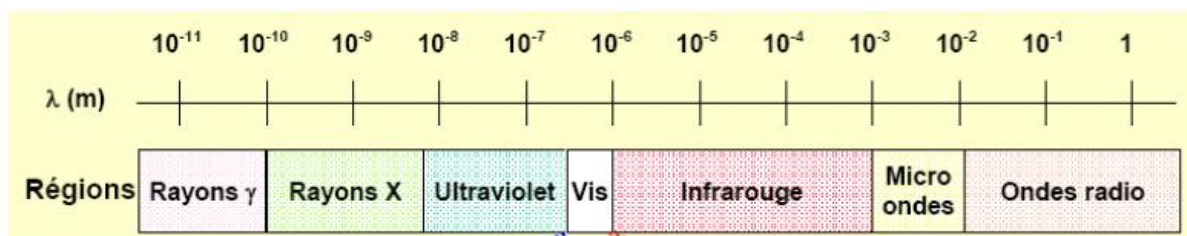


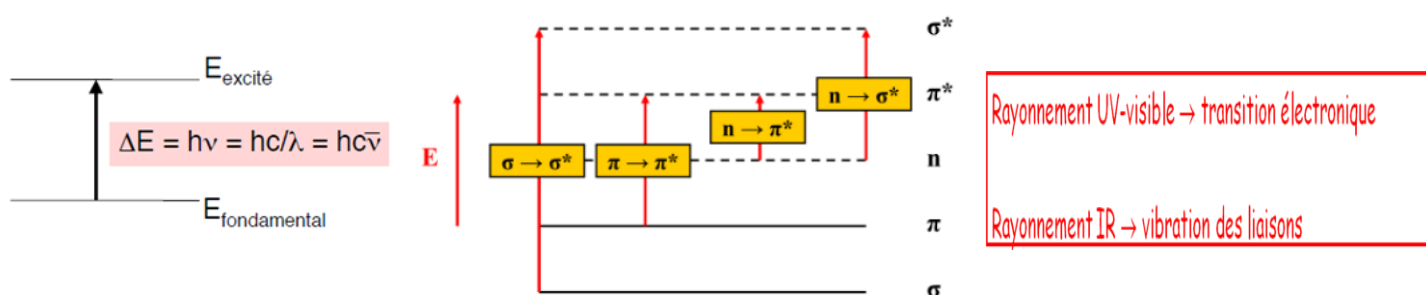
## TP N° 2 : Étalonnage d'un spectrophotomètre UV-Vis, Construction d'une courbe d'étalonnage et détermination d'une concentration

La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine UV (185 à 400 nm environ) et Visible (400 à 800 nm environ) est une technique courante de contrôle et d'analyse. Elle repose, pour les molécules organiques, sur des interactions entre les rayonnements électromagnétiques et les électrons des orbitales moléculaires, et plus spécifiquement des électrons p et des paires libres. On appelle alors « chromophore » les groupes fonctionnels insaturés porteurs de tels électrons (molécules, ions, polymères).



### I.1. Les différents types de transitions

Une molécule absorbera une radiation de fréquence  $\nu$  s'il existe des transitions nécessitant une énergie :



### I.2. Spectromètres UV/Visible

- Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance en fonction des longueurs d'ondes ( $\lambda$ ) repérées en abscisses.

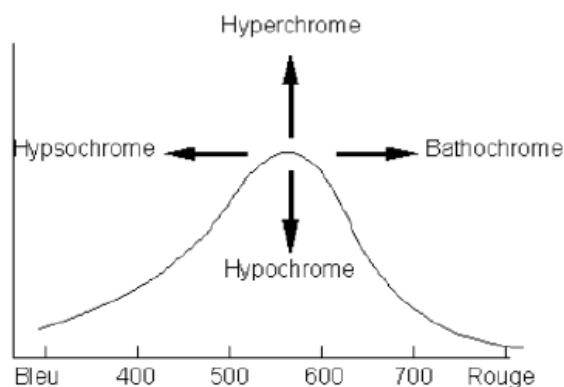
#### I.2.1. Détermination des chromophores :

-les chromophores détectés par les spectromètres UV-VIS ont généralement des liaisons doubles entre atomes de carbone ( $C=C$ ) ou des liaisons doubles ou triples entre un atome de carbone et un autre atome ( $C=O$ ,  $C \equiv N...$ )

-Si une molécule possède plusieurs chromophores isolés (n'interagissant pas l'un sur l'autre) parce que séparés par au moins deux liaisons simples, on observe la superposition des effets de chacun des chromophores isolés.

- Dans d'autres cas, les effets qui peuvent être observés sont :

Effet	Conséquences
Hypsochrome (Blue shift)	$\lambda_{\max}$ diminue
Bathochrome (Red shift)	$\lambda_{\max}$ augmente
Hyperchrome	$I_{\max}$ augmente
Hypochrome	$I_{\max}$ diminue



### I.3.1. Analyse quantitative

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui permet de mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique en solution présente dans le trajet du rayonnement. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière (dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert).

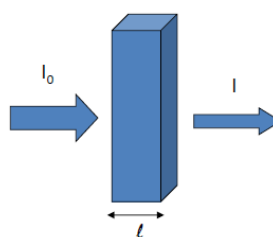
Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité  $I$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$

On définit l'absorbance (A) de la solution comme :

$$A = \epsilon l c = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

La transmittance définie par la relation :

$$T = \frac{I}{I_0}$$



**Loi de Lambert** : à une  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur

laquelle la lumière traverse la solution) :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l C$$

Avec :

$A_\lambda$  = absorbance de la solution pour une  $\lambda$ .

$C$  = concentration de l'espèce absorbante (en mol.L<sup>-1</sup>)

$l$  = longueur du trajet optique (en cm).

$\epsilon_\lambda$  = coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ; il rend compte de sa capacité à absorber la lumière à  $\lambda$ . il dépend de la température et de la nature du solvant.

### I.3.2. Absorbance:

L'absorbance (A), également appelée densité optique (DO), est la quantité de lumière absorbée par une solution. La transmittance est la quantité de lumière qui passe à travers une solution. Toute solution colorée absorbe certaines radiations de la lumière blanche. A l'aide d'un spectrophotomètre, il est possible de mesurer cette absorbance

#### Coefficient d'absorption molaire:

En chimie, le coefficient d'absorption molaire est une mesure de la force avec laquelle une espèce chimique absorbe, à une longueur d'onde donnée.

#### Conditions de validité : la loi de Beer-Lambert:

- une lumière monochromatique donnée ( $\lambda_{\text{max}}$ ).
- une concentration faible (Solution diluée) sinon  $A = f(c)$  n'est plus respectée.
- une solution limpide et homogène
- des molécules stables en solution et sous l'effet de l'irradiation.
- la cuve a longueur du 1cm
- Absence d'interférences avec d'autres espèces.

**I.3.3. Le graphique:** Le graphique représentant l'absorbance en fonction de la concentration, appelé droite (ou courbe) d'étalonnage, permet de déterminer la concentration d'une solution à partir de la mesure de l'absorbance de solutions de concentrations connues.

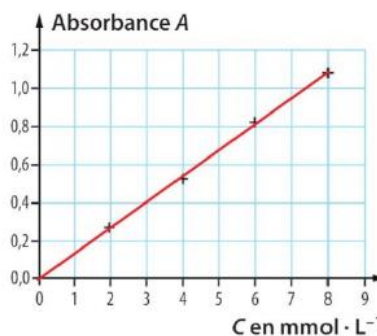
Doc. 9. Exemple de courbe d'étalonnage. La concentration de la solution inconnue doit être inférieure à celle de la solution étalon la plus concentrée.

#### Fonction de la courbe d'étalonnage

$$A = a \cdot C + b$$

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C$$

$$a = \epsilon_\lambda \cdot l \quad \text{et} \quad b = 0$$



$$f(x) = ax$$

$\swarrow$        $\searrow$   
 $a = \epsilon l$        $x = C$

### I.4. Le coefficient de corrélation "R<sup>2</sup>"

La **linéarité** est évaluée par le **coefficient de corrélation R<sup>2</sup>**, qui mesure la qualité de l'ajustement linéaire entre les concentrations et les absorbances mesurées.

Théoriquement, la courbe devrait être basée sur le principe Mais du fait de l'existence de coefficient de corrélation "R<sup>2</sup>" La courbe de fonction ne passe pas par le principe en raison de plusieurs facteurs:

- erreur de dilution
- erreur de poids

- erreur de spectrophotométrie

- idéalement le coefficient de corrélation  $R^2 > 0,995$

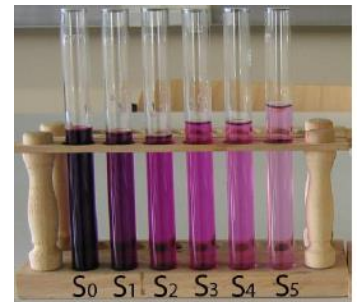
$$r = \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$R^2 = \frac{[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}$$

### I.5. Dosages spectrophotométriques par étalonnage

**Doser une espèce chimique en solution consiste à déterminer la concentration de cette espèce.**

Plusieurs méthodes existent pour effectuer un dosage. L'une d'elles est le **dosage spectrophotométrique par étalonnage**, utilisant des solutions étalons.

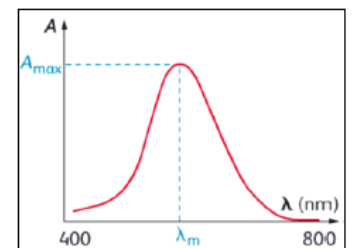


Les différentes étapes de ce dosage sont les suivantes :

- 1<sup>ère</sup> étape : **Choix de la longueur d'onde de travail  $\lambda_{\max}$**

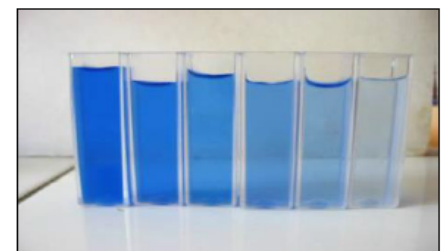
Grâce au spectre d'absorption, on choisit une longueur d'onde  $\lambda_{\max}$  pour laquelle l'absorbance de l'espèce à doser est maximale, afin d'augmenter la précision des mesures.

Par exemple, on choisira une longueur d'onde correspondant au rouge pour une solution de sulfate de cuivre bleu turquoise (cyan).



- 2<sup>ème</sup> étape : **Préparation des solutions étalons de concentrations connues, par dilutions successives**

On réalise, à partir d'une solution mère de l'espèce à doser, une échelle de teinte en diluant successivement la solution mère pour obtenir des solutions filles de moins en moins concentrées et surtout de concentrations connues. Ces solutions sont appelées **solutions étalons**.

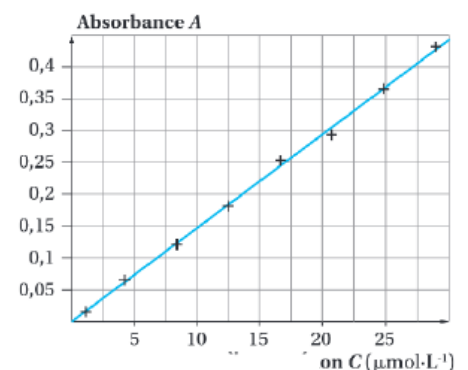


- 3<sup>ème</sup> étape : **Construction de la droite d'étalonnage :  $A = f(c)$**

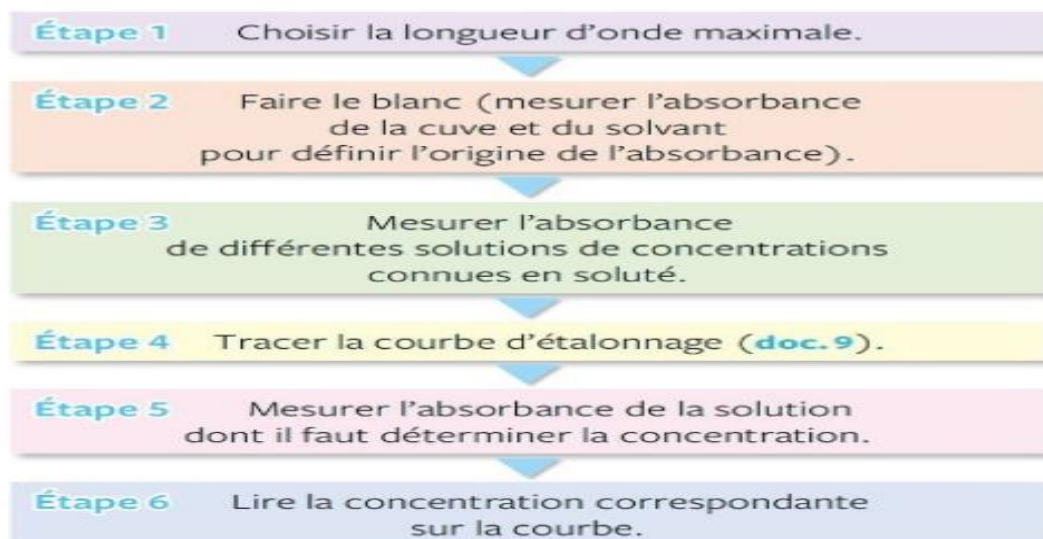
Pour la longueur d'onde  $\lambda_{\max}$ , on mesure l'absorbance A des solutions étalons.

On trace la **droite d'étalonnage** représentant l'absorbance des solutions étalons en fonction de leur concentration :  $A = f(c)$ .

On sait qu'il s'agit d'une droite passant par l'origine car il y a proportionnalité entre A et c d'après la loi de Beer-Lambert.



- 4<sup>ème</sup> étape : **Mesure de l'absorbance  $A_0$  de la solution de concentration inconnue  $c_0$**
- 5<sup>ème</sup> étape : **Utilisation de la droite d'étalonnage pour déterminer la concentration inconnue  $c_0$**



## I.7. Objectifs du TP

Le but du TP consiste à :

- Connaître la technique de spectrophotométrie (étalonnage).
- Vérifier la loi de Beer-Lambert .
- Déterminer à partir d'une courbe d'étalonnage la concentration d'une solution de bleu méthylène

### I.7.1. Matériel et Produits

- Solution de bleu méthylène de concentration 200 mg/l, eau distillée.
- Plaque à agitation magnétique, barreau magnétique, spatule, éprouvette graduée, tubes à essai, bécher de 100ml,

## II.1. Protocole expérimental

Réaliser des dilutions (solutions filles) à partir d'une solution mère  $S_0$  bleu de méthylène de concentrations **200 mg /l** (voir le tableau).

solutions filles	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$	$S_6$
Volume $V_0$ (ml) de la solution mère $S_0$	0	1	3	7	8	10
Volume $V_{\text{eau}}$ (ml) d'eau distillée	200	199	197	193	192	190
Concentration en BM (mg/l)						
Absorbance A						

- Calculer la concentration dans chaque échantillon

- Faire le blanc à l'aide d'une cuve remplie d'eau distillée
- On faire passer les différentes solutions (mère et filles) dans l'appareil d'analyse
- On note la valeur d'absorbance A de  $\lambda_{\max}$  de chaque solution.
- Tracer la courbe d'étalonnage
- Vérifier le coefficient de corrélation  $R^2$

**NB** : la longueur d'onde du **BM**  $\lambda_{\max} = 655 \text{ nm}$

**$M_{\text{BM}} = 319,85$**

## **II.2. Mesures spectrophotométriques détaillées**

### **II.2.1. Réglage du spectrophotomètre (la qualification d'Equipement QE) :**

1. Allumer l'appareil 15-20 minutes avant les mesures (stabilisation)
2. Sélectionner la longueur d'onde appropriée
3. Remplir une cuve avec le solvant (blanc)
4. Essuyer soigneusement l'extérieur de la cuve
5. Faire le "blanc" ( $A = 0$ )

### **II.2.2. Mesures :**

1. Rincer la cuve avec la solution à mesurer
2. Remplir la cuve aux  $\frac{3}{4}$
3. Essuyer l'extérieur avec papier optique
4. Vérifier l'absence des bulles
5. Placer la cuve dans le bon sens (face transparente)
6. Noter l'absorbance
7. Répéter pour chaque solution