

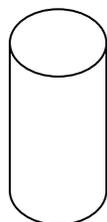
# Spectrophotométrie

## Remplacement de la droite d'étalonnage par un seul point étalon

On obtient une jolie droite d'étalonnage lors de nos TP parce qu'on se souvient que concentrations et absorbances sont proportionnelles.

1. Si pour un premier tube ayant une concentration  $C_1$  en glucose à 1,00g/L, on obtient une absorbance  $A_1$  de 0,250 alors pour un second tube, si on obtient une absorbance  $A_2$  de 0,500, la concentration  $C_2$  en glucose de ce tube 2 est forcément de 2,00g/L. Résultat facile à obtenir parce que la concentration  $C_1$  et les absorbances  $A_1$  et  $A_2$  choisies permettent un calcul mental rapide.

2. Si pour un premier tube ayant une concentration  $C_1$  en glucose à 1,00g/L, on obtient une absorbance  $A_1$  de 0,250 alors pour un second tube si on obtient une absorbance  $A_2$  de 0,445, la concentration  $C_2$  en glucose de ce tube 2 est forcément de ... ? g/L. Le résultat est plus difficile à obtenir de tête. Pour le trouver, le calcul en utilisant la règle de trois s'impose (à moins d'avoir des capacités de calcul mental exceptionnelles)



Tube n°1  
 $C_1 = 1,00 \text{ g/L}$   
 $Abs A_1 = 0,250$

Tube n°2  
 $C_2 = ???$   
 $Abs A_2 = 0,445$



Tube 1	$C_1 = 1,00 \text{ g/L}$	→	$A_1 = 0,250$
Tube 2	$C_2 = ??? \text{ g/L}$	→	$A_2 = 0,445$

$$C_2 = \frac{C_1 \times A_2}{A_1}$$

$$C_2 = \frac{1,00 \times 0,445}{0,250}$$

$$C_2 = 1,78 \text{ g/L}$$

## Exercices d'application :

**Q1 :** Si la concentration d'une solution n°1 de fructose (C1) est de 2,00 mol/L et que pour celle-ci, on obtient une absorbance de 0,200 (A1), quelle est la concentration d'une solution n°2 de fructose (C2) si son absorbance est de 0,100 (A2) ?

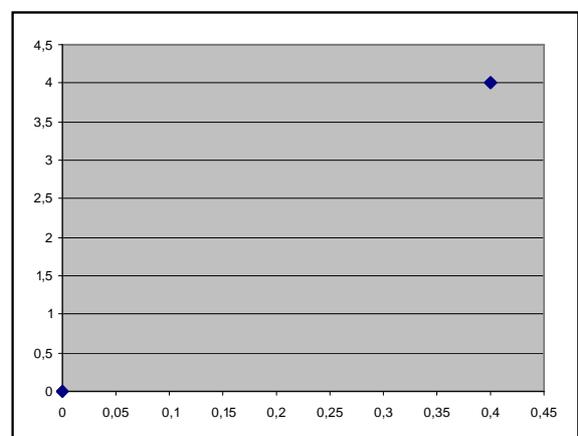
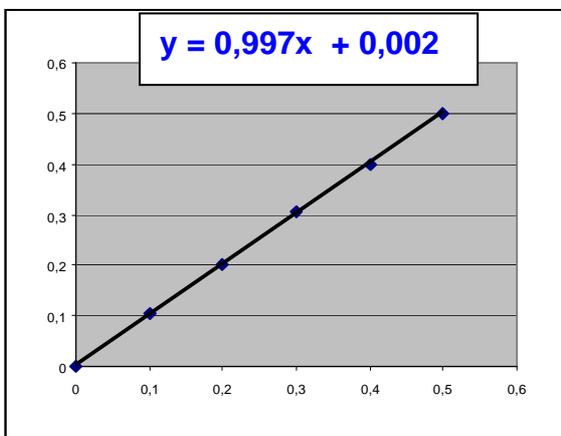
**Q2 :** Si la concentration d'une solution n°1 de fructose est de 2,00 mol/L et que pour celle-ci, on obtient une absorbance de 0,200, quelle est la concentration d'une solution n°2 de fructose si son absorbance est de 0,400 ?

**Q3 :** Si la concentration d'une solution étalon de saccharose (C<sub>étalon</sub>) est de 2,00 mol/L et que pour celle-ci, on obtient une absorbance de 0,200 (A<sub>étalon</sub>); quelle est la concentration de la solution essai de saccharose (C<sub>essai</sub>) si son absorbance est de 0,400 (A<sub>essai</sub>) ?

**Q4 :** Si la concentration de la solution étalon de saccharose (C<sub>étalon</sub>) est de 2,00 mol/L et que pour celle-ci, on obtient une absorbance de 0,213 (A<sub>étalon</sub>); quelle est la concentration de la solution essai de saccharose (C<sub>essai</sub>) si son absorbance est de 0,306 (A<sub>essai</sub>) ?

**Mais...?!... S'il est aussi simple de déterminer la concentration d'une solution essai à partir d'une simple règle de 3 et d'une solution étalon.... pourquoi "s'embêter" à faire une gamme d'étalonnage puis une droite d'étalonnage ???**

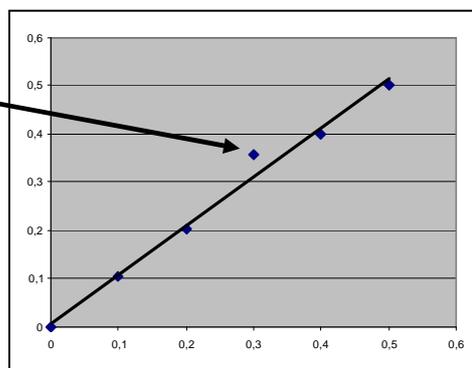
**D'habitude on demande de faire ça... mais aujourd'hui on me dit qu'un point suffit !?**



**Eh bien... en fait, oui et non !**

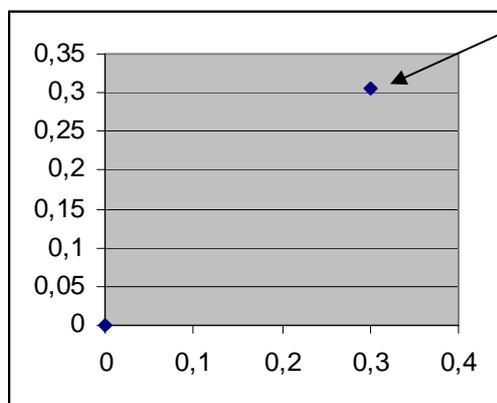
On s'est aperçu que lorsqu'on trace la droite d'étalonnage, un ou deux points ne passent pas par la droite. Ce sont des points qui correspondent à des tubes qui ont été mal réalisés et qu'il faut retirer de l'étude car ils fausseraient le résultat.

par exemple ce point ci

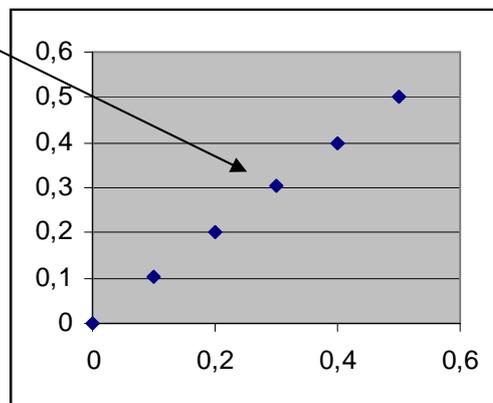


Imaginez n'utiliser qu'un seul tube étalon que vous avez très bien réalisé d'un point de vue pratique. Ce tube pourrait correspondre au seul point présent sur le graphe 1

graphe 1



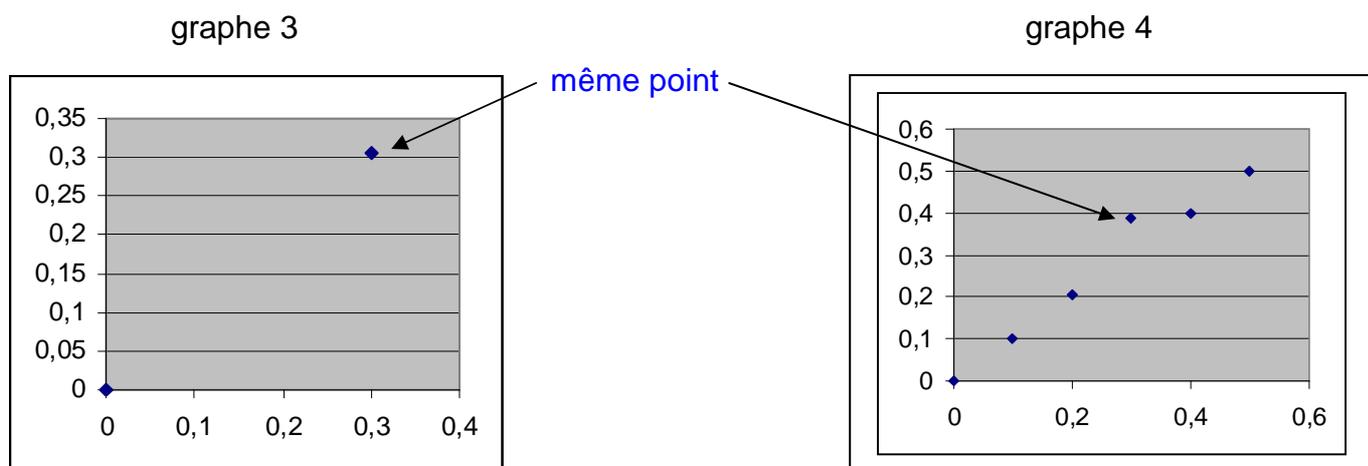
graphe 2



même point

Utiliser la règle de 3 est alors tout à fait possible car ce point figurerait sur la droite qu'on obtiendrait en réalisant plusieurs tubes (graphe 2).

Imaginez à présent n'utiliser qu'un seul tube étalon que vous avez très mal réalisé d'un point de vue pratique. Ce tube pourrait correspondre au seul point présent sur le graphe 3



Utiliser la règle de 3 n'est alors pas du tout possible car ce point ne figurerait pas sur la droite qu'on obtiendrait en réalisant plusieurs tubes (graphe 4). Le résultat du dosage qu'on obtiendrait en utilisant ce point serait totalement faux !

Comment savoir alors si notre tube étalon est bien réalisé et qu'il est possible du coup de l'utiliser pour faire notre dosage par un seul point ?

Il faut juste CONTROLER notre tube étalon.

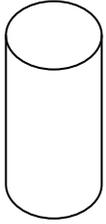
C'est ce que l'on fait avec une SOLUTION DE CONTROLE.

Il s'agit d'une solution qui contient la molécule qui doit être dosée et dont on connaît la concentration exacte.

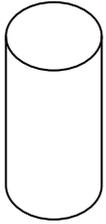
On réalise le dosage de cette solution de contrôle en utilisant comme solution étalon notre tube étalon à contrôler. Deux possibilités :

- le résultat du dosage donne un résultat très proche\* de la concentration affichée sur la solution de contrôle. On sait alors que notre étalon a bien été réalisé et qu'on peut s'en servir pour réaliser des dosages.

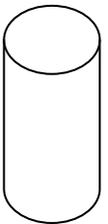
- le résultat du dosage donne un résultat trop éloigné\* de la concentration affichée sur la solution de contrôle. On sait alors que notre étalon n'a pas bien été réalisé et on ne peut s'en servir pour réaliser des dosages



1. **Solution de contrôle**  
Ne sert qu'à savoir si on va pouvoir utiliser la solution étalon pour doser la solution essai.  
On connaît sa concentration  $C_{\text{contrôle}}$  et son absorbance  $Abs_{\text{contrôle}}$ .



2. **Solution étalon**  
On connaît sa concentration  $C_{\text{étalon}}$  et son absorbance  $Abs_{\text{étalon}}$ .



3. **Solution essai**  
On connaît son absorbance  $Abs_{\text{essai}}$  mais pas sa concentration  $C_{\text{essai}}$ . **Trouver  $C_{\text{essai}}$  est le but de la manipulation.**

4. On fait comme si on ne connaissait pas  $C_{\text{contrôle}}$  et on la calcule à l'aide de la solution étalon ( $C_{\text{étalon}}$  et  $Abs_{\text{étalon}}$ ) avec la règle de 3

5. 
$$C_{\text{contrôle}} = \frac{C_{\text{étalon}} \times Abs_{\text{contrôle}}}{Abs_{\text{étalon}}}$$

8. On calcule  $C_{\text{essai}}$  à l'aide  $Abs_{\text{essai}}$ , de la solution étalon ( $C_{\text{étalon}}$  et  $Abs_{\text{étalon}}$ ) et de la règle de 3.

9. 
$$C_{\text{essai}} = \frac{C_{\text{étalon}} \times Abs_{\text{essai}}}{Abs_{\text{étalon}}}$$

6. La  $C_{\text{contrôle}}$  calculée est **très éloignée \*** de sa valeur réelle, l'utilisation de l'étalon pour doser une solution essai n'est pas possible

7. La  $C_{\text{contrôle}}$  calculée est **très proche \*** de sa valeur réelle, l'utilisation de l'étalon pour doser une solution essai est possible

10. Le dosage de la solution essai est terminé !

\* concrètement, c'est combien "très proche" ou "trop éloigné" ?

Imaginons une solution de contrôle à 1,00 g/L. La manipulation permet de déterminer une concentration de solution de contrôle de 1,09 g/L.

1,09 g/L, est assez proche ou trop éloigné de 1,00 g/L ? Peut-on valider notre manipulation et poursuivre avec le dosage de la solution essai ou non ?

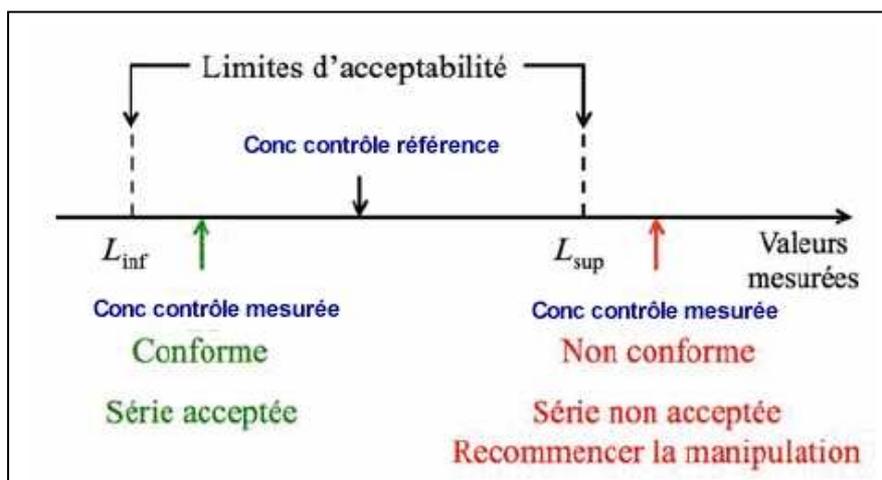
Lorsqu'on utilise une solution de contrôle (avec sa concentration connue  $C_{\text{contrôle ref}}$ ) il est donné à chaque fois des limites d'acceptabilité. Elles comprennent une limite inférieure  $L_{\text{inf}}$  au dessus de laquelle  $C_{\text{contrôle mesurée}}$  doit figurer, ainsi qu'une limite supérieure  $L_{\text{sup}}$  en dessous de laquelle  $C_{\text{contrôle mesurée}}$  doit figurer

$$L_{\text{inf}} < C_{\text{contrôle mesurée}} < L_{\text{sup}}$$

Si la concentration du contrôle mesurée (déterminée par la manipulation) appartient à l'intervalle d'acceptabilité, on peut affirmer que la valeur mesurée est exacte, donc conforme. La manipulation est satisfaisante. En conséquence, on peut poursuivre le travail et accepter les valeurs mesurées pour les tubes étalon et essai

Attention, il faut que tous les tubes (essai, étalon, contrôle) aient été réalisés en même temps.

A l'inverse, si la concentration du contrôle mesurée n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité, on peut affirmer que la valeur mesurée est inexacte, donc non conforme. La manipulation n'est pas satisfaisante. En conséquence, on ne peut accepter aucun tube réalisé. Le travail doit être recommencé après avoir trouvé l'origine de cet écart d'exactitude du contrôle



Un peu comme le logigramme de compatibilité que nous avons étudié (Sr) , voici le document mis à disposition des candidats lors de l'épreuve du baccalauréat en rapport avec la notion d'acceptabilité :

### 1. Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont possibles afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On peut effectuer, dans la même série de mesurages :

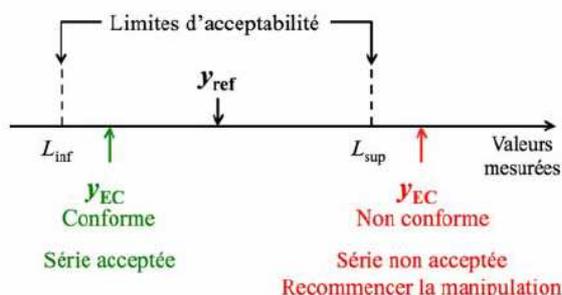
- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée  $y_{EC}$ .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle ( $y_{ref}$ ) ainsi que ses limites d'acceptabilité ( $L_{inf}$  et  $L_{sup}$ ). On recherche si la valeur mesurée ( $y_{EC}$ ) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit :  $L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$

#### Si la valeur mesurée $y_{EC}$ appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée  $y_{EC}$  est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.



#### Si la valeur mesurée $y_{EC}$ n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées**; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Si pour des raisons matérielles, il n'est pas possible de recommencer les manipulations, le candidat poursuivra l'exploitation de ses valeurs mesurées afin d'exprimer un résultat de mesure de façon complète mais en signalant clairement que ce résultat n'est pas « acceptable » au sens métrologique.

## Exercice d'application : Dosage des protéines sériques

Nous disposons du sérum (noté sol S) d'un patient atteint d'une pathologie hépatique.

Pour les besoins du dosage, ce sérum a été dilué 50 fois.

Le but de ce dosage est de vérifier les répercussions de sa maladie sur la physiologie hépatique.

Le dosage est réalisé par méthode spectrophotométrique à l'aide :

- d'une solution étalon de protéines à 2g/L (notée sol E)

- d'une solution de contrôle de protéines à 2,5g/L (notée sol C)

L'absorbance est mesurée à 540nm

	Etalon	Contrôle	Sérum
Abs à 540 nm	0,202	0,254	0,139

1. Pour pouvoir utiliser l'absorbance du sérum afin de déterminer la concentration en protéines dans ce dernier, je dois d'abord vérifier l'exactitude du dosage de la solution de contrôle.

A l'aide de la règle de 3, on détermine la concentration massique de la solution de contrôle (en g/L) à partir de cette équation :

Equation aux grandeurs :  $C_m \text{ contrôle} = (C_m \text{ Etalon} \times \text{Abs contrôle}) / \text{Abs Etalon}$

Equation aux unités :  $\text{g/L} = ( \text{g/L} \times 1 ) / 1$

Equation aux valeurs numériques :  $C_m \text{ contrôle} = (2 \times 0,254) / 0,202$

Résultat avec unités :  $C_m \text{ contrôle} = 2,52 \text{ g/L}$

Phrase de conclusion : Ma solution de contrôle est dosée à 2,52 g/L de protéines

2. Je vérifie l'exactitude de la concentration massique de solution de contrôle à l'aide des limites d'acceptabilité qui me sont données pour la solution de contrôle :

$L_{\text{inf}} = 2,47\text{g/L}$  et  $L_{\text{sup}} = 2,53\text{g/L}$

$2,47 < 2,52 < 2,53$

La concentration du contrôle mesurée appartient à l'intervalle d'acceptabilité, on peut affirmer que la valeur mesurée est exacte et donc conforme. La manipulation est satisfaisante. En conséquence, on peut poursuivre le travail et accepter les valeurs mesurées pour les tubes étalon et sérum

3. Grâce aux résultats du contrôle jugés exacts et conformes, j'ai le droit de déterminer la concentration massique en glucose dans le sérum du patient (en g/L) à partir de sa seule absorbance (1 seul point plutôt qu'une gamme d'étalonnage)

Toujours avec ma règle de 3.

Je dois juste adapter mon équation aux grandeurs :

Equation aux grandeurs :  $C_m \text{ sérum} = (C_m \text{ Etalon} \times \text{Abs sérum}) / \text{Abs Etalon}$

Equation aux unités :  $\text{g/L} = ( \text{g/L} \times 1 ) / 1$

Equation aux valeurs numériques :  $C_m \text{ sérum} = (2 \times 0,139) / 0,202$

Résultat avec unités :  $C_m \text{ sérum} = 1,38 \text{ g/L}$

Phrase de conclusion : Le sérum dilué du patient possède une concentration massique en protéines de 1,38 g/L de protéines

4. Je calcule la concentration massique en protéines dans le sérum non dilué.

L'énoncé me dit que le sérum a été dilué 50 fois.

$C_m \text{ sérum non dilué} = C_m \text{ sérum dilué} \times \text{facteur de dilution}$

$C_m \text{ sérum du patient} = 1,38 \times 50$

$C_m \text{ sérum du patient} = 69 \text{ g/L}$

Le sérum du patient possède une concentration massique en protéines de 69 g/L

5. J'interprète les résultats de la protéinémie (taux de protéines dans le sang) du patient à l'aide des valeurs de références de la protéinémie :

La protéinémie normale est située entre 65 et 80 g/L

Le patient possède une concentration massique sanguine en protéines de 69 g/L ce qui est compris entre 65 et 80 g/L.

→ Sa protéinémie est normale

6. Je conclus que la pathologie hépatique du patient n'affecte pas pour le moment sa protéinémie.