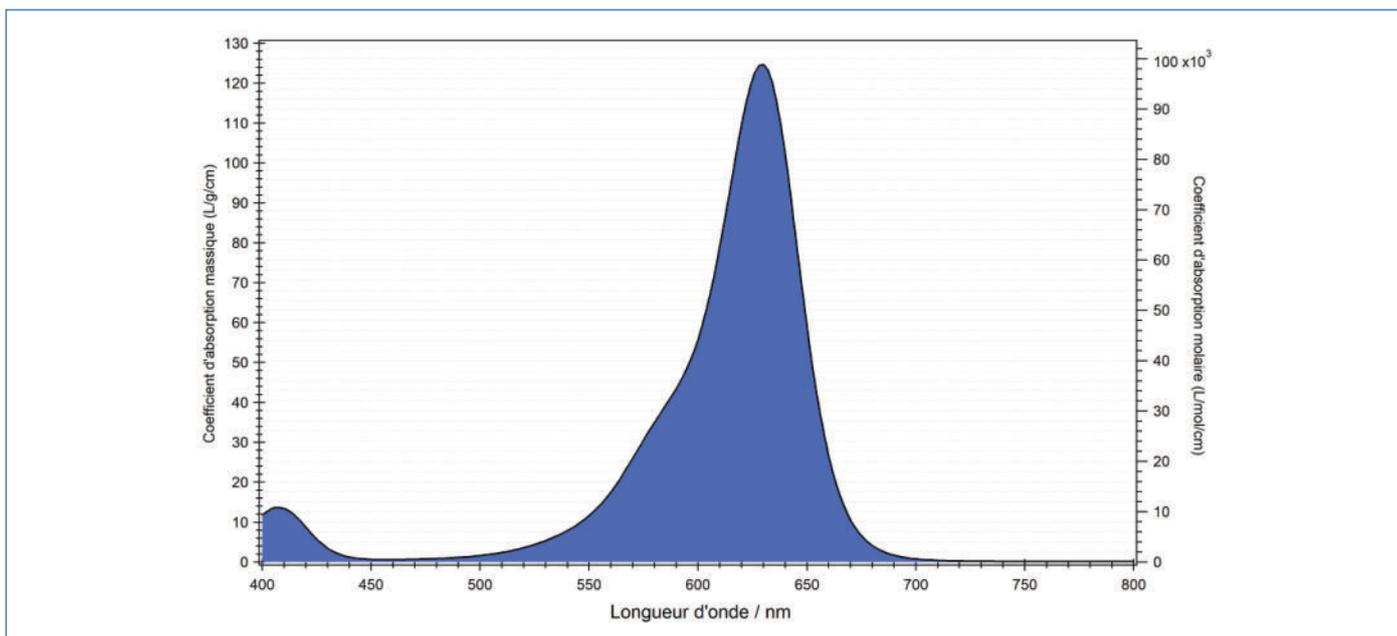


Figure 4 - Spectre d'absorption du bleu brillant.

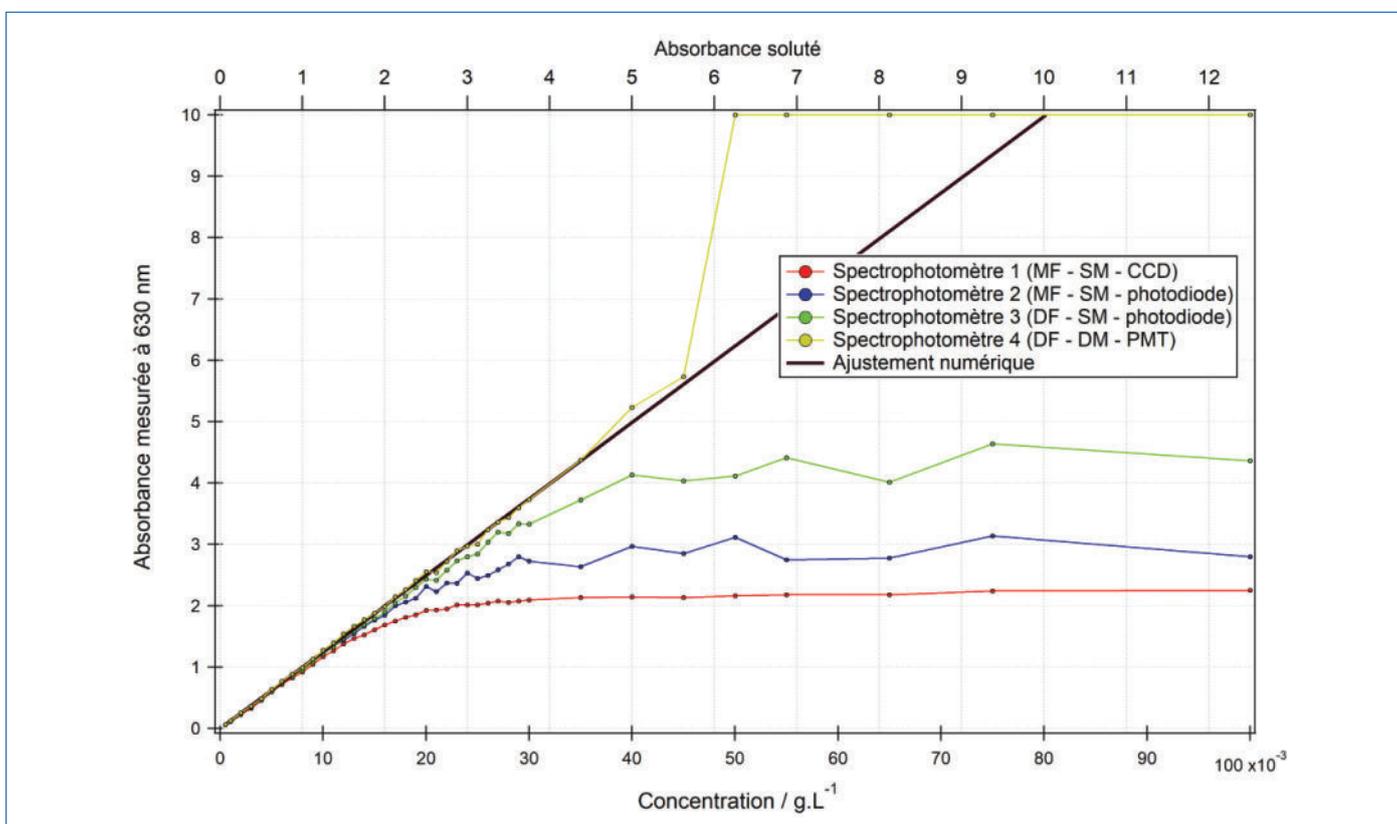


Figure 5 - Droite d'étalonnage à 630 nm dans le cas de quatre spectrophotomètres (1 à 4) et ajustement numérique.

Ceci conduit à des valeurs d'absorbance maximales pour ces deux derniers appareils respectivement de 2,8 ($f_{\text{par}} = 0,15 \%$) et 2,1 ($f_{\text{par}} = 0,79 \%$) à 630 nm. L'importance de la qualité du monochromateur est ici mise en exergue en sus de la sensibilité de détection liée au type de détecteur. Le spectrophotomètre 2 muni d'une photodiode plus sensible qu'une CCD peut également expliquer les résultats obtenus. Aucune discussion n'est en revanche possible sur le courant d'obscurité car celui-ci n'est connu que du fournisseur. Il est également à noter que pour le spectrophotomètre 4, le taux de lumière parasite devrait être inférieur à celui du spectrophotomètre 3

car il est muni d'un double monochromateur et que le détecteur est très sensible (PMT).

Sachant que la sensibilité du détecteur n'est pas la même suivant les différentes longueurs d'onde et que la(es) source(s) lumineuse(s) ne possèdent pas une émission homogène sur toute la gamme de longueur d'onde, des différences en termes de taux de lumière parasite peuvent être observées selon les longueurs d'onde. Pour le vérifier, l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration pour plusieurs longueurs d'onde peut être tracée (figure 6 dans le cas du spectrophotomètre 2). On note ainsi pour des longueurs

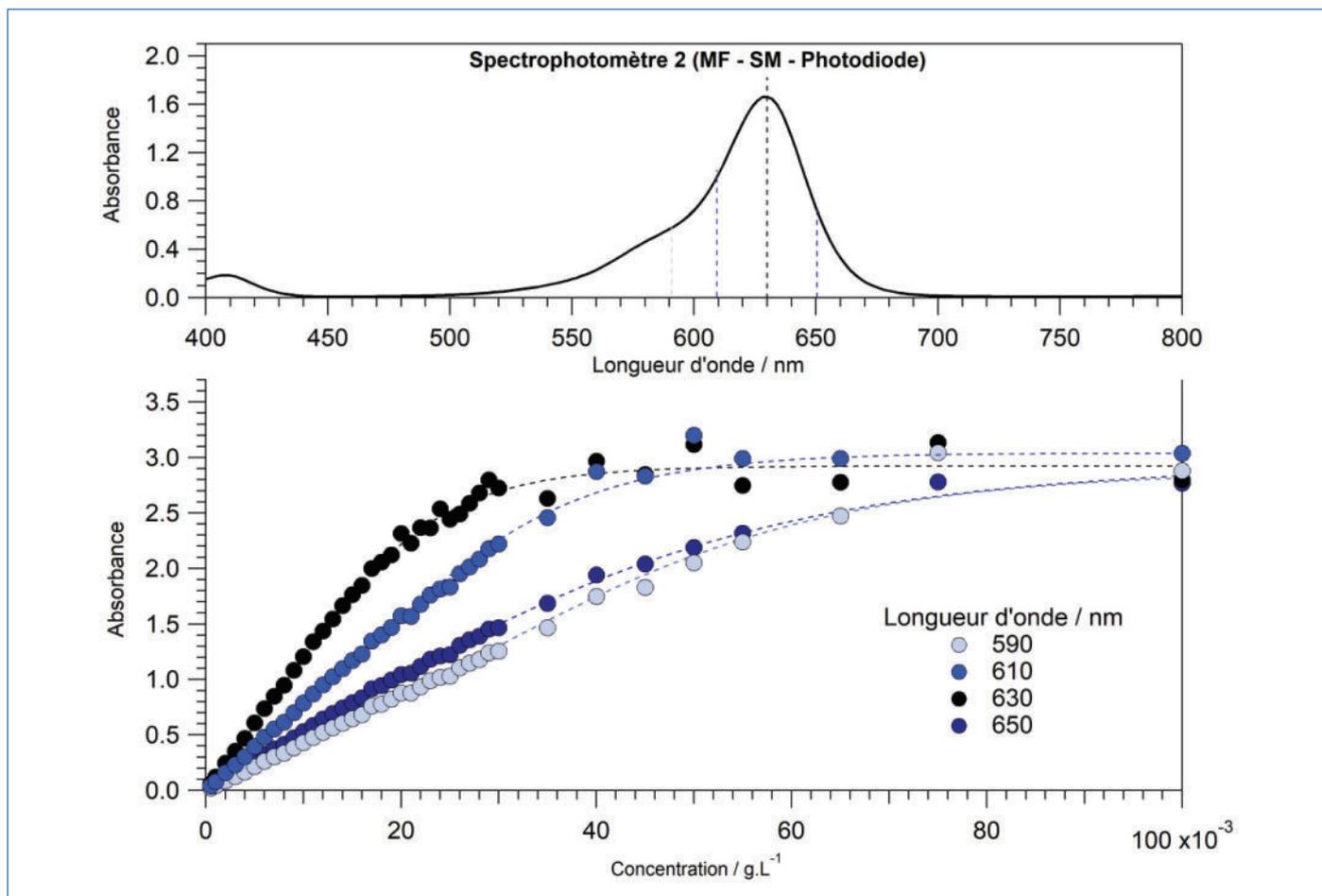


Figure 6 - (En haut) spectre d'absorption du bleu brillant et (en bas) évolution de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde en fonction de la concentration pour le spectrophotomètre 2.

d'onde de 590, 610, 630 et 650 nm de légères différences en termes de valeurs d'absorption à saturation A_{sat} et donc de taux d'intensité parasite (imputable principalement à la lumière parasite). Ces différences peuvent être plus importantes dans d'autres gammes de longueur d'onde comme nous le verrons plus loin.

Dans tous les cas, on note que le domaine de linéarité ne se limite pas au domaine d'absorbances [0,1]. Pour évaluer celui-ci, un ajustement numérique a été réalisé sur le spectrophotomètre 4 pour des concentrations allant de 0 à $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. Cet ajustement correspond à la droite noire de la figure 5. Cette droite de linéarité est une droite théorique, et les courbes des spectrophotomètres la suivraient parfaitement s'ils avaient un faisceau parfaitement monochromatique (donc un taux de lumière parasite de 0%), un détecteur capable de mesurer les signaux extrêmement faibles et un réglage de courant d'obscurité de détecteur précis.

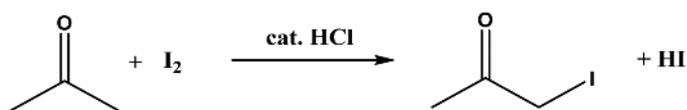
On note alors qu'il existe un domaine de linéarité commun à l'ensemble des spectrophotomètres entre des absorbances allant de 0 à 1,4 environ. Toutefois pour des valeurs supérieures à 1,4, il apparaît que l'absorbance n'est plus linéaire pour le spectrophotomètre 1. Une perte de linéarité similaire est observée à 2,0 et 2,8 respectivement pour les spectrophotomètres 2 et 3. En revanche, pour le spectrophotomètre 4, la perte de linéarité s'opère pour une absorbance d'environ 4,4. L'appréciation de la « zone de perte de linéarité » est très subjective et très difficile à estimer à l'œil, en raison de l'effet logarithmique des absorbances et de notre tendance à visualiser le début de non-linéarité à partir d'un même écart de la droite noire au lieu de tenir compte de l'expansion

d'échelle. Les valeurs données précédemment sont néanmoins cohérentes avec les valeurs de taux d'intensité parasite. En effet, la zone de début de perte de linéarité se situe à chaque fois aux alentours de 30% en-dessous de l'asymptote : 33% pour le spectrophotomètre 3, 29% pour le spectrophotomètre 2 et 30% pour le spectrophotomètre 1. Ce domaine de linéarité est également dépendant de la longueur d'onde de suivi comme nous pouvons le voir sur la figure 6 avec une valeur maximale pour le domaine de linéarité de 1,7 à 590 nm, 2,2 à 610 nm, 2,0 à 630 nm et 1,9 à 650 nm.

L'étude des domaines de linéarité confirme donc bien que la croyance qui veut que la loi de Beer-Lambert n'est plus valable pour une absorbance supérieure à l'unité est infondée.

Expérience 2 : suivi cinétique

Une autre façon de montrer que le phénomène responsable de la perte de linéarité est l'intensité parasite est d'étudier la réaction d'iodation de l'acétone en milieu acide [12-13], dont l'équation de réaction est la suivante :



La vitesse de la réaction est d'ordre 1 par rapport aux ions hydronium H^+ et à l'acétone et le diiode n'intervient pas dans cette vitesse (ordre 0) car il n'est pas mis en jeu dans l'étape cinétiquement déterminante :

$$v = k[\text{H}^+][\text{acétone}]$$

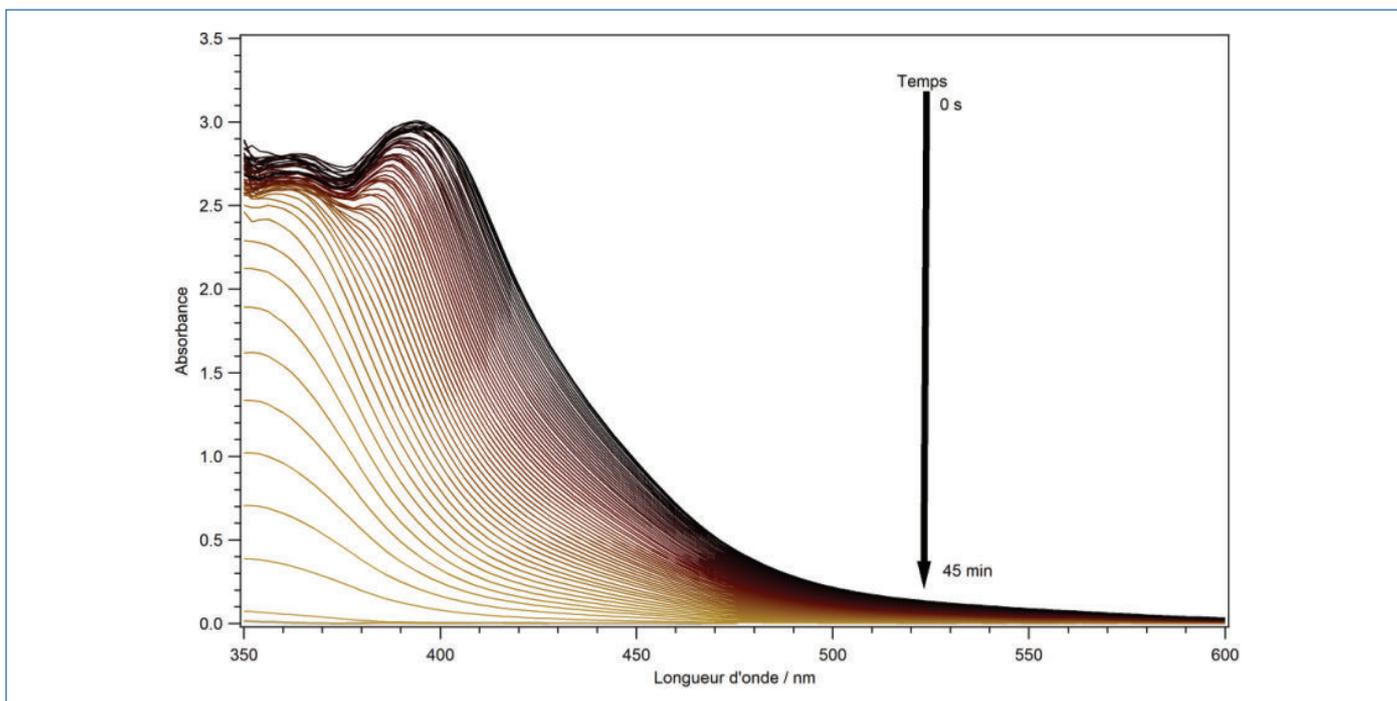


Figure 7 - Évolution des spectres d'absorption au cours de la réaction d'iodation de l'acétone (1 ml de HCl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 1 ml de I_2 à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ + 2 ml d'acétone à 2 mol.L^{-1}) dans le cas du spectrophotomètre 2'.

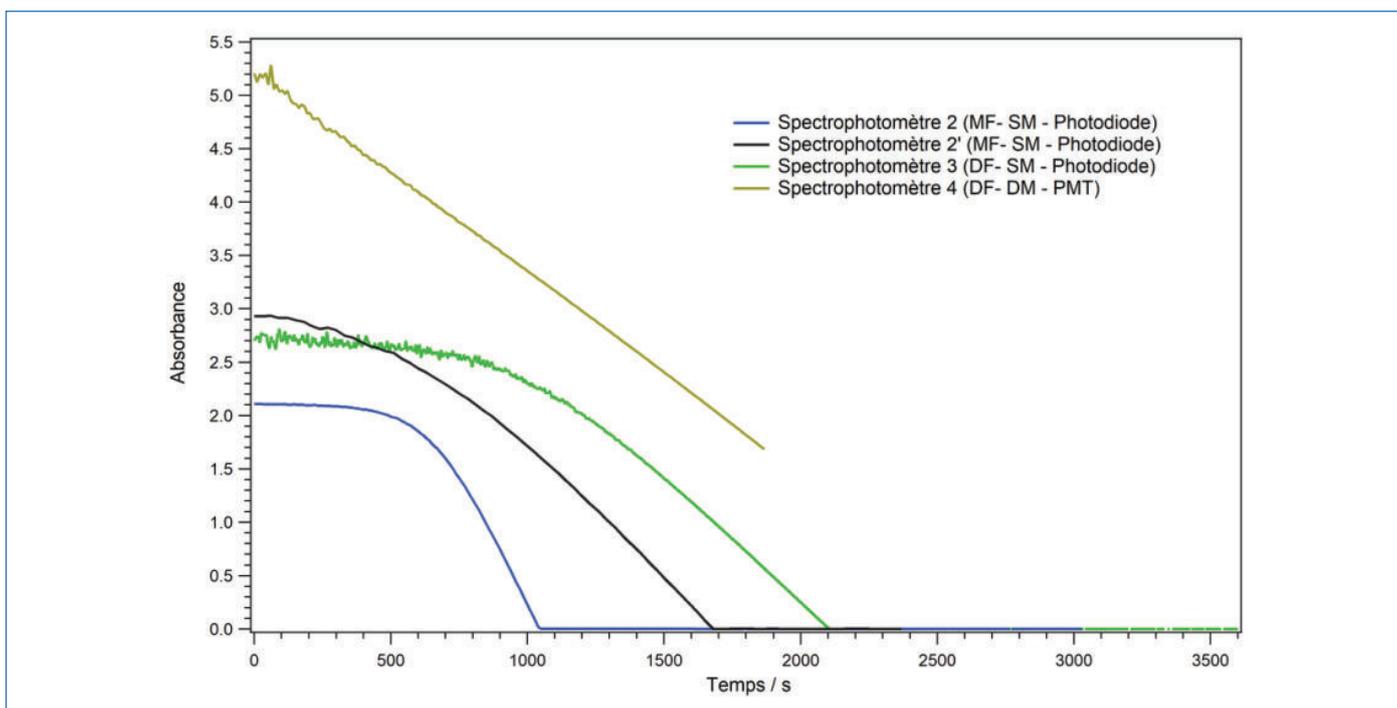


Figure 8 - Suivi cinétique de la réaction de l'iodation de l'acétone (1 ml de HCl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 1 ml de I_2 à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ + 2 ml d'acétone à 2 mol.L^{-1}) sur plusieurs spectrophotomètres.

En se plaçant en dégénérescence de l'ordre par rapport à H^+ et l'acétone, le vitesse de la réaction est alors d'ordre 0 :

$$v = k \text{ avec } K = k[\text{H}^+]_0 [\text{acétone}]_0$$

avec $[\text{H}^+]_0$ et $[\text{acétone}]_0$ les concentrations initiales en H^+ et acétone.

Un suivi spectrophotométrique de cette réaction lors de l'ajout de 1 ml de HCl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à une solution constituée de 1 ml de I_2 à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et 2 ml d'acétone à 2 mol.L^{-1} est donné sur la figure 7 dans le cas du spectrophotomètre 2'. Les propriétés d'absorption entre 350 et 600 nm de la solution sont uniquement dues au diiode I_2 . On note en effet une diminution progressive en fonction du temps de l'absorption

jusqu'à l'obtention d'une valeur nulle de l'absorbance sur toute la gamme de longueur d'onde après 45 minutes. Le maximum du spectre d'absorption à $t = 0$ est évalué à 400 nm. Pour un ordre 0, l'évolution théorique de l'absorbance en fonction du temps est une droite : la concentration de I_2 évolue de manière affine avec le temps ($C = C_0 - Kt$, avec C_0 la concentration initiale). Toute déviation de cette droite correspond donc à une déviation de la loi de Beer-Lambert. Partant d'absorbance initiale A_0 très élevée, il est alors possible d'observer les différences en termes de suivi spectrophotométrique à 400 nm sur différents spectrophotomètres (2, 2', 3 et 4). Les résultats, donnés sur la figure 8, diffèrent selon le spectrophotomètre. On retrouve de plus, pour la totalité des

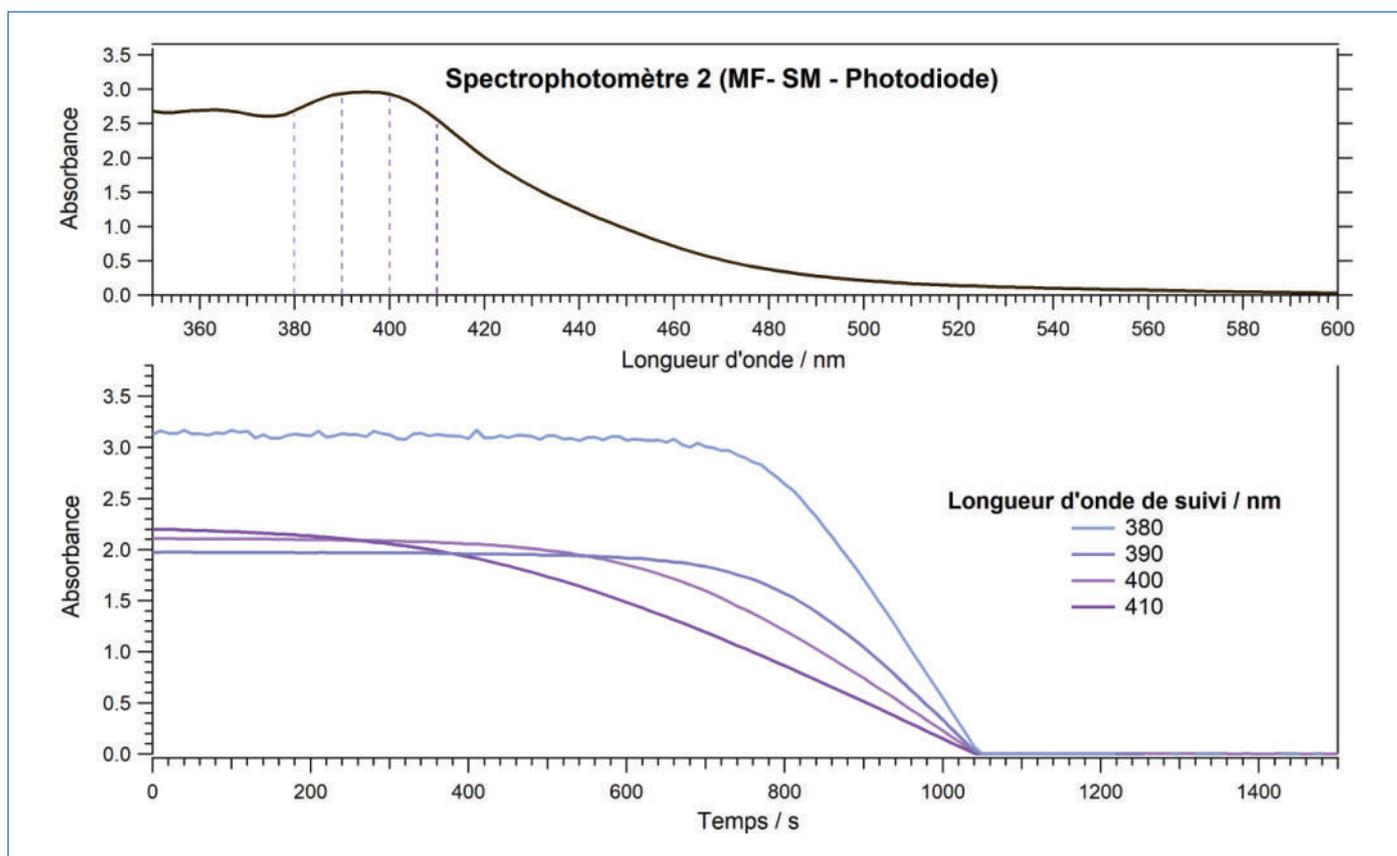


Figure 9 - (En haut) spectre d'absorption de la solution à $t = 0$ s et (en bas) suivi cinétique de la réaction avec le spectrophotomètre 2 à plusieurs longueurs d'onde.

spectrophotomètres, une allure de courbe comme indiquée à la *figure 3* avec la présence d'une asymptote horizontale (même si celle-ci est moins marquée dans le cas des spectrophotomètres 2' et 4) aux fortes concentrations (absorbances) et un comportement affine dès que la concentration en I_2 diminue (faibles absorbances). Ceci montre une nouvelle fois par l'expérience que la perte de linéarité de la loi de Beer-Lambert est due à une limitation instrumentale, et plus précisément l'intensité parasite.

Les différences observées entre les cinétiques obtenues peuvent être interprétées de la manière suivante : 1. les pentes dans les zones où l'absorbance est linéaire avec le temps peuvent être imputées à des différences de température dans les compartiments échantillons des spectrophotomètres (ces différences restent faibles sauf pour le spectrophotomètre 2), et 2. l'intensité parasite pour chaque spectrophotomètre à 400 nm. Ce dernier point s'avère même vrai pour deux spectrophotomètres (2 et 2') proches en termes de caractéristiques (monofaisceau à simple monochromateur et muni d'une photodiode) mais dont la nature du monochromateur diffère notamment. Comme explicité au paragraphe précédent, la valeur à la saturation A_{sat} permet d'accéder au taux de lumière parasite totale. Il apparaît que dans cette gamme de longueur d'onde autour de 400 nm, le spectrophotomètre 4 muni d'un double monochromateur et d'un PMT présente le taux d'intensité parasite le plus faible (0,0006 %). Les autres spectrophotomètres munis d'un simple monochromateur possèdent quant à eux des taux d'intensité parasite très différents les uns des autres selon la nature de celui-ci : spectrophotomètre 2 (0,80 %), 2' (0,12 %) et 3 (0,20 %). Comme pour l'expérience 1, l'évolution de l'absorbance en fonction du temps peut être suivie pour plusieurs longueurs d'onde (*figure 9* dans le cas du spectrophotomètre 2). On note

ainsi pour des longueurs d'onde de 380, 390, 400 et 410 m de légères différences en termes de valeurs d'absorption à saturation A_{sat} et donc de taux d'intensité parasite. Ce dernier se trouve être le plus faible, dans le cas du spectrophotomètre 2, pour une longueur d'onde de 380 nm.

Comme dans le cas de l'expérience 1, une étude des domaines de linéarité peut être effectuée et on note une perte de linéarité pour les différents spectrophotomètres à 400 nm pour des valeurs d'absorbance de 1,2 pour le spectrophotomètre 2, 1,7 pour le spectrophotomètre 2', 2,0 pour le spectrophotomètre 3 et 4,6 pour le spectrophotomètre 4. Dans le cas du spectrophotomètre 2, les valeurs maximales sont également différentes selon les longueurs d'onde (*figure 9*) : 2,4 à 380 nm, 1,1 à 390 nm, 1,2 à 400 nm et 1,6 à 410 nm.

L'étude des domaines de linéarité confirme bien une nouvelle fois que la croyance qui veut que la loi de Beer-Lambert n'est plus valable pour une absorbance supérieure à l'unité est infondée.

De l'importance de comprendre les origines d'une mesure et les limites instrumentales

Pour celles et ceux qui en doutaient encore, les expériences 1 et 2 menées sont assez claires : la perte de linéarité de la loi de Beer-Lambert obtenue expérimentalement est généralement due à une limitation d'ordre instrumental et non fondamental. L'intensité parasite (lumière parasite liée au recouvrement des ordres et courant d'obscurité) est le facteur prédominant la plupart du temps. Ceci se manifeste par la présence d'un phénomène de « saturation de l'absorbance » (asymptote horizontale) lorsque l'on augmente la concentration en l'espèce d'intérêt. La valeur à la saturation A_{sat} est généralement assez éloignée de 1 si bien que le domaine de

linéarité de la loi de Beer-Lambert ne se limite pas au domaine d'absorbance [0, 1]. Elle permet également d'avoir directement accès au taux d'intensité parasite.

Mais alors, d'où vient cette croyance d'une absorbance égale à 1 comme limite fondamentale de la loi de Beer-Lambert ? Certainement parce que d'une part, si limite fondamentale il doit y avoir, alors celle-ci s'exprimerait dans les mêmes conditions que pour la limitation instrumentale : à forte concentration en espèce. L'amalgame entre limitation fondamentale et instrumentale est alors vite fait. À cela s'ajoute l'utilisation en règle générale de spectrophotomètres de paillasse bon marché avec des gammes dynamiques de l'ordre de 1 et un taux d'intensité parasite de l'ordre de 10 % (en gardant à l'esprit qu'il est néanmoins peu probable que cette valeur de 1 soit la valeur à saturation pour toutes les longueurs d'onde). Les résultats de cet article en sus d'infirmer par l'expérience cette croyance d'une limitation de la loi de Beer-Lambert à une absorbance de 1 permettent de mettre en exergue l'importance de la compréhension des origines d'une mesure et des limites instrumentales inhérentes à celle-ci. Ceci dépasse bien sûr le cadre de la seule spectrophotométrie UV-visible qui a fait l'objet de cet article.

Les auteurs remercient Franck Bussotti, directeur général de SAFAS (Société Anonyme de Fabrication d'Appareils Scientifiques) – l'entreprise ayant inventé en 1958 les premiers spectrophotomètres UV-visible à monochromateur à réseau – pour ses réponses précises et claires à leurs questions et la relecture attentive de cet article, ainsi que l'Union des professeurs de physique et de chimie (UdPPC), cet article reprenant plusieurs éléments théoriques des articles du BUP (2021, n° 1037, p. 909-925).

(1) En effet, les cuves spectrophotométriques possèdent généralement une épaisseur de 1 cm et cela rend la manipulation des valeurs de coefficients d'absorption molaire plus aisée. L'utilisation des unités SI conduit à diviser les coefficients d'absorption molaire usuels par 100 000.

(2) En chimie analytique, on parle de matrice.

(3) Un réseau échelette est un réseau en réflexion qui présente un profil en forme de dent de scie d'où son nom.

[1] A. Beer, Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten, *Annalen der Physik und Chemie*, **1852**, 162(5), p. 78-88.

[2] J.H. Lambert, *Photometria Sive De Mensura Et Gradibus Luminis, Colorum et Umbræ*, Eberhardt Klett., Augsburg (All.), **1760**.

[3] P. Bouguer, *Essai d'optique sur la gradation de la lumière*, Claude Jombert, Paris, **1729**, p. 16-22.

[4] Programme de physique-chimie de première générale, *Bulletin officiel spécial n° 1* du 22 janvier **2019**.

[5] Programme de physique-chimie de terminale générale, *Bulletin officiel spécial n° 8* du 25 juillet **2019**.

[6] J. Randon, J. Piard, S. Guy, Comment l'information jaillit de la lumière : retour sur les notions cachées liées à une « mesure d'absorbance », *L'Act. Chim.*, **2020**, 455, p. 52-58.

[7] S. Clède, Dosage par spectroscopie infrarouge, *Le BUP*, **2021**, 1031, p. 219-232.

[8] J. Piard, *Chimie générale expérimentale : tout pour réussir les TP aux concours*, De Boeck Sup., **2018**.

[9] H. Trad, Développement de la technique de spectroscopie d'absorption UV, pour l'étude de l'émission de NO dans la chambre de combustion d'un moteur à allumage commandé, Thèse, Université d'Orléans, **2004**.

[10] J. Piard, J. Randon, L'absorbance : comment rendre sa compréhension plus lumineuse aux yeux des apprenant-es, *Le BUP*, **2021**, 1037, p. 909-925.

[11] J. Piard, J.-P. Placial, C. Doré, Discussion sur les limites de loi de Beer-Lambert, *Le BUP*, **2022**, 1048, p. 1043-56.

[12] J. Girard, F. Girard, Iodation de l'acétone : étude cinétique de la catalyse acido-basique, in *Chimie inorganique et générale*, De Boeck, **2015**, p. 177-187.

[13] C. Baillet, M. Hanaeur, Cinétique chimique suivie par spectrophotométrie : action du diode sur la propanone, *Le BUP*, **1994**, 762, p. 447-453.

Jonathan PIARD, professeur agrégé, et **Clément DORÉ**, technicien, Département d'Enseignement et de Recherche (DER) de Chimie, ENS Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

* jonathan.piard@ens-paris-saclay.fr ;
clement.dore@ens-paris-saclay.fr



L'Union des professeurs de physique et de chimie

Vous présente

son nouveau site : <http://www.udppc.asso.fr>

L'association	Espaces collège et lycée
L'UdPPC ?, Tarifs, Enquêtes,	Actualités, Les journées... Ressources
Charte graphique, Olympiades,	Espace labo
Partenaires, Positions, Nous soutenons	Actualités, Ressources
Publications	Divers
Le Bup, Nous avons lu,	Agenda, congrès, réseaux sociaux,
L'arpenteur du web, Appel aux auteurs,	Sites académiques
Parus au BO, Ressources	

...la publication numérique mensuelle avec impression papier trimestrielle



...la consultation du Bup en ligne par articles et par numéro avec BupDoc

Du 1^{er} janvier au 31 décembre 2023 :

- ◆ Pour tous : 1907 → 2018
- ◆ Pour les abonnés : 2019 → 2023



...un congrès organisé chaque année par une académie différente



Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS
Tél. : 01 40 46 83 80 - secretariat.national@udppc.asso.fr

