

TP1 : Dosage par spectrophotométrie UV-Visible d'une espèce colorée en solution

1. Objectifs du TP

- Comprendre le principe de la spectrophotométrie
- Réalisation et utilisation d'une échelle de teinte.
- Exploitation d'un spectre UV-Visible.
- Vérification de la loi de Beer Lambert.
- Détermination de la concentration en permanganate de potassium d'une solution de Dakin.

2. Spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible repose sur l'interaction de la matière et du rayonnement électromagnétique dans le domaine 190-800 nm.

3. Principe

La spectrophotométrie est une technique basée sur la mesure des propriétés d'absorption de la lumière par une substance. Plus généralement, ils provoquent des **transitions électroniques** entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

La spectrométrie d'absorption est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie des atomes. En effet un atome qui passe de son état (d'énergie) fondamental à un état excité quelconque absorbe un ou plusieurs photons. La fréquence ν du photon dépend de l'énergie ΔE acquise par l'atome selon la relation :

$$\Delta E = h \nu$$

Où h est la constante de Planck.

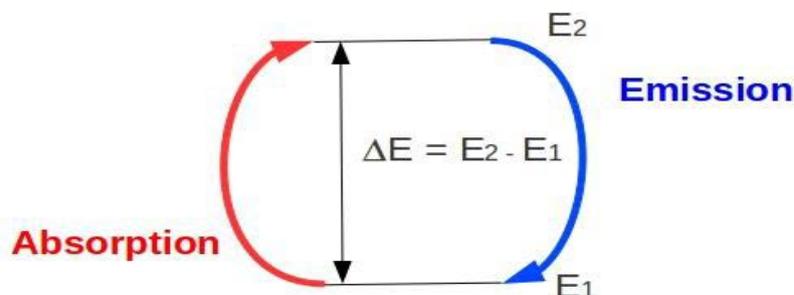
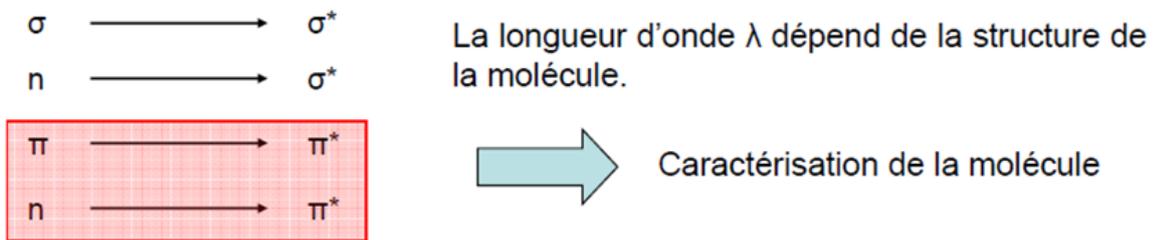


Figure 1 : Lien entre l'absorption ou l'émission d'un rayonnement électronique et les niveaux d'énergie atomiques.

Transitions autorisées



4. Les différents types de spectrophotomètres UV-visible

Il existe sur le marché des spectrophotomètres UV simple faisceau ou double faisceau. Le 2nd étant plus précis et plus chers. Ils comportent

- la source: composé de 2 lampes, une au tungstène pour le domaine visible, l'autre au deutérium pour le domaine UV
- le monochromateur
- le compartiment à échantillon
- le détecteur à photodiode ou photomultiplicateur.

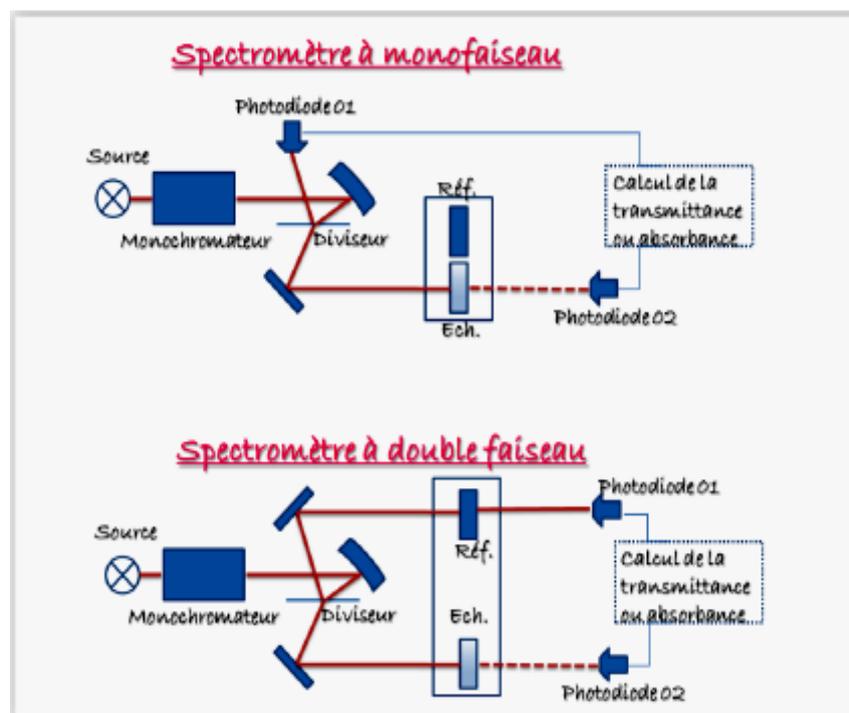


Figure 2: Différents types de spectromètres UV-visible.

Dans le montage à double faisceau, la source passe par le monochromateur puis elle est partagée en 2 faisceaux: l'un dirigé vers le «blanc» c'est-à-dire le compartiment contenant le solvant, l'autre dirigé vers le compartiment de l'échantillon. L'intensité lumineuse est mesurée par 2 photodiodes ou un photomultiplicateur.

5. Cuves de spectrophotométrie

Attention à la matière des cuves, tous les matériaux ne sont pas transparents à l'UV. Seules les cuves en Quartz permettent de descendre à 200 nm dans l'UV.

-quartz pour les ultra-violets + visible.

-verre ou polystyrène pour le visible.

Matière de la cuve	Domaine
Polystyrène	340 à 900 nm
Verre standard	360 à 2500 nm
Quartz	200 à 2500 nm

6. Mode opératoire

Nous allons mettre en œuvre un protocole expérimental permettant d'évaluer qualitativement la concentration en ion permanganate de potassium dans la solution d'eau de Dakin.

Sachant que l'eau de Dakin est un liquide antiseptique utilisé pour le lavage des plaies et des muqueuses, de couleur rose et a l'odeur d'eau de javel. L'eau de dakin est constituée d'hypochlorite de sodium à 0,5% de chlore actif (eau de javel diluée) additionnée de permanganate de potassium (KMnO_4) pour la stabiliser et ralentir la décomposition de l'eau de javel. On peut évaluer la concentration d'une espèce chimique colorée dans une solution grâce à la couleur de cette solution. A partir d'une solution S0 appelée solution mère, on prépare des solutions diluées de concentration différentes. On réalise une « échelle de teinte » qui permettra de donner un encadrement de la concentration de l'eau de Dakin par comparaison de la couleur. Afin d'affiner le résultat, on utilisera ensuite le spectrophotomètre.

SOLUTE DE DAKIN STABILISE COOPER	
COMPOSITION	
Principes actifs	
Hypochlorite de sodium0,500 g de chlore actif pour 100 mL
Principes non actifs	
Permanganate de Potassium0,0010g pour 100 mL
Dihydrogénophosphate de sodium dihydraté Excipient
Eau purifiée Excipient
MODE D'EMPLOI	
Posologie habituelle : en application cutanée sans dilution, soit en lavages, en bains locaux ou en irrigation, soit en compresses imbibées ou en pansements humides.	
Les flacons doivent être conservés fermés dans des endroits frais et à l'abri de la lumière. Une fois ouvert, la stabilité du soluté est réduite à deux mois.	

6.1. Matériels et produits

Spectrophotomètre UV-visible, fiole de 50,0 ml, pipettes jaugées de 1,0 ml, de 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml et 20,0 ml, 2 béchers de 50 ml, portoirs à tubes à essais, tubes à essais, cuves pour spectrophotomètre, pipettes+ une poire à pipeter, d'eau distillée, une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) $5,0 \times 10^{-4}$ mol. L⁻¹, l'eau de Dakin

6.2. Réalisation et utilisation d'une échelle de teinte

Afin de réaliser le dosage du permanganate de potassium, il faut tout d'abord préparer une gamme d'étalonnage. Six solutions doivent être préparées dans des fioles de 50,0 mL de concentration C_i indiquées ci-dessous à partir d'une solution mère (S_E) dont la concentration est $C_E = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$. Déterminer les volumes de solutions à prélever pour chacune des dilutions et compléter le tableau ci-dessous. Les volumes sont à prélever à la pipette graduée

On rappelle les relations (à retenir) pour une dilution :

$$C_{\text{mère}} \times V_{\text{mère}} = C_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}}$$

$$\text{Facteur de dilution} = C_{\text{mère}} / C_{\text{fille}} = V_{\text{fille}} / V_{\text{mère}}$$

Numéro de la solution	1	2	3	4	5	6
Concentration molaire de la solution fille C_i (10^{-5} mol/l)	1.00	2.50	5	7,5	10.00	20.00
Volume de solution mère V_E à prélever (ml)						
Volume de la solution fille préparée V_f (ml)	50	50	50	50	50	50
Rapport de dilution						
Absorbance						

Après chaque dilution, prélever 10 ml et les verser dans un tube à essais. Numéroter chaque tube et les disposer selon une coloration graduelle : on a réalisé **une échelle de teintes**.

On dispose d'un tube à essais rempli de 10 ml d'eau de Dakin. Comparer sa coloration avec l'échelle des teintes.

Déterminer un encadrement de la concentration molaire en permanganate de potassium dans l'eau de Dakin.

A l'aide des informations fournies par l'étiquette du flacon et des données, calculer la concentration molaire en permanganate de potassium de l'eau de dakin et la comparer à votre encadrement.

Élément	Potassium K	Manganèse Mn	Oxygène O
Masse molaire (g. mol^{-1})	39,1	54,9	16,0

6.3. Détermination de la concentration molaire par spectrophotométrie

I. Spectre d'absorption

On dispose d'une solution mère S_0 de permanganate de potassium de concentration $C_0 = 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

- Remplir une cuve avec la solution. Attention, ne pas toucher les faces transparentes des cuves!
- Faire le blanc, à l'aide d'une cuve remplie d'eau distillée.
- Repérer λ_{\max} .

II. Application de la loi de Beer Lambert : Détermination de la concentration d'une solution par étalonnage :

On applique la loi de Beer Lambert : $A = \epsilon \cdot C \cdot l$

Avec :

- A : Absorbance de la solution (sans unité)
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- l : Épaisseur de la cuve (cm)
- c : Concentration de la solution (mol/l)

Cette loi **n'est valable** que si la solution est **diluée**.

A partir de la loi de Beer Lambert, il est possible de déterminer la concentration d'une espèce par mesure de son absorbance.

A l'aide du spectrophotomètre, on souhaite tracer **la courbe d'étalonnage de l'absorbance** d'une solution de permanganate de potassium **en fonction de la concentration** de la solution.

On peut suivre le protocole expérimental suivant :

- Remplir la cuve avec la solution.
- Sélectionner la longueur d'onde λ_{\max} sur le spectrophotomètre.
- **Faire le blanc, à l'aide d'une cuve remplie d'eau distillée.**
- Mesurer successivement et rapidement l'absorbance des solutions étalons par ordre de concentration croissante **en allant de la moins concentrée à la plus concentrée**, ainsi que celle de la solution de Dakin.
- Compléter le tableau ci-dessus

7. Questions

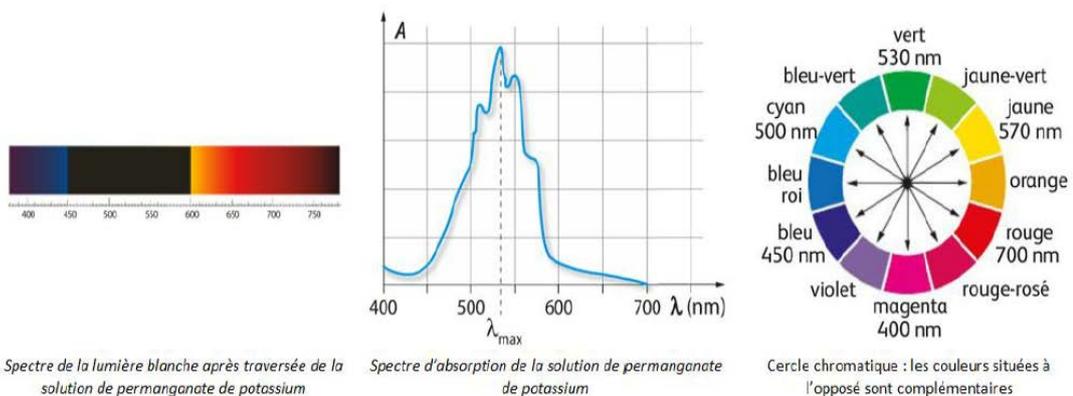
1. A l'aide des informations fournies par l'étiquette du flacon et des données, calculer la concentration molaire en permanganate de potassium de l'eau de Dakin et la comparer à votre encadrement
2. Pourquoi est-il demandé de régler le spectrophotomètre à la longueur d'onde λ_{\max} ?
3. Pourquoi faut-il réaliser une courbe d'étalonnage ?
4. Quelle est l'utilité du « blanc » ?
5. Regroupez toutes les mesures d'absorbance dans un tableau.
6. Tracez la courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration de permanganate de potassium. La loi de Beer Lambert est-elle vérifiée ?
7. Déterminer graphiquement la concentration en ion permanganate de la solution de Dakin C_{Dakin} . Comparer à ce qu'indique le flacon commercial puis conclure.

Annexe

1. Allure d'un spectre d'absorption

Le tracé l'intensité de l'énergie absorbée (absorbance A) par la molécule en fonction de la longueur d'onde λ_{\max} s'appelle le spectre d'absorption de l'espèce chimique ou de la solution étudiée. Il comporte des bandes assez larges et peu nombreuses et est caractérisé par sa longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}). La couleur perçue d'une solution est la couleur complémentaire de la couleur correspondant au maximum d'absorption de son spectre d'absorption.

La solution de permanganate de potassium



2. Description du Spectrophotométrie

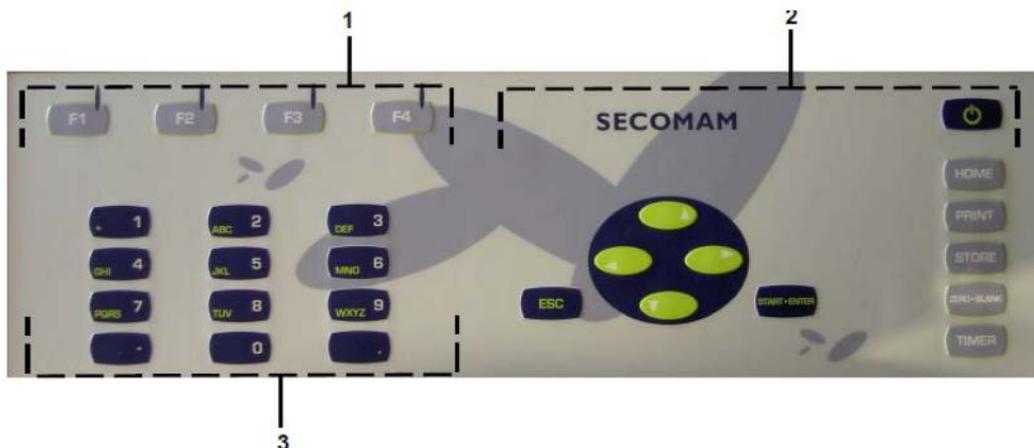
2.1. L'appareil avec élément de commande



Spectrophotomètre UviLine 9100 – 9400

2.2. Clavier

- 1 : Touches de fonction F1 à F4 (fonction dépendant du menu)
- 2 : Touches à fonction fixe
- 3 : Bloc de touches alphanumériques



Clavier

-Fonction des touches



<ON/OFF> : Allume et éteint le spectrophotomètre



<HOME> : Commute sur le menu principal à partir de toute configuration de service



<PRINT> : Sortie de la valeur de mesure affichée via une interface



<STORE> : Enregistrement d'une valeur de mesure affichée, un spectre ou une courbe



<ZERO BLANK> : Démarrage de l'une des mesures suivantes en fonction de la Situation.

-Réglage du zéro

-Mesure du blanc

-Mesure de la ligne de base



<TIMER> : Ouverture du menu Minuterie



<Esc> : Interruption de l'action en cours

-Rejet des entrées qui ne sont pas encore prises

-Commutation dans le niveau de menu immédiatement supérieur



<START ENTER> : Démarrage d'une action (Ex : Mesure)

-Ouverture d'un menu sélectionné

-Confirmation d'une sélection ou d'une entrée

-Les touches de fonction F1 à F4 ont des fonctions qui changent selon la situation de service.

-Les touches du bloc alphanumérique sont occupées par des chiffres et caractères gravés dessus. Pour sélectionner le caractère désiré, appuyer autant de fois que nécessaire sur la touche.

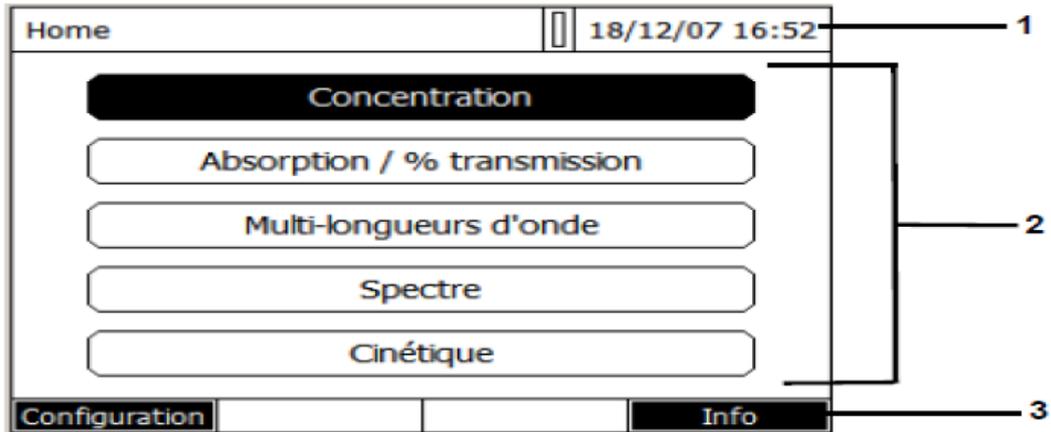
-Afficheur

-L'aspect de l'interface du logiciel est présenté sur la figure ci-dessous.

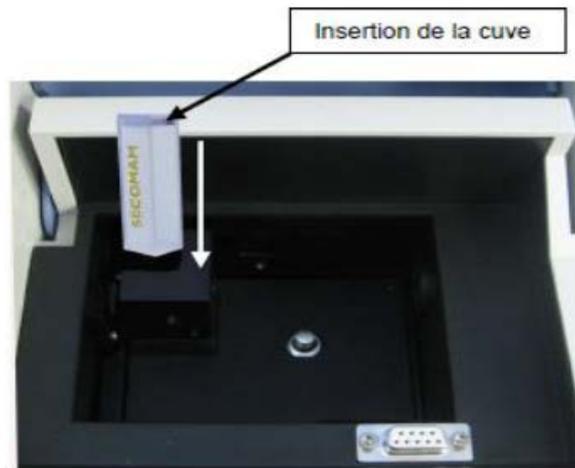
1 : Ligne d'état (état actuel, date et heure)

2 : Zone d'affichage des menus ou des résultats de mesure

3 : Menu de touches de fonction



2.3. Comment installer le support cuve



2.4. Allumage du spectrophotomètre

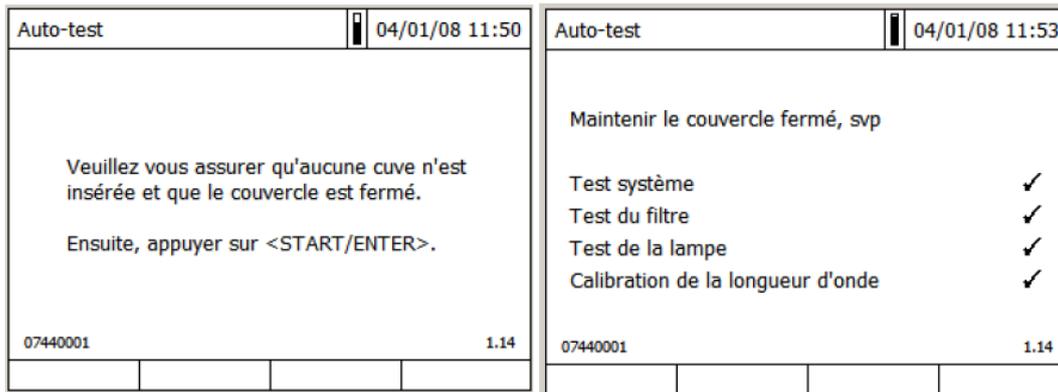
Appuyer sur la touche  . L'appareil est allumé. Il affiche :

-Demande de l'exécution de vérification (AUTOTEST)

Une fois que l'appareil est mis sous tension et allumé, il passe ensuite à l'exécution de vérification. Pendant la vérification, il faut que toutes les cuves soient enlevées et le couvercle des puits de cuve doit être fermé.

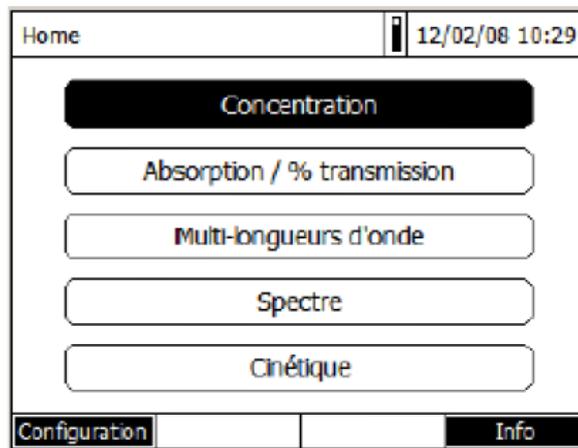
Lancement de la vérification.

Il faut s'assurer que le porte-cuve est vide. Ensuite appuyer sur la touche <START ENTER> pour lancer la vérification



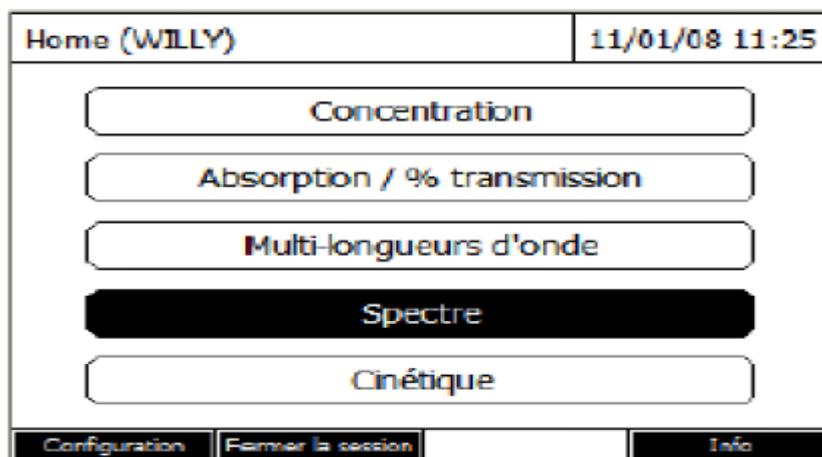
Demande de l'exécution de la vérification Lancement de la vérification.

Pendant la vérification, différents organes sont testés. Si le test est satisfaisant, le symbole ✓ s'affiche sur la ligne correspondante.



Menu principal

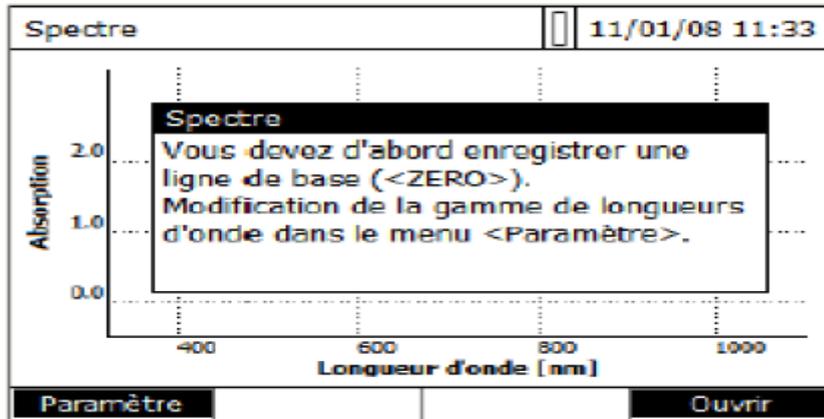
2.5. Mesure d'un spectre



Mode spectre.

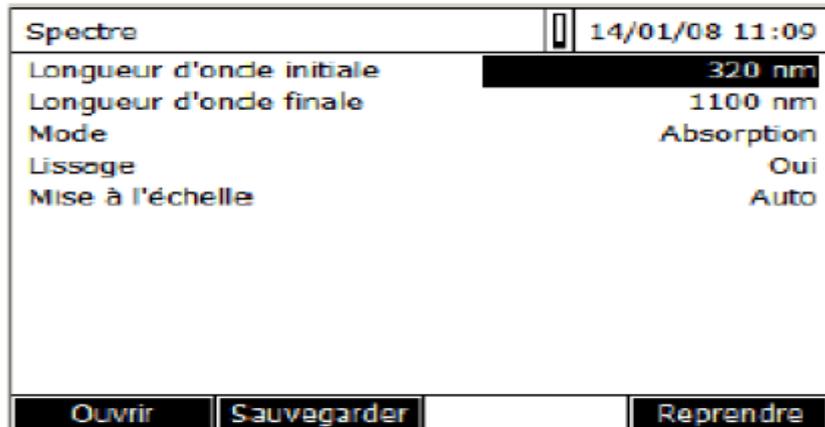
Avant d'enregistrer un spectre, il faut faire une ligne de base.

Une ligne de base une fois mesurée reste enregistrée dans le spectrophotomètre jusqu'à l'enregistrement d'une nouvelle ligne de base ou jusqu'à la sortie du mode Spectre ou l'extinction du spectrophotomètre. Ce dernier renvoie l'affichage suivant :



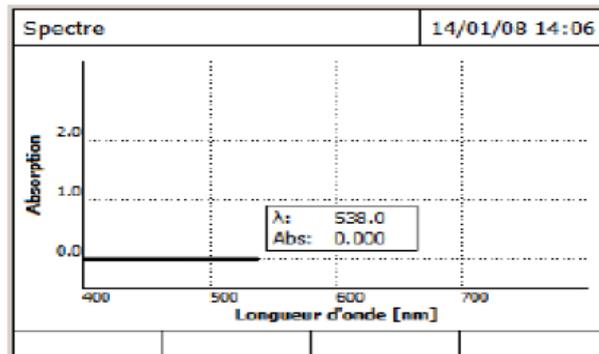
Mesure de la ligne de base.

Avant de lancer la mesure de la ligne de base, appuyer sur la touche F1 [Paramètre] pour configurer les paramètres de mesure. L'appareil renvoie l'affichage suivant :



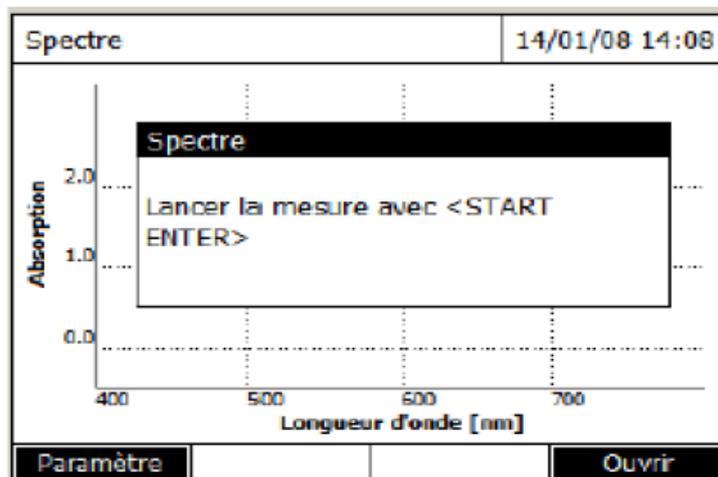
Configuration des paramètres d'acquisition du spectre.

Faire la ligne de base en appuyant sur la touche <ZERO BLANK>. L'appareil entame la mesure de la ligne de base :



Enregistrement de la ligne de base.

Le spectrophotomètre mémorise la ligne de base. Attendez la fin de la mesure. Maintenant l'appareil est prêt à mesurer l'échantillon. Il revoit l'affiche suivant :



Lancement de la mesure

Insérer l'échantillon à analyser dans le porte-cuve. Fermer le couvercle. Lancer la mesure en appuyant sur la touche <START ENTER>. Lorsque le spectre est complètement acquis il affiche le message suivant : "l'enregistrement du spectre est achevé".

Appuyer sur <START ENTER> pour confirmer le message. Le spectrophotomètre revoit le spectre mesuré (Affichage du spectre mesuré).

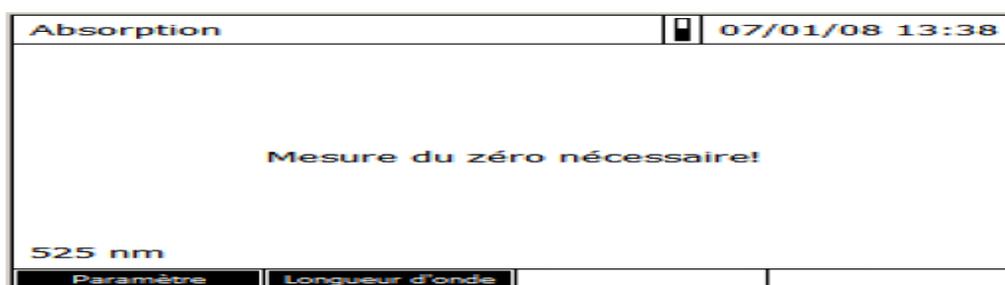
Si nécessaire revenir au menu principal avec la touche <HOME>

Choisir avec les touches «▲» et «▼» le mode « Absorption / % transmission ».



Mode Absorption/Transmission

-Ensuite entrer dans le mode absorption, voila l'affichage renvoyé :



Correction de la ligne de base

-Choix de la longueur d'onde.

Régler la longueur d'onde de travail (par exemple λ_{max}) en appuyant sur la touche F2 [Longueur d'onde]. Une fois le réglage de la longueur d'onde de travail est terminé, faire la ligne de base en appuyant sur la touche <ZERO BLANK>.

Lancer la mesure ensuite, en appuyant sur la touche <Start Enter>. L'absorbance



Affichage des résultats de la mesure

Vous pouvez lancer une nouvelle mesure, en appuyant de nouveau sur la touche <Start Enter>.

Appuyer sur la touche F4 [Continuer] afin d'afficher la courbe d'étalonnage.

P.S

-Pour obtenir plus d'information, veuillez consulter le manuel d'utilisation.

Manuel d'utilisation UviLine 9100 - 9400, Réf. 0M8626. SECOMAM, a NOVA ANALYTICS Company. ALES FRANCE.