

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Sciences de la Nature et de la Vie / Département des sciences écologie et environnement
Master Biodiversité et environnement
Travaux pratique Ingénierie de l'environnement (Semestre 3) / Section A

1. Objectif :

Analyse quantitative d'une espèce colorée par étalonnage spectrophotométrique

L'objectif de la manipulation est de tracer la courbe $A = f(\text{Méthyle orange})$ suivant la loi de Beer-Lambert. La courbe d'étalonnage obtenue servira à doser une solution de Méthyle orange de concentration inconnue.

Loi de Beer-Lambert :

absorbance (sans unité)
↓
 A

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$

↑
trajet optique (cm)
 l

coefficient d'absorption moléculaire
ou coefficient d'extinction molaire
($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ou $\text{cm}^2 . \text{mol}^{-1}$)
↑
 ϵ

concentration de la substance
dans la solution (mol/l)
 c

2. Principe de la Spectroscopie UV-Visible:

La région ultraviolette s'étend de 10 nm à 400 nm mais les spectromètres UV usuels ne permettent le tracé des spectres que pour les longueurs d'onde comprises entre 200 nm et 400 nm (proche UV).

La région du visible s'étend de 400 nm à 800 nm; cette gamme de mesure est atteinte avec le même type de spectromètre que celui utilisé en UV, par la simple commutation de la source lumineuse.

3. Spectre d'absorption d'une solution colorée (Interaction avec la lumière)

La couleur d'une solution résulte de la superposition de toutes les radiations non absorbées par cette solution. Le spectre d'absorption présente une bande noire correspondant aux radiations absorbées : on parle de spectre de bandes.

Les couleurs absorbées et non absorbées sont complémentaires (se sont les couleurs dont l'association donne le blanc).

Les molécules qui absorbent dans l'ultraviolet sont incolores. De nombreuses molécules absorbent dans le domaine du visible: de telles molécules sont colorées.

Un spectrophotomètre permet de mesurer l'absorbance A d'une solution colorée, c-à-d la proportion de lumière absorbée par cette solution. L'absorbance dépend du rapport I_t / I_0 (I_0 : intensité de lumière incidente et I_t : intensité de lumière transmise).

4. Matériel :

Spectrophotomètre UV-Visible. Epprouvettes de 10 mL, pipettes ou burette.

Méthyle orange : **Méthyle orange**, $M = 327.34 \text{ g/mol}$. Eau distillée.

5. Principe de la manipulation :

a. Tracé du spectre d'absorption de la solution de Méthyle orange :

A l'aide du Spectrophotomètre UV-Visible, on réalise le spectre d'absorption du composé  $A = f(\lambda)$ entre les longueurs d'ondes 400 et 700 nm. Puis, on repère la longueur d'onde max pour laquelle l'absorbance est maximale. Cette valeur de max sera utilisée pour les mesures de la partie suivante.

b. Courbe d'étalonnage :

A partir de la solution étalon de **Méthyle orange** de concentration $C = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$, préparer une solution étalon fille convenable pour réaliser la gamme de solutions aux concentrations reportées dans le tableau ci-dessous. On prendra un volume final de **10 mL**, utiliser pour cela pipettes ou burette.

Mesurer l'absorbance de chaque tube à la longueur d'onde max $\lambda_{\text{max}} = \dots\dots\dots \text{ nm}$. (théoriquement 465 nm).

Tube	0	1	2	3	4	5	6	X
V Méthyle orange (mL)	0							/
VH ₂ O (mL)	10							/
C Méthyle orange (mol.L ⁻¹)	0	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	
A($\lambda_{\max}$)	0							

ATTENTION : Veiller à respecter les consignes suivantes :

- Ne pas laisser de gouttelettes sur les parois de la cuve (l'essuyer avant chaque mesure)
- Refaire le blanc (**A = 0**) avant chaque mesure.

6. Dosage d'une solution X de concentration inconnue par spectrophotométrie :

Mesurer l'absorbance de la solution X de concentration inconnue à $\lambda_{\max}$ nm.

7. Exploitation des résultats :

- Calculer la dilution à réaliser pour préparer la gamme d'étalonnage.
- Recopier et compléter le tableau ci-dessus.
- Tracer sur papier millimétrique la courbe représentative de la variation d'absorbance **A** en fonction de la concentration en **Méthyle orange** : **A = f(C Méthyle orange)** en employant la méthode des moindres carrés.
- En déduire la valeur du coefficient d'extinction molaire du **Méthyle orange** : **ϵ Méthyle orange**, à la longueur d'onde considérée.
- Utiliser l'Excel pour répondre aux questions c. et d.
- Déterminer graphiquement la valeur de la concentration de la solution X.