

Initiation à la spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Partie pratique

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

- ▶ Objectifs pédagogiques: A la fin de la formation pratique le stagiaire doit pouvoir:
 - ▶ Réaliser une droite d'étalonnage pour réaliser un dosage
 - ▶ Déterminer la concentration d'une espèce dosée en utilisant une droite d'étalonnage et la méthode d'étalonnage en 1 point
 - ▶ Réaliser un dosage d'activités enzymatique en cinétique et en comprendre le calcul

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Le KMnO_4 est violet, il doit absorber les radiations.....

Version travail pratique

- ▶ Recherche de λ max
 - ▶ Préparer une dilution au 1/5 de la solution mère à environ exactement $0,3 \text{ g.L}^{-1}$
 - ▶ A l'aide de cette solution, tracer le spectre d'absorption du KMnO_4 entre 400 et 800 nm
 - ▶ Déterminer λ max.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travail pratique

- ▶ Recherche de λ max
 - ▶ Préparer une dilution au 1/5 de la solution mère à environ exactement $0,3 \text{ g.L}^{-1}$
 - ▶ A l'aide de cette solution, tracer le spectre d'absorption du KMnO_4 entre 400 et 800 nm
 - ▶ Déterminer λ max.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travail pratique

▶ Etablissement de la gamme d'étalonnage

- ▶ Réaliser les dilutions suivantes en tube ou en fioles jaugées à partir de la solution mère :

Dilution	1/2,5	1/5	1/10	1/20	1/50	1/100
Volume de sol. mère en mL						
Volume d' H_2O Δ en mL						

- ▶ Mesurer l'absorbance à λ max des différentes solutions diluées dans l'ordre croissant des concentrations en commençant par faire un autozéro sur l'eau désionisée.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travail pratique

- ▶ Dosage des solutions inconnues

- ▶ Mesurer les absorbances des solutions inconnues S_1 et S_2 . Si besoin, les diluer pour les ramener à une concentration située dans l'intervalle de la gamme étalon.

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travail pratique

- ▶ Expression des résultats

- ▶ **Calcul de ε :**

A partir des valeurs de la gamme d'étalonnage, déterminer ε du KMnO_4 en $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

- ▶ Détermination de la concentration des solutions inconnues :

- ▶ A l'aide de ε , déterminer la concentration des solutions S_1 et S_2 en mg.L^{-1} .

- ▶ Tracer la courbe : $\text{Abs} = f([\text{KMnO}_4])$. A l'aide de cette courbe d'étalonnage, déterminer la concentration des solutions S_1 et S_2 en mg.L^{-1} .

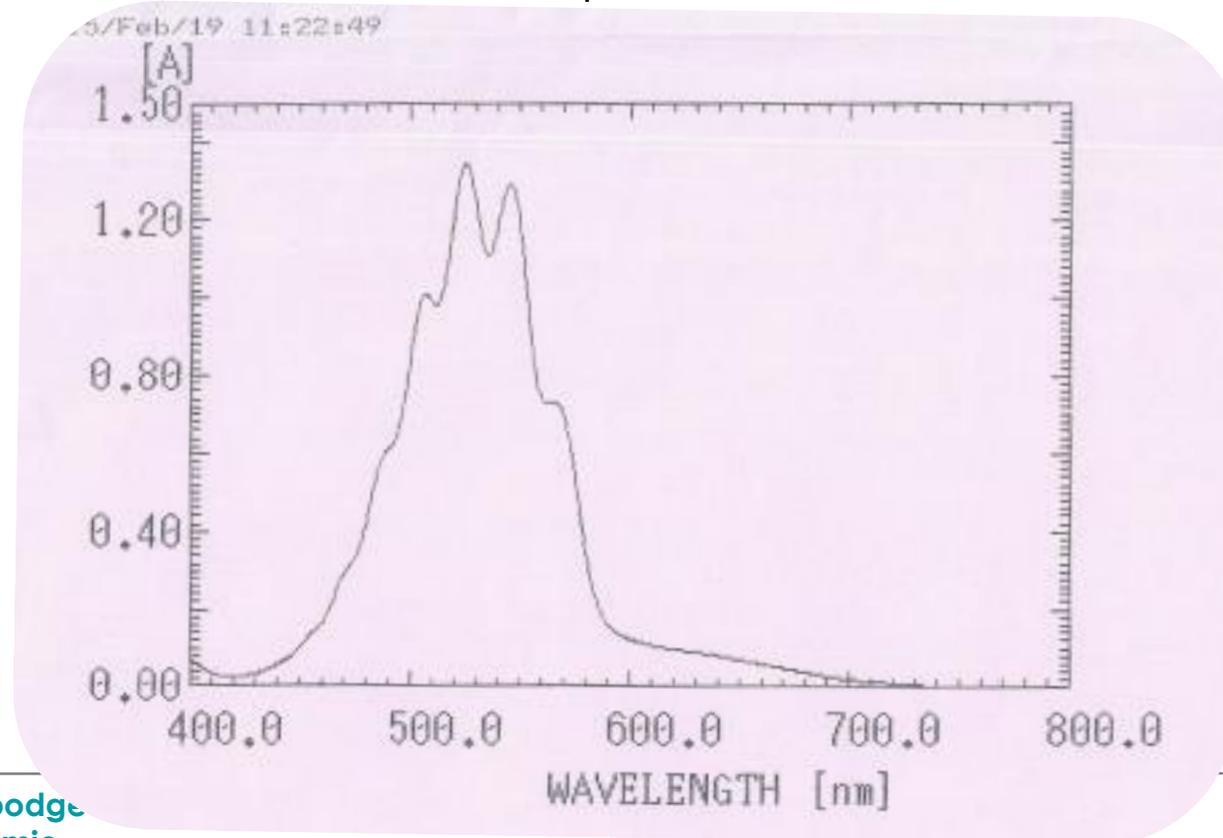
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travaux dirigés

► Recherche de λ_{max}

A partir du spectre d'une solution de KMnO_4 tracé entre 400 nm et 800 nm, déterminer λ_{max} .



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travaux dirigés

▶ **Etablissement de la gamme d'étalonnage**

▶ A partir d'une solution mère à $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ les dilutions suivantes sont réalisées:

1/2,5

1/5

1/10

1/20

1/50

1/100

▶ Calculer les concentrations de ces différentes solutions en g.L^{-1} et en mmol.L^{-1} sachant que la masse molaire moléculaire de KMnO_4 est égale à 158 g.mol^{-1}

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO₄ – Méthode directe

Version travaux dirigés

- ▶ La mesure des absorbances, à λ max et dans une cuve de 1 cm de large, a donné les résultats suivants pour les solutions de la gamme d'étalonnage:

dilution	Dilution 1/2,5	Dilution 1/5	Dilution 1/10	Dilution 1/20	Dilution 1/50	Dilution 1/100
Abs	1,748	0,878	0,441	0,220	0,087	0,044

- ▶ Tracer la droite d'étalonnage $Abs = f([KMnO_4])$ sur papier millimétré ou sur Excel en exprimant KMnO₄ en en g.L⁻¹ et en mmol.L⁻¹

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO₄ – Méthode directe

Version travaux dirigés

► Calcul de ε :

A partir des valeurs de la gamme d'étalonnage, déterminer ε du KMnO₄ en L.g⁻¹.cm⁻¹ et en L.mol⁻¹.cm⁻¹.

► Détermination de la concentration des solutions inconnues :

Les absorbances de 2 solution S1 et S2 ont été mesurées à λ max et dans une cuve de 1 cm de large, les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

solution	S1	S2
Abs	0,535	1,993

Que pensez-vous de l'absorbance de la solution S2 ?

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage de KMnO_4 – Méthode directe

Version travaux dirigés

L'absorbance de la solution S2 diluée au $\frac{1}{2}$ est mesurée de nouveau le résultat est :

solution	S2 dilution au 1/2
Abs	1,256

Déterminer les concentrations en KMnO_4 des solutions S1 et S2 :

- ▶ Par détermination graphique
- ▶ Par le calcul en utilisant ε du KMnO_4

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

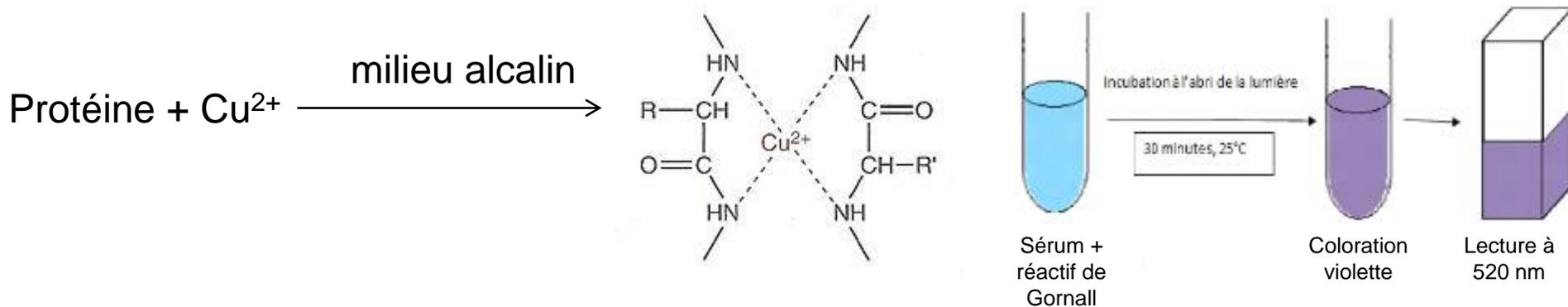
- ▶ Méthode indirecte car:
 - ▶ les protéines n'absorbent pas dans le visible
 - ▶ Les protéines absorbent en UV à 280 nm mais
 - ▶ interférences nombreuses
 - ▶ absorbances différentes selon les protéines
- ▶ Méthode chimique
 - ▶ La réaction est purement chimique
- ▶ Méthode en point final
 - ▶ L'absorbance est mesurée après la fin de la réaction

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

▶ Principe:

- ▶ Utilise la réaction du biuret: formation d'un complexe coloré violet entre le Cu^{2+} (bleu) et la liaison peptidique de la protéine en milieu alcalin : formation d'un complexe rose
- ▶ Additivité des absorbances : bleu (excès de réactif) + rose = violet



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Méthode en point final avec gamme d'étalonnage ou étalonnage en un point
- ▶ Avantages de la méthode
 - ▶ Simple
 - ▶ Peu chère
 - ▶ robuste
 - ▶ Absorption égale pour toutes les protéines
- ▶ Inconvénients de la méthode
 - ▶ Moyennement rapide
 - ▶ Méthode peu sensible (seuil = 1 mg) convient aux protéines sériques mais pas aux protéines urinaires ni aux protéines du LCR
 - ▶ Sensibilité à certains interférents (peptides, saccharose, TRIS, glycérol, etc.)

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

▶ Matériel

- ▶ Tubes à hémolyse de 5 mL et de 10 mL
- ▶ Pipettes automatique de 1000 μL et de 5000 μL
- ▶ Spectrophotomètre d'absorption moléculaire
- ▶ Macrocuves de spectro en plastique PS

▶ Réactifs

- ▶ Réactif de Gornall cupro-tartrique
- ▶ Solution de chlorure de sodium à 9 g.L^{-1} (9 ‰) = eau physiologique
- ▶ Solution d'albumine sérique bovine (SAB) titrée à 7 g.dL^{-1} = étalon (standard)
- ▶ Ou kit de dosage (Cromatest LINEAR total protein)

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Mode opératoire
 - ▶ Préparation de la gamme d'étalonnage

Diluer la solution d'albumine à 7 g.dL^{-1} (réactif CAL. Standard du kit) dans l'eau physiologique de manière à obtenir 6 points d'étalonnage entre 1 et 7 g.dL^{-1} .

	1	2	3	4	5
Concentration en SAB en g.dL^{-1}	0	1,75	3,5	5,25	7
Volume d'étalon à 7 g.dL^{-1}					
Volume d'eau physiologique					
Volume final (μL)	100	100	100	100	100
Facteur de dilution					

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Mode opératoire
 - ▶ Préparation de la gamme d'étalonnage

Corrigé:

	1	2	3	4	5
Concentration en SAB en g.dL ⁻¹	0	1,75	3,5	5,25	7
Volume d'étalon à 7 g.dL ⁻¹	0	25	50	75	100
Volume d'eau physiologique	100	75	50	25	0
Volume final (µL)	100	100	100	100	100
Facteur de dilution	/	4	2	1,33	1

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

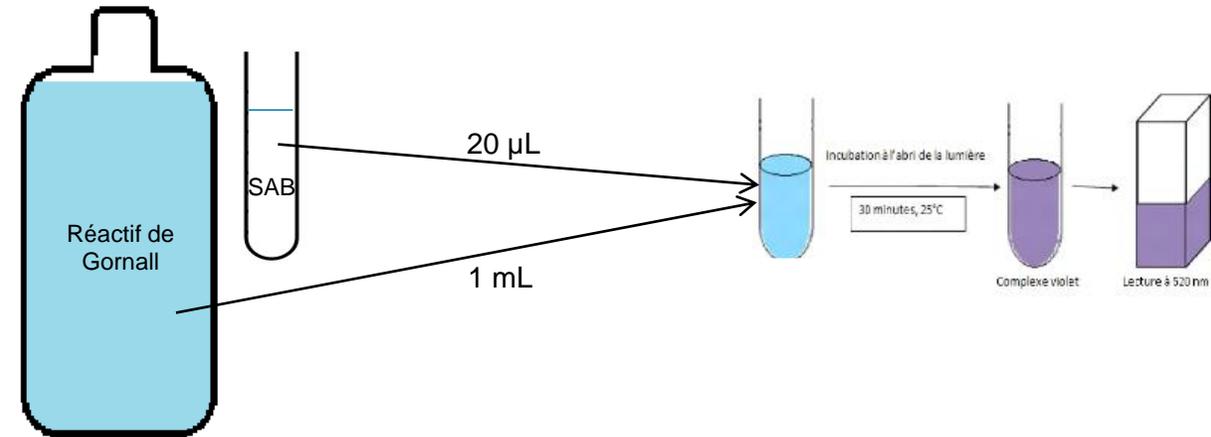
Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

▶ Mode opératoire

▶ Préparation de la gamme d'étalonnage

Dans une autre série de tubes introduire :

- ▶ 20 µl de chacune des dilutions précédentes
- ▶ 1 ml de réactif de biuret (réactif R1 kit)
- ▶ Mélanger au Vortex



- ▶ Laisser reposer 5 mn à 37 °C : la coloration développée est stable 1 h
- ▶ Faire un témoin réaction dans les mêmes conditions sur 20 µl d'eau physiologique

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Mode opératoire
 - ▶ Dosage des protéines du sérum distribué
 - ▶ Dans 1 tube introduire :
 - ▶ 20 µl de sérum
 - ▶ 1 ml de réactif de biuret (R1)
 - ▶ Mélanger au Vortex
 - ▶ Laisser reposer 5 mn à 37 °C : la coloration développée est stable 1 h
- ▶ Lecture spectrophotométrique
 - ▶ Faire le zéro du spectrophotomètre **sur de l'eau**
 - ▶ Après 5 mn de repos, lire les absorbances de la gamme et des essais au spectrophotomètre à 540 nm ⇒ obtention d'absorbances brutes: $Abs_{brutes} = Abs_{réactifs} + Abs_{complexe\ coloré}$

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

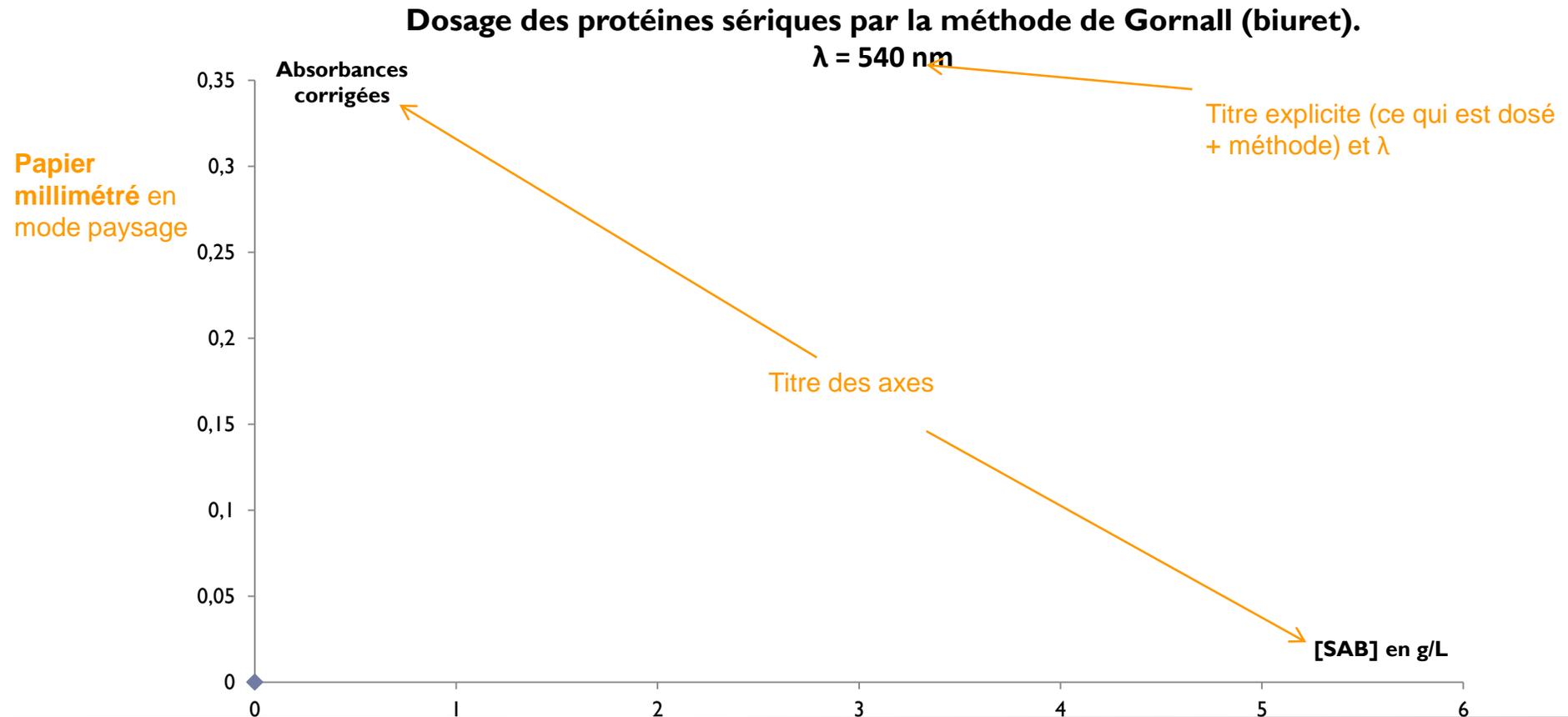
Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Exploitation des données
 - ▶ Obtention des absorbances corrigées
 - ▶ Corriger les absorbances de la gamme et des essais en soustrayant l'absorbance du témoin réactif à toutes les absorbances brutes :
 - ▶ $Abs_{\text{complexe coloré}} = Abs_{\text{brutes}} - Abs_{\text{réactifs(blanc)}}$
 - ▶ Tracé de la droite d'étalonnage
 - ▶ Construire la droite d'étalonnage en portant en abscisses la concentration en protéines des différentes dilutions de SAB et en ordonnées les absorbances corrigées

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

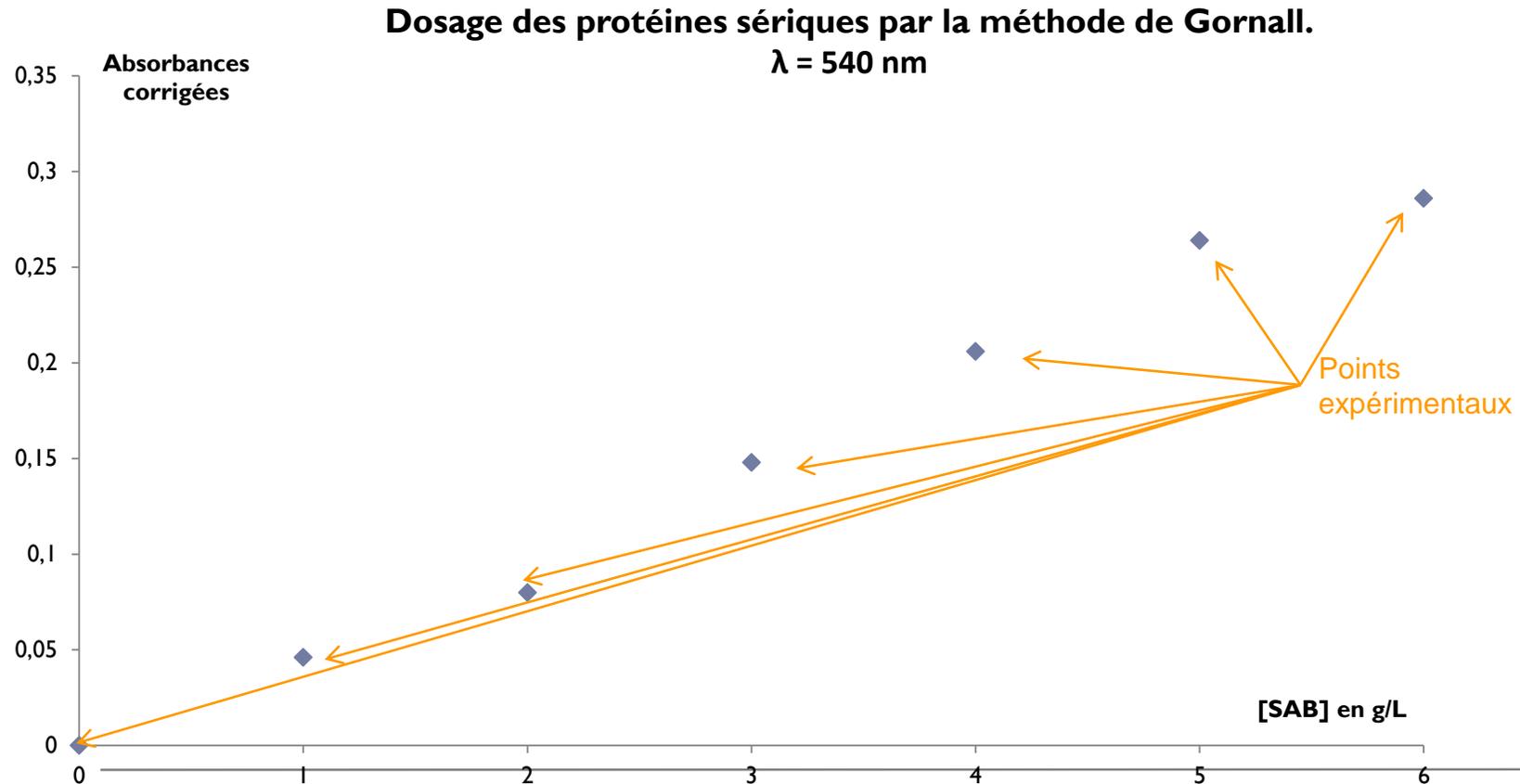
- ▶ Exploitation des données
 - ▶ Tracé de la droite d'étalonnage



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

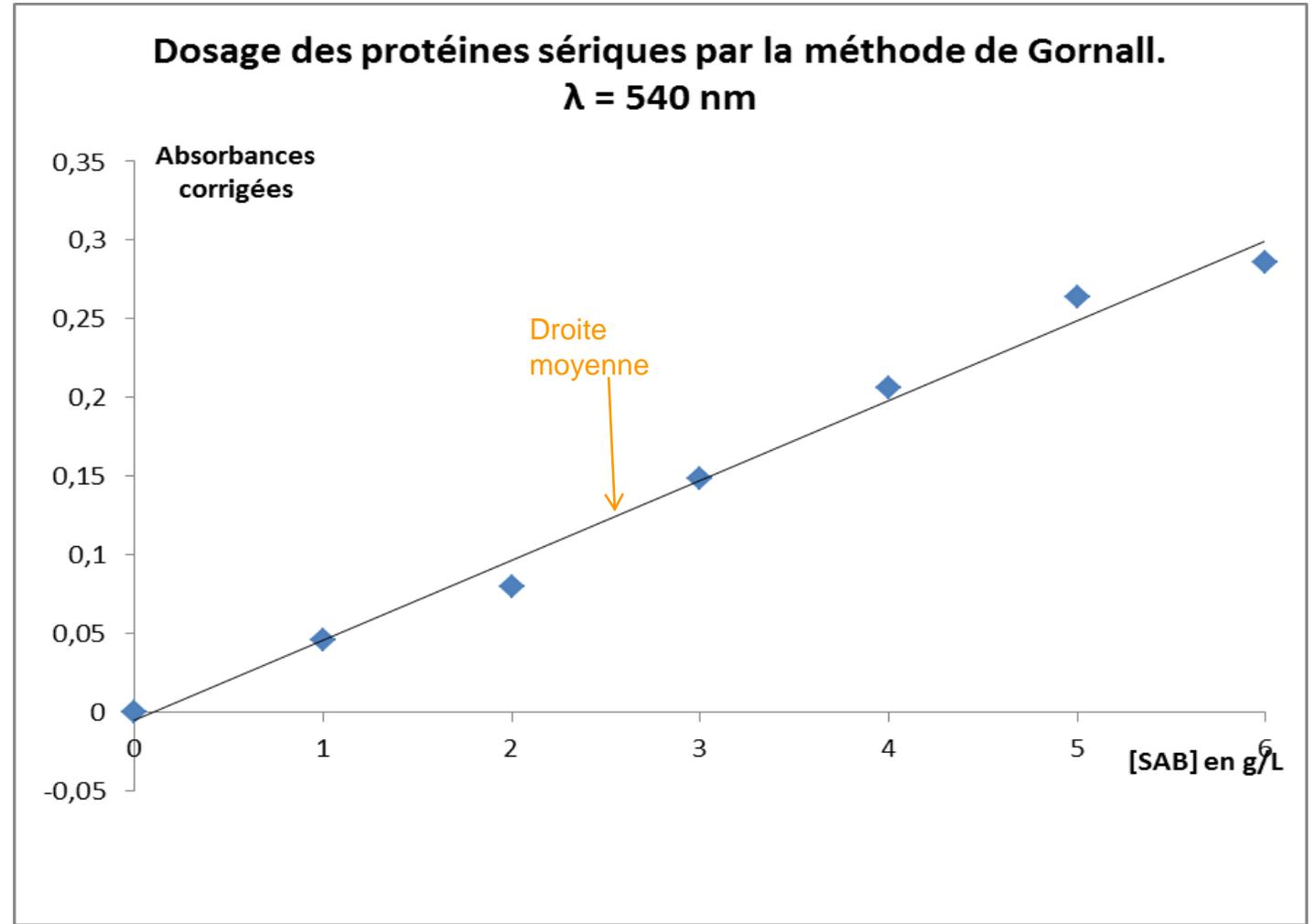
- ▶ Exploitation des données
 - ▶ Tracé de la droite d'étalonnage



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

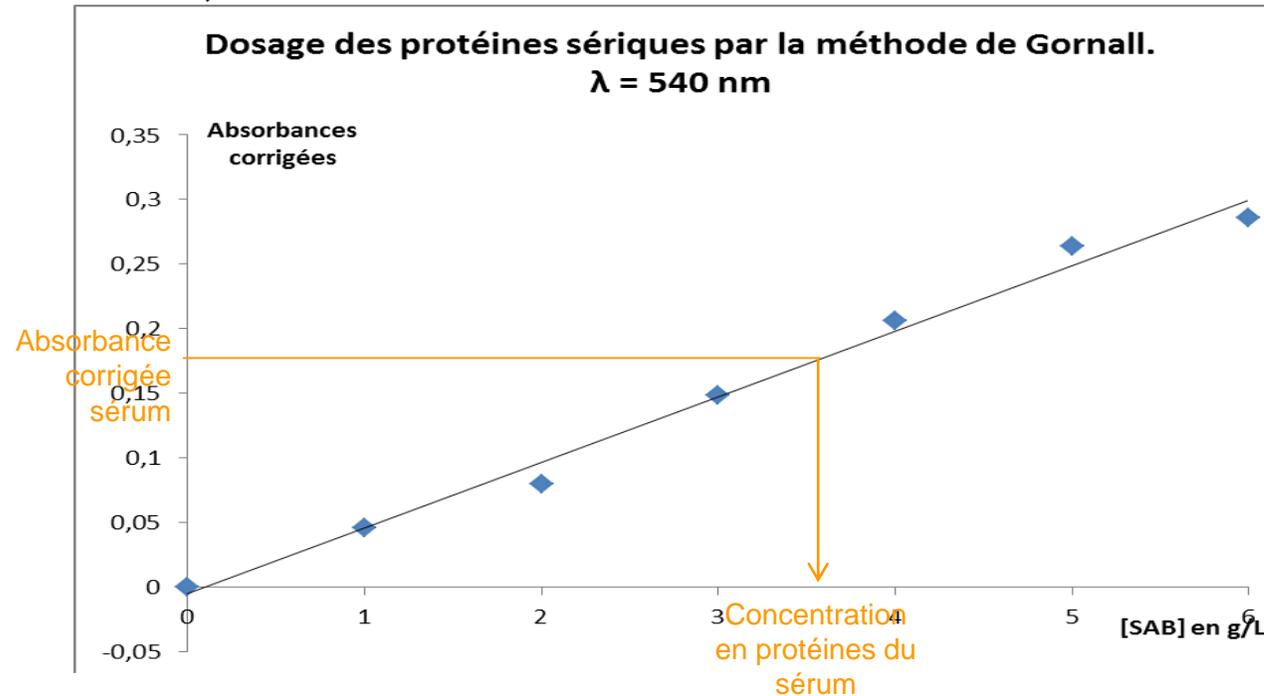
- ▶ Exploitation des données
 - ▶ Tracé de la droite d'étalonnage



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Exploitation des données
 - ▶ Calcul de la concentration en protéines du sérum inconnu par la représentation graphique
 - ▶ Porter l'absorbance corrigée du sérum sur la courbe d'étalonnage, déduire la concentration en protéines totales dans l'essai,



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage des protéines sériques par la méthode de Gornall

- ▶ Méthode en point final avec étalonnage en un point
- ▶ Utilisation de la loi de Beer–Lambert (AbsC = Absorbance Corrigée)
 - ▶ Standard : $\text{Absc}_{\text{std}} = \varepsilon \cdot [\text{Prot}]_{\text{sdt}} \cdot l$
 - ▶ Echantillon: $\text{Absc}_{\text{éch}} = \varepsilon \cdot [\text{Prot}]_{\text{éch}} \cdot l$

Comme ε et l sont identiques pour le standard et l'échantillon on a :

$$\frac{\text{Absc}_{\text{std}}}{\text{Absc}_{\text{éch}}} = \frac{[\text{Prot}]_{\text{sdt}}}{[\text{Prot}]_{\text{éch}}} \text{ d' où } [\text{Prot}]_{\text{éch}} = \frac{[\text{Prot}]_{\text{sdt}} \times \text{Absc}_{\text{éch}}}{\text{Absc}_{\text{std}}}$$

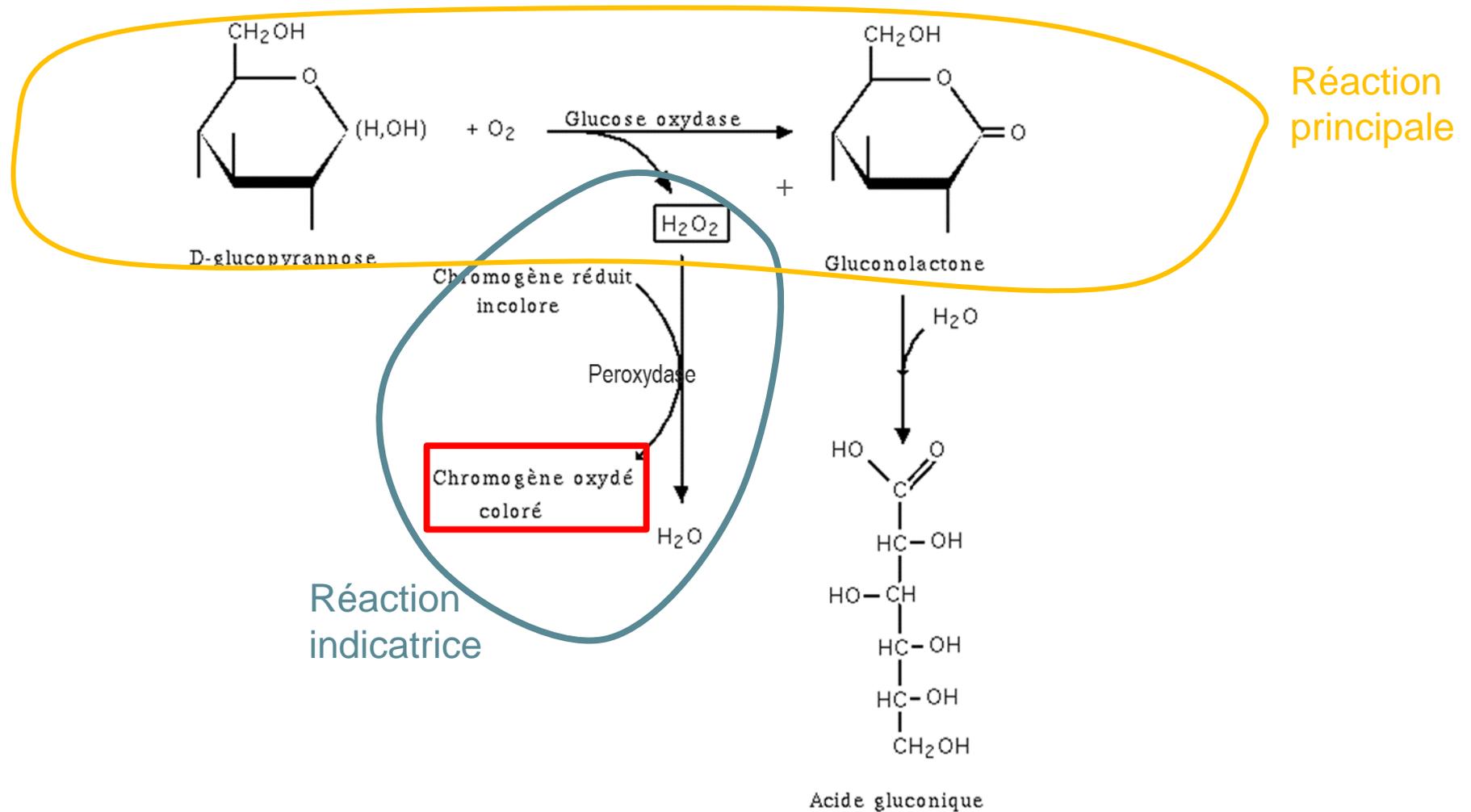
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage enzymatique du glucose par la méthode à la glucose oxydase

- ▶ Méthode indirecte car:
 - ▶ Le glucose n'absorbe pas dans le visible
 - ▶ Le glucose n'absorbe pas en UV
- ▶ Méthode enzymatique
 - ▶ La réaction est catalysée par une enzyme: la glucose oxydase
 - ▶ Avantages: réaction rapide, réaction spécifique du glucose
- ▶ Méthode en point final
 - ▶ L'absorbance est mesurée après la fin de la réaction

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

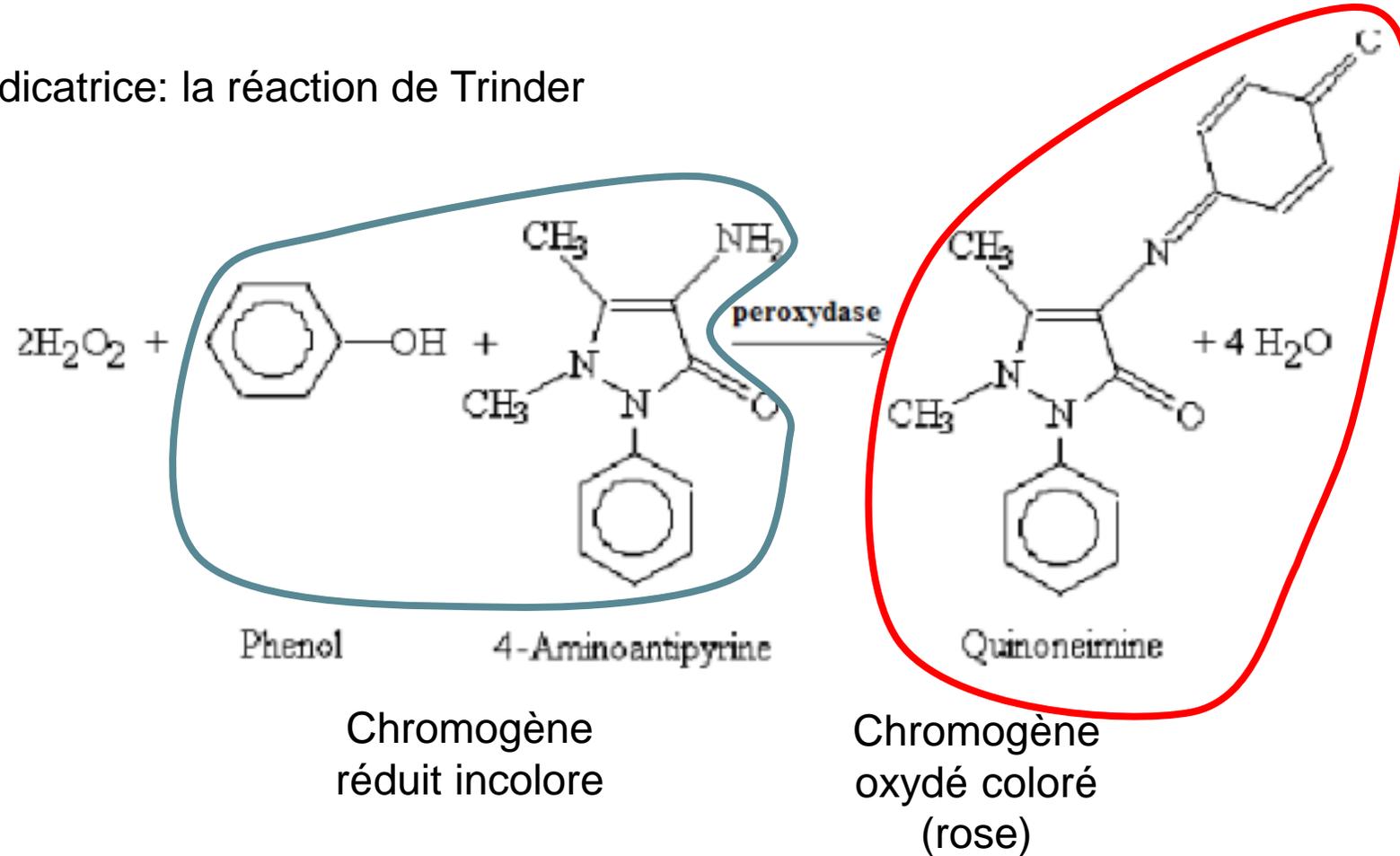
Application au dosage du glucose par la méthode à la glucose oxydase



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage enzymatique du glucose par la méthode à la glucose oxydase

Exemple de réaction indicatrice: la réaction de Trinder



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Application au dosage enzymatique du glucose par la méthode à la glucose oxydase

- ▶ Méthode en point final avec étalonnage en un point
- ▶ Utilisation de la loi de Beer–Lambert (AbsC = Absorbance Corrigée)
 - ▶ Standard : $\text{Absc}_{\text{std}} = \varepsilon \cdot [\text{Glc}]_{\text{sdt}} \cdot l$
 - ▶ Echantillon: $\text{Absc}_{\text{éch}} = \varepsilon \cdot [\text{Glc}]_{\text{éch}} \cdot l$

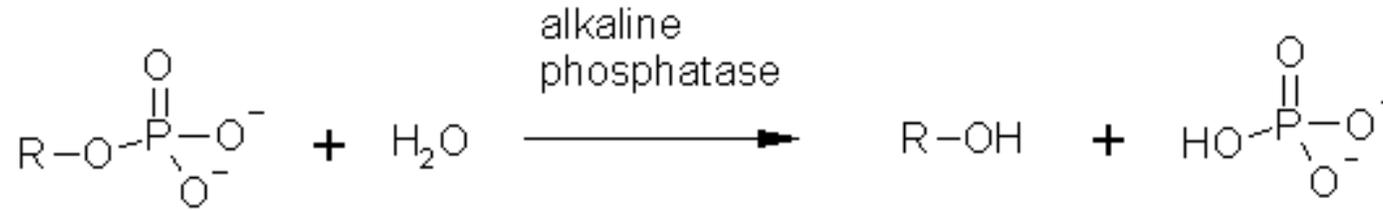
Comme ε et l sont identiques pour le standard et l'échantillon on a :

$$\frac{\text{Absc}_{\text{std}}}{\text{Absc}_{\text{éch}}} = \frac{[\text{Glc}]_{\text{sdt}}}{[\text{Glc}]_{\text{éch}}} \text{ d' où } [\text{Glc}]_{\text{éch}} = \frac{[\text{Glc}]_{\text{sdt}} \times \text{Absc}_{\text{éch}}}{\text{Absc}_{\text{std}}}$$

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage en cinétique: Activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

- ▶ PAL = Phosphomonoestérases fonctionnant avec des ions métalliques (Mg²⁺, Zn²⁺).



- ▶ Spécificité très large
- ▶ pH optimum compris entre 7,5 et pH 9,6.
- ▶ Trois isoenzymes humaines (intestinale, placentaire et « non spécifique du tissu » dans os, foie, reins...)

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

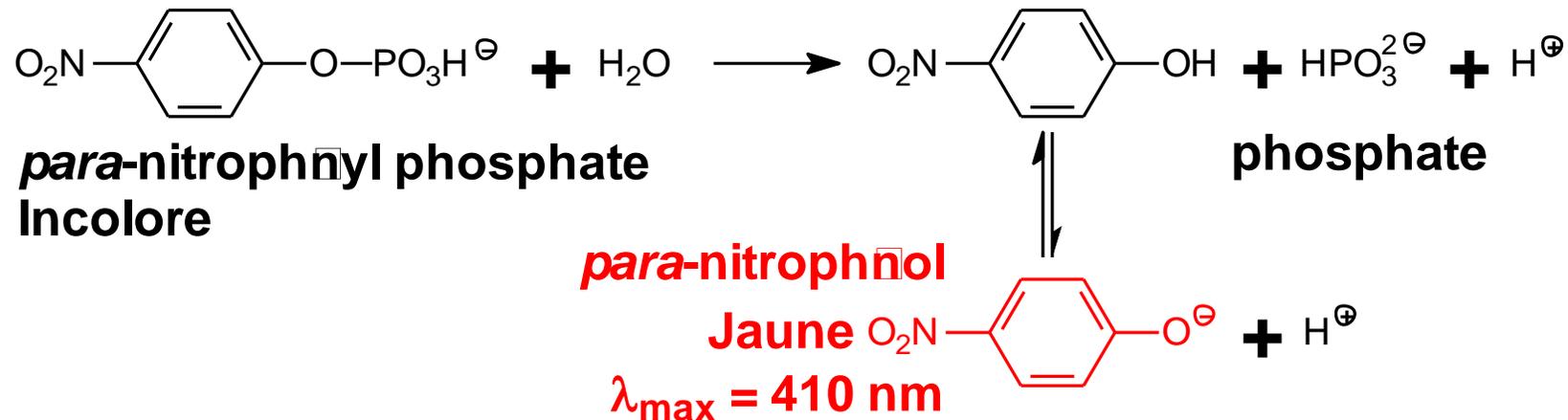
Dosage en cinétique: Activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

- ▶ Définition : Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui transforme 1 μ mole de substrat par minute, dans des conditions standards. La concentration d'activité est exprimée en unités par litre d'échantillon (U/L).
- ▶ Une unité internationale est donc **une vitesse de réaction enzymatique** (linéairement proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon)

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage en cinétique: Activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

- ▶ Principe du dosage: on fournit à l'enzyme présente dans le sérum un substrat et on mesure la vitesse de la réaction en mesurant **la variation d'absorbance** d'un partenaire de la réaction (substrat, produit, coenzyme), qui absorbe à une longueur d'onde définie, **au cours du temps**.
- ▶ La technique de dosage de la PAL la + courante utilise un substrat chromogène artificiel, le para-nitrophényl phosphate dont l'hydrolyse donne du para-nitrophénol qui s'ionise en milieu alcalin en ion para-nitrophénate jaune dosable par spectrophotométrie à 410 nm :



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage en cinétique: activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

- ▶ Méthode (Kit Cypress Diagnostics Phosphatase Alcaline (ALP))
 - ▶ Longueur d'onde 405 ou 410 nm; Température 25, 30, 37°C;
 - ▶ Cuvette trajet optique 1 cm.
 - ▶ Ajustez le zéro de l'instrument avec de l'eau distillée ou de l'air.
 - ▶ Pipetez dans une cuvette:
 - ▶ Solution de travail 1 ml
 - ▶ Échantillon 20 μ l
 - ▶ Mélangez et attendez 1 minute. Lire l'absorbance (abs) initiale,
 - ▶ Démarrez le chrono ou programmer le spectrophotomètre pour lire les absorbances toutes les minutes pendant 3 minutes.
 - ▶ Calculez la différence d'absorbance moyenne par minute (Δ abs./min).

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage en cinétique: activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

► Calcul :

- Rappel: La concentration d'activité est exprimée en unités par litre d'échantillon (U/L). Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui transforme 1 μ mole de substrat par minute, dans des conditions standards..

$$\text{PAL (U/L)} = \frac{\Delta[\text{PNP}]}{\Delta\text{tps}} \cdot f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\varepsilon_{\text{PNP}} \cdot l \cdot \Delta\text{tps}} \times f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta\text{tps}} \times F$$

- Le terme F comprend ε du para-nitrophénol à la longueur d'onde du dosage, la longueur du trajet optique, la dilution du sérum dans la cuve de mesure et le facteur permettant la conversion des concentrations de mol/l à μ mole/l.

- $F = \frac{1}{\varepsilon_{\text{PNP}} \cdot l} \times f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{1}{18500 \cdot 1} \times \frac{1020}{20} \times 10^6 = 2756$

* 18500 = ε du paranitrophénol à **405 nm**.

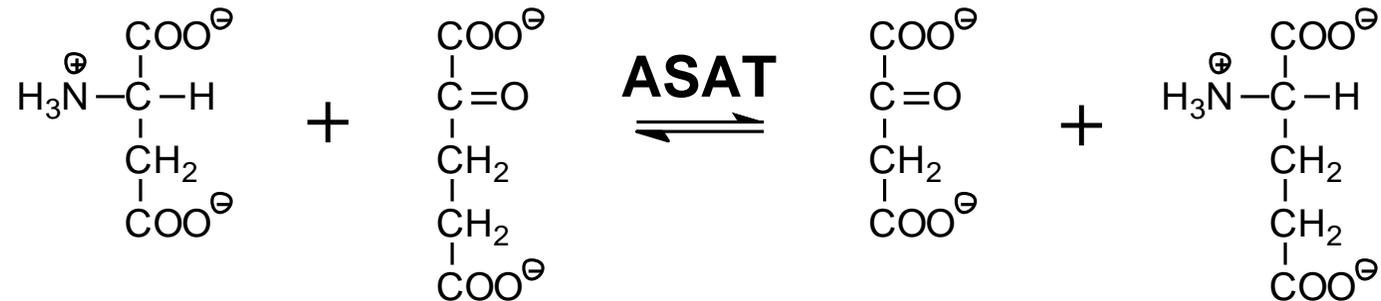
- Le protocole du Kit Cypress Diagnostics Phosphatase Alcaline (ALP) donne F = 2764

Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage de l'ASAT :

▶ Principe: 2 réactions couplées :

- ▶ réaction principale catalysée par l'enzyme dont l'activité doit être déterminée



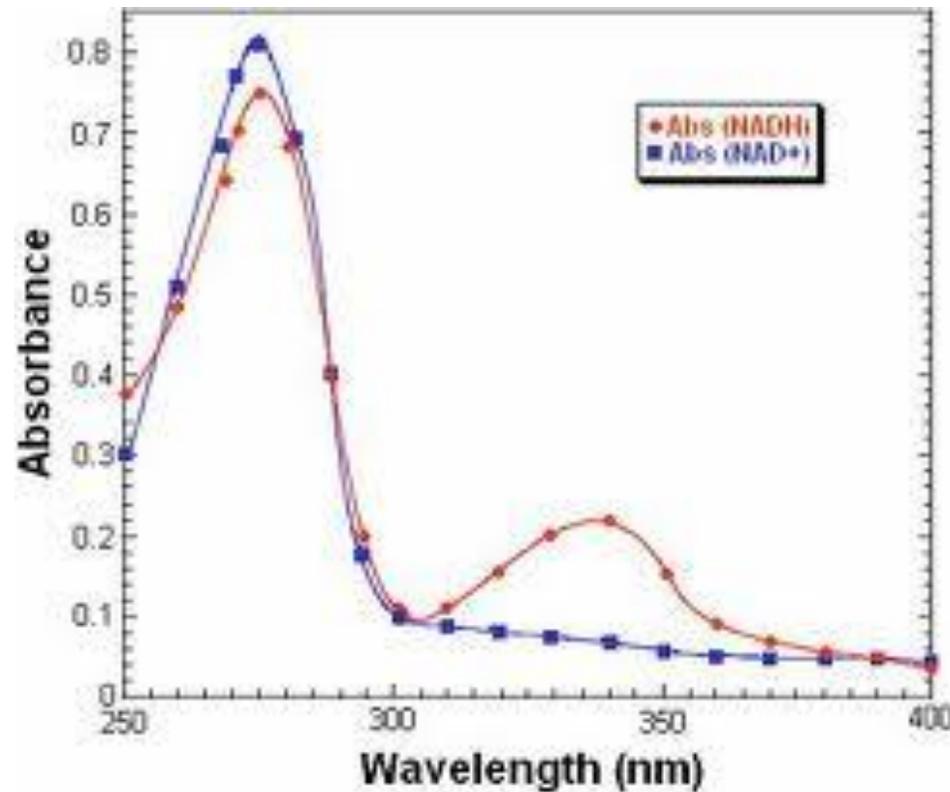
- ▶ réaction indicatrice avec utilisation du coenzyme NADH qui absorbe spécifiquement la lumière UV à 340 nm (la forme NAD⁺ n'absorbe pas) catalysée par la MDH = L-malate déshydrogénase.



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage de l'ASAT :

Le coenzyme réduit NADH absorbe spécifiquement en UV à 340 nm alors que la forme oxydée NAD⁺ n'absorbe pas



Spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Dosage de l'ASAT

- ▶ La vitesse de disparition du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de l'ASAT.
- ▶ Elle est suivie par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm donc dans l'UV (invisible à l'œil nu)

Calcul:

$$\text{PAL (U/L)} = \frac{\Delta[\text{NADH}]}{\Delta\text{tps}} \cdot f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l \cdot \Delta\text{tps}} \times f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta\text{tps}} \times F$$

- ▶ Le terme F comprend ϵ du NADH à la longueur d'onde du dosage, la longueur du trajet optique, la dilution du sérum dans la cuve de mesure et le facteur permettant la conversion des concentrations de mol/l à $\mu\text{mole/l}$.

$$\text{▶ } F = \frac{1}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot l} \times f_{\text{dilution}} \times f_{\text{conversion}} = \frac{1}{6225^* \cdot 1} \times \frac{1100^{**}}{100} \times 10^6 = 1767$$

* 6225 = ϵ du NADH à 340 nm, ** le protocole prévoit l'ajout de 100 μl de sérum à 1 ml de réactif.