



Année 2023 - 2024

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Activité technologique en analyse biochimique N°4



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

godin.lionel@orange.fr

TP n°4 : MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS

PRINCIPE ET APPLICATIONS

1. BUT	2
2. APPLICATION À LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	2
2.1. Produits	2
2.2. Matériel et réactifs fournis	2
2.3. Généralités	3
2.4. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode de la droite d'étalonnage	4
2.4.1. Préparation de la solution mère F_0	4
2.4.2. Préparation et mesure des solutions filles	4
2.4.2.1. Méthode de la droite d'étalonnage	4
2.4.2.2. Obtention de la droite d'étalonnage	4
2.4.3. Préparation et mesure de l'échantillon de sucre Vanillé et de l'étalon de contrôle	5
2.5. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés	6
2.5.1. Préparation des solutions filles	6
2.5.2. Méthode des ajouts dosés	6
2.5.2.1. Réalisation des mesures et obtention de la droite	6
2.5.2.2. Analyse des résultats	6
2.5.3. Conclusion et comparaison des résultats	7
3. APPLICATION À LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	7
3.1. Produits	7
3.2. Matériel et réactifs fournis	7
3.3. Généralités	8
3.4. Mode opératoire	8
3.4.1. Préparation des solutions mères S_0 et S_{sch}	8
3.4.2. Préparation et mesure des solutions filles	9
3.4.3. Résultats	9
3.4.4. Conclusion	10
4. CONCLUSION GÉNÉRALE	10
5. ÉLÉMENTS DE RÉPONSE AUX QUESTIONS	11

6. RAPPORT D'ACTIVITÉ : APPLICATION DES AJOUTS DOSES A LA SPECTROSCOPIE

UV-VISIBLE 13

6.1. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode de la droite d'étalonnage 13

6.1.1. Préparation des solutions mères S_0 et B_0 13

6.1.2. Préparation et mesure des solutions filles 13

6.1.2.1. Méthode de la droite d'étalonnage 13

6.1.2.2. Obtention de la droite d'étalonnage 14

6.2. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés 17

6.2.1. Méthode des ajouts dosés 17

6.2.1.1. Réalisation des mesures et obtention de la droite 17

6.2.1.2. Analyse des résultats 18

6.2.2. Conclusion et comparaison des résultats 20

7. APPLICATION DES AJOUTS DOSES À LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE 21

7.1. Préparation des solutions mères S_0 et S_{Sch} 21

7.2. Résultats 22

7.3. Conclusion et comparaison des résultats 24

8. CONCLUSION GÉNÉRALE 25

1. BUT

Ce Tp expose les principes et fondements de la méthode des ajouts dosés (aussi nommée méthode des additions connues).

Cette méthode constitue une alternative intéressante à la méthode de la droite de calibration afin de déterminer la concentration d'un analyte donné. Celle-ci possède notamment comme avantage la **prise en compte des effets matrice** (c'est-à-dire du réel milieu environnant de l'analyte).

Le but du Tp est d'appliquer cette méthode à plusieurs types d'analyses tels que la spectrophotométrie d'absorption UV-Visible et la spectrofluorimétrie.

2. APPLICATION À LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

2.1. Produits

- Sucre Vanillé en poudre
- Vanilline à 99 % de pureté
- Soude à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

2.2. Matériel et réactifs fournis

- 6 fioles jaugées de 10 et 20 mL
- Micro-cuves plastique
- fioles jaugées de 50 et 100 mL
- 1 micropipette P1000 (100 – 1000 μL)
- Spectrophotomètre UV-Visible CAMSPEC M550, pour la gamme classique
- Spectrophotomètre UV-Visible UVIKON 900 Lite, pour la gamme par ajouts dosés
- Une balance de précision

2.3. Généralités

Le sucre vanillé est un indémodable pour réaliser des préparations gourmandes. En pâtisserie, le sucre blanc et le sucre cassonade sont parfumés grâce à de l'extrait de vanille. Pour les plus gastronomes, c'est l'extrait de vanille pure, gratté à même la gousse de vanille, qui est ajouté pour sucrer le lait, les oeufs ou les crèmes. **Le sucre vanillé** se trouve facilement dans le commerce. Il est le plus souvent conditionné en sachets de 7,5 g. En effet, très peu de sucre vanillé suffit pour obtenir une préparation agréablement parfumée.

le sucre vanillé a en général une teinte ambrée due à la coloration de la vanille. Mais en fonction de la qualité du sucre et de l'extrait de vanille utilisé, cette teinte peut varier. Plus le sucre vanillé est clair et moins il est parfumé. La vanille est une épice dont la gousse s'utilise séchée.

Sur l'étiquette du sachet de sucre vanillé, il est précisé l'information suivante : « **4 % en masse de gousse de vanille** ». On souhaite vérifier cette indication, sachant qu'**un gramme de gousse de vanille peut contenir de 5 à 25 mg de vanilline**, cela revient à vérifier que l'on obtienne une **teneur comprise entre 0,2 et 1,0 mg/g**. La **vanilline** est un aldéhyde aromatique naturel qui se développe dans les gousses de vanille lors de la préparation de celles-ci comme épice. On l'utilise pour faire des arômes naturels

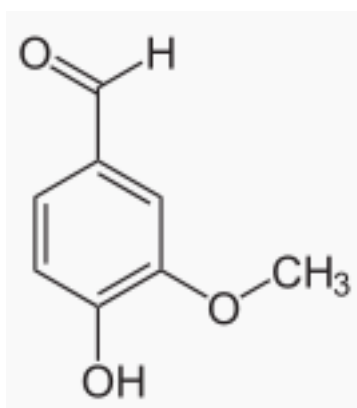


Figure 3. Structure moléculaire de la vanilline

Le but de l'expérience dans cette partie est de déterminer la quantité en masse de vanilline dans un sachet commercial de sucre vanillé. La méthode des ajouts dosés se révèle ici très intéressante en raison de la complexité de la matrice ainsi que de l'absence d'informations sur celle-ci.

2.4. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode de la droite d'étalonnage

2.4.1. Préparation de la solution mère F_0

☞ Dans un bécher de 100 mL, introduire environ exactement 10 mg de vanilline pure et environ 80 mL de soude. Mettre sous agitation, et lorsque la dissolution est complète, transférer dans une fiole de 100 mL. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de la soude. Cette solution sera appelée F_0 .



Rapport

- On obtient une solution mère F_0 dont vous donnerez la concentration massique exacte C_0 .

2.4.2. Préparation et mesure des solutions filles

2.4.2.1. Méthode de la droite d'étalonnage

☞ Préparer 5 solutions filles de concentration en Vanilline par dilutions successives de la solution mère F_0 , préparée précédemment, dans des fioles de 20 mL.

Vous remplirez un tableau du type de celui indiqué ci-dessous :

Solutions filles F_i	Concentration C_i ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$V(F_0)$ (μL)	V_{soude} (mL)
Blanc	0	0	Qsp soude
F_1		200	
F_2		400	
F_3		600	
F_4		800	
F_5		1000	

Tableau 1. Récapitulatif des concentrations des solutions F_1 à F_5 et de leur mode de préparation à partir de F_0

2.4.2.2. Obtention de la droite d'étalonnage

☞ Réaliser le spectre de la solution F_6 entre 300 et 400 nm, en mode « Wavelength Scan Mode » pour déterminer la longueur d'onde de travail.



Rapport

Vous rendrez le spectre correspondant, et vous indiquerez clairement la longueur d'onde de travail.

☞ Réaliser la droite d'étalonnage $A = f(C)$ directement sur le CAMSPEC M550 en **mode « Fixed Points Measurement »**. Pour cela utiliser la notice fournie directement sur le spectrophotomètre. Ne pas imprimer tout de suite !

2.4.3. Préparation et mesure de l'échantillon de sucre vanillé et de l'étalon de contrôle

☞ **Préparation de l'échantillon de sucre vanillé** : Dans un bécher de 50 mL, introduire environ exactement 200 mg de sucre vanillé et environ 40 mL de soude. Mettre sous agitation, et lorsque la dissolution est complète, transférer dans une fiole de 50 mL. Compléter jusqu'au trait de jauge avec de la soude.

☞ **Préparation de l'étalon de contrôle** : Préparer une fiole CQ de 20 mL, en utilisant $V(F_0) = 500 \mu\text{L}$.



Rapport

Donner la concentration C_{ref} correspondante.

☞ Réaliser 2 fois la mesure sur l'échantillon de sucre vanillé et 1 fois la mesure de l'étalon de contrôle.

☞ Lorsque tous les résultats sont à l'écran, **imprimer**.



Rapport

- Imprimer la droite d'étalonnage.
- Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{\text{ref}} \pm 10 \%$.
- En déduire, grâce à la droite d'étalonnage, les concentrations en Vanilline pour l'échantillon de sucre Vanillé, C_1 et C_2 , puis vérifier la compatibilité métrologique en répétabilité des deux essais à l'aide de l'annexe métrologique.
- Donner alors la concentration en Vanilline. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.
- En déduire finalement la quantité en masse de Vanilline par gramme de vanille, c'est-à-dire la teneur.

Q Quel type de cuve peut-on utiliser pour faire les mesures ?

Q Indiquer la nature du blanc de mesure.

Q Quel est l'intérêt de déterminer la longueur d'onde de travail ?

2.5. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés

2.5.1. Préparation des solutions filles

☞ Préparer 6 solutions filles de concentration croissante en Vanilline par ajouts successifs connus de la solution mère F_0 à la solution de l'échantillon de sucre vanillé, dans des fioles de 10 mL.

Vous utiliserez le tableau ci-dessous, pour réaliser les solutions filles :

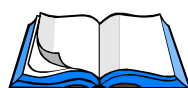
Solutions filles X_i	Volume V_x de l'échantillon (mL)	$V_s(F_0)$ (μ L)	V_{soude} (mL)
Blanc	0	0	Qsp soude
X_1	5,0	100	
X_2	5,0	200	
X_3	5,0	300	
X_4	5,0	400	
X_5	5,0	500	
X_6	5,0	600	

Tableau 2. Récapitulatif du mode de préparation des solutions X_1 à X_6 à partir de F_0 et de l'échantillon de sucre vanillé

2.5.2. Méthode des ajouts dosés

2.5.2.1. Réalisation des mesures et obtention de la droite

☞ Réaliser la droite d'étalonnage $A = f(V_s)$ directement sur l'Uvikon 900 Lite en **mode Quantification**.



Rapport

- Imprimer la droite des ajouts dosés.
- Démontrer la relation : $C_x = \frac{b}{m} \cdot \frac{C_s}{V_x}$

2.5.2.2. Analyse des résultats



Rapport

- Donner les valeurs obtenues pour la pente m et l'ordonnée à l'origine b , avec leur unité convenable.
- En déduire, la concentration en Vanilline, pour l'échantillon.
- En déduire finalement la quantité en masse de Vanilline par gramme de vanille.

2.5.3. Conclusion et comparaison des résultats



Rapport

- Comparer les résultats obtenus dans le cas des deux méthodes utilisées.
- Conclure sur la conformité du produit.

Q Quel est l'intérêt de la méthode des ajouts dosés ?

Q Le domaine de linéarité est-il important à prendre en compte dans chacune des deux méthodes ?

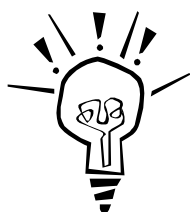
3. APPLICATION À LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

3.1. Produits

- Sulfate de quinine monohydraté (CAS n° 6119-70-6)
- Solution aqueuse d'acide sulfurique molaire H_2SO_4 (1 mol.L^{-1})
- Schweppes®

3.2. Matériel et réactifs fournis

- 6 fioles jaugées de 20 mL
- 1 cuve 4 faces optiques
- 2 fioles jaugées de 100 mL
- 1 P1000 et une pipette jaugée de 4 mL
- Spectrofluorimètre Shimadzu 1501
- Une balance de précision



Remarque

Les cuves en quartz à quatre faces optiques sont extrêmement fragiles et coûtent très cher. Les manipuler avec le plus grand soin et ne les utiliser que pour le **spectrofluorimètre**.

3.3. Généralités

Le Schweppes® Indian Tonic est une boisson gazeuse rafraîchissante aux extraits d'écorces de Quinquina et d'oranges amères.

Il est composé d'eau gazéifiée, de sirop de glucose-fructose, de sucre (8,7 %), d'un acidifiant : l'acide citrique et d'arôme naturel tel que la quinine.

La quinine est une molécule organique de formule $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ($M = 782,94 \text{ g.mol}^{-1}$) dont la structure est représentée ci-dessous :

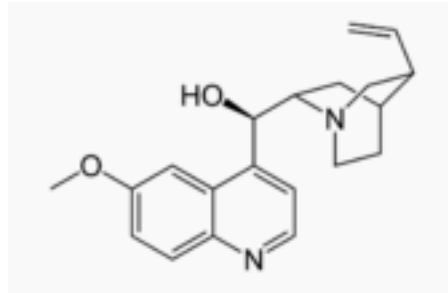


Figure 4. Structure moléculaire de la quinine

Elle présente des propriétés pharmacologiques (antipyrétique, analgésique et antipaludique). C'est une molécule fluorescente extraite naturellement de l'écorce du Quinquina (arbuste) sous forme d'une poudre blanche. C'est un composant aromatique de l'"eau tonique" (goût amer) présente dans le Schweppes® et dans les boissons gazeuses portant la mention "tonic". Ces boissons peuvent contenir jusqu'à 100 mg.L^{-1} de quinine sans inconvénient pour la santé.

En dose excessive, la quinine peut provoquer des problèmes de surdité et même la mort (dans de rare cas).

Le maximum de la fluorescence est situé à 450 nm et le domaine de linéarité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration est compris entre 0 et $6,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Un dosage à l'aide de la méthode de la droite d'étalonnage a permis d'évaluer la **concentration massique en quinine dans le Schweppes® à (71 ± 8) mg.L^{-1}** .

La méthode des ajouts dosés se révèle encore ici très intéressante pour les mêmes raisons que dans le cas du sucre vanillé (c'est-à-dire complexité de la matrice et absence d'informations sur celle-ci).

3.4. Mode opératoire

3.4.1. Préparation des solutions mères S_0 et S_{Sch}

☞ **Préparer une solution concentrée de sulfate de quinine** de concentration environ exactement $C_{quinine} = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$. Pour cela, peser une masse $m_{quinine}$ de sulfate de quinine que vous introduirez dans une fiole jaugée de 100 mL . Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution aqueuse de H_2SO_4 à 1 mol.L^{-1} .

☞ Prélever $600 \mu\text{L}$ de la solution précédente que vous placerez dans une fiole jaugée de 20 mL . Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution aqueuse de H_2SO_4 à 1 mol.L^{-1} . Cette solution sera appelée S_0 .

☞ **Prélever** un volume $V_{Sch} = 1 \text{ mL}$ de Schweppes® que vous introduirez dans une fiole jaugée de 100 mL . Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution aqueuse de H_2SO_4 à 1 mol.L^{-1} .



Rapport

- Indiquer la masse exacte pesée m_{quinine} .
- On obtient une solution mère S_0 dont vous donnerez la concentration $[\text{quinine}]_0$.
- Pour la seconde préparation, vous donnerez le facteur de dilution de la solution de Schweppes®.

3.4.2. Préparation et mesure des solutions filles

☞ Préparer 5 solutions filles de concentration croissante en sulfate de quinine par ajout successifs de volumes connus de la solution mère S_0 à la solution S_{Sch} , dans des fioles de 20 mL

Vous utiliserez le tableau ci-dessous, pour réaliser les solutions filles :

Solutions filles X_i	Volume V_x de S_{Sch} (mL)	$V_s(S_0)$ (mL)	$V_{\text{acide sulfurique}}$ (mL)
X_1	4,0	0	Qsp H_2SO_4
X_2	4,0	0,6	
X_3	4,0	1,2	
X_4	4,0	1,8	
X_5	4,0	2,4	

Tableau 3. Récapitulatif du mode de préparation des solutions X_1 à X_5 à partir de S_0 et S_{Sch}

☞ Paramétrez le spectrofluorimètre comme indiqué dans la notice technique.

☞ Pour chaque mesure, remplir un tableau sous Excel.

Réitérer **3 fois** la mesure (cela veut dire, concrètement, qu'il faut vider et remplir à chaque fois la cuve 4 faces optiques).

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'émission ?

3.4.3. Résultats



Rapport

- Imprimer la droite des ajouts dosés, sous Excel, en choisissant une courbe de tendance affine.



Rapport

- Donner les valeurs obtenues pour la pente m et l'ordonnée à l'origine b ainsi que leurs écart-types s_m et s_b .
- En déduire, la concentration en quinine pour la solution S_{Sch} , ainsi que son écart-type.
- Donner alors la concentration de quinine dans le Schweppes®, ainsi que son écart-type.

3.4.4. Conclusion et comparaison des résultats



Rapport

- Comparer le résultat obtenu avec celui obtenu par la méthode de la droite d'étalonnage.
- Conclure sur la conformité de la quinine dans le Schweppes®.

4. CONCLUSION GÉNÉRALE



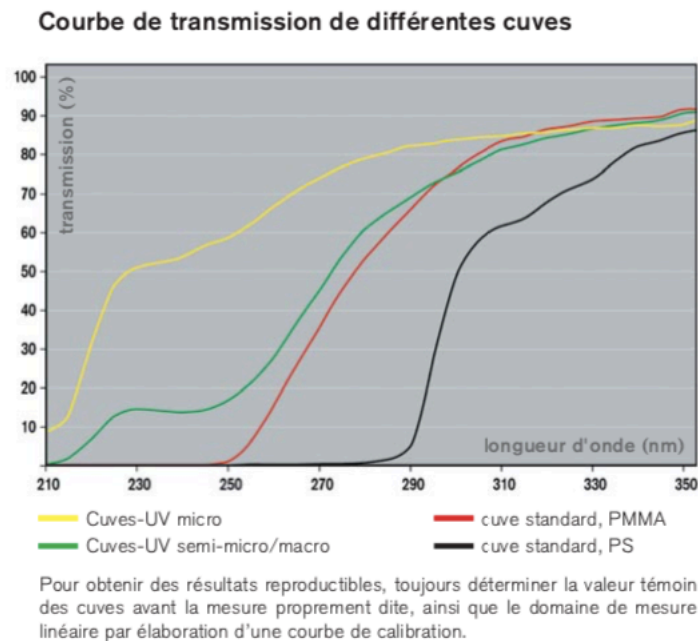
Rapport

Conclure sur tous les résultats obtenus.

5. ÉLÉMENTS DE RÉPONSE AUX QUESTIONS

Q Quel type de cuve peut-on utiliser pour faire les mesures ?

On peut utiliser des cuves en quartz (UV), verre (PMMA) ou plastique (PS), mais pour des raisons économiques, on préférera utiliser des cuves en plastique. Le graphe ci-dessous l'atteste :



Q Indiquer la nature du blanc de mesure.

Le blanc de mesure doit être le solvant utilisé pour réaliser les différentes solutions, donc dans le cas de la vanilline, la soude.

Q Quel est l'intérêt de déterminer la longueur d'onde de travail ?

Il faut effectuer un spectre de l'analyte afin de déterminer la longueur d'onde de travail, c'est-à-dire la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance de l'analyte est maximale.

Cela permet, d'une part, de travailler au maximum de sensibilité de la méthode d'analyse, d'autre part, les bandes passantes des spectrophotomètres n'étant pas infiniment minces, les écarts à la loi de Beer-Lambert seront minimisés si l'on travaille à cette longueur d'onde.

Q Quel est l'intérêt de la méthode des ajouts dosés ?

Cette méthode constitue une alternative intéressante à la méthode de la droite de calibration afin de déterminer la concentration d'un analyte donné. Celle-ci possède notamment comme avantage la **prise en compte des effets matrice** (c'est-à-dire du réel milieu environnant de l'analyte).

Donc, cette méthode permet de savoir si l'espèce dosée se comporte de la même manière dans le milieu d'analyse et dans la gamme.

Q Le domaine de linéarité est-il important à prendre en compte dans chacune des deux méthodes ?

Il arrive souvent que la relation de linéarité ne soit valable que pour une gamme donnée de concentration. Ainsi, pour de fortes concentrations en analyte, il est fréquent que la relation linéaire ne soit plus vérifiée. L'utilisateur devra donc veiller à se situer dans le **domaine de linéarité de la méthode** pour l'analyte, généralement en pratique, en diluant les différents étalons, et autres échantillons.

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'émission ?

Dans cette opération, le monochromateur d'excitation est fixe et c'est le monochromateur d'émission qui balaye en longueur d'onde.

TP n°4 : Rapport

6. RAPPORT D'ACTIVITÉ : APPLICATION des AJOUTS DOSÉS à la SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

6.1. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode de la droite d'étalonnage

6.1.1. Préparation de la solution mère F_0

On obtient une solution mère F_0 dont vous donnerez la concentration massique exacte C_0 .
Donner la concentration de référence $C_{\text{réf}}$.

6.1.2. Préparation et mesure des solutions filles

6.1.2.1. Méthode de la droite d'étalonnage

Remplir le tableau ci-dessous :

Solutions filles F_i	Concentration C_i ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$V(F_0)$ (μL)	V_{soude} (mL)
Blanc	0	0	Qsp soude
F_2		200	
F_3		400	
F_4		600	
F_5		800	
F_6		1000	

Tableau 1. Récapitulatif des concentrations des solutions F_1 à F_5 et de leur mode de préparation à partir de F_0

6.1.2.2. Obtention de la droite d'étalonnage

Indiquer la longueur d'onde de travail : $\lambda_{\text{Vanilline}} =$

Spectre de la Vanilline

Imprimer la droite d'étalonnage $A = f(C)$

Droite d'étalonnage

- Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10 \%$.
- En déduire, grâce à la droite d'étalonnage, les concentrations en Vanilline pour l'échantillon de sucre Vanillé, C_1 et C_2 , puis vérifier la compatibilité métrologique en répétabilité des deux essais à l'aide de l'annexe métrologique. Donner alors la concentration en Vanilline retenue.
- En déduire finalement la quantité en masse de Vanilline par gramme de vanille. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.
- Vérifier l'indication : « 4 % en masse de gousse de vanille » (Cf p. 5.3).

6.2. Mode opératoire dans le cas de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés

6.2.1. Méthode des ajouts dosés

6.2.1.1. Réalisation des mesures et obtention de la droite

- Imprimer la droite des ajouts dosés $A = f(V_s)$.

Droites des ajouts dosés
à coller ici

- Démontrer la relation : $C_x = \frac{b}{m} \cdot \frac{C_s}{V_x}$

Pour cela, rappeler les expressions de l'ordonnée à l'origine b et de la pente m et en faire le rapport. (Cf partie théorique p. 5.4)

6.2.1.2. Analyse des résultats

- Rappeler l'équation de modélisation obtenue pour la droite des ajouts dosés, avec le coefficient de corrélation R^2 .
- Donner les valeurs obtenues pour la pente m et l'ordonnée à l'origine b , avec leur unité convenable.

- En déduire, la concentration en Vanilline, pour l'échantillon.
- En déduire finalement la quantité en masse de Vanilline par gramme de vanille, c'est-à-dire la teneur.

6.2.2. Conclusion et comparaison des résultats

- Comparer les résultats obtenus dans le cas des deux méthodes utilisées. Quelle est la meilleure méthode ?

Conclure sur la conformité du produit.

7. APPLICATION des AJOUTS DOSÉS à la SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

7.1. Préparation des solution mères S_0 et S_{Sch}

- On obtient une solution mère S_0 dont vous donnerez la concentration molaire [quinine]₀.
- Pour la seconde préparation, vous donnerez le facteur de dilution de la solution de Schweppes ®.

7.2. Résultats

Imprimer la droite des ajouts dosés $I = f(V_s)$:

*Droite des ajouts dosés
à coller ici*

- Donner les valeurs obtenues pour la pente m et l'ordonnée à l'origine b ainsi que leurs écart-types s_m et s_b .
- En déduire, la concentration en quinine pour la solution S_{Sch} , ainsi que son écart-type.
- Donner alors la concentration de quinine dans le Schweppes®, ainsi que son écart-type.

7.3. Conclusion et comparaison des résultats

- Comparer le résultat obtenu avec celui obtenu par la méthode de la droite d'étalonnage (Cf p. 4.8). Quelle est la meilleure méthode ?
- Conclure sur la conformité de la quinine dans le Schweppes®.

8. CONCLUSION GENERALE

Conclure sur tous les résultats obtenus.