

# Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

## 1) Principe

Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité  $I$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$ . On définit l'**absorbance** de la solution comme :

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

On parle aussi de **transmittance** définie par la relation :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{C'est-à-dire que } A = -\log T$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La **relation de Beer-Lambert** décrit que, à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l c$$

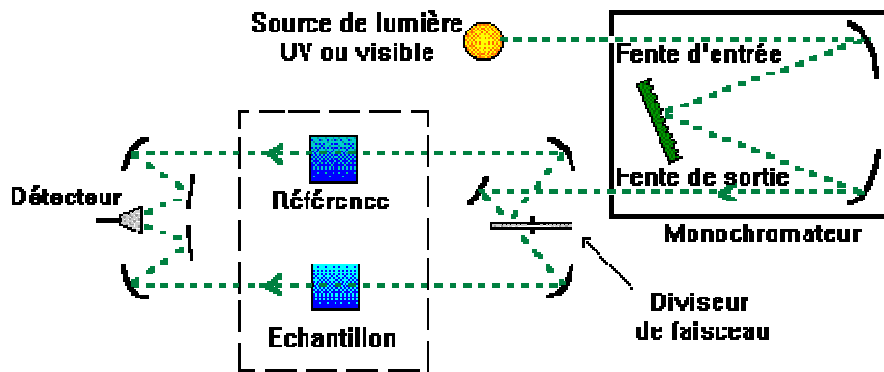
- $A_\lambda$  est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$  ;
- $c$  (en mol.L<sup>-1</sup>) est la concentration de l'espèce absorbante ;
- $l$  (en cm) est la longueur du trajet optique (cuve de 1 cm en général)
- $\epsilon_\lambda$  (en mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde  $\lambda$ .

## 2) Domaine UV-visible de la spectrophotométrie

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm). On parle de spectrophotocolorimétrie ou plus simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV.

Un **spectrophotomètre** mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée. Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée.

## Éléments constituant un spectrophotomètre U.V./visible



*Figure 1 : schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau*

Un spectrophotomètre comprend 4 parties essentielles.

### source lumineuse

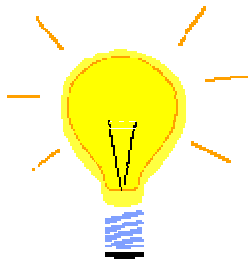
Elle est constituée par :

- Une lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm avec un maximum d'émission à 652,1nm.



*Figure 2 : lampe UV au deutérium*

- Une lampe à filament de tungstène pour la région allant de 350 à 800 nm.



*Figure 3 : Lampe à incandescence à filament de tungstène*

- Une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Elle fonctionne sous forme de flash, juste au moment de faire une mesure.

### Cuve

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La longueur de la cuve est définie (1cm de trajet optique en général). Elle doit être transparente aux radiations d'étude. Par exemple en UV, les cuves sont en quartz, elles ne peuvent être ni en verre ni en plastique.

### 3) Applications

#### **Détermination d'une concentration inconnue**

Connaissant le spectre d'absorption d'une espèce chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde  $\lambda_{max}$  (là où l'absorption est maximale) les variations de l'intensité  $I$  d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur  $l$  de solutions de concentrations diverses. Si le composé ne comporte pas de pic d'absorption caractéristique, il est nécessaire de développer un complexe coloré soluble et spécifique sous l'influence de réactifs chimiques.

#### **Courbe d'étalonnage**

Ceci permet d'établir expérimentalement la courbe  $A = f(c)$  reliant l'absorbance et la concentration de la substance étudiée (avec  $l = 1cm$ ), en effectuant les mesures de  $A$  pour diverses concentrations. Cette courbe est une **courbe d'étalonnage**. La courbe expérimentale d'étalonnage permet ensuite de déterminer la concentration inconnue d'une solution de cette substance par simple mesure de son absorbance et report sur le graphe  $A = f(c)$ .

## A. Dosage des sucres réducteurs par la méthode de SOMOGYI-NELSON

### Principe

Les sucres réducteurs, à ébullition et en milieu alcalin, réduisent une solution cuivrique ( $\text{Cu}^{++}$ ), avec précipitation d'oxyde cuivreux  $\text{Cu}_2\text{O}$  ( $\text{Cu}^+$ ) rouge brique. Par addition d'une solution arsénio-molybdique à température ambiante, les ions cuivreux sont engagés dans un complexe coloré en bleu, dont la D.O. à 520 nm, est proportionnelle à la concentration en sucres réducteurs présents.

### Matériel nécessaire

#### Extraction :

Matériel commun	Matériel par groupe	
Rotavapor	Ballons à évaporation 250 ml (1/gr)	Tubes à centrifuger 35 mL (2/groupe)
Broyeur	Eprouvettes de 10 ml (2/gr)	Micropipettes (P100 ou 200+P1000)
Centrifugeuse	Etiquettes + ruban adhésif	Piluliers pour la gamme (8/gr)
Couteau	Pots à bouchon rouge (1/gr)	Tubes à centrifuger 2 mL (2/gr)
Alcool à 80°		

### Dosage

Piluliers pour gamme étalon (8/gr)	Bain marie	Tubes folin (14/groupe)
Cuves spectro (14/ groupe)	Réactif C (10 ml /groupe)	Réactif D (10 ml /groupe)
Solution de glucose (5 mL/ gr)	Portoirs pour tubes folin	

### Solutions utilisées et fournies

#### Solution de Glucose à 1 mg/ml

Glucose	100 mg
Eau distillée qsp	100 ml

#### Solution de Glucose X ou Y

Concentration à déterminer  
 par les étudiants

#### Solution A

Nom du produit	Formule	Quantité
Sulfate de sodium anhydre	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	40g
Carbonate de sodium anhydre	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	5g
Tartrate de sodium et potassium (Sel de Rochelle)	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5g
Bicarbonate de sodium anhydre	$\text{NaHCO}_3$	4g
Eau distillée qsp		200 ml

#### Solution B

Nom du produit	Formule	Quantité
Sulfate de cuivre hydraté	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30g
Glucose		50 mg
Acide sulfurique concentré	$\text{H}_2\text{SO}_4$	4 gouttes
Eau distillée		200 ml

#### Solution D

Nom du produit	Formule	Quantité
Molybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 g
Eau distillée		400 ml
Ajouter		
Acide sulfurique concentré	$\text{H}_2\text{SO}_4$	10 ml
Peser		
Arséniate de sodium $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
Eau distillée		25 ml
Verser dans les 410 ml précédents et ajuster le volume avec de l'eau distillée		
Eau distillée qsp puis 37°C pendant 48h. stockage à l'abri de la lumière		500 ml

## **Mode opératoire**

### **1- Extraction**

1. Peser environ 3 g de chair de tubercule prélevée soit au niveau apical, soit au niveau distal du tubercule. Noter soigneusement l'origine et le poids.
2. Mettre dans un pot à bouchon rouge. Ajouter environ 5 ml d'alcool à 80°. Broyer à l'ultraturrax. Recueillir dans un tube à centrifuger. Rincer l'ultraturrax avec de l'alcool à 80°. Ajouter au précédent.
3. Prendre un autre tube à centrifuger et équilibrer les tubes 2 à 2, en versant du sable de Fontainebleau dans le tube vide. Placer les tubes diamétralement opposés dans la centrifugeuse. Centrifuger 10 min à 10000g.
4. En vous appuyant sur une baguette en verre, transférer le surnageant dans un ballon à évaporation en faisant attention de ne pas décoller le culot.
5. Suivre les instructions pour l'évaporation.
6. A la fin de l'évaporation, mettre environ 1 ml d'eau dans le ballon, agiter doucement afin de dissoudre les sucres. Recueillir dans une éprouvette graduée. Recommencer l'opération 2 fois. Noter soigneusement le volume obtenu.
7. Transférer dans un pilulier.
8. Identifier le pilulier en mettant une étiquette avec le poids, le volume recueilli après extraction.
9. Cet extrait sous servira au dosage des sucres solubles.

### **2- Préparation du réactif de SOMOGYI-NELSON**

#### **Solution C**

à préparer extemporanément (au moment de l'emploi)

Solution A	25 ml ou 25 volumes	12,5 mL
Solution B	1 ml ou 1 volume	0,5 mL

### **3- Préparation de la gamme étalon**

Dans des tubes à centrifuger de 2 ml	Gamme étalon							
[ Conc] <sup>o</sup> de glucose (µg/ml)	<u>0</u>	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>150</u>	<u>200</u>	<u>250</u>	<u>500</u>	<u>1000</u>
Volume de solution de Glu à 1mg/ml à prélever (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2
Eau distillée (ml)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1	0
Volume final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2

Pour chacun des 2 échantillons

- Prendre 2 tubes à centrifuger, les numéroter en indiquant la dilution.
- Prélever 0,4 ml d'échantillon, ajouter 1,6 ml d'eau distillée. Bien homogénéiser. Ce tube constitue Ech/5
- A partir de **ce** tube, prélever 0,5 ml ajouter 1,5 ml d'eau distillée, homogénéiser. Ce tube constitue Ech/20

Numéroter 17 tubes de Folin. Dans chacun des tubes, introduire selon l'ordre suivant

N°tubes	Gamme étalon								Tém	Echantillon			Glu Xou Y	
	<u>0</u>	<u>50</u>	<u>100</u>	<u>150</u>	<u>200</u>	<u>250</u>	<u>500</u>	<u>1000</u>		Pur	Ech/5	Ech/20	pur	1/2
<b>Solut<sup>o</sup>C</b> (ml)	0,5 mL dans tous les tubes													
Vol. sol <sup>o</sup> Glu (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	---	---	---	---	---	---
Vol. d'éch. (ml)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,5	0,5	0,5	---	---
Vol. GluX/Y (ml)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,5	0,25
Eau distillée (ml)	---	---	---	---	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---	0,25
Volume total	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Boucher les tubes- Agiter- Plonger 30 min dans un bain mairie bouillant. Refroidir sous un courant d'eau														
<b>Solution D</b> (ml)	0,5 mL dans tous les tubes													
Laisser agir pendant 10 min.														
Ajouter dans tous les tubes 11 ml d'eau distillée jusqu'à un volume de 12,5ml														
Volume final	12,5 mL dans tous les tubes													
Transférer dans des cuves spectro. Mesurer la DO à 520nm contre un essai à blanc														

## Calcul

Utilisation du logiciel JASCO spectra manager pour l'analyse quantitative des données obtenues.

- 1) Tracé de la droite d'étalonnage  $A = f$  (concentration en glucose)
- 2) Mesure de la D.O. des échantillons
- 3) Calcul des teneurs en sucres

$$\text{Teneur en sucres des échantillons (mg/g de MF)} = d \times \text{conc lue} \times V / 1000 \times M$$

V : volume total de l'extrait d : dilution éventuelle M : masse (en g) de matière fraîche de l'échantillon

## B. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

### Principe

La méthode de Bradford est basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

### Matériel nécessaire

Balance	Papier aluminium	Sachet de broyage (1/groupe)
microtubes 2 ml (2-3/groupe)	Microcentrifugeuse	Glace
Micropipettes P100 ou P200	Cônes	Cuves spectro ( 11 /groupe)
Spectrophotomètre	Parafilm	Béchers

### Solutions utilisées

#### Tampon phosphate 2M pH 7,8

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	63,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g
Eau distillée	qsp 200 ml

Vérifier que le pH est de 7,8 sinon ajuster

#### Solution de EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	46,52 g
Eau distillée	qsp 250 ml
Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH 10N	
Conserver à température ambiante	

#### Solution d'Acétate de sodium 0,1 M

NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> -3H <sub>2</sub> O	1,361 g
Eau distillée	qsp 100 ml

#### Solution de DTT (Dithiothréitol)

DTT	1,545 g
Solution d'Acétate de sodium 0,1 M	1 ml
Eau distillée	qsp 10 ml

### Tampon QB

	pour 100 ml	Concentration finale
Solution de tampon phosphate 2M pH 7,8	5 ml	100 mM
Solution de EDTA 0,5M	200 µl	1mM
Triton X-100	1 ml	1%
Glycerol 80%	12,5 ml	10%
Eau distillée qsp 100 ml	81,1 ml	

Au moment de l'utilisation ajouter

DTT (1,0 M)	100 µl	1mM
-------------	--------	-----

La solution Tampon QB + DTT se conserve au congélateur à -20°C.

### Solution-mère de BSA (1 mg/ml)

### Solution de protéine proX ou proY

BSA 100 mg  
 Eau distillée 100 ml

concentration à déterminer  
 par les étudiants

### Solution de BRADFORD

Bleu de Coomassie Brillant Blue G250 Merck1544 100 mg  
 Ethanol absolu 50 ml  
 Eau distillée environ 250 ml  
 Agiter pendant 30 à 60 min  
 Acide phosphorique 85% 100 ml  
 Eau qsp 1000 ml

### Mode opératoire

#### 1) Extraction

1. Peser (environ) 1 g de feuilles. Noter soigneusement le poids. Placer dans un sachet de broyage.
2. Verser 2 ml de tampon QB/g de feuille. Broyer soigneusement.
3. Transférer dans des microtubes, de 1,5 à 2 ml de liquide. Placer les microtubes sur de la glace
4. Centrifuger les microtubes 15 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à vitesse max.
5. Transférer le surnageant dans un microtube neuf.
6. S'il reste encore des fragments de tissus en suspension, transférer le surnageant dans un nouveau tube et refaire la centrifugation pendant 10 minutes et transférer dans un nouveau tube.
7. Conserver sur de la glace

#### 2) Dosage

La gamme étalon se fait à partir d'une solution de sérum albumine bovine de concentration connue.

1. Numéroter les tubes folin.
2. Préparer les dilutions de l'échantillon  
 Prendre 2 tubes à centrifuger, les numéroter en indiquant la dilution.
  - Dilution 1/20: Prélever 50 µl d'échantillon, ajouter 950 µl d'eau distillée. Bien homogénéiser.
  - Dilution 1/50: Prélever 20 µl d'échantillon, ajouter 980 µl d'eau distillée. Bien homogénéiser
 Dans la cuve correspondante mettre 100 µl de la dilution préparée.
3. Préparer les dilutions de la solution mère de BSA directement dans les tubes folin en suivant les indications du tableau suivant
4. Faites de même pour les dilutions de la solution de protéine de concentration inconnue (proX ou proY).

N° des tubes	Gamme étalon (solution mère de BSA)						Echantillon			pro X ou Y	
							pur	1/20	1/50	pur	1/2
Qté de BSA/cuve (µg)	0	20	40	60	80	100	***	***	***	?	?
Volume de SM de BSA (µl)	0	20	40	60	80	100	***	***	***	***	***
Volume d'échantillon (µl)	***	***	***	***	***	***	100	100	100	***	***
Volume de BSA X (µl)	***	***	***	***	***	***	***	***	***	100	50
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0	0	0	0	0	50
Vol final ds tube folin (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Solution de Bradford	4 ml dans tous les tubes										
Bien homogénéiser											
Attendre 2-3 minutes, profitez pour numéroter les cuves spectro											
Transférer dans des cuves spectro											
Mesurer l'absorption à 595 nm											

### Calcul

Utilisation du logiciel JASCO spectra manager pour l'analyse quantitative des données obtenues.

- 1) Tracé de la droite d'étalonnage
- 2) Mesure de la D.O. des échantillons
- 3) Calcul des teneurs en protéines

$$\text{Teneur en protéines des échantillons (mg/g de MF)} = D \times \text{quantité lue} \times V / M \times v_e$$

V : volume total de l'extrait

D : dilution éventuelle

M : masse (en g) de matière fraîche de l'échantillon

$v_e$  : volume de l'échantillon

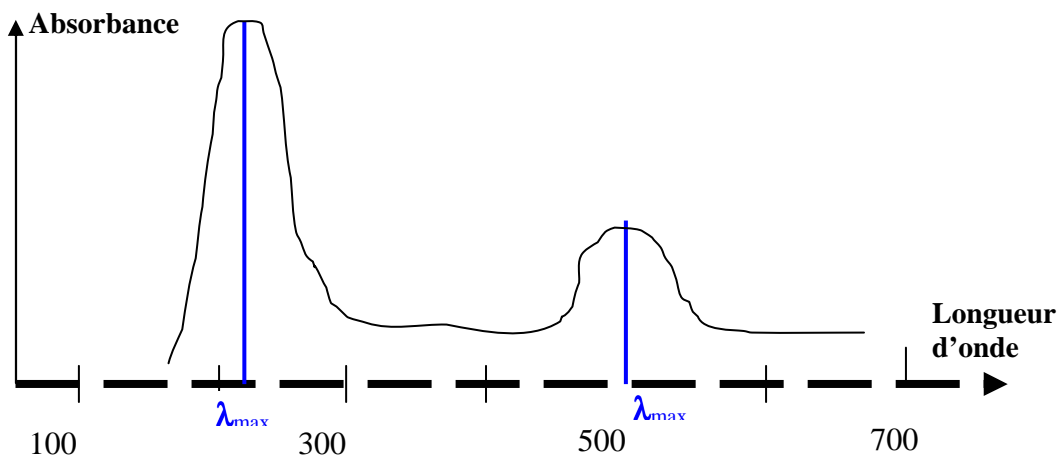
## C. Analyse spectrale

### Comment obtenir un spectre d'absorption ?

Dans une cuve spectro on met une solution pure de la substance à analyser

On balaye la cuve avec le faisceau de longueur d'ondes du spectro.

On obtient un graphe de ce type

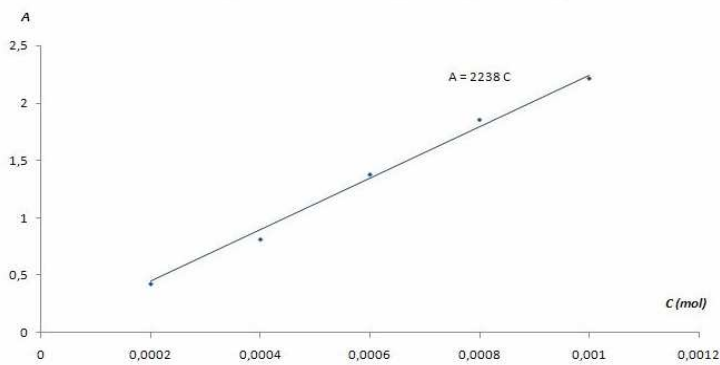


Le "spectre d'absorption" permet de repérer dans une la plage de longueurs d'onde UV-Vis, la ou les zones où la molécule recherchée absorbe (ici  $\lambda_{\max} = 220$  et  $500$  nm).

### Courbe d'étalonnage

Connaissant le spectre d'absorption d'une substance, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde  $\lambda_{\max}$  (là où l'absorption est maximale) les absorbance d'un faisceau lumineux dans des solutions de concentrations différentes.

On établit la courbe reliant absorbance et concentration de la substance « Absorbance = f(concentration) ». Cette courbe est une **courbe d'étalonnage**.



### **Application**

Les protéines en solution absorbent la lumière ultraviolette avec des maxima d'absorption à 280 et 200 nm. Les acides aminés avec des cycles aromatiques (tryptophane, tyrosine) et des résidus de cystéine, expliquent la présence d'un pic d'absorption à 280 nm. Les liaisons peptidiques sont responsables du pic à 200 nm. La structure secondaire, tertiaire et quaternaire affectent tous l'absorbance, donc des facteurs tels que le pH, la force ionique, etc peuvent altérer le spectre d'absorbance.

Il est possible d'estimer la concentration de protéines dans une solution en utilisant un spectromètre simple grâce à l'absorption du rayonnement dans le proche UV (280 nm), si on connaît sa composition en acides aminés. Les avantages de cette méthode sont les suivants: elle est très simple et ensuite l'échantillon peut être récupéré.

### **Expérimentation**

Analyse du spectre (D.O en fonction de la longueur d'onde entre 200 et 320 nm) et dosage d'une solution de Sérum albumine bovine. Le coefficient d'extinction molaire est de  $4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  et la masse molaire de 65000g/mole.



## Feuille de résultats

### Extraction des glucides- Dosage du glucose par la méthode de SOMOGYI-NELSON

**Groupe** .....

<b>Noms</b>		

	Essai 1	Essai 2
Poids de tubercule (g)		
Volume après extraction (ml)		

Exposer les calculs vous ayant permis d'arriver aux dilutions voulues :  
 Dilution Glu X / 2 :

	Gamme étalon							
[Glu] <sup>°</sup>	0	50	100	150	200	250	500	1000
DO lue								

	Témoïn	Echantillon 1			Echantillon 2			Solution Glu X	
		Ech pur	Ech/5	Ech/20	Ech pur	Ech/5	Ech/20	Glu X	GluX/2
DO lue									

Quelle est la concentration en glucose de la solution Glu X (ou Y) ?

.....

### Extraction des protéines- Dosage par la méthode de BRADFORD

Poids de feuille (g)	
Qté de tampon (ml)	

	Gamme étalon					
[BSA] <sup>°</sup>	0	10	20	40	60	80
DO lue						

	Echantillon			pro X ou pro Y	
	pur	1/20	1/50	pur	1/2
DO lue					

Quelle est la concentration en protéine de la solution de pro X (ou Y) ?

.....