

Chapitre III :

LE DOSAGE

1. Introduction

Nous allons utiliser dans ce chapitre les notions de : **conductimétrie, réactions acido-basiques et d'oxydoréductions**. En combinant ces notions, nous allons pouvoir déterminer la quantité de matière d'une espèce chimique.

2. Principe d'un dosage

Doser (ou titrer) une espèce chimique (molécule ou ion) en solution, c'est déterminer sa concentration molaire dans la solution considérée.

Nous avons besoin de ces dosages dans tout ce qui concerne les analyses, par exemple, analyse chimique du sang :

Dosage du cholestérol, la concentration peut-être molaire (mol/L) ou massique (en g/L).

Détection et dosage de produits dopants.

3. Les différentes méthodes de dosage

3.1. Des méthodes non destructives :

Elles ne font pas intervenir de réactions chimiques.

On utilise des grandeurs physiques dont la valeur ne dépend que de la concentration en espèce de la solution :

- Variation de l'indice de réfraction.
- Variation de l'absorption de lumière (absorbance).
- Variation de la conductance G .

3.2. Dosages destructifs ou directs :

On utilise alors une réaction chimique.

Le réactif titré est l'espèce dont on veut déterminer la concentration, il est contenu dans la solution à doser.

On utilise une solution titrante contenant un réactif titrant choisi en fonction de l'espèce à doser.

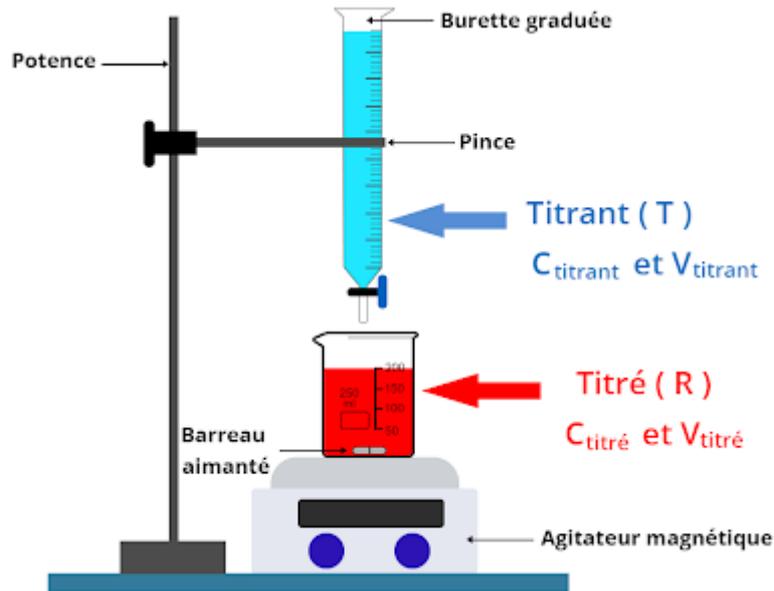


Fig : Le Titrage

Le titrant est placé dans une burette graduée de précision surmontant un bécher contenant un volume précis $V_{\text{titré}}$ du soluté titré dont on souhaite déterminer la concentration $C_{\text{titré}}$.

4. Déroulement d'un dosage direct :

- On verse à l'aide de la burette la solution titrante dans la solution à titrer.

Il se produit alors la réaction de dosage qui met en jeu le réactif titré et le réactif titrant. Celle-ci peut être soit acido-basique, soit d'oxydoréduction.

- Pour qu'une réaction chimique soit utilisée comme réaction de dosage, il faut qu'elle soit :

- Univoque : il faut que les deux réactifs, titré et titrant, réagissent selon une seule et unique réaction.
- Totale : Un des deux réactifs mis en présence doit disparaître complètement.
- Rapide.

- Jusqu'à quand faut-il verser la solution titrante ?

On verse la solution titrante jusqu'à ce que le réactif titré soit totalement réagi. On atteint alors l'équivalence.

Au cours du dosage, les réactifs réagissent dans les proportions stœchiométriques.

Avant l'équivalence, le réactif titrant est le réactif limitant (à chaque fois que l'on en verse, il disparaît).

A l'équivalence, les réactifs sont intégralement consommés.

Après l'équivalence, le réactif titrant est introduit en excès (il n'y a plus de réactif titré donc plus de réaction).

- Que se passe-t-il au niveau de l'avancement de la réaction ?

A chaque ajout de réactif titrant, l'avancement est maximal. A l'équivalence, les deux réactifs sont totalement consommés est l'avancement prend la valeur x_{eq} .

- Repérage de l'équivalence :

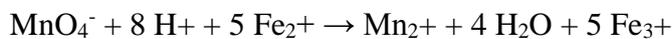
C'est le but de chaque dosage, repérer l'équivalence et noter le volume de solution titrante que nous avons introduit. On peut effectuer ce repérage soit par :

- Un changement de couleur du milieu réactionnel (fréquent en oxydoréduction).
- Un changement de couleur d'un indicateur coloré. Il a été introduit préalablement au dosage dans la solution à titrer.
- Le tracé d'une courbe

Exemple : dosage d'oxydoréduction des ions fer II par une solution de permanganate de Potassium

La solution d'ion fer(II) est dans un bêcher alors que la solution titrante contenant les ions permanganate est délivrée par une burette.

La réaction de dosage :



La solution de permanganate se décolore au fur et à mesure de son ajout car les ions $\text{MnO}_4^- \text{aq}$ violet disparaissent pour laisser place aux ions $\text{Mn}_2^+ \text{aq}$ transparent.

A l'équivalence, les ions $\text{Fe}_2^+ \text{aq}$ ont été intégralement consommés, il n'y a donc plus réactions et les ions $\text{MnO}_4^- \text{aq}$ sont en excès d'où la persistance de la couleur violette à ce moment.

Cette réaction fait intervenir des ions H^+ en tant que réactifs, il faudra donc travailler en milieu acide. L'acide chlorhydrique (H^+ , Cl^-) doit être évité car les ions chlorure ont des propriétés rédox et pourraient intervenir dans le dosage. On utilisera plutôt de l'acide sulfurique H_2SO_4 .

Un tableau d'avancement pour la réaction de dosage :

Equation		$\text{MnO}_4^- (\text{aq}) + 5 \text{Fe}^{2+} (\text{aq}) + 8 \text{H}^+ (\text{aq}) \rightarrow \text{Mn}^{2+} (\text{aq}) + 5 \text{Fe}^{3+} (\text{aq}) + 4 \text{H}_2\text{O} (\text{l})$					
Etat du système	Avancement (x en mol)	$n_{\text{MnO}_4^-}$	$n_{\text{Fe}^{2+}}$	n_{H^+}	$n_{\text{Mn}^{2+}}$	$n_{\text{Fe}^{3+}}$	-
Initial	$x = 0$	$c_2 \cdot v_2$	$c_1 \cdot v_1$	excès	0	0	-
Au cours du dosage	x	$c_2 \cdot v_2 - x$	$c_1 \cdot v_1 - 5x$	excès	x	5x	-
A l'équivalence	$x_{\text{eq}} = 3.6 \cdot 10^{-4}$	0	0	excès	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-3}$	-

Comment repérer l'équivalence ?

La question est maintenant de savoir comment repérer l'équivalence. On va essayer de repérer l'équivalence par un changement de couleur dans le becher. Il faut alors savoir que les ions permanganate sont de couleur violette alors que tous les autres ions sont incolores.

- Contenu du bêcher avant l'équivalence : l'ion permanganate est introduit en défaut. Il est alors complètement consommé. Dans le becher, il y a : ion Mn^{2+} , ion Fe^{2+} (non complètement consommés car ils étaient en excès), ion Fe^{3+} .

Couleur de la solution contenue dans le becher : incolore

- Contenu du becher à l'équivalence : l'ion permanganate a été introduit dans les proportions stœchiométriques par rapport aux ions Fe^{2+} . Ces deux ions ont été complètement consommés par la réaction de dosage totale. Dans le bêcher, il reste : Mn^{2+} et Fe^{3+} .

Couleur : incolore

- Contenu du becher après l'équivalence : l'ion permanganate est introduit en excès. Il ne reste plus d'ion Fe^{2+} , l'ion permanganate s'accumule dans le milieu.

Couleur : violette

Conclusion : l'équivalence peut être repérée lors du changement de couleur dans le becher qui passe de l'incolore à violette.

Détermination de la concentration du réactif à doser :

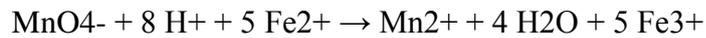
Dans un erlen de 200 cm^3 , on introduit 10 cm^3 d'une solution contenant du sulfate de fer(II) de concentration inconnue C_{red} , exactement mesurés à la pipette et 1 mL d'acide sulfurique concentrée. La solution de permanganate de potassium de concentration connue égale à C_{ox}

$=0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ est introduit dans la burette. Le changement de couleur dans l'eren est obtenu après avoir ajouté 11,9 mL de solution d'ion permanganate.

Déterminer la concentration C_{red} .

Quelle est la concentration de la solution de fer (II) C_{red} ?

On part de la réaction de dosage :



A l'équivalence, on a la relation suivante :

$$n(\text{Fe}^{2+})/5 = n(\text{MnO}_4^-)$$

En remplaçant les quantités de matière par le produit des concentrations et des volumes :

$C_{\text{red}}.V_{\text{red}}/5 = C_{\text{ox}}.V_{\text{oxe}}$ où V_{oxe} est le volume de solution oxydante versé à l'équivalence.

Vous pouvez consulter la vidéo suivant qui vous permettra de bien illustrer le phénomène :

<https://www.youtube.com/watch?v=xamXNWEYOIM>

5. Dosage colorimétrie

Un dosage colorimétrique est un type de dosage possible lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et si l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Beer-Lambert.

Un dosage colorimétrique est également possible en utilisant des indicateurs colorés tels que l'hélianthine, la phénolphthaléine, le vert de bromocrésol qui vont se colorer par exemple à pH différents et de ce fait, vont pouvoir indiquer quand on atteint le point d'équivalence. On parle alors aussi de titrage colorimétrique.

Le principe d'un dosage colorimétrique repose sur un changement de couleur lors d'un dosage, ce changement ayant généralement lieu lors des équivalences.

Loi de Beer-lambert

La forme utilisée est la suivante : $A = \epsilon \times l \times C$

A : absorbance de la solution sans unité

ϵ : coefficient d'extinction molaire en $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ (parfois noté avec un ξ)

l : longueur de cuve traversée par la lumière en cm

C : concentration molaire en $mol \times L^{-1}$.

5.1. Réalisation d'une gamme d'étalonnage

5.1.1. Principe d'une gamme étalon et d'une droite étalon

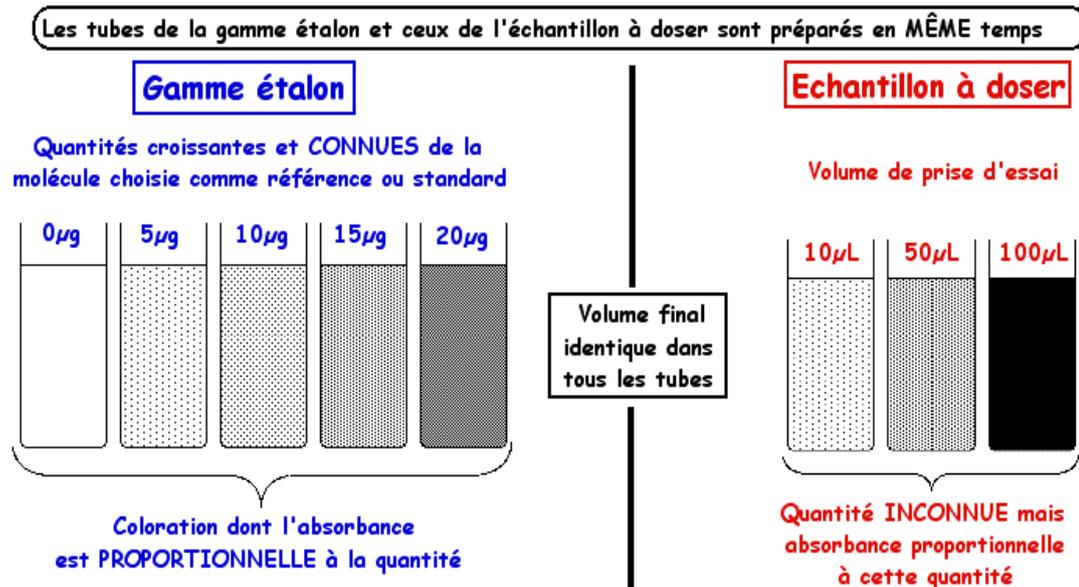
On utilise trois types de solution :

1. une solution de la protéine dont on veut déterminer la concentration.
2. une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration. Cette protéine de référence peut être la même protéine que celle que l'on veut doser.
3. une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines.

La solution de concentration connue permet de constituer une gamme étalon : série de tubes qui contiennent un volume identique mais des quantités croissantes et connues de la protéine de référence.

En parallèle, une série de tubes, contenant différents volumes de prise d'essai de la protéine dont on veut déterminer la concentration (l'échantillon à doser), est préparée.

La solution de réactif est ajoutée au même moment dans tous les tubes afin que la coloration se développe dans les mêmes conditions pour la gamme étalon et l'échantillon à doser.



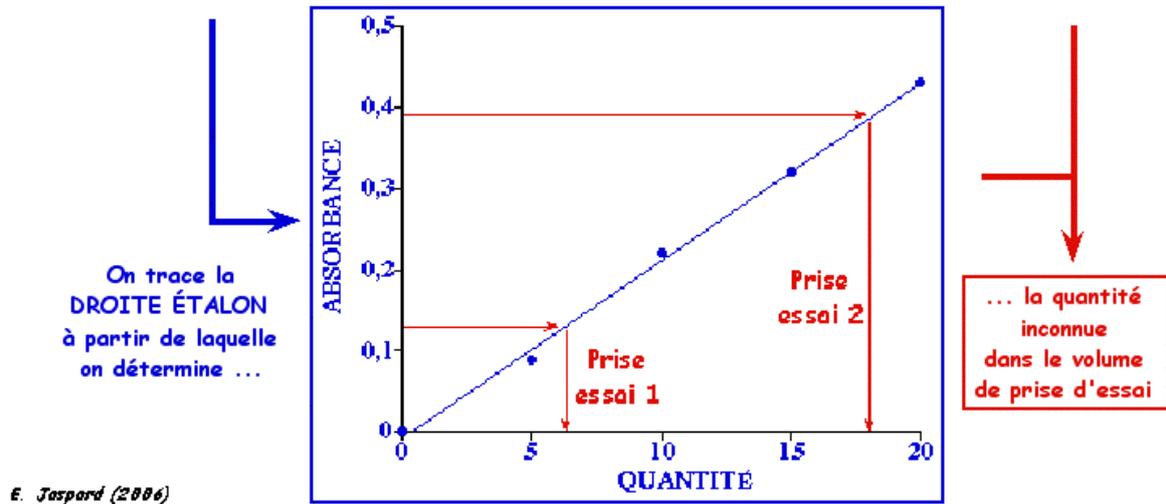
L'absorbance de tous les tubes est ensuite mesurée.

Pour régler le spectrophotomètre, la réalisation d'une gamme d'étalonnage est indispensable (y compris pour certains kits vendus dans le commerce). Cette gamme permet de déterminer une absorbance à une longueur d'onde donnée, pour un tube donné ou une cuve de spectrophotomètre de longueur donnée, pour une concentration en composé recherché. Il faut donc préparer une solution de l'élément à doser de faible concentration. Pour la réalisation de la gamme d'étalonnage et du dosage, le volume final de liquide dans chaque tube doit être identique. Or les volumes de réactifs doivent rester constants pour permettre la réaction, et les quantités (reliées aux concentrations) de composé à doser doivent varier dans chaque tube. Dans certaines méthodes de dosage, on complète avec de l'eau distillée à un même volume (par exemple 100 ml) en ajustant le niveau à un trait de jauge.

Un tube 0 ou blanc doit impérativement être réalisé pour annuler l'absorbance due aux réactifs eux-mêmes. Ce tube ne contient pas d'échantillon de composé à doser.

La réalisation d'une gamme d'étalonnage demande beaucoup de précision (utilisation de fioles jaugées, de pipettes...), et doit être, de préférence, réalisée dans les mêmes conditions que les essais et par le même opérateur.

Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite étalon : $\text{absorbance} = f(\text{quantité})$.



Cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser. On en déduit alors la concentration de la protéine à doser.

5.2. Méthodes colorimétriques les plus courantes pour la détermination de la concentration en protéines

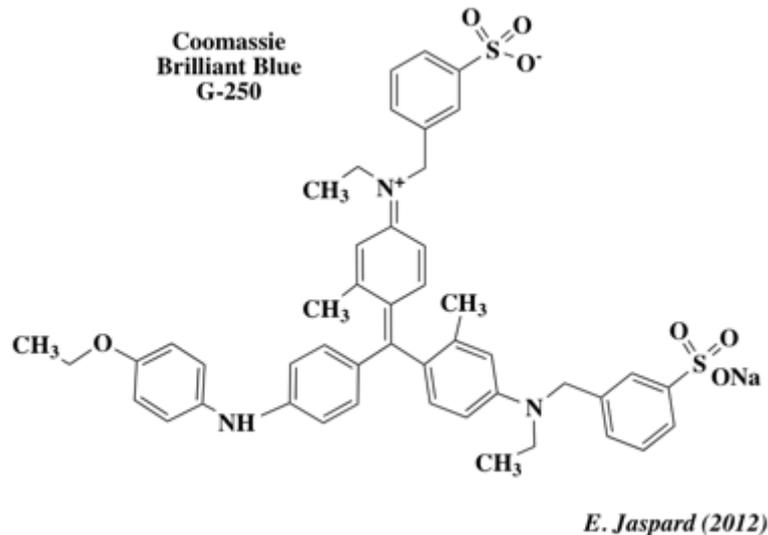
Méthode	Bradford	Biuret	Lowry
Réactif	Le bleu de Coomassie (s'adsorbe sur le verre des cuves qu'il faut nettoyer fréquemment)	Le biuret (NH ₂ -CO-NH-CO-NH ₂)	Le biuret et le réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate - 1927)
Groupements réactifs	Réaction avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques	Formation d'un complexe pourpre avec la liaison peptidique en présence de cuivre à pH basique	Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la Tyr et le Trp et, dans une moindre mesure, avec la Cys, l'His et la liaison peptidique
λ mesure	595 nm (bleu de Coomassie seul : 465 nm)	545 nm (ou 300 nm)	745 nm
Sensibilité	Elevée (seuil = 1 µg)	Faible (seuil = 100 µg)	Elevée (seuil = 1 µg)
Rapidité et complexité	Méthode simple et très rapide	Méthode simple et moyennement rapide	Méthode moyennement simple et moyennement rapide
Interférence	Dosage peu influencé par la présence d'autres molécules sauf les détergents et les bases fortes	Dosage influencé par les autres solutés	Dosage fortement influencé par les autres solutés.
Variation d'une protéine à une autre	Forte : la protéine de référence (l' albumine de sérum bovin ou BSA, " <i>Bovine Serum Albumin</i> ") est une protéine globulaire peu représentative de l'ensemble des protéines. La γ-globuline, parfois employée, est une protéine qui est une meilleure protéine de référence.	Faible : la formation du complexe est à peu près équivalente pour toutes les protéines puisque le biuret réagit avec la liaison peptidique	Forte

Cher étudiants, merci de consulter ce site :

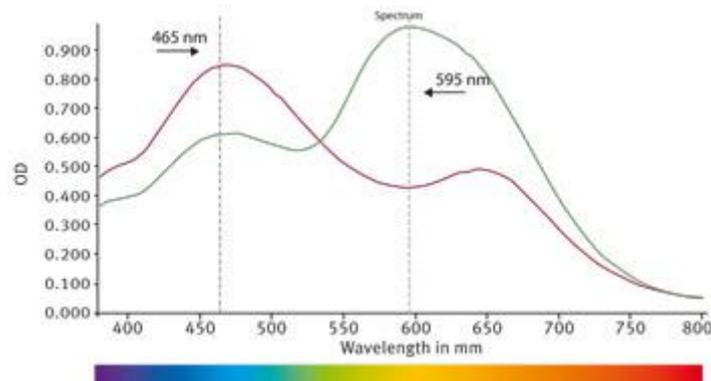
<https://www.youtube.com/watch?v=wU->

3. Exemple de la méthode de Marion Bradford

Le nom anglais du réactif de Bradford est : "Bradford Coomassie brilliant blue G-250 protein-binding dye". Le pigment ("dye") existe sous forme cationique, neutre et anionique.



Sa longueur d'onde d'absorbance maximale est **465 nm**.



Le pigment forme un complexe avec les protéines : sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595 nm.

L'interaction pigment - protéine s'effectue essentiellement avec :

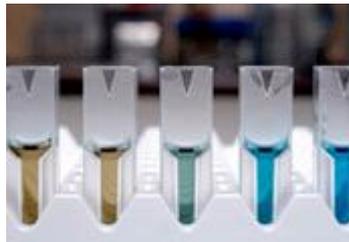
- les résidus d'acides aminés hydrophobes
- des résidus d'acides aminés basiques (arginine - lysine et histidine)
- les forces de Van der Waals contribuent aussi à la formation du complexe

Le nombre de molécules de pigment fixé par molécule de protéine est approximativement proportionnel au nombre de charges positives portées par la protéine.

Le pigment ne réagit pas avec les acides aminés libres. La masse du peptide ou de la protéine doit être au moins de 3 kDa.

En absence de protéine, la couleur du réactif seul est marron (à gauche - figure ci-contre).

Plus la concentration en protéine est élevée, plus celle du complexe formé l'est aussi : la couleur est de plus en plus bleue.



Le développement de cette couleur bleue n'est proportionnelle à la concentration en protéine que dans une gamme de quantité limitée (précisée par le fabricant). Au-delà, il n'y a plus proportionnalité : d'où l'importance d'établir une gamme étalon précise.

Le complexe n'est stable que pendant un temps limité : il faut donc préparer en même temps les mélanges pour la gamme étalon et pour les échantillons, à température ambiante. Il faut effectuer les lectures de la gamme étalon et des échantillons au même moment.

Il est à noter que le bleu de Coomassie est un moyen de révéler les protéines dans les gels d'électrophorèse même si ça n'est plus la méthode de choix du fait du développement de réactifs beaucoup plus sensibles qui permettent de détecter des quantités bien inférieures (par exemple les fluorophores).

Merci de consulter également les deux sites :

<https://www.youtube.com/watch?v=dLEE0KhVCJE>

<https://www.youtube.com/watch?v=U-ibtXjq8ag>

Cher étudiants, merci de consulter ce site :

<https://www.youtube.com/watch?v=wU->