



N° d'anonymat

Note sur X

Note Finale sur
20

Licence Professionnelle Industries pharmaceutiques, cosmétiques et de santé

Option Contrôle et Développement Analytique

Année universitaire 2023-2024
Première session

UE N° 7

Matière : Spectrophotométrie UV-Visible &
spectrofluorimétrie

Durée de l'épreuve : 1h

Documents autorisés : **Aucun**

Calculatrice autorisée : **Yes**

Ordinateur ou tablette autorisés : **No**

Epreuve notée sur : **20**

Correcteur : **L. Godin**

Ce cahier comporte 9 pages celle-ci comprise

Instructions générales

- Ne pas dégrafer ou déchirer ce fascicule
- Soyez très clair si vous faites un renvoi pour terminer une question.
- Respecter les modalités de réponses proposées
- Toute fraude ou tentative de fraude fera l'objet de poursuites disciplinaires (décret n° 92-657 du 13 juillet 1992)

**1^{ère} PARTIE : SPECTROPHOTOMÉTRIE d'ABSORPTION UV-VISIBLE
(10 points)**

Analyse spectrophotométrique de deux acides aminés.

Des solutions contenant des résidus tyrosine et tryptophane peuvent être différenciées en milieu alcalin (soude à 0,1 mol.L⁻¹) d'après leur spectre d'absorption dans l'UV. Dans ces conditions, les coefficients d'absorption molaires sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Coefficients d'absorption molaires de la tyrosine et du tryptophane.

	Tyrosine	Tryptophane
ϵ à 240 nm (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	11 300	1 960
ϵ à 280 nm (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	1 500	5 380

Un échantillon de 10 mg de protéine est soumis à une hydrolyse totale non acide et dilué dans un volume final de 100 mL de soude à 0,1 mol.L⁻¹. L'absorbance dans une cuve de 1 cm est respectivement de 0,717 à 240 nm et 0,239 à 280 nm.

1^{ère} question

(2 points)

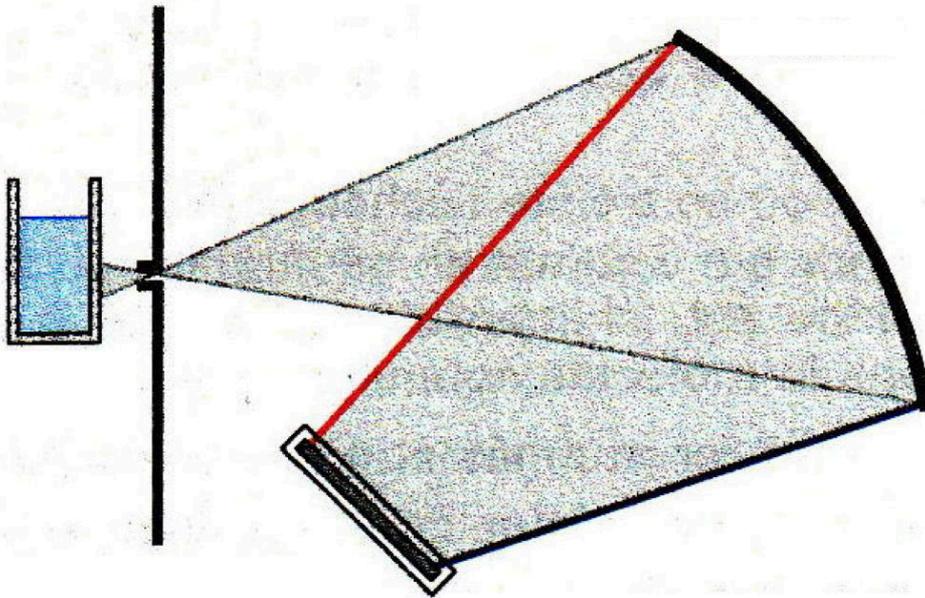
Rappeler la loi de Beer-Lambert en explicitant tous les termes de cette loi. Dans le cas de l'étude d'un mélange de molécules absorbantes, rappeler la loi d'additivité des absorbances.

Réponse du candidat :

2^{ème} question

(2 points)

Le spectrophotomètre utilisé possède un polychromateur à optique inversée, comme celui qui est présenté ci-dessous :



Indiquer directement sur le schéma les 4 éléments principaux.

3^{ème} question

(1 point)

Quelle est la différence essentielle entre le montage à optique directe et celui à optique inversée ? Quelle est alors l'intérêt du montage à optique inversée ?

Réponse du candidat :

4^{ème} question

(1 point)

Quel est le type de cuve utilisé et pourquoi ?

Réponse du candidat :

5^{ème} question

(2 points)

Calculer les concentrations en tyrosine que l'on notera C_{Tyr} et en tryptophane que l'on notera C_{Trp} . Écrire au préalable la loi d'additivité des absorbances aux deux longueurs d'onde, puis résoudre le système à deux équations.

Réponse du candidat :

6^{ème} question

(2 points)

Estimer les teneurs en tryptophane et en tyrosine par masse de protéine en mg/g.

On donne les masses molaires suivantes :

$M(\text{tryptophane}) = 204,23 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M(\text{tyrosine}) = 181,19 \text{ g.mol}^{-1}$.

Réponse du candidat :

2^{ème} PARTIE : SPECTROFLUORIMÉTRIE (10 points)
Étude de la chlorophylle a.

La mesure de la chlorophylle *a* est utilisée comme indicateur de la biomasse phytoplanctonique dans les eaux naturelles. La chlorophylle *a* représente en effet le plus important pigment chez les organismes photosynthétiques aérobies (en excluant les cyanobactéries) et toutes les algues en contiennent. Le contenu cellulaire en chlorophylle *a* est de 1 % à 2 % en poids sec. Afin de doser la chlorophylle *a*, nous nous basons sur un mode opératoire trouvé dans la littérature. Certaines étapes étant peu claires voire non précisées ; il sera nécessaire de les compléter.

Il faut filtrer 250 mL d'eau sur une membrane 0,8 μm , pour recueillir les cellules algales. Les pigments sont extraits de ces cellules avec 250 mL d'acétone à 90 % (v/v). Cette dernière solution sera directement utilisée pour le dosage. Le dosage est réalisé par fluorimétrie.

7^{ème} question

(1 point)

Qu'indique la technique d'analyse utilisée à propos de la structure de la chlorophylle *a* ? Justifier votre réponse.

Réponse du candidat :

8^{ème} question

(1,5 points)

La publication parle des longueurs d'onde de 431 et 664 nm. Préciser, en justifiant, quelle est la longueur d'onde d'excitation et quelle est la longueur d'onde d'émission

Réponse du candidat :

9^{ème} question

(1 point)

Indiquer comment préparer 500 mL d'acétone à environ 90 % (v/v) à partir d'acétone à 100 % (v/v).

Réponse du candidat :

Il faut ensuite préparer une gamme d'étalonnage dont l'intensité de fluorescence sera mesurée en même temps que l'inconnue. Vous disposez d'une solution mère à 10 mg.L^{-1} de chlorophylle *a* dans de l'acétone à 90 % (v/v). Il est nécessaire de préparer une gamme d'étalonnage allant de 0 à $0,200 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlorophylle *a*.

10^{ème} question

(3 points)

Expliquer, en justifiant, comment réaliser 6 points de gamme régulièrement répartis dans des tubes à hémolyse (dont les points de concentration devront être de 0 à $0,200 \text{ mg.L}^{-1}$ équitablement répartis). La liste du matériel dont vous disposez est la suivante :

- Tubes à hémolyse (contenance 5 mL)
- Fioles jaugées de 10 et 100 mL classe A,
- Pipettes jaugées de 1 et 10 mL classe A,
- Pipettes graduées de 1 mL et 5 mL au $1/100^{\text{ème}}$ (2 traits),
- Eprouvettes de 5, 100, 500 mL,
- Béchers.

Vous commencerez par faire une dilution exacte de la solution étalon au $1/10^{\text{ème}}$, puis réaliserez la gamme. Préciser la verrerie et le diluant utilisés.

Puis 3 mL de chaque solution et de l'inconnue sont déposés dans les cuves pour les mesures.

Réponse du candidat :

Réponse du candidat :

11^{ème} question

Quel type de cuve utiliser ? Justifier.

(1 point)

Réponse du candidat :

12^{ème} question

Composition du blanc ?

(1 point)

Réponse du candidat :

Après ces mesures, nous désirons étudier l'interférence d'un autre pigment, la phéophitine. Pour cela, il suffit d'acidifier l'échantillon pour atteindre un pH de 2,5 environ puis de mesurer l'intensité de fluorescence correspondante. Vous disposez d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

13^{ème} question

Calculer le volume d'acide chlorhydrique à ajouter sachant que la cuve contient déjà 3 mL de solution. (1,5 points)

Réponse du candidat :

FIN D'ÉPREUVE