

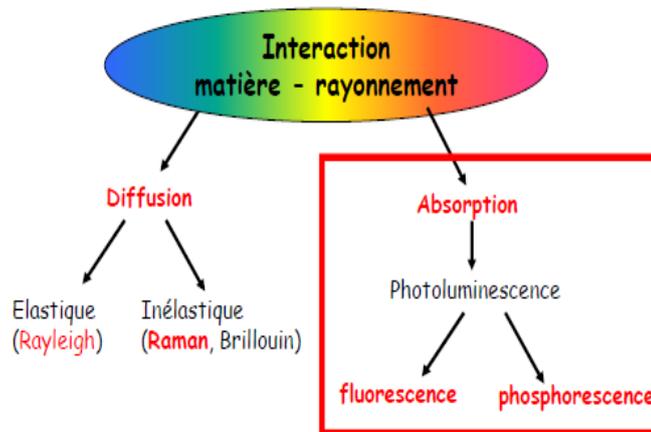


UEF : Analyse Instrumental

Partie I

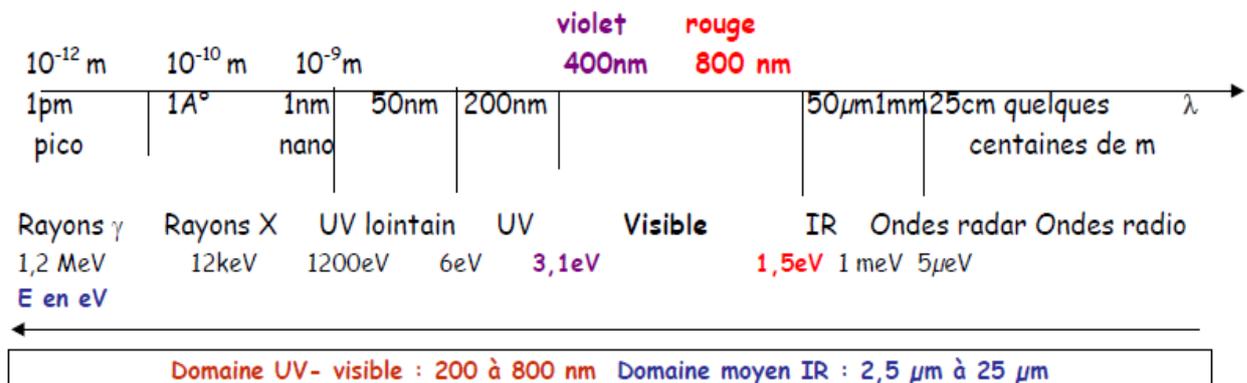
Chapitre I : Méthodes spectroscopiques

1. Introduction : Les méthodes spectroscopiques sont des méthodes basées sur l'interaction entre la matière et la lumière.



La lumière est une onde électromagnétique constituée de corpuscules, les photons. Chaque photon porte un quantum d'énergie. L'énergie transportée par le photon est inversement proportionnelle à la longueur d'onde à laquelle il est associé.

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

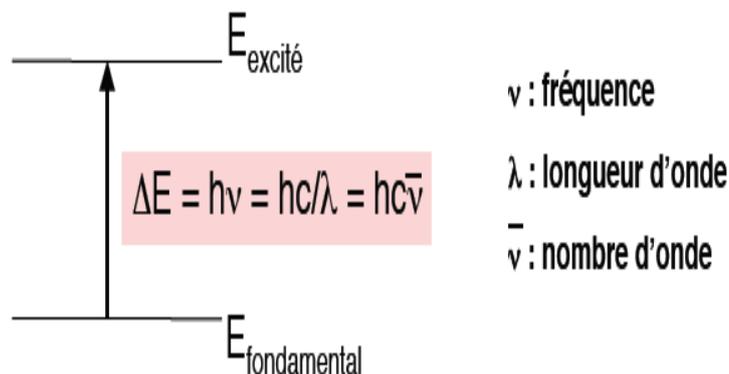


2. Principe

Quand un photon est capté par une molécule, l'énergie qu'il transporte peut être utilisée à modifier les distances entre les atomes ou à augmenter leur énergie rotative ou vibratoire.

Une molécule absorbera une radiation de fréquence ν s'il existe des transitions

nécessitant une énergie : $\Delta E = h\nu$ ($h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ Js, cte de Planck)



3. Types d'interaction (spectrophotométries) : Il existe plusieurs types d'interaction de la lumière avec la matière. Lorsqu'ils y a excitation des électrons avec absorption de l'atome on parle de spectroscopie d'absorption atomique ou de la molécule, on parle de spectroscopie d'absorption moléculaire (spectroscopie UV-visible).

Lorsqu'ils y a excitation thermique suivi de désexcitation par émission de l'atome on parle de spectroscopie d'émission atomique ou de la molécule on parle de spectroscopie d'émission moléculaire. Mais quand il y a excitation par onde électromagnétique de l'atome on parle de spectroscopie de fluorescence atomique ou de la molécule on parle de spectroscopie de fluorescence moléculaire.

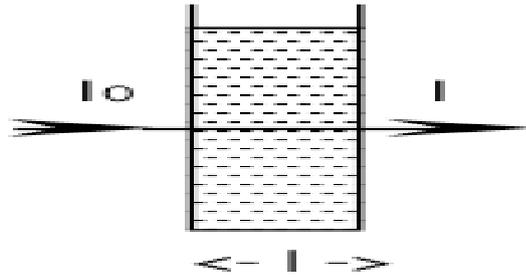
En **biologie**, généralement les **dosages spectroscopiques sont moléculaires**. Donc, les niveaux d'énergie sont caractéristiques des molécules.

- Si l'on éclaire une substance avec une lumière polychromatique continue (lumière blanche par exemple), la connaissance des longueurs d'onde des rayonnements absorbés donne des renseignements sur la nature de la molécule : on peut donc faire de **l'analyse qualitative**.

- D'autre part, la quantité de photons absorbés dépend de la quantité de substance absorbante dans la solution : on peut donc faire de **l'analyse quantitative**.

4. Spectrométrie d'absorption moléculaire (La Loi de Beer-Lambert)

Lorsqu'un faisceau de lumière (longueur d'onde donnée λ) d'intensité initiale I_0 traverse une solution dans une cuve transparente, une partie de la lumière est absorbée et l'intensité de la lumière transmise I est inférieure à I_0 . La perte d'intensité lumineuse est due à la l'absorption de la lumière par la solution.



Loi de Beer et Lambert : Lorsqu'un faisceau de lumière (photons) traverse un milieu absorbant son intensité décroît d'une manière exponentielle en fonction de l'augmentation de la concentration de la solution absorbante et de la longueur du trajet optique.

$$I = I_0 e^{-kcl}$$

- La transmittance $T = I / I_0$. (Exprimée en %, elle mesure la transmission de la solution).

- L'**absorbance** (**A**) appelée aussi densité optique (**DO**), elle mesure l'absorption de la solution.

$$A = \log (1/T) = \log I_0/I = \epsilon_{\lambda} C l$$

ϵ_{λ} : coefficient d'extinction molaire de la substance, exprimé en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

C : $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

l : épaisseur de la cuve (cm)

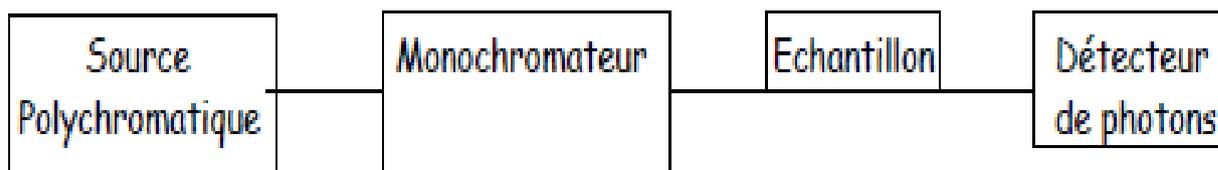
Remarque : Cette loi est valable à condition d'avoir :

- une lumière monochromatique, (en général, on se place à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la substance à doser),
- des solutions à doser très diluées ($c < 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

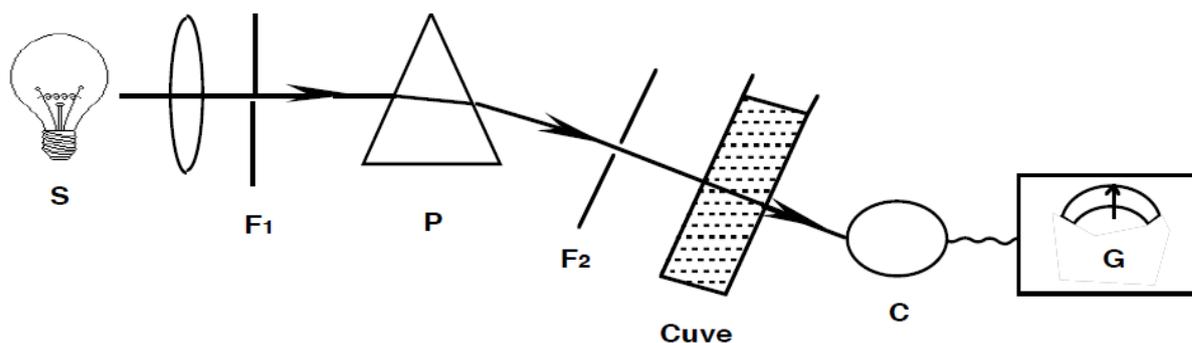
En pratique, on mesure l'absorbance d'une solution à l'aide d'un spectrophotomètre et de cuves plastiques (λ du visible) ou en quartz ou plastique spécial (λ U.V.).

5. Types de spectrophotomètres

- Colorimètre visuelle
- Photomètre ou photolorimètre (filtres)
- Spectrophotomètre (dispositif monochromateur à prisme ou à réseau).



Principe d'un spectromètre



Spectrophotomètre

S : source de lumière blanche

F1 : fente de réglage de l'intensité de la lumière blanche

P : dispositif dispersif (prisme)

F2 : fente sélectionnant une longueur d'onde déterminée

C : détecteur (cellule photoélectrique) engendrant un courant d'intensité proportionnelle à l'intensité de la lumière reçue. L'intensité de ce courant est traduite en absorbance sur le galvanomètre **G**.

6. Méthodes de dosage (voir travaux pratiques)

- méthode directe
- méthode de comparaison avec étalon
- méthode de dosage avec gamme d'étalonnage

Chapitre II : Méthodes enzymatiques

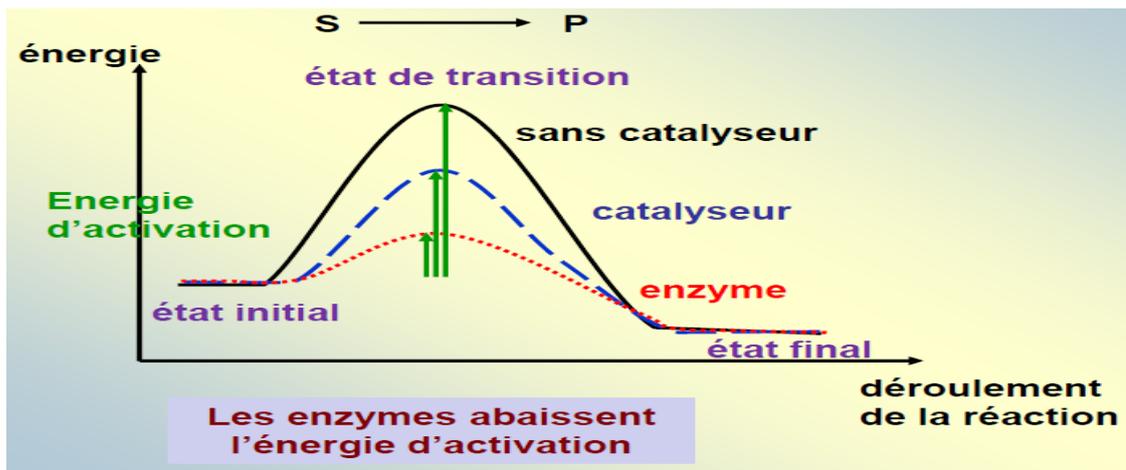
1. Introduction : Les méthodes enzymatiques est un terme qui couvre la mesure de l'activité d'une enzyme et le dosage d'un substrat par voie enzymatique. C'est l'étude de la réaction enzymatique (cours d'ENZYMOLOGIE).

2. Définition d'une enzyme: Catalyseur biologique de nature protéique qui augmente la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier l'équilibre.

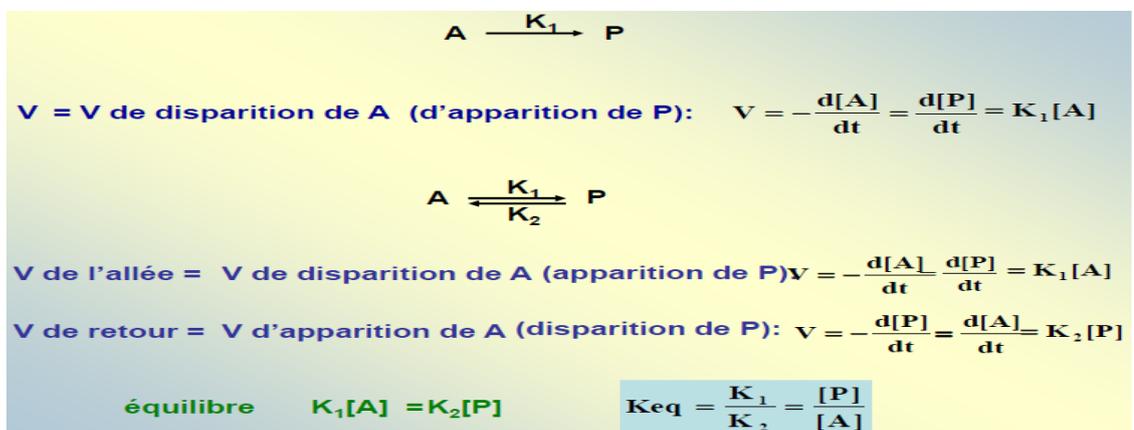
3. Propriétés et caractéristiques des enzymes

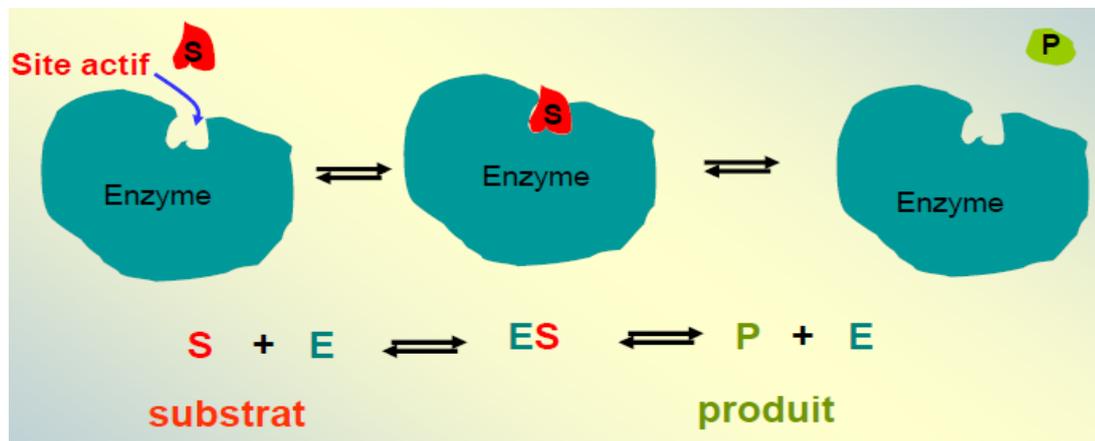
- Agissent en très faible quantité
- Sont régénérées au cours de la réaction
- Sont **spécifiques**

4. Mode d'action des enzymes

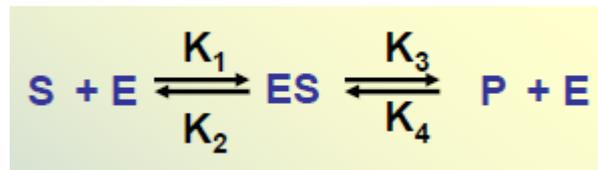


5. Cinétique enzymatique

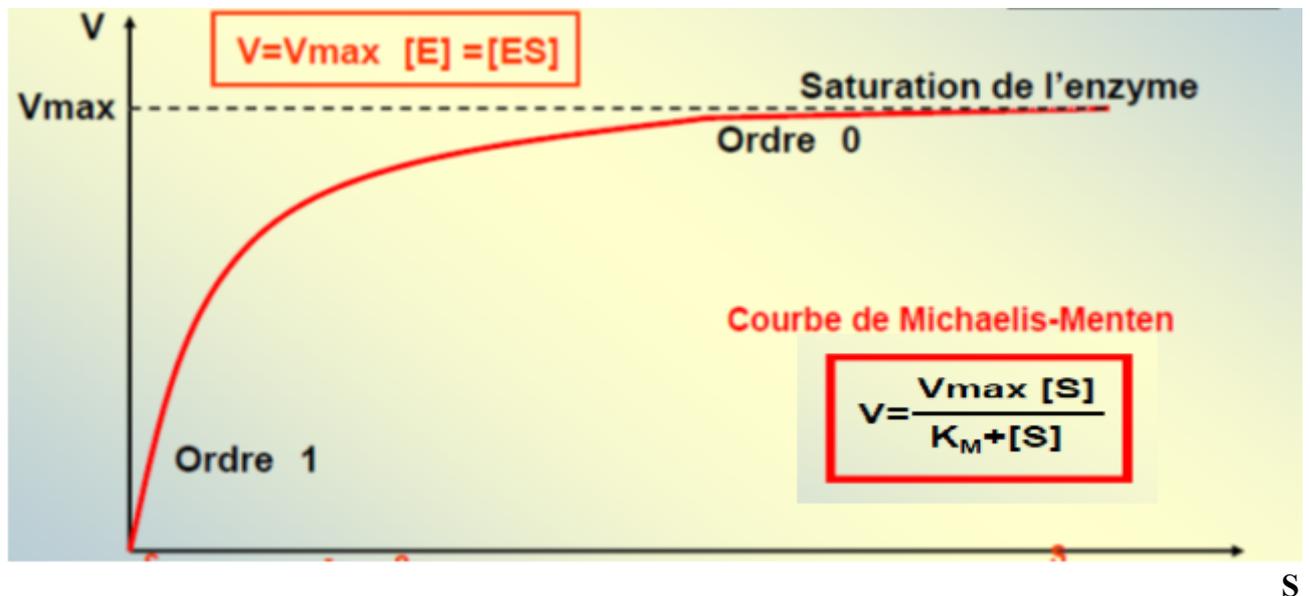




Structure enzyme-Substrat

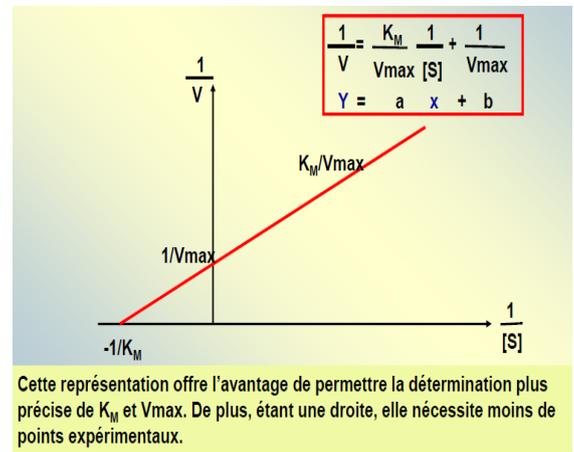
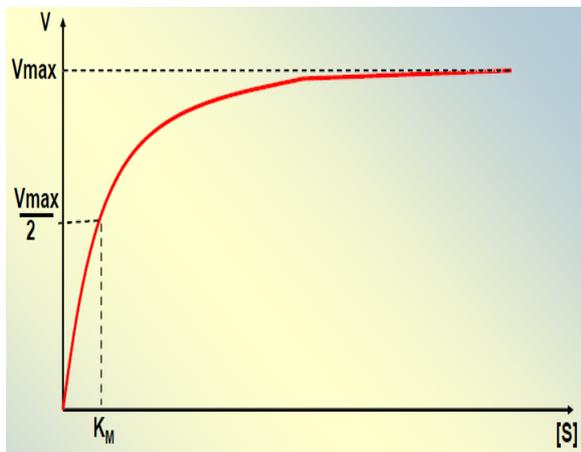


Remarque : La V de la réaction enzymatique est influencée par [S], [E], température, pH, effecteurs.



Cinétique M.M

S



V_{max} est atteinte lorsque toute l'enzyme est saturée par le substrat

K_M est la valeur de S pour laquelle la vitesse de la réaction est $V_{max}/2$

K_M est une grandeur expérimentale qui peut varier avec la structure du S , le pH, la température. Chaque enzyme a un K_M caractéristique pour un S

K_M indique l'affinité de l'enzyme pour le S

K_M ↗

↘ affinité

- Aux faibles $[S]$, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat (réaction d'ordre 1)
- Lorsque la $[S]$ augmente, la vitesse ne s'accroît plus dans les mêmes proportions (réaction d'ordre mixte)
- Aux fortes $[S]$ la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration (réaction d'ordre 0): l'enzyme est saturée par son substrat. Ce phénomène est particulier à la cinétique enzymatique.

6. Techniques enzymatiques

- Déterminer l'activité d'une enzyme
- **Dosage des substrats par voie enzymatique (dosage enzymatique)**

6.1. Dosage enzymatique : Les enzymes sont d'excellents réactifs pour le dosage de leurs substrats. On distingue :

❖ **Dosage par cinétique :** Cette approche consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu avec des méthodes spectrométriques. Donc, il faut qu'un des substrats ou produits de la réaction aient des propriétés spectrales (visibles ou

UV) utilisables. C'est particulièrement le cas du NADH et du NADPH qui absorbent fortement dans le violet lointain.

❖ **Dosage à temps fixe** : Elle consiste essentiellement à mélanger les composantes de la réaction et à incuber durant un certain temps. à la fin de l'incubation (généralement de 30 min à 2 h), on prélève des échantillons. On y mesurera alors la quantité du substrat ou du produit voulu. On pourra alors calculer la variation de sa concentration en la comparant à celle mesurée au début de la réaction (t_0), puis, sachant la durée de l'incubation, déterminer la vitesse de la réaction. Le dosage du composé peut se faire par des méthodes spectroscopiques.