

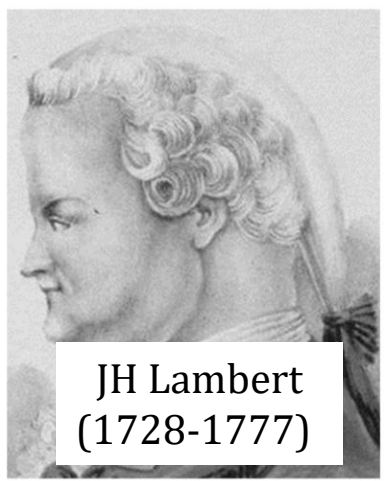
Chimie analytique

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

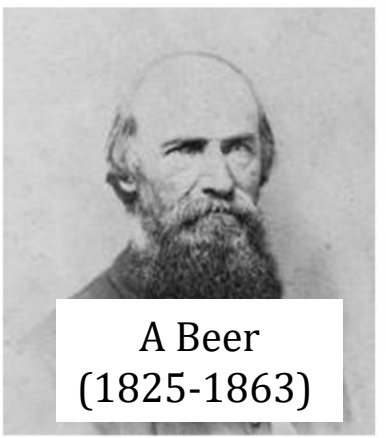
Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes



UFR Pharmacie - Rennes



JH Lambert
(1728-1777)



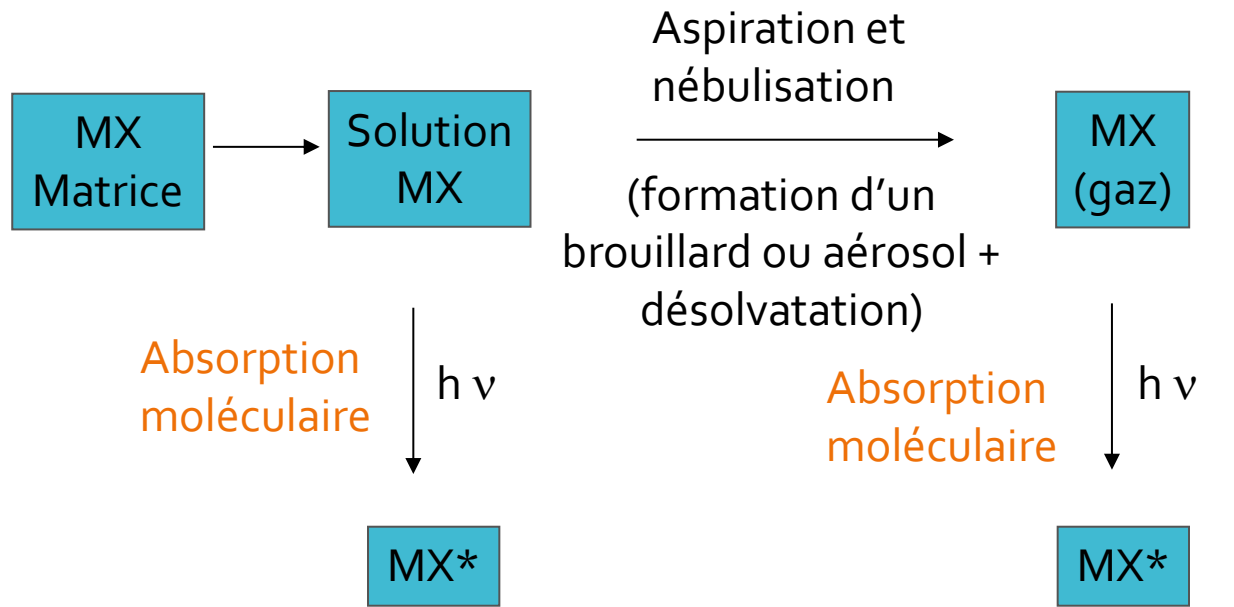
A Beer
(1825-1863)

Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

- Entraînement

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire



Spectres de bandes (\pm fines)

- Absorption \Leftrightarrow chromophores
- Transitions permises \Leftrightarrow spectre spécifique de la molécule
- Influence du milieu et des substituants (auxochromes) \Leftrightarrow effets bathochrome, hypsochrome, hyperchrome ou hypochrome
- L'absorption d'une molécule est caractérisée par λ_{\max} et ϵ
- Quantification possible grâce à la loi de Beer-Lambert

Exercice 1 : Une solution contenant le complexe formé par la thiourée et le Bi^{III} a un coefficient d'absorption molaire de $9\,320 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ à 470 nm

- 1- Quelle est l'absorbance d'une solution à $6,24.10^{-5} \text{ M}$ du complexe à 470 nm dans une cellule de 1 cm ?
- 2- Quelle est la transmittance de la solution?
- 3- Quelle est la concentration du complexe dont la transmittance est le double de celle trouvée en (2)?
- 4- Quelle est la concentration du complexe dans une solution qui a l'absorbance trouvée en (1) dans une cellule de 5 cm ?

Remarque

$$A = \varepsilon \ell C$$

Les unités de ε , C et ℓ doivent être homogènes dans l'application numérique :

Si C en g/L alors ε en cm.L.g^{-1} (coefficient d'extinction spécifique)

Si C en mol/L alors ε en cm.L.mol^{-1} (coefficient d'extinction molaire = coefficient d'absorption molaire)

Exercice 1 : Une solution contenant le complexe formé par la thiourée et le Bi^{III} a un coefficient d'absorption molaire de $9\,320 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ à 470 nm

1- Quelle est l'absorbance d'une solution à $6,24\cdot 10^{-5} \text{ M}$ du complexe à 470 nm dans une cellule de 1 cm ?

$$A = \varepsilon \ell C$$

ε : coefficient d'extinction molaire

C : Concentration soluté

ℓ : trajet optique en cm

$$A = 9320 \times 1 \times 6,24 \cdot 10^{-5}$$

$$A = 0,582$$

2- Quelle est la transmittance de la solution?

$$T = 10^{-A}$$

$$T = 10^{-0,582}$$

$$T = 0,262$$

$$T\% = 26,2\%$$

3- Quelle est la concentration du complexe dont la transmittance est le double de celle trouvée en (2)?

concentration = f(A) \Leftrightarrow chercher la correspondance de la transmittance en absorbance

$$T' = 2T = 0,524$$

$$A' = -\log T' = -\log 0,524$$

$$A' = 0,281$$

$$A' = \varepsilon \ell C'$$

$$C' = \frac{A'}{\varepsilon \ell} = \frac{0,281}{9320}$$

$$C' = 3,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Alternative

$$A' = -\log 2T = -\log T - \log 2 = A - \log 2 = 0,281$$

4- Quelle est la concentration C'' du complexe dans une solution qui a l'absorbance trouvée en (1) (où $\epsilon = 1\text{cm}$ et $C = 6,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$) dans un cellule de $\ell'' = 5\text{cm}$?

$$A = \cancel{\epsilon} C = \epsilon \ell'' C'' = \cancel{\epsilon} 5 C''$$

$$C = 5C''$$

$$C'' = \frac{C}{5} = \frac{6,24 \cdot 10^{-5}}{5}$$

$$C'' = 1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Exercice 2 : Identifier les molécules présentant un spectre d'absorption dans l'UV-visible

↪ Conjugaison, aromaticité et hétéroatome

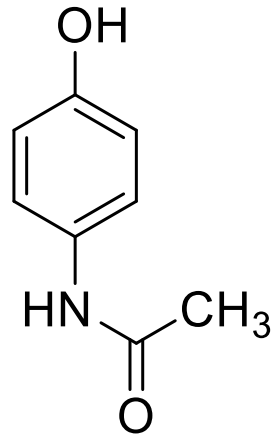
↪ Domaine UV et coeff d'extinction molaire suffisamment élevé

CH_3COOH
Acide acétique

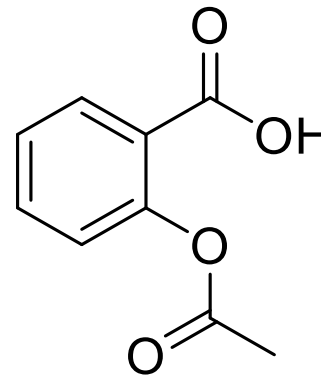
CO_3^{2-}
Ion carbonate

H_2PO_4^-
Ion dihydrogénophosphate

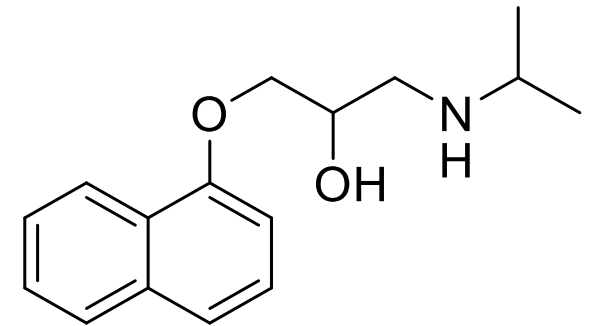
NH_4OH
Ammoniaque



Paracétamol



Acétyl
salicylique
(Aspirine)



Propranolol
(bétabloquant)

Exercice 2 : Identifier les molécules présentant un spectre d'absorption dans l'UV-visible

- ↪ Conjugaison, aromaticité et hétéroatome
- ↪ Domaine UV et coeff d'extinction molaire suffisamment élevé

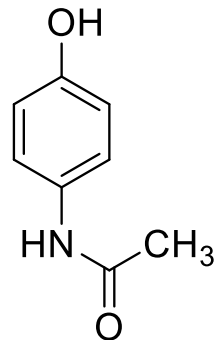
CH_3COOH
Acide acétique

CO_3^{2-}
Ion carbonate

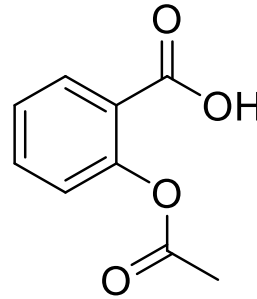
H_2PO_4^-
Ion dihydrogénophosphate

NH_4OH ($\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$)
Ammoniaque

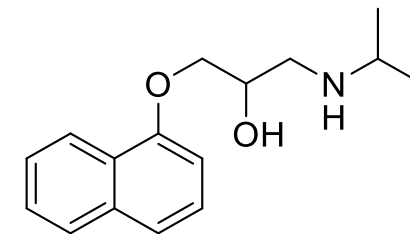
↪ ϵ trop faible ou
pas dans le domaine
UV-visible



Paracétamol



Acétyl
salicylique
(Aspirine)



Propranolol
(bétabloquant)

Ce qu'il faut retenir du tableau sur les chromophores :
-Connaitre les transitions possibles des chromophores indiqués

-Avoir une idée des longueurs d'onde et ϵ associées
-Les ϵ des transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ sont faibles et ne permettent généralement pas de voir la bande sur le spectre sachant que $A = \epsilon l C$ avec C de l'ordre de 10^{-5} M

Pour rappel : le domaine UV-visible correspond à 200-900 nm

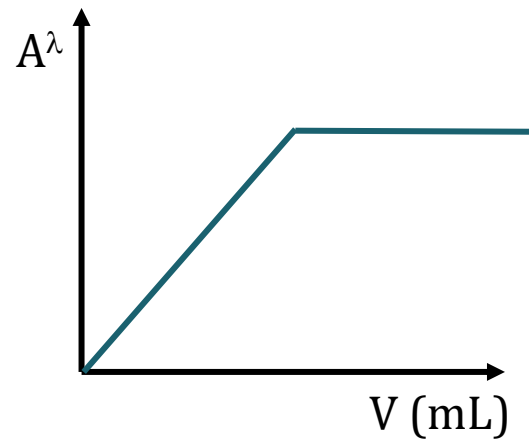
Exercice 3 : Au cours d'un titrage spectrophotométrique, on suit la réaction : $A + B \longrightarrow C$

A : espèce à doser

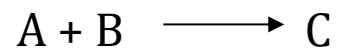
B : titrant

C : produit de la réaction

Sachant que la loi d'additivité est suivie ($A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$) et au vu de la courbe de titrage, indiquer en argumentant si une ou plusieurs espèces possèdent un coefficient d'extinction molaire nul.



Applications

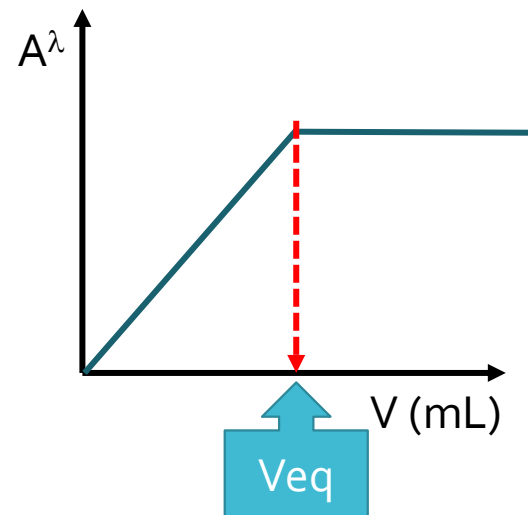


$$A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_B + A^\lambda_C$$

A : espèce à doser

B : titrant

C : produit de la réaction



$$t=0 : A^\lambda = A^\lambda_A = [A]\varepsilon_A^\lambda \quad A^\lambda = 0 \Rightarrow \varepsilon_A^\lambda = 0$$

$$t < Eq : A^\lambda = A^\lambda_A + A^\lambda_C \text{ avec } \varepsilon_A^\lambda = 0 \Rightarrow \varepsilon_C^\lambda \neq 0$$

$$t > Eq : A^\lambda = A^\lambda_B + A^\lambda_C$$

$$\text{Or } A^\lambda = [B]\varepsilon_B^\lambda + [C]\varepsilon_C^\lambda = \text{cte avec } [B] \nearrow \Rightarrow \varepsilon_B^\lambda = 0$$

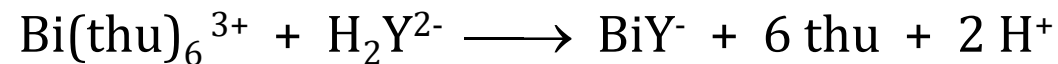
$$\varepsilon_A^\lambda = 0$$

$$\varepsilon_B^\lambda = 0$$

$$\varepsilon_C^\lambda \neq 0$$

Les espèces A et B possèdent un coefficient d'extinction molaire nul.

Exercice 4 : L'acide éthylènediaminetétraacétique (H_2Y^{2-}) extrait le bismuth (III) de son complexe avec la thiourée :

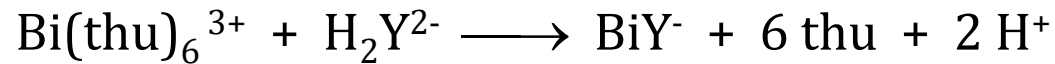


Où thu : thiourée $(NH_2)_2CS$

Prédire l'allure d'une courbe de titrage photométrique basée sur cette réaction, sachant que le complexe Bi(III)/thiourée est la seule espèce dans le système qui absorbe à 465 nm, la longueur d'onde choisie pour l'analyse.

Entrainement

L'acide éthylènediaminetétraacétique (H_2Y^{2-}) extrait le bismuth (III) de son complexe avec la thiourée :



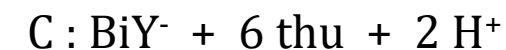
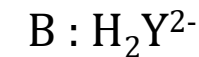
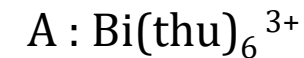
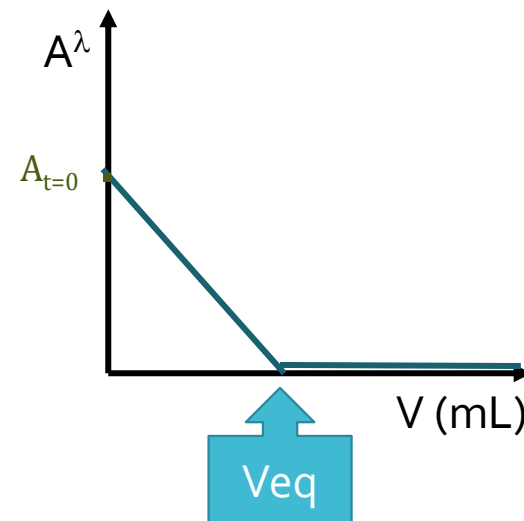
Où thu : thiourée $(NH_2)_2CS$

Prédire l'allure d'une courbe de titrage photométrique basée sur cette réaction, sachant que le complexe $Bi(III)/thiourée$ est la seule espèce dans le système qui absorbe à 465 nm, la longueur d'onde choisie pour l'analyse.

$$t=0 : A^\lambda = A^\lambda_A = [A]\varepsilon_A^\lambda \Rightarrow A^\lambda > 0$$

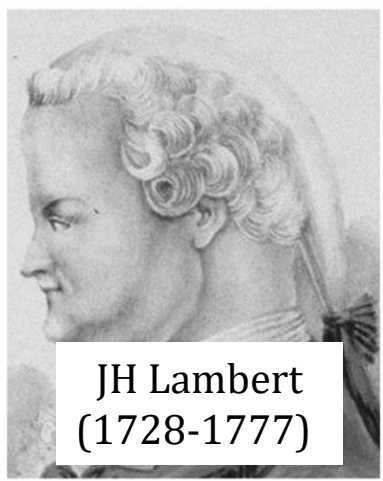
$$t < Eq \quad [A] \searrow \Rightarrow A^\lambda \searrow$$

$$t > Eq : [A] = 0 \Rightarrow A^\lambda = 0$$

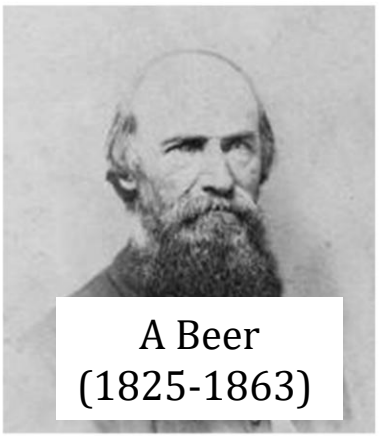


Seule l'espèce A absorbe donc en tout point du titrage :

$$A^\lambda = A^\lambda_A = [A]\varepsilon_A^\lambda$$



JH Lambert
(1728-1777)

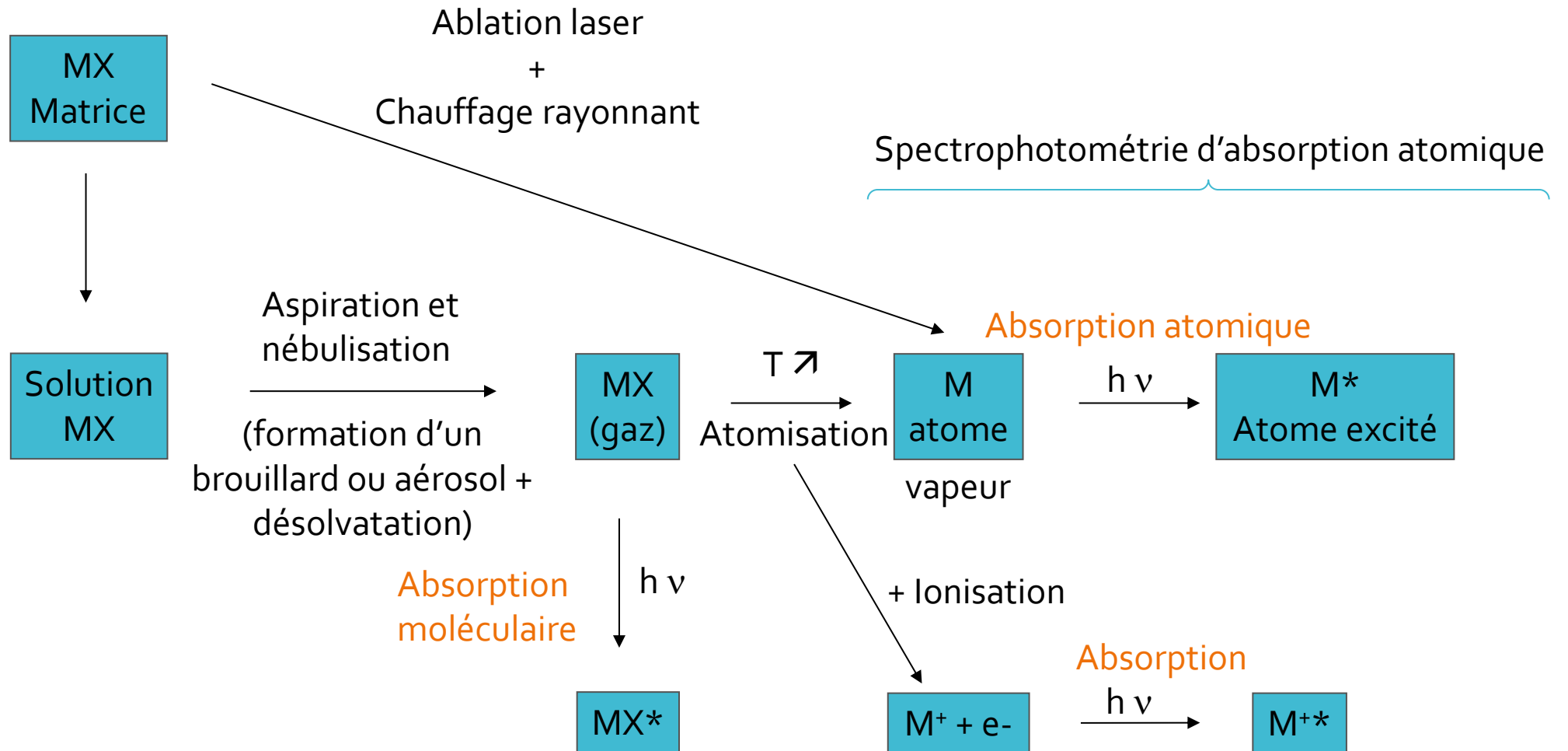


A Beer
(1825-1863)

Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

- Introduction
- Absorption moléculaire
- **Absorption atomique**



Atomisation et passage à l'état gazeux

Etape clé : De la qualité de l'atomisation, dépendent la sensibilité, l'exactitude et la précision de la méthode

Liquide : Introduction de l'échantillon en continu par aspiration ou en discontinu par injection

Atomisation d'autant plus efficace que les solutions sont dispersées et en fines gouttelettes ⇔ nébuliseur : aérosol

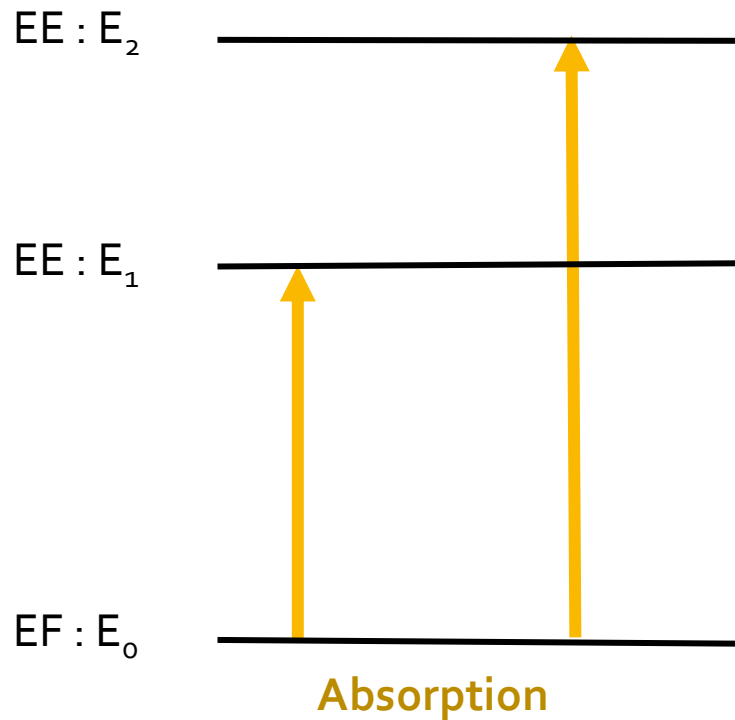
L'atomisation et le passage à l'état gazeux se font par apport d'énergie

- Atomiseurs électrothermiques Spectroscopie d'absorption électrothermique
- Flamme T° jq'à 3000 K ⇔ photométrie de flamme, que pour échantillons liquides

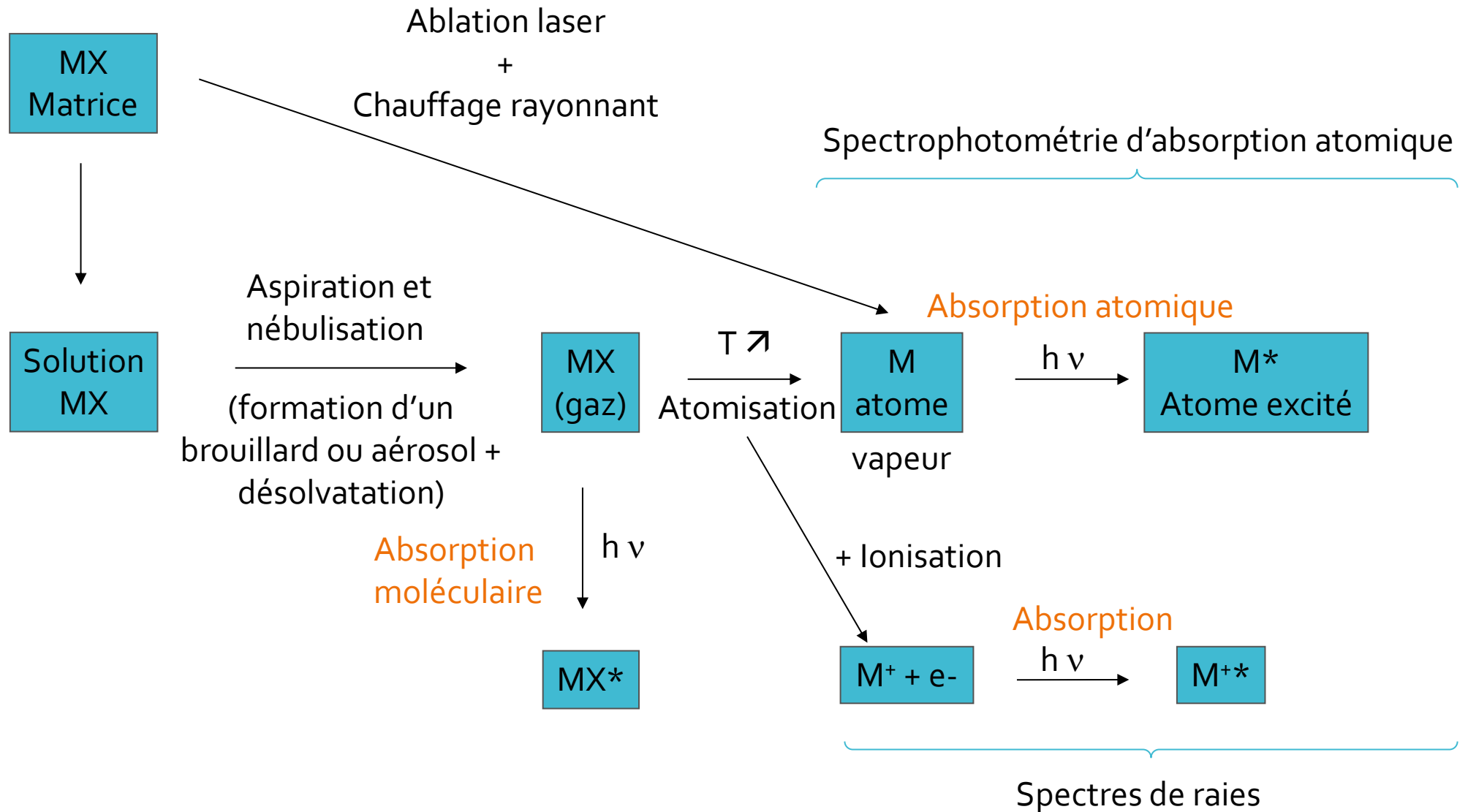
Le choix dépend de la nature de l'échantillon, des espèces à doser et de la sensibilité attendue

Solide : Introduction en discontinu. L'atomisation se fait par ablation laser. La vaporisation se fait ensuite par chauffage rayonnant.

L'apport d'énergie permet l'excitation des électrons de l'état fondamental vers un état excité ⇔ absorption
Elle peut entraîner l'ionisation de l'atome

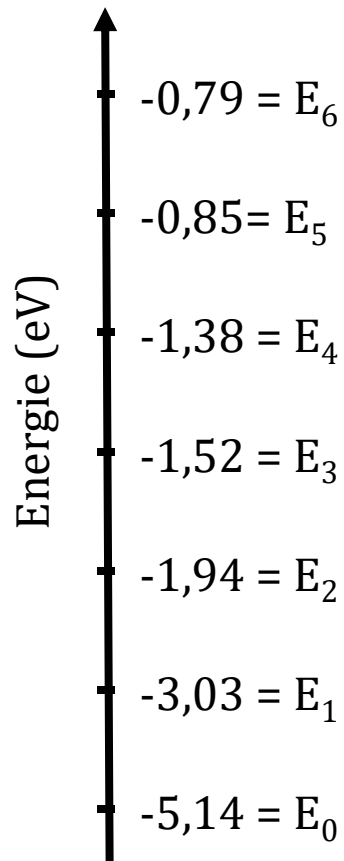


- ✓ Concerne les électrons externes
- ✓ Seules certaines transitions sont permises selon règles de sélection
 - ⇒ entre états électroniques : diagramme énergétique est spécifique de l'élément ⇔
 - λ absorbée spécifique de l'élément
 - ⇒ Pas d'états vibrationnels à l'état gazeux = moins de transitions possible
 - ↳ Spectres de raies ± fines



Exercice 5 : cas du sodium

Niveaux énergétiques du sodium



Cas du sodium : 1 seul électron périphérique

Transition :

$$3s \quad 3p : 590 \text{ nm}$$

$$3s \quad 4p : 330 \text{ nm}$$

$$3s \quad 5p : 285 \text{ nm}$$

Sachant que les électrons externes sont sur le niveau E_0 et que les longueurs d'onde absorbées observées sont 590 nm, 330 nm et 285 nm. Indiquer par des flèches les transitions électroniques correspondantes.

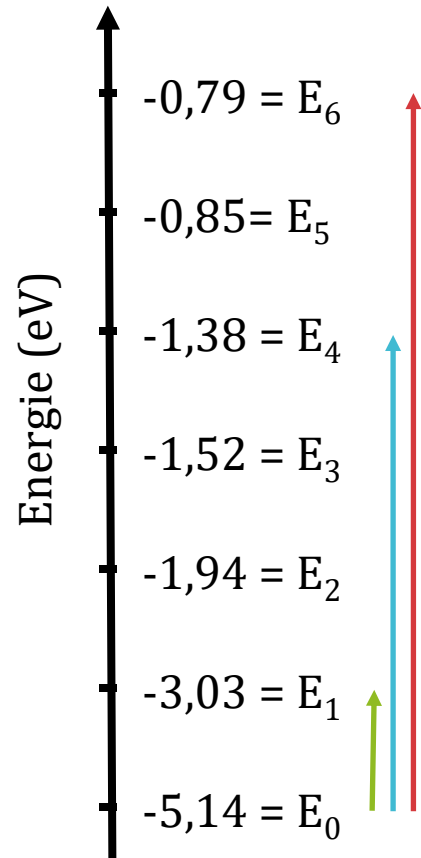
Données :

$$h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

$$c = 3,00 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

$$1\text{eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

Niveaux énergétiques
du sodium

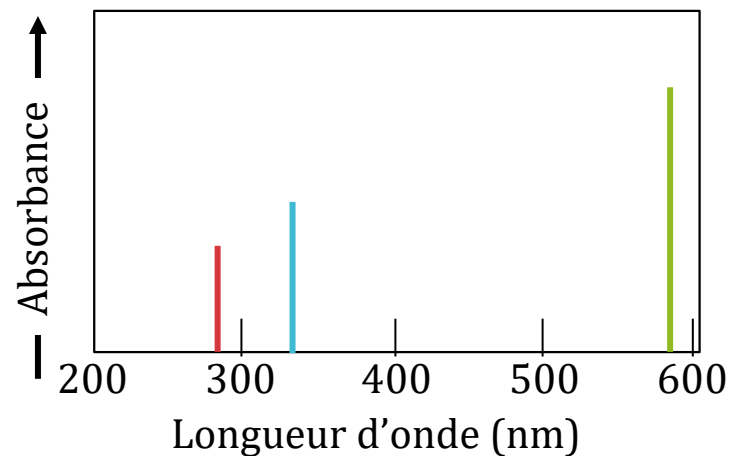


La différence d'énergie est liée à la longueur d'onde par l'expression :

$$E_n - E_0 = \Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

$$E_n = E_0 + \frac{hc}{\lambda}$$

λ (nm)	ΔE (J)	ΔE (eV)	E_n (eV)
590	$3,37 \cdot 10^{-19}$	2,10	-3,04
330	$6,02 \cdot 10^{-19}$	3,76	-1,38
285	$6,97 \cdot 10^{-19}$	4,36	-0,79



Application :

SAA : Spectroscopie d'Absorption Atomique

SAA : Concerne 70 éléments du tableau périodique

Photométrie de flamme : alcalins (Na, K, Li) et alcalino-terreux (Ca, Mg)

Éléments sont à l'état gazeux lors de la mesure

Quantification à λ spécifique de l'élément \Leftrightarrow Absorption proportionnelle à quantité d'atomes

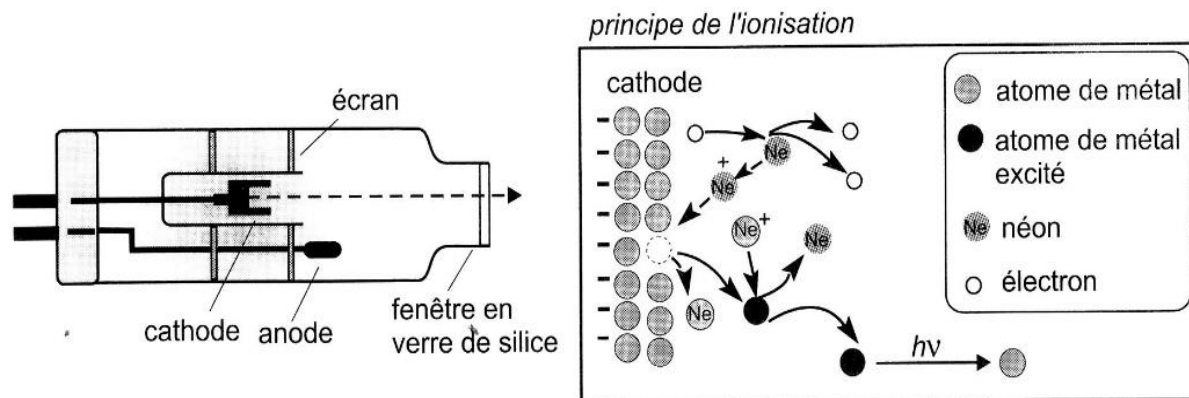
Nécessité d'une source lumineuse

Source lumineuse

Bande passante ne permet pas de lumière monochromatique \Leftrightarrow Absorption optimisée par un faisceau incident à la longueur d'onde qui sera absorbée \Leftrightarrow La source lumineuse est spécifique de l'élément à doser

Ex Pb : lampe émet à 283 nm
Se : lampe émet à 196 nm

Lampe à Cathode creuse : des lampes existent pour chacun des 70 éléments que l'on peut doser par SAA



Lampe à cathode creuse d'un modèle classique.

La cathode est un cylindre creux dont l'axe de révolution correspond à l'axe optique de la lampe. L'intensité est de quelques milliampères. À droite, dans l'encadré, représentation imagée de l'excitation des atomes de la cathode sous l'impact des ions néon.

Anode tungstène
Cathode faite du métal à analyser dans
Ne(gaz inerte) sous pression
Courant de qq mA

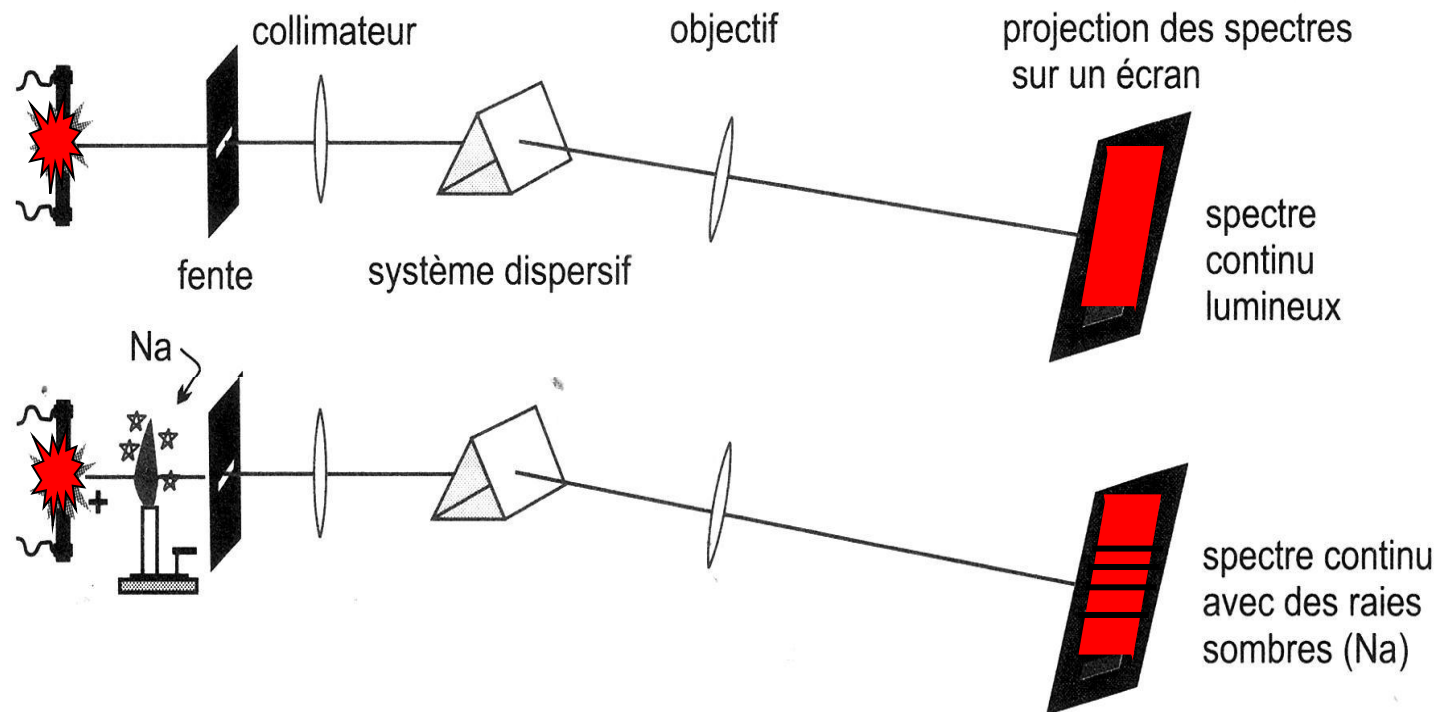
Lampe à décharge sans électrode

10 à 100 fois plus intenses que lampe à cathode creuse. Energie fournie par un champ électromagnétique de fréquence radio ou micro-ondes.

Gaz inerte s'ionise dans le champ électromagnétique et cations formés y sont accélérés jusqu'à entrer en collision avec le métal qui sera alors atomisé et excité

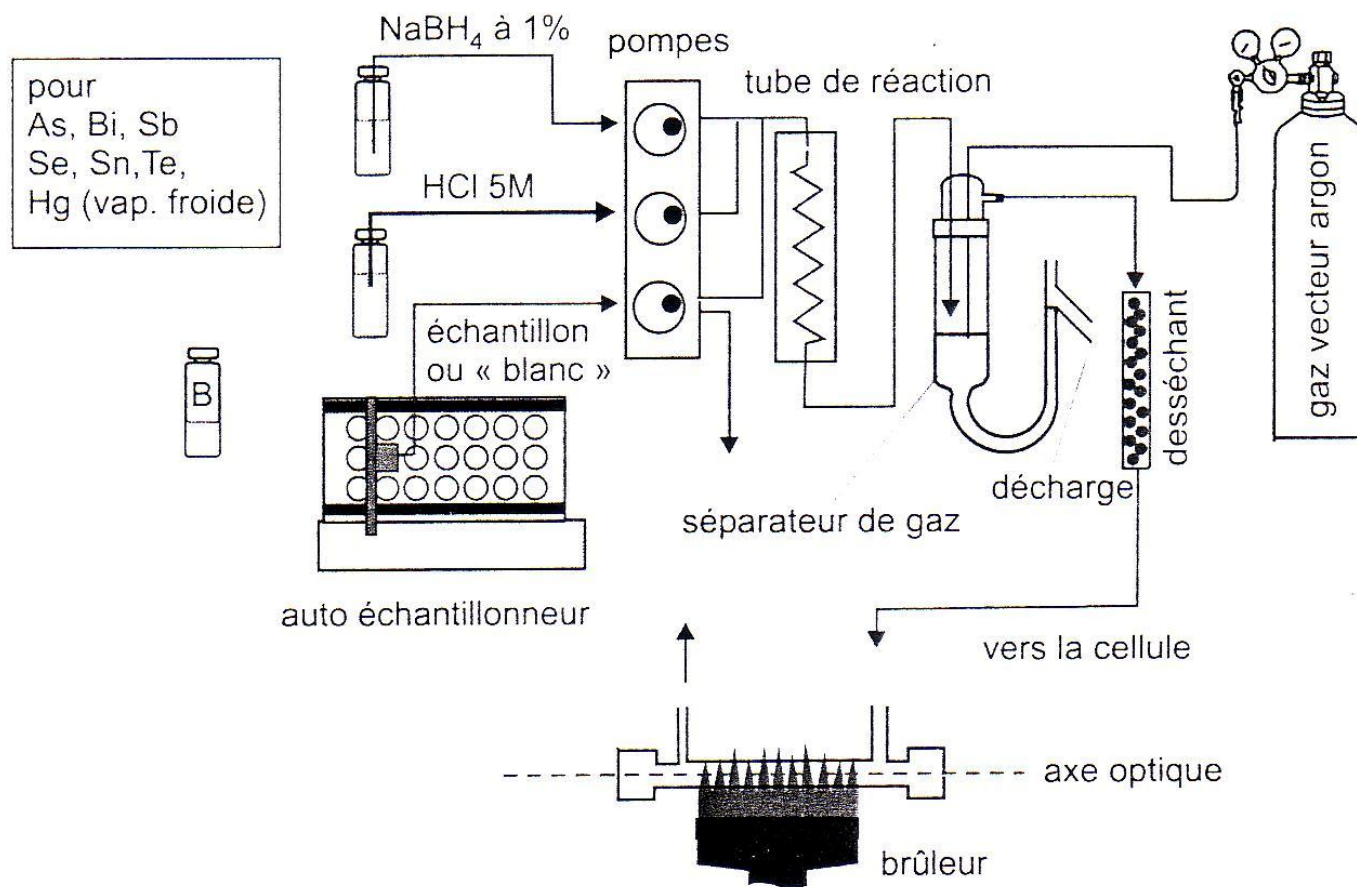
Pour As, Se, Te (énergie des cations de gaz inerte dans la cathode creuse trop faible pour arracher les atomes de la cathode)

Principe

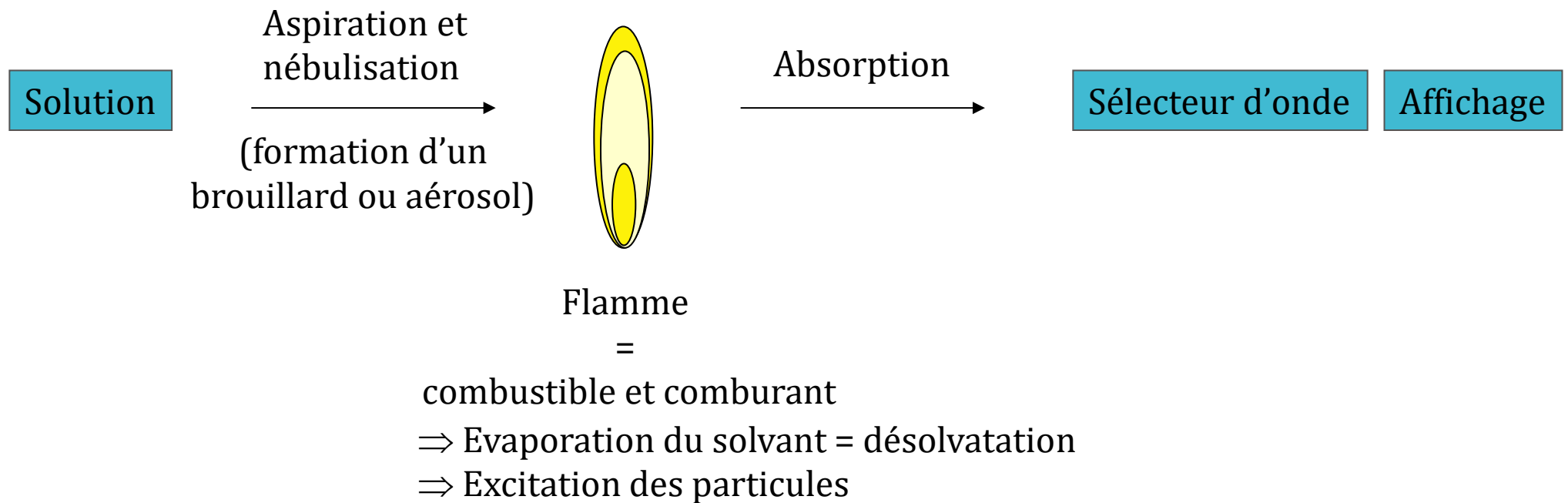


Atomisation : prétraitement

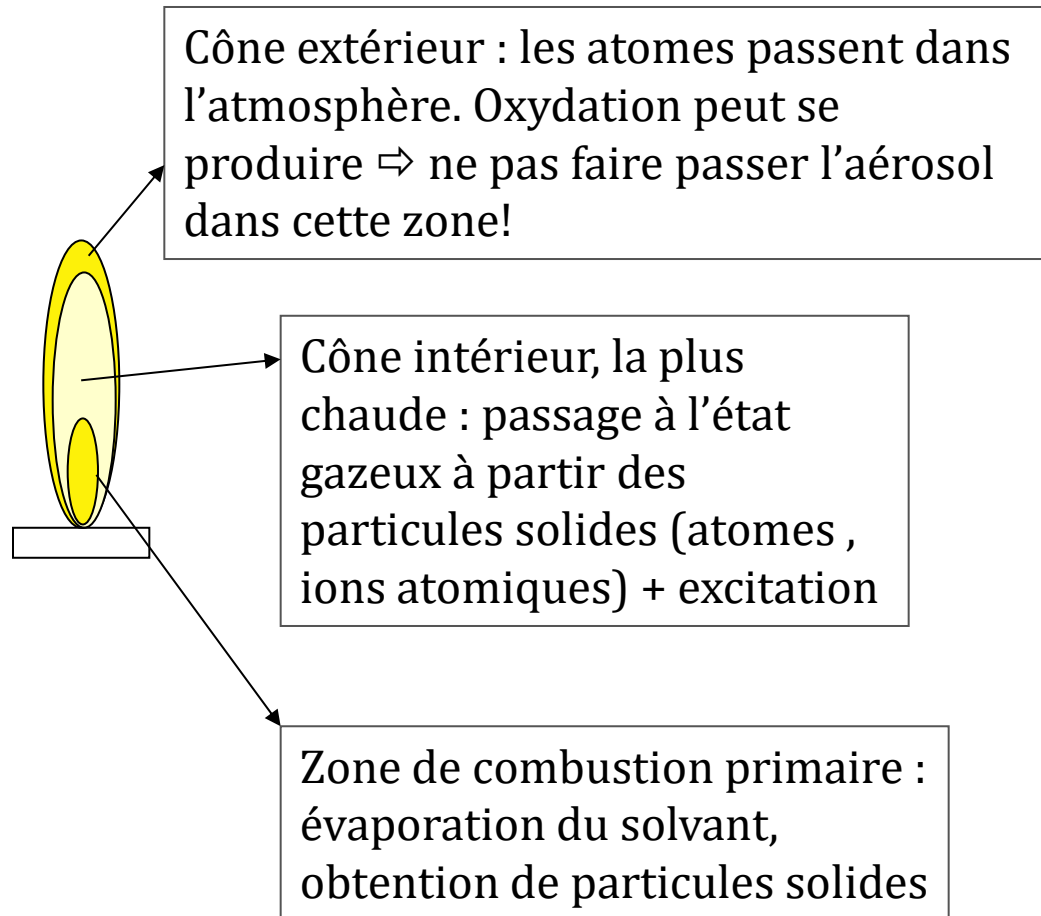
Remarque : qd produits pas suffisamment volatils, possibilité de prétraitement de l'échantillon.
Ex : formation d'hydrures (\Leftrightarrow passage à l'état MX)



Principe de l'appareillage



Importance de la flamme



Flammes utilisées

Combustible et comburant	Température (°C)
Gaz-air	1700-1900
Gaz-O ₂	2700-2800
H ₂ -air	2000-2100
H ₂ -O ₂	2550-2700
C ₂ H ₂ -air	2100-2400
C ₂ H ₂ -O ₂	3050-3150
C ₂ H ₂ -N ₂ O	2600-2800

Excitation des alcalins et alcalino-terreux

Excitation des métaux lourds

Passage dans la flamme bref, peu de solution subit l'ensemble du processus \Leftrightarrow flamme n'est pas un atomiseur efficace.
Remarque : Atomiseur électrothermique plus performant à ce niveau

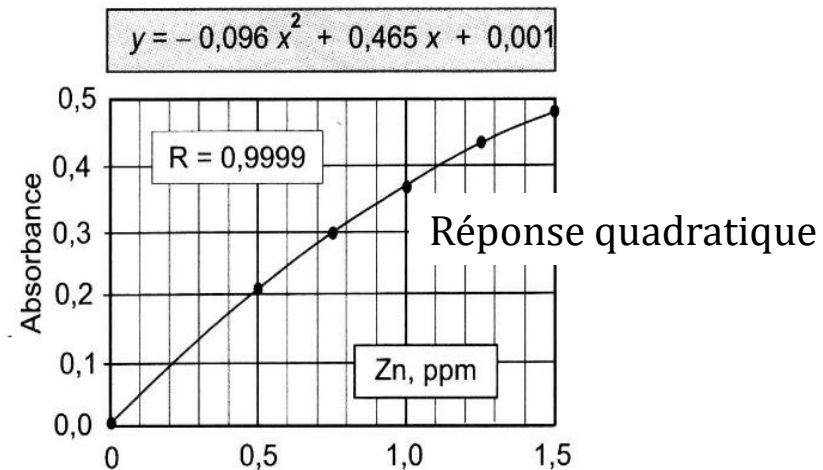
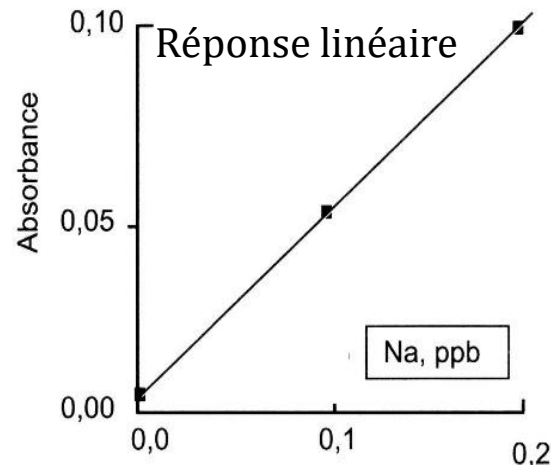
Étalonnage

- Écart à la linéarité fréquent \Rightarrow étalonnage sur plusieurs pts $A = k C$ avec k : coeff propre à chq élément à λ donnée.
- Application pour $C < 3\text{ppm}$ (rappel : $1\text{ ppm} = 1\text{mg/L}$)

2 méthodes fréquemment utilisées :

- *l'étalonnage externe* : le domaine de concentration dans lequel la linéarité existe est étroit.

1^{ère} étape : Préparation et analyse de solutions de concentrations croissantes de l'atome à doser $\Rightarrow A = f(C)$.



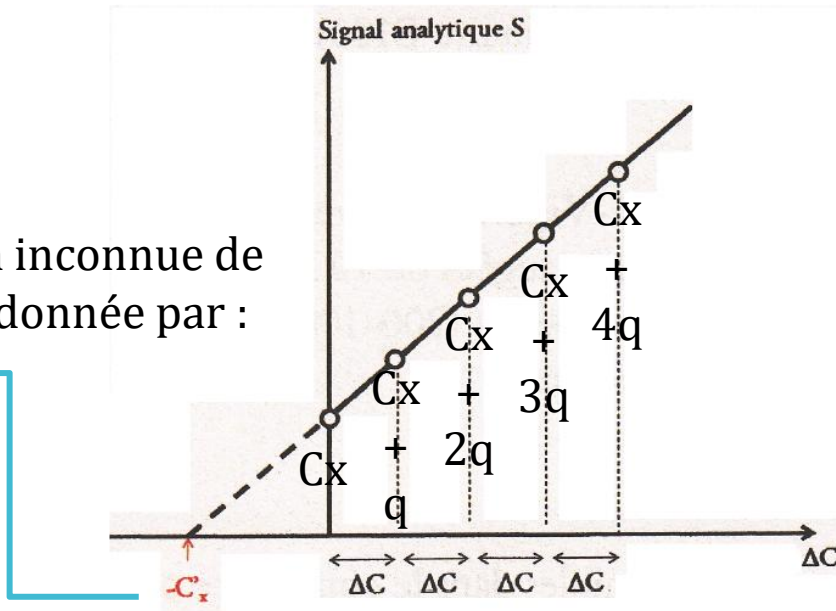
2^{ème} étape : Analyse de l'échantillon et report sur l'étalonnage \Rightarrow déduction de la concentration inconnue

Application : analyse quantitative

- la méthode des ajouts dosés : pour éviter les effets de matrice. Des quantités connues et croissantes q_i de l'élément à doser sont ajoutées à l'échantillon. On trace $A = f(q \text{ ou } V)$.

La concentration inconnue de l'échantillon est donnée par :

$$C_x = -b/a$$



Equation de la droite obtenue

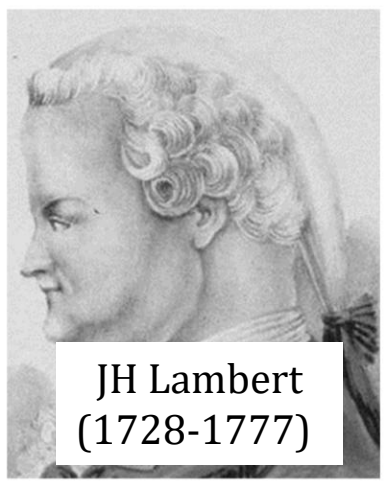
$$\text{Signal} = a C + b$$

Courbe obtenue par la méthode des ajouts dosés

Application : analyse quantitative

Limites de détection

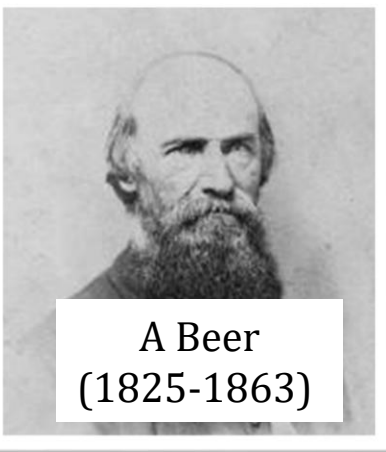
Elément	LD (ng/mL)
Ag	3
Al	30
Ba	20
Ca	1
Cu	2
Fe	6
K	2
Na	0,2
NI	3
Pb	5
Sn	15



Spectrophotométrie

Utilisée pour l'identification et le dosage de nombreuses molécules, principes actifs ou impuretés

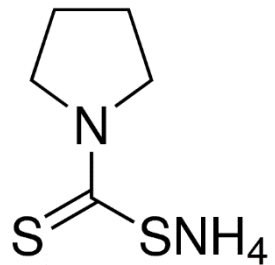
- Entraînement (suite)



Exercice 6

Un échantillon de 5,00 mL de sang est traité par de l'acide trichloracétique pour précipiter les protéines. Après centrifugation, la solution résultante est amenée à pH 3 et extraite par deux portions de 5 mL d'isobutylméthylcétone contenant de l'APDC (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate) qui complexe le plomb. L'extrait est aspiré directement dans une flamme air/acétylène et présente une absorbance de 0,502 à 283,3 nm.

Des prises de 5 mL de solutions étalons contenant 0,400 et 0,600 ppm de plomb sont traitées de la même manière et donnent des absorbances de 0,396 et 0,599. Calculez la teneur en plomb en ppm dans l'échantillon en admettant que la loi de Beer est suivie.

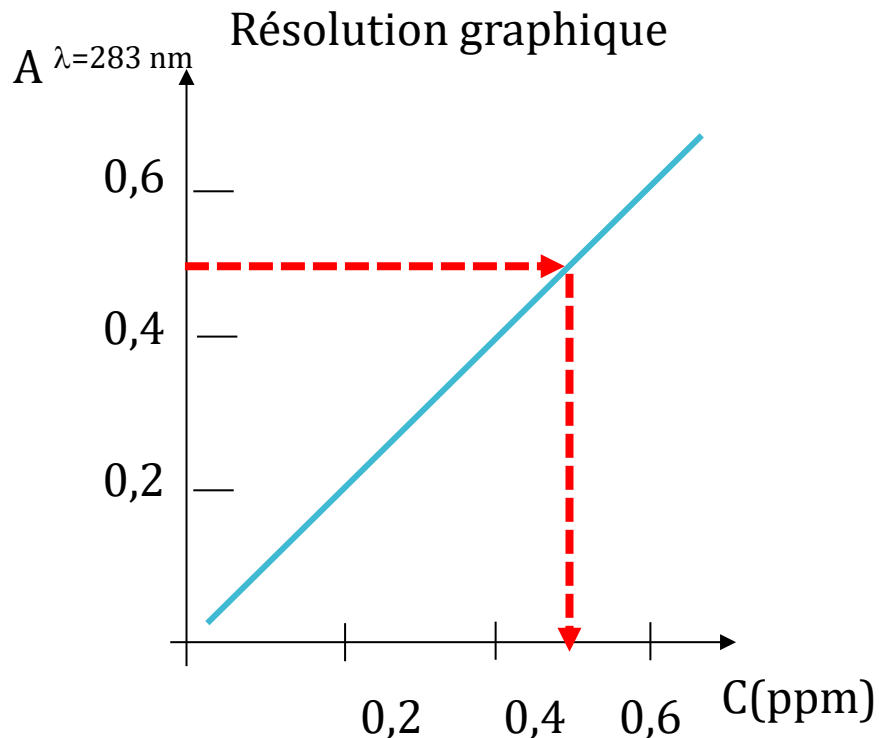


Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate

Exercice 6

Un échantillon de 5,00 mL de sang est traité par de l'acide trichloracétique pour précipiter les protéines. Après centrifugation, la solution résultante est amenée à pH 3 et extraite par deux portions de 5 mL d'isobutylméthylcétone contenant de l'APDC (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate) qui complexe le plomb. L'extrait est aspiré directement dans une flamme air/acétylène et présente une absorbance de 0,502 à 283,3 nm.

Des prises de 5 mL de solutions étalons contenant 0,400 et 0,600 ppm de plomb sont traitées de la même manière et donnent des absorbances de 0,396 et 0,599. Calculez la teneur en plomb en ppm dans l'échantillon en admettant que la loi de Beer est suivie.



Résolution mathématique

Loi de Beer-lambert suivie \Leftrightarrow équation de la forme $A = k C$

$$K = \text{Pente} = \frac{0,599 - 0,396}{0,6 - 0,4} = 1,015$$

$$[\text{Pb}_{\text{éch}}] = \frac{A}{k} = \frac{0,502}{1,015} = 0,495 \text{ ppm}$$

Ce document est la propriété exclusive de B Gargadennec-Legouin et ne saurait être utilisé, reproduit, représenté, transmis ou divulgué sans son accord préalable et explicite.

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes



UFR Pharmacie - Rennes

Une question...
Une précision...
RDV sur le forum

Dr Béatrice GARGADENNEC-LEGOUIN / UFR Pharmacie / Rennes

Dr Nicolas GOUAULT / UFR Pharmacie / Rennes



UFR Pharmacie - Rennes