

1. Analyse quantitative

1.1 Choix de la longueur d'onde de travail

Lors de la mesure de l'absorbance d'un composé chimique donné pour déterminer sa concentration (qui est l'inconnue), il est fortement conseillé de choisir la longueur d'onde λ_{max} . Cette dernière correspond à une absorbance maximale A_{max} (ou encore ϵ_{max}). Le choix de λ_{max} est justifié par la nécessité de minimiser l'incertitude sur l'absorbance. Il faut savoir que lorsqu'on mesure la concentration d'une substance, on considère un rayonnement UV-Visible parfaitement monochromatique (une seule λ). En réalité, ce rayonnement incident n'est pas parfaitement monochromatique, il est formé d'une bande passante. Cette dernière est constituée d'un intervalle de longueur d'onde $\Delta\lambda$. Ainsi, cette incertitude sur la longueur d'onde va se répercuter sur l'absorbance mesurée. Le choix de la longueur d'onde de travail est illustré sur le graphe ci-dessous.

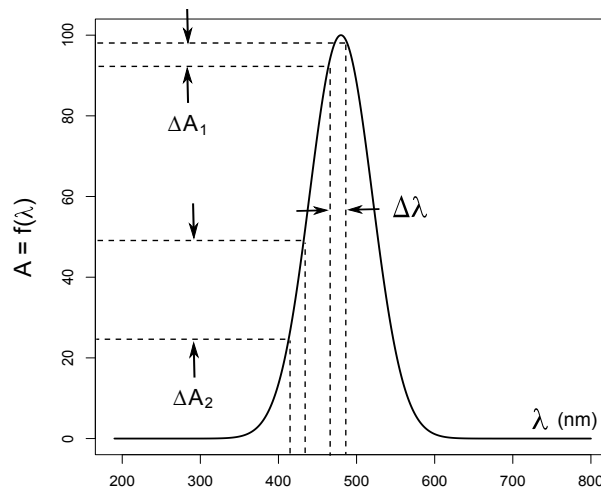


FIGURE 1: Effet de l'incertitude $\Delta\lambda$ sur la mesure de l'absorbance

Comme le montre clairement ce graphique, plus la longueur d'onde est choisie au voisinage du maximum d'absorption, plus l'incertitude sur l'absorbance est faible. Pour une même bande passante $\Delta\lambda$, nous avons $\Delta A_1 < \Delta A_2$, d'où le choix de λ_{max} . Le choix de la longueur d'onde de travail impacte également la *sensibilité*¹ du spectrophotomètre. La sensibilité peut être vue comme le pouvoir de discrimination de l'absorbance pour une très faible variation de la concentration de la substance. Plus le spectrophotomètre détecte des variations significative de l'absorbance générées par d'infimes variations de la concentration, plus l'appareil en question est sensible. Cette définition se traduit mathématiquement par la relation² :

$$\frac{dA}{dc} = l \epsilon(\lambda) \quad (1)$$

La Gaussienne est maximale pour $\lambda = \lambda_0$, usuellement on note $\lambda_0 = \lambda_{max}$. Ceci implique une dérivée maximale pour la relation (2) :

$$\frac{dA}{dc} = l \epsilon(\lambda = \lambda_{max}) \quad (2)$$

On comprend ainsi que lorsque $\lambda = \lambda_{max}$, la sensibilité du spectrophotomètre devient maximale.

1. La sensibilité influe directement sur la limite de détection et de quantification du spectrophotomètre. Cet aspect est discuté à la fin du chapitre.

2. La pente de la loi de Beer-Lambert correspond à la sensibilité.

1.2 Détermination de la concentration

1.2.1 Analyse monocomposant

1ère méthode - connaissons la valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ_λ de la substance, au moyen de la loi de Beer-Lambert, on calcule la concentration inconnue avec :

$$C_x = \frac{A_x(\lambda = \lambda_{max})}{\epsilon_\lambda l} \quad (3)$$

Avec, $A_x(\lambda = \lambda_{max})$ est l'absorbance mesurée, à la longueur d'onde de travail λ_{max} de la substance x .

2ème méthode : dans le cas où l'on connaît pas la valeur de ϵ_λ . La concentration inconnue C_x sera déterminée par comparaison avec un étalon (de concentration connue C_0). On mesure l'absorbance de la substance A_x et pour l'étalon aussi A_0 . La concentration inconnue est calculée selon :

$$C_x = C_0 \times \frac{A_x}{A_0} \quad (4)$$

Néanmoins, il faudra s'assurer du domaine de validité de la loi de Beer-Lambert et vérifier qu'on a bien une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration.

3ème méthode : nous avons également la possibilité de calculer cette concentration à partir de la préparation d'une gamme d'étalons. Cette préparation est conduite en diluant une solution mère en plusieurs solutions filles.

$$\begin{cases} A_0 = \epsilon_\lambda l C_0 \\ A_1 = \epsilon_\lambda l \left(\frac{C_0}{k} \right) \\ A_2 = \epsilon_\lambda l \left(\frac{C_0}{2k} \right) \\ A_3 = \epsilon_\lambda l \left(\frac{C_0}{3k} \right) \end{cases} \quad (5)$$

Pour chaque solution on mesure son absorbance. On obtient ainsi une série de couples (C_i, A_i) que l'on peut porter sur un graphique. La droite de régression permet de vérifier, dans la gamme des absorbances considérées, la linéarité de la loi de Beer-Lambert. Elle tient compte aussi des erreurs d'expérimentation. Rappelons que cette loi n'est valable que pour des solutions diluées. Deux inconvénients majeurs peuvent survenir quand on utilise des solutions concentrées :

- Les molécules forment des agglomérats dont l'absorption du rayonnement incident est différente de celle de la molécule isolée. Dans ce cas aussi, la contribution du flux diffusé est importante par rapport au flux absorbé (effet de la taille).
- Saturation du photo-détecteur du spectrophotomètre. Il en ressort donc si l'absorbance mesurée est supérieure à 2, il est fortement recommandé de diluer encore la solution.

1.2.2 Analyse multicomposants - Régression linéaire multiple

la régression linéaire multiple constitue un autre outil permettant la réalisation d'une analyse multicomposants. Considérons comme précédemment un mélange (M) de deux composés A et B. De façon analogue, nous désirons déterminer la concentration des deux composés dans le mélange M. Tenant compte de la loi d'additivité des absorbances, celle du mélange s'écrit :

$$A_M = (\epsilon_A C_A + \epsilon_B C_B) l \quad (6)$$

On mesure expérimentalement cette absorbance, ensuite, il faudra préparer deux solutions des composés A et B pris individuellement. Ces solutions feront office d'étalons (références), ainsi leurs concentrations sont connues C_A^{ref} et C_B^{ref} . Les absorbances, mesurées expérimentalement, des composés purs A et B servent à calculer ϵ_A et ϵ_B :

$$\begin{cases} A_A^{ref} = \epsilon_A l C_A^{ref} \\ A_B^{ref} = \epsilon_B l C_B^{ref} \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \epsilon_A = \frac{A_A^{ref}}{l C_A^{ref}} \\ \epsilon_B = \frac{A_B^{ref}}{l C_B^{ref}} \end{cases} \quad (7)$$

Substituons (8) dans (7) il vient :

$$A_M = \left(\frac{A_A^{ref}}{l C_A^{ref}} \times C_A + \frac{A_B^{ref}}{l C_B^{ref}} \times C_B \right) \times l \quad (8)$$

$$\Rightarrow A_M = \frac{A_A^{ref}}{C_A^{ref}} \times C_A + \frac{A_B^{ref}}{C_B^{ref}} \times C_B \quad (9)$$

En divisant (10) par A_A^{ref} (ou par A_B^{ref}) on obtient :

$$\underbrace{\left(\frac{A_M}{A_A^{ref}} \right)}_Y = \underbrace{\frac{C_B}{C_B^{ref}}}_a \times \underbrace{\left(\frac{A_B^{ref}}{A_A^{ref}} \right)}_X + \underbrace{\frac{C_A}{C_A^{ref}}}_b \quad (10)$$

En traçant la droite affine $Y = aX + b$, la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b) conduiront au calcul des concentrations C_A et C_B . Cette procédure implique la préparation de plusieurs étalons afin d'accroître la fiabilité des résultats.

Exercice d'application

On souhaite quantifier la concentration de deux composés A et B présents dans un mélange M. A cet effet, nous avons préparé des solutions de référence pour les composés A (4.50×10^{-3} mol/L) et B (4.50×10^{-3} mol/L) pris individuellement. Les absorbances ont été mesurées dans la gamme des longueurs d'onde 260 à 380 (nm). Les résultats de ces mesures spectrales sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

TABLE 1: Résultats des mesures

λ (nm)	A_A^{ref} (u.a.)	A_B^{ref} (u.a.)	A_M (u.a.)
260	0.08	0.24	0.35
280	0.12	0.16	0.28
300	0.26	0.26	0.60
320	0.38	0.42	0.88
340	0.62	0.58	1.22
360	0.18	0.64	0.90
380	0.10	0.48	0.70

1. Démontrer la relation :

$$\underbrace{\left(\frac{A_M}{A_A^{ref}}\right)}_Y = \underbrace{\frac{C_B}{C_B^{ref}}}_a \times \underbrace{\left(\frac{A_B^{ref}}{A_A^{ref}}\right)}_X + \underbrace{\frac{C_A}{C_A^{ref}}}_b \quad (11)$$

2. Déterminer les paramètres de l'équation ci-dessus.

3. Calculer les concentrations des composés A et B dans le mélange.

On donne :

$$a = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2} \quad b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{i=1}^n y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}$$