

Linéarité de la relation absorbance en fonction de la concentration :

cas du colorant rouge Ponceau S à 520 nm dans un diluant bleu n'absorbant pas à 520 nm

1 Contexte du travail

La loi de Beer-Lambert est une « loi idéale » supposant l'absence de tout phénomène de réflexion de la lumière, l'absence de tout phénomène de diffusion de la lumière, des interactions nulles entre molécules ... On suppose aussi des mesures avec un appareil parfait : monochromatisme parfait, aucune lumière parasite, réponse parfaite du photodétecteur ...

La linéarité de la relation entre l'absorbance mesurée et la concentration pour une molécule absorbante donnée mérite souvent d'être étudiée expérimentalement. Elle caractérise un système spectrophotomètre/produit étudié.

Le colorant rouge Ponceau S est utilisé pour tester les volumes de l'ordre du μL délivrés par les pipettes à piston par les 2 méthodes photométriques décrites dans la norme ISO 8655-7 : 2005 (F)ISO 8655-7 :2005(F) . Ces méthodes (dont la description est inutile ici) exigent d'étudier la linéarité de la relation absorbance à 520 nm en fonction de la concentration pour le rouge Ponceau S (dans le diluant mis en œuvre). C'est l'objet de ce travail pratique.

2. Réactifs disponibles et solutions à préparer

2.1 Réactifs disponibles

- **Tampon zéro** : tampon phtalate 0,02 mol/L ajusté à pH 6,0 (4,08 g d'hydrogénophthalate de potassium et 13,3 mL de NaOH à 1 mol/L pour 1 litre). Le tampon zéro n'absorbe ni à 520 ni à 730 nm.
- **Diluant bleu** : tampon zéro contenant 3,74 g/L d'EDTA tétrasodique et 1,12 g/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,0, filtré sur 0,2 μm . Le diluant est bleu, présentant un pic d'absorbance à 730 nm. N'absorbe pas à 520 nm.
- **Solution mère de Rouge Ponceau en tampon bleu**: solution à 0,0824 g/L en tampon bleu, filtration stérilisante avec filtre 0,2 μm = SMb/1
- **Solution mère de Rouge Ponceau en tampon zéro**: solution à 0,0824 g/L en tampon zéro, filtration stérilisante avec filtre 0,2 μm = Smz/1. Puis dilution exacte au 1/10 (pipette jaugée 2 traits de 10 mL, et fiole jaugée de 100 mL, classe A) = Smz/10.

2.2 Solutions à préparer

Chaque étudiant prépare une des solutions suivantes et la conditionne en flacon étanche :

Nom de la solution	SMb/50	SMb/20	SMb/10	SMb/5	SMb/2
Solution à diluer	SMb/1				
Dilutions à réaliser	d=1/50	d=1/20	d=1/10	d=1/5	d=1/2
Avec	Pj2+A* 5 mL, fjA* 250 mL	Pj2+A 5 mL, fjA 100 mL	Pj2+A 10 mL, fjA 100 mL	Pj2+A 10 mL, fjA 50 mL	Pj2+A 25 mL, fjA 50 mL
Diluant	Diluant bleu				
Incertitude-type dilution **	0,00005	0,00014	0,00016	0,00035	0,00062
en %	0,27 %	0,28%	0,16 %	0,17 %	0,12%

* : Pj2+A = pipette jaugée 2 traits de classe A, fjA = fiole jaugée de classe A.

** : d'après feuille de calculs métrologie disponible à <http://www.perrin33.com/polys/analytiq/tp-linearitebeerlambertrougeponceau-ficheincertitudespipetages.odt>, pour verrerie de classe A, répétabilité standard de technicien, à 20°C avec une incertitude-type de température de 2°C

3 Spectres

Par groupe de 4 étudiants, obtenir les spectres superposés du diluant bleu et de SMb/10 et SMz/10 contre le tampon zéro entre 450 et 750 nm. Travailler avec une cuve unique qui sera rincée soigneusement ou un système de cuve à aspiration. Noter dans le compte-rendu les caractéristiques de largeur de bande passante du spectrophotomètre utilisé.

On pourra éventuellement vérifier que le tampon zéro n'absorbe pas entre 450 et 750 nm contre de l'eau.

Analyser les résultats obtenus. Expliquer pourquoi il n'était pas possible de travailler directement avec les solutions SMb/1 et Smz/1.

4. Etude de linéarité de la relation absorbance en fonction de la concentration

Par groupe de 4 étudiants, mesurer toutes (15) les solutions SMb/1, SMb/2, SMb/5, SMb/10, SMb/20, SMb/50 réalisées contre le tampon zéro, à 520 nm. Utiliser une unique cuve qui sera vidée/rincée soigneusement (pas de rayure, pas d'empreintes sur la zone de lecture ...) entre chaque solution (de la moins concentrée à la plus concentrée) ou un système de cuve à aspiration.

Analyser la linéarité.

5. Analyse de risques et de sécurité

Se documenter collectivement sur les réactifs : hydrogénophthalate de potassium, EDTA, rouge ponceau S, CuCl₂. Analyser, conclure (préparation des réactifs, utilisation des réactifs, gestion en déchets).

Bibliographie : normes ISO 8655-7 : 2005 (F) et ISO 8655-7 :2005(F)