

CORRECTION DU TD DE SPECTROPHOTOMETRIE

Exercice :

Votre laboratoire d'analyse vient de recevoir une forte demande d'analyses d'eau issue d'une centrale de traitement des eaux usées. Le client (une municipalité) a détecté un problème environnemental chronique dans la rivière en aval de la station. Il cherche donc à évaluer l'efficacité de cette STEP. La demande est ciblée sur le niveau trophique des échantillons, notamment sur la quantité d'azote présent dans l'eau en entrée et en sortie de la station.

Le devis final comporte une analyse de l'azote totale (N_{tot}), et une l'analyse des différentes formes de l'azote présentes dans l'eau (nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) et l'azote ammoniacal (NH_3^+)).

Pour répondre à cette commande, votre technicien a adapté 4 protocoles d'analyses HACH®. Ces protocoles passent tous par des lectures spectrophotométriques (HACH-DR/2400®) :

- Méthode n°10020 pour le nitrate (0.2 à 30.0 mg/L en N-NO_3)
- Méthode n°8507 pour le nitrite (0.002 à 0.3 mg/L en N-NO_2)
- Méthode n°10023 pour l'ammoniac (0.02 à 2.50 mg/L en N-NH_3)
- Méthode n°10071 pour l'azote total (0.5 à 25.0 mg/L en N_{tot})

Malheureusement votre technicien est en arrêt maladie et vous allez devoir réaliser les analyses à sa place. Pour compléter votre malchance, la démarche qualité instaurée dans votre laboratoire ne vous permet pas d'avoir accès à tous les documents nécessaires à la bonne application des différents protocoles. Les documents disponibles sont en annexe.

- 1) A l'aide des documents disponibles en annexe et du document ci-dessous, déterminez la fourchette de longueurs d'ondes dans laquelle se situe la longueur d'onde de lecture de chacun des protocoles utilisés (justifier votre démarche pour un des quatre protocoles).

NB : « je suis allé chercher la solution sur internet » ne sera pas considéré comme une justification valide.

λ (nm)	Couleur de la réaction	Couleur complémentaire
400 – 465	Violet	Jaune – Vert
465 – 482	Bleu	Jaune
482 – 487	Bleu – Vert	Orange
487 – 510	Vert – Bleu	Orange – Rouge
493 – 530	Vert	Rouge
530 – 559	Vert – Jaune	Pourpre – Rouge
559 – 571	Vert – Jaune	Pourpre
571 – 576	Jaune – Vert	Violet
576 – 580	Jaune	Bleu
580 – 597	Orange	Bleu – Vert
597 – 617	Orange – Rouge	Vert – Bleu
617 – 780	Rouge	Vert – Bleu

Les solutions sont consignées dans le tableau ci-dessous.

	couleur de réaction	couleur complémentaire	fourchette longueurs d'ondes
10020	Jaune/vert	Violet	400-465 nm
8507	Rouge	Vert/bleu	487-510 nm
10023	Vert	Rouge	617-780 nm
10071	Jaune/vert	Violet	400-465 nm

- 2) A l'aide de la liste du matériel et du tableau 1 disponibles en annexe expliquer comment vous élaborer la gamme étalon du protocole 10071 (justifier en donnant la nature et le volume de solution mère insérer en fiole jaugée pour les cinq points de gamme évoqués dans le tableau)

Le protocole d'analyse 10071 comporte 2 phases. La première est une phase de digestion qui va transformer toutes les formes d'azote en Nitrate. La seconde phase est la réaction qui est sollicitée dans le protocole 10020. La solution mère utilisée est donc la solution de N-NO₃ à 100 mg/L.

Nous avons à disposition deux volumes de fioles jaugées : 50 et 100 mL. Les deux sont utilisables, mais utiliser les fioles de 50 mL vous permettra de faire des économies de solution mère.

Le calcul du volume de solution mère à transférer dans chacune des fioles est relativement simple

$$V = \frac{C \cdot V_{\text{fiole}}}{C_{\text{mère}}}$$

c	V (mL)
0,5	0,25
5	2,5
10	5
15	7,5
20	10

Pour pipeter le premier volume vous pouvez utiliser la propipette 100-1000 µL, et pour les quatre autres volumes vous pouvez utiliser la propipette 500-5000 µL. Notez que le pipetage des deux derniers volumes se réalisera alors en deux fois (risque d'erreur supplémentaire par rapport à un pipetage simple).

Afin de roder vos protocoles, votre client vous fait parvenir 6 échantillons. 3 échantillons pris en entrée de la station et 3 échantillons pris en sortie de station. Chaque échantillon est numéroté entre 1 et 3. Cette numérotation correspond à une date :

- La date n°1 correspond à une date à faible pluviométrie.
- La date n°2 correspond à une pluviométrie intermédiaire.
- La date n°3 correspond à une date fortement pluvieuse.

- 3) Vous avez à disposition en annexe les graphiques représentant les gammes étalons des trois premiers protocoles. Toutefois la figure 4 n'est pas complète. Placez les points du tableau n° 1 sur cette figure. Tracez une droite passant par l'origine du graphique et par le point le plus fort de la gamme étalon. Calculer l'équation de cette droite.

Pour calculer l'équation d'une droite, il faut sélectionner deux points sur la droite. Relever les coordonnées de ces deux points (x_a ; y_a et x_b ; y_b). Le coefficient directeur a s'obtient en appliquant cette relation :

$$a = \frac{Y_b - Y_a}{X_b - X_a}$$

ATTENTION : Vous ne devez pas prendre les coordonnées des points issus de l'expérimentation.

Cf. figure n°4 en annexe.

La droite tracée sur la figure n°4 est la droite de régression linéaire (elle ne passe pas par l'origine du graphique comme demandé dans l'énoncé). L'équation de la droite que vous avez calculée n'a pas d'ordonnée à l'origine, mais a le même coefficient directeur.

Vous pourrez remarquer que les résultats obtenus en forçant la droite par l'origine et ceux obtenus en utilisant la droite de régression sont sensiblement les mêmes.

- 4) Vous avez réalisé les analyses, les résultats (D.O) sont consignés dans le document ci-dessous. A l'aide des figures 1 à 4 convertissez ces valeurs en concentrations (Elaborer un tableau, vous pouvez utiliser l'équation de la droite que vous venez de calculer).

D.O	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₃	Ntot
entrée 1	0,25	0,45	0,3	0,35
entrée 2	0,69	0,56	0,2	0,3
entrée 3	0,56	0,9	0,1	0,4
Sortie 1	0,06	0,35	0,15	0,25
Sortie 2	0,09	0,3	0,2	0,19
Sortie 3	0,85	1,01	0,55	0,95

mg/L	N-NO ₂	N-NO ₃	N-NH ₃	Ntot
entrée 1	0,06	8,15	0,45	17,28
entrée 2	0,16	10,27	0,30	14,78
entrée 3	0,13	16,83	0,14	19,78
Sortie 1	0,01	6,22	0,22	12,28
Sortie 2	0,02	5,25	0,30	9,28
Sortie 3	0,20	18,96	0,84	*

Deux méthodes de transformations des données D.O en concentrations :

- Lecture directe sur les graphiques 1, 2, 3 et 4 (problème d'erreur de lecture difficile à quantifier et surtout non constant).
- Lecture indirecte par calcul de l'équation de droite et résolution de cette dernière avec les valeurs de D.O disponibles (le problème d'erreur liée à une mauvaise lecture de graphique existe toujours, mais avec cette méthode, l'erreur de lecture est répliquée à l'identique pour tous nos points).

- 5) Commentez vos résultats (efficacité de la STEP). Calculez les proportions d'azote traitées par la station. Cohérence des résultats.

Notez que les D.O Ntot disponibles sur votre poly de TD ont été modifiées (x10). Les Concentrations correspondantes aux valeurs de D.O non corrigées donnaient des valeurs de concentrations non cohérentes ($CN_{tot} < (CN-NO_3 + CN-NO_2 + CN-NH_3)$).

Notez aussi que la D.O du point Ntot de la sortie 3 se situe hors gamme, et donc hors domaine d'application de la loi Beer Lambert. Nous ne pouvons donc pas transformer cette valeur en concentration. Dans la pratique, l'échantillon en question doit être dilué (ici par trois avec de l'eau distillée), afin d'obtenir une D.O appartenant au domaine d'application de la loi Beer Lambert. La concentration obtenue ainsi sera par la suite multipliée par notre facteur de dilution pour obtenir la concentration « réelle » de notre échantillon.

Nous pouvons observer globalement que pour des pluviométries faibles et intermédiaires que la STEP joue un rôle épurateur non négligeable. En revanche, si nous isolons les résultats observés en période de forte pluviométrie, nous pouvons constater que ce rôle épurateur n'existe plus, et que la centrale est source de pollution.

ANNEXE :

Méthode 10071 :

Résumé : Une digestion alcaline au persulfate convertit toutes les formes de l'azote en nitrate. On ajoute du métabisulfite de sodium après digestion pour éliminer les interférences inhérentes aux oxydes halogénés. Ensuite le nitrate réagit avec l'acide chromotropique en condition fortement acide et forme un complexe de couleur **jaune-vert**.

Méthode 10023 :

Résumé : Les composés de l'ammoniaque se combinent avec le chlore pour former de la monochloramine. La monochloramine réagit avec le salicylate pour former du 5-aminosalylate. Le 5-aminosalylate s'oxyde en présence d'un catalyseur, le nitroprusside de sodium, pour former des composés de couleur bleue. Cette coloration masquée par la coloration jaune due à l'excès de réactif, finit par virer **au vert**.

Méthode 10020 :

Résumé : Le nitrate présent dans l'échantillon réagit avec l'acide chromotropique en condition fortement acide et forme un complexe de couleur **jaune-vert**.

Méthode 8507 :

Résumé : Le nitrite présent dans l'échantillon réagit avec le sulfanilamide et la N(1naphtyl) éthylène diamine en condition fortement acide pour former un complexe de couleur **rouge**.

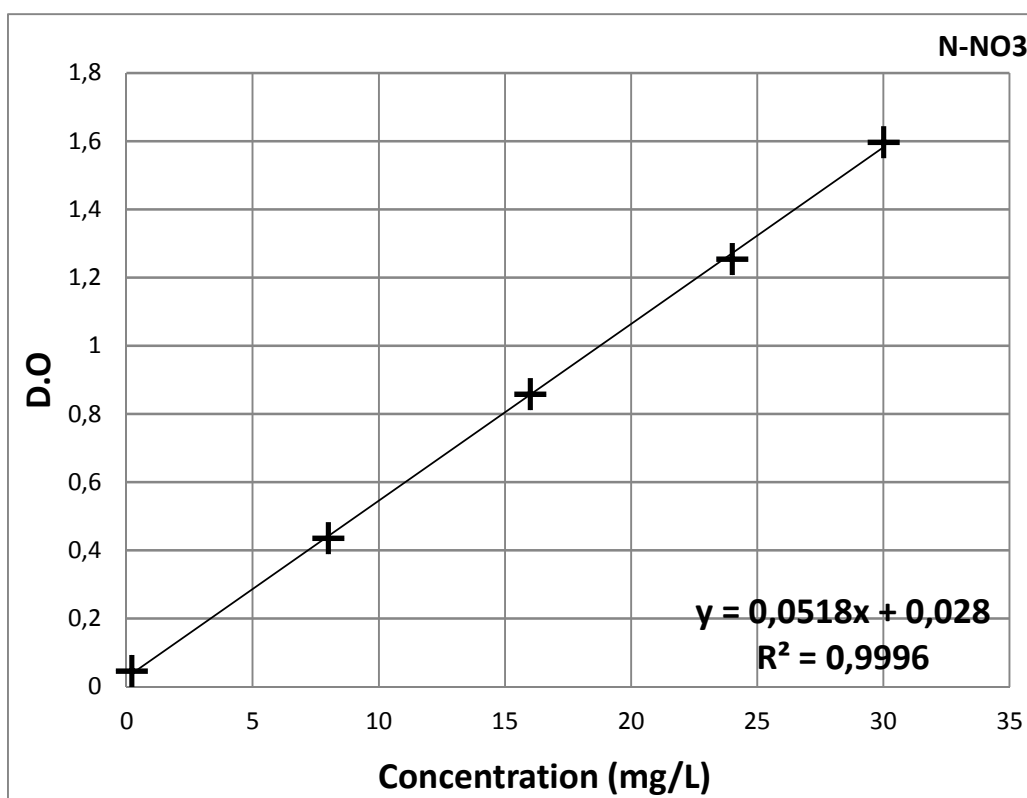


Figure 1 : courbe d'étalonnage du protocole n°10020

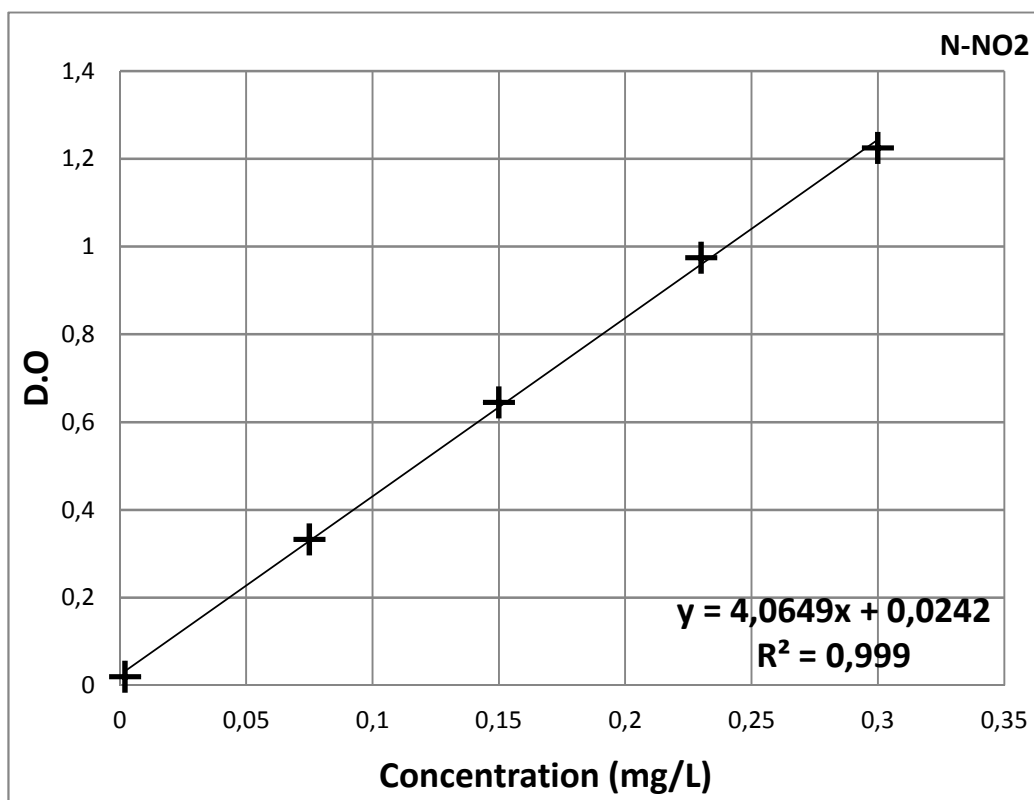


Figure 2 : Courbe d'étalonnage du protocole n°8507

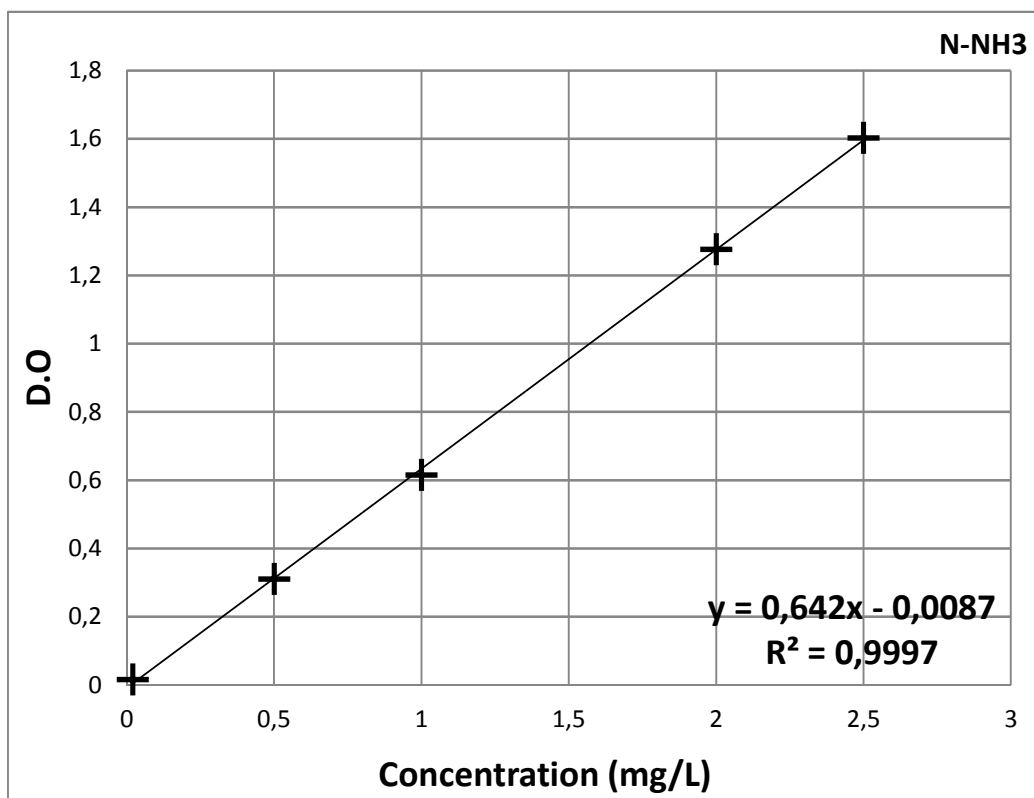


Figure 3 : courbe d'étalonnage du protocole n° 10023

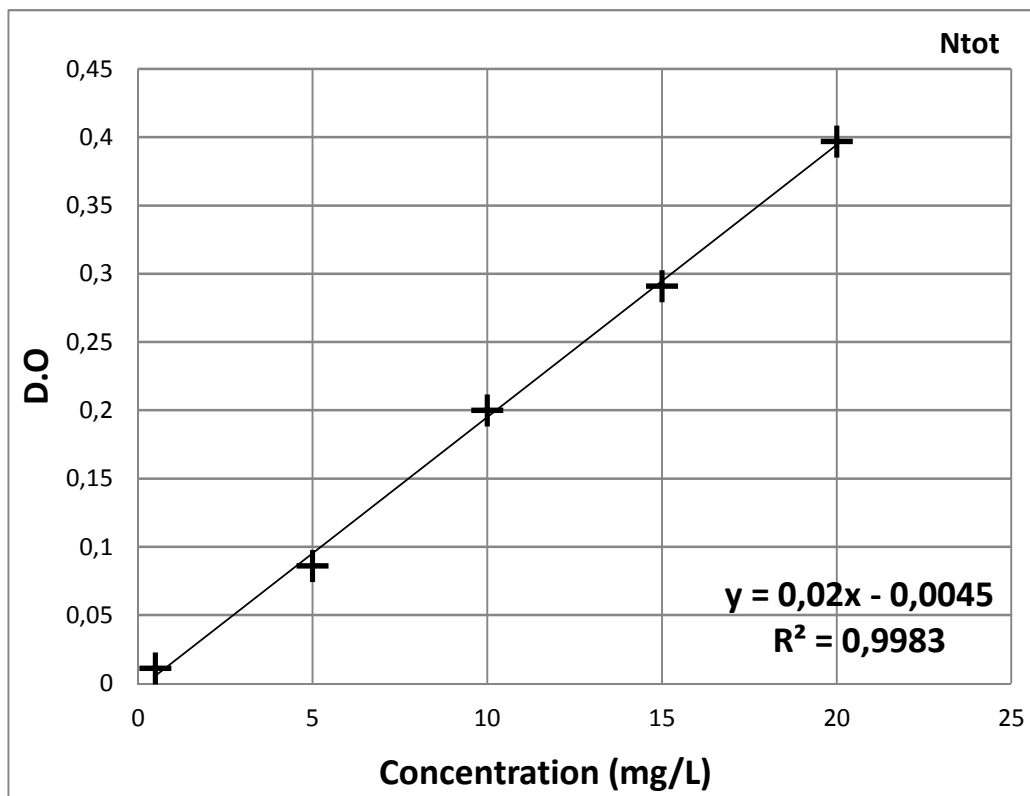


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du protocole 10071.

Tableau n°1 : Point d'étalonnage du protocole 10071 (c : concentration en mg/L de N)

c	DO
0,5	0,011
5	0,086
10	0,2
15	0,291
20	0,397

Liste du matériel disponible :

- 20 fioles jaugées de 100 mL
- 20 fioles jaugées de 50 mL
- 30 Béchers.
- 1 micropipette (500-5000 µL)
- 1 micropipette (100-1000 µL)
- 1 micropipette (20-200 µL)
- 1 micropipette (2-20 µL)
- 1 micropipette (0.5-10 µL)
- 1 solution mère de nitrite à 100 mg/L en N
- 1 solution mère de nitrate à 100 mg/L en N
- 1 solution mère d'ammoniac à 100 mg/L en N
- Papier filtre, parafilm et pissettes d'eau distillée.
- 1 spectrophotomètre DR/2400 HACH®.
- Kits HACH® n°8507, 10023, 10071 et 10020 (contient l'ensemble des réactifs nécessaires + modes d'emploi).