

TD2: spectrophotométrie: Analyse quantitative

Exercice 1

On mesure dans les mêmes conditions (longueur d'onde et épaisseur de cuve) la transmission d'une solution $T(\text{solution})=20\%$, puis celle du solvant seul $T(\text{solvant})=90\%$. Quelle est la valeur de l'absorbance due à l'analyte ?

Exercice 2

On considère une solution contenant un seul analyte dans un solvant transparent dans l'UV-visible. On trace son spectre à 295nm, longueur d'onde du maximum d'absorption de cet analyte en utilisant une cuve de 2cm. Le coefficient d'extinction molaire correspondant vaut 27000. La valeur de l'absorbance mesurée est de 0,750. Quelle est la valeur de la concentration cherchée?

Exercice 3

Avec un spectrophotomètre, on peut mesurer l'absorbance, par un soluté, de l'énergie lumineuse d'un faisceau monochromatique. L'absorbance est fonction de la concentration du soluté comme le montre la loi de Beer - Lambert:

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A = absorbance (ou densité optique) sans unité ;

I_0 = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté)

I = intensité lumineuse transmise

ϵ = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde) :

Si la concentration du soluté est en M (ou mol.L⁻¹), ϵ est en M⁻¹.cm⁻¹ et on l'appelle coefficient d'extinction molaire ϵ_M . Si la concentration du soluté est en % (m/v), ϵ est en g⁻¹.L.cm⁻¹ et on l'appelle coefficient d'extinction pondéral ϵ_p

l = longueur du trajet optique (en cm)

C = concentration du soluté.

- Une solution d'un composé X à 2 % transmet 75 % de la lumière incidente à une longueur d'onde donnée. Calculez l'absorbance de cette solution et ϵ_M du composé X.
- Une solution d'élastase d'une concentration de 500 μM a une absorbance de 0,7 à pH 7. La longueur d'onde d'absorbance maximale du groupement phénol est 277 nm

à pH 7 et 297 nm à pH 13. Calculez le coefficient d'extinction molaire du groupement phénol. Calculez l'absorbance de cette solution à pH 13.

Données: M. M. de X = 250; pKa phénol = 10,5; $l = 1 \text{ cm}$; ϵ_M ion phénolate = $2500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Exercice 4

a. Afin de déterminer la quantité de protéines dans un échantillon, on a procédé au dosage par **méthode de Bradford** à 595nm. Cette méthode d'analyse spectrophotométrique repose sur un **dosage colorimétrique**, utilisant le **bleu brillant de Coomassie** (BBC) comme **réactif** et le **sérum albumine de bœuf** (BSA) comme standard.

albumine (μg)	0	2	4	6	8	10	12
A595	0	0,25	0,38	0,69	0,84	1,08	1,12

1- Pourquoi pour 12 μg a-t-on A595 = 1,12 ? Pourquoi ne faut-il pas tenir compte de ce point pour tracer la droite étalon ?

2-Tracer (sur papier millimétré) la droite de régression linéaire de la gamme d'étalonnage.

b. A partir des valeurs suivantes, calculez la concentration (en $\mu\text{g/ml}$) d'une solution de protéines à doser.

Volume prélevé de solution à doser (μL)	10	60	150
Dilution préalable de la solution à doser	Non diluée	3	8
A595	0,51	0,98	0,94

Solution de TD3

Exercice 1

$$A_{\text{solution}} = A_{\text{solvant}} + A_{\text{analyte}}$$

$$\Rightarrow A_{\text{analyte}} = A_{\text{solution}} - A_{\text{solvant}} = -\log T_{\text{solution}} + \log T_{\text{solvant}} = \log(T_{\text{solvant}}/T_{\text{solution}})$$

D'où $A_{\text{analyte}} = 0,635$

Exercice 2 :

$$A = \epsilon_{\lambda} I C \Rightarrow C = A / \epsilon_{\lambda} I = 0,750 / (27000)(2) = 1,389 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

Attention aux unités: I en cm, C en mol.L⁻¹

Exercice 3 :

a) [X] massique = 2% = 2 g / 100 mL = 20 g.l⁻¹ ==> [X] = (20 g.l⁻¹ / 250 g.mol⁻¹)

==> [X] molaire = 8. 10⁻² M

Calcul de ϵ_M avec une transmission de 75% = 75/100 = 0,75 et $\log(I_0/I) = \epsilon_M \cdot l \cdot C$

==> $\epsilon_M = \log(1,00 / 0,75) / (1 \times 8 \cdot 10^{-2})$

==> $\epsilon_M = 1,56 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Calcul de l'absorbance: $A = \epsilon_M \cdot l \cdot C$ ==> $A = 1,56 \times 1 \times 8 \cdot 10^{-2}$ ==> $A = 0,125$.

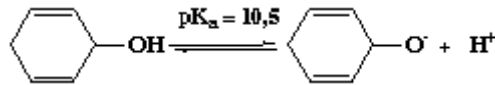
b) Calcul du coefficient d'extinction molaire du groupement phénol des Tyrosine:

$$\epsilon_M^{\text{Tyr pH 7}} = A / l \cdot C$$

$$\epsilon_M^{\text{Tyr pH 7}} = [0,7 / (1 \times 500 \cdot 10^{-6})]$$

==> $\epsilon_M^{\text{Tyr pH 7}} = 1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Le groupement phénol des Tyrosine est ionisé en ion phénolate avec un pKa = 10,5:



L'ionisation induit une augmentation du coefficient d'extinction molaire (ϵ_M ion phénolate = 2500 M⁻¹.cm⁻¹) avec un décalage de la longueur d'onde d'absorbance maximale (273 - 277 nm ---> 293 - 297 nm).

Calcul de l'absorbance de la solution d'élastase à pH 13:

$$A_{\text{élastase pH 13}} = \epsilon_M^{\text{Tyr pH 13}} \cdot l \cdot [\text{Tyr}] = 2500 \cdot 1 \cdot (500 \cdot 10^{-6})$$

$$A_{\text{élastase pH 13}} = 1,25$$

Exercice 4 :

1- Pourquoi pour 12 µg a-t-on $A_{595} = 1,12$? Pourquoi ne faut-il pas tenir compte de ce point pour tracer la droite étalon ?

Pour cette quantité de protéine, le bleu de Coomassie (réactif de Bradford) n'est pas en excès suffisant pour que la réaction [réactif + protéine \Rightarrow complexe] soit proportionnelle à cette quantité de protéine. Pour augmenter la gamme de quantité de BSA étudiée, il faudrait un plus large excès de réactif.

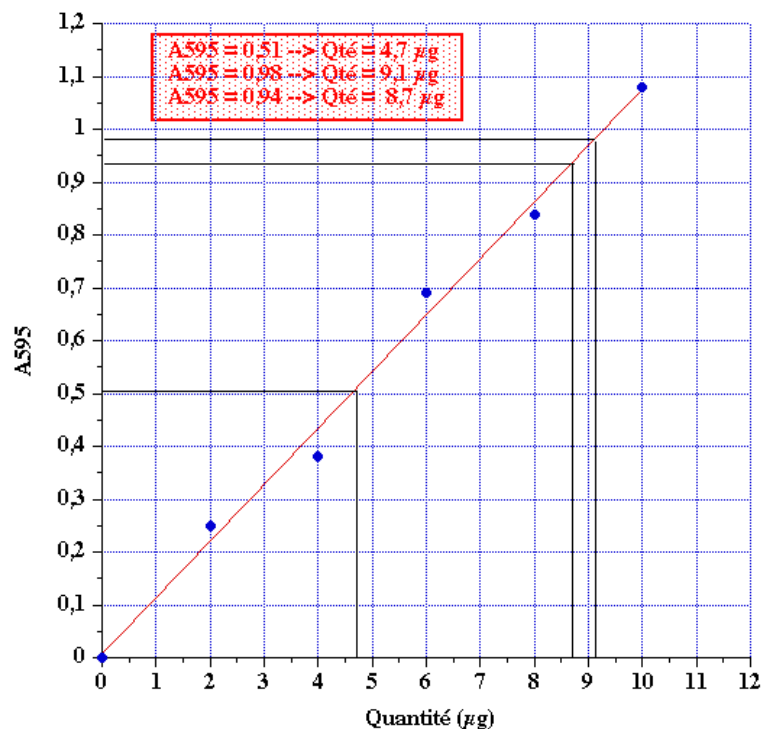
2- La droite si contre est une droite de type $Y = aX + b$ (droite de régression linéaire):

$a =$ pente de la droite ; $a = (\sum xy - n \bar{x} \bar{y}) / (\sum x^2 - n(\bar{x})^2)$.

$b =$ Coefficient; si $b=0$, la droite passe par l'origine.

$Y =$ Absorbance.

$X =$ Concentration



Calcule la la concentration de la solution en protéines:

Pour calculer la concentration de la solution on procède d'abord au calcul des valeurs **des constantes a et b** on **utilisant les absorbances et les concentrations de la gamme d'étalonnage inséré dans le tableau précédent.**

On a : $y = ax + b$

$a = (\sum xy - n \bar{x} \bar{y}) / (\sum x^2 - n(\bar{x})^2)$.

y	0.25	0.38	0.69	0.84	$\bar{y} = 0.54$
x	2	4	6	8	$\bar{x} = 5$
x ²	4	16	36	64	$\sum x^2 = 120$
xy	0.5	1.52	4.14	6.72	$\sum xy = 12.88$

$$a = (\sum xy - n \bar{x} \bar{y}) / (\sum x^2 - n(\bar{x})^2)$$

et on a :

$$\sum xy = 12.88$$

$$n \bar{x} \bar{y} = 4(0.54)(5) = 10.8 \quad (n=4)$$

$$\sum x^2 = 120$$

$$n (\bar{x})^2 = 4(5)^2 = 100$$

$$\text{Donc } a = 0.104$$

$$b = \bar{y} - a \bar{x}$$

$$b = 0.02$$

Calcul des concentrations en protéines :

1^{ère} concentration :

$$y = ax + b \text{ donc } x = (y - b) / a$$

$$x = (0.51 - 0.02) / 0.104 = 4.711$$

$$x = 4.711 \mu\text{g} / 10 \mu\text{l}$$

A₅₉₅ = 0.51 correspond à 4.711 μg pour 10 μl de solution à doser non diluée soit :

$$x = 4.711 \mu\text{g} \longrightarrow \text{dans } 10 \mu\text{l} \quad (10 \mu\text{l} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ ml})$$

$$x = ? \mu\text{g} \longrightarrow \text{dans } 1 \text{ ml}$$

$$x = 4.711 / 10^{-2}$$

$$x = 471.1 \mu\text{g/ml}$$

2^{ème} concentration :

$$y = ax + b \text{ donc } x = (y - b) / a$$

$$x = 9.23 \mu\text{g} / 60 \mu\text{l}$$

A₅₉₅ = 0.98 correspond à 9.23 μg pour 60 μl de solution à doser diluée 3 fois soit :

(9.23 x 3 = 27.69) donc 27.69 μg dans 60 μl non diluée soit 27.69/60 = 0.461 μg / 1 μl

2^{ème} méthode

On peut aussi calculer la concentration en μg/μl on utilisant l'équation :

$$\text{F (coefficient de dilution)} = V1/V0 \text{ (voir TD 1)}$$

Donc : $V_0 = V_1 / F = 60/3 = 20$

La concentration sera : $X = 9.23/20 = 0.461 \mu\text{g}$ dans $1 \mu\text{l}$

On doit convertir la concentration $\mu\text{g/ml}$

$x = 0.461 \mu\text{g}$ —————> dans $1 \mu\text{l}$ ($1 \mu\text{l} = 1. 10^{-3} \text{ ml}$)

$x = ? \mu\text{g}$ —————> dans 1 ml

$x = 0.461/ 10^{-3}$

$x = 461 \mu\text{g/ml}$

3^{ème} concentration :

$y = ax + b$ donc $x = y - b / a$

$x = 0.94 - 0.02 / 0.104 = 8.846$

$x = 8.846 \mu\text{g} / 150 \mu\text{l}$

$A_{595} = 0.94$ correspond à $8.846 \mu\text{g}$ pour $150 \mu\text{l}$ de solution à doser diluée 8 fois soit :
($8.846 \times 8 = 70.768$) donc $70.768 \mu\text{g}$ dans $150 \mu\text{l}$ non diluée soit $70.768/150 = 0.472 \mu\text{g} / 1 \mu\text{l}$

2^{ème} méthode

On peut aussi calculer la concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ on utilisant l'équation :

$F(\text{coefficient de dilution}) = V_1/V_0$ (voir TD 1)

Donc : $V_0 = V_1 / F = 150/8 = 18.75$

La concentration sera : $X = 8.846/18.75 = 0.472 \mu\text{g}$ dans $1 \mu\text{l}$

On doit convertir la concentration $\mu\text{g/ml}$

$x = 0.472 \mu\text{g}$ —————> dans $1 \mu\text{l}$ ($1 \mu\text{l} = 1. 10^{-3} \text{ ml}$)

$x = ? \mu\text{g}$ —————> dans 1 ml

$x = 0.472/ 10^{-3}$

$x = 472 \mu\text{g/ml}$