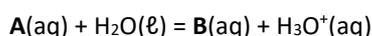




DM3 – Solutions aqueuses, Spectroscopies (à rendre le mardi 3 octobre)

Détermination d'un pK_a par spectroscopie de RMN 1H

Ce sujet aborde une méthode de détermination de la constante d'acidité d'un couple acide-base par spectroscopie de RMN 1H . L'équation de la réaction chimique support de l'étude est notée ci-dessous :



On s'intéresse plus particulièrement aux signaux liés à des noyaux hydrogène non impliqués dans les échanges acido-basiques des espèces **A** et **B**. Par suite de l'échange de proton avec l'eau, un noyau d'hydrogène H_A de la molécule **A**, non échangé, est noté H_B dans la molécule **B**. Le changement d'environnement chimique de l'atome d'hydrogène dans les molécules **A** et **B** peut induire des différences de déplacement chimique pour les signaux de RMN de H_A et H_B .

Dans la suite du sujet, les échanges de protons entre les molécules **A**, **B** et le solvant H_2O sont supposés très rapides devant le temps d'enregistrement d'un spectre de RMN.

Le déplacement chimique d'un noyau d'hydrogène étant directement lié à l'environnement électronique des noyaux d'hydrogène, un échange rapide de proton tend à modifier plusieurs fois l'environnement de certains noyaux pendant l'enregistrement d'un spectre de RMN. Deux cas limites apparaissent (**Figure 1**) :

- Soit l'échange d'hydrogène est lent devant le temps caractéristique de la RMN : dans ce cas, l'environnement d'un noyau d'hydrogène n'est pas modifié par l'enregistrement. Les protons H_A et H_B résonnent à des déplacements chimiques propres δ_A et δ_B qui seraient également observés dans les cas où l'échantillon ne contiendrait que l'espèce chimique **A** ou l'espèce chimique **B**,
- Soit l'échange d'hydrogène est rapide devant le temps caractéristique de la RMN : dans ce cas, un signal unique est enregistré pour les protons H_A et H_B , à une valeur de déplacement chimique δ intermédiaire entre les déplacements chimiques propres δ_A et δ_B . Le déplacement chimique moyen δ est donné par la relation barycentrique dans laquelle p_A et p_B représentent les proportions des espèces chimiques **A** et **B** dans le mélange : $\delta = p_A\delta_A + p_B\delta_B$

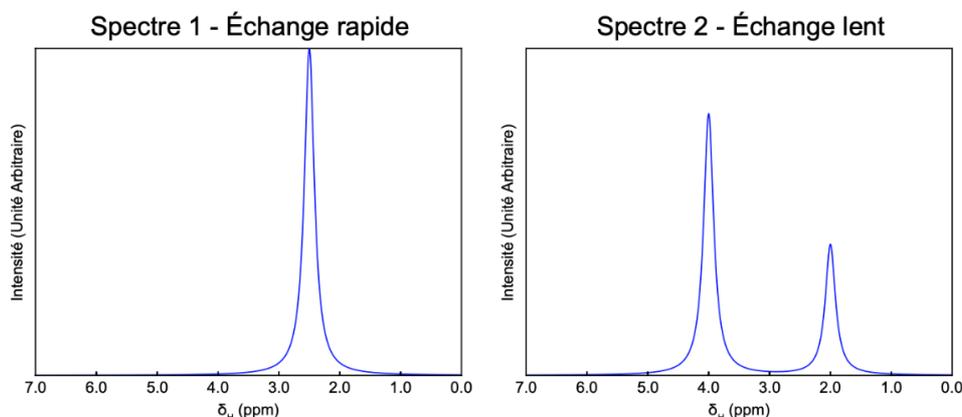


Figure 1 – Spectres simulés pour deux cas limites d'échange chimique entre deux espèces constituées chacune d'un proton, l'une ayant un déplacement chimique de 2,0 ppm (espèce A), l'autre de 4,0 ppm (espèce B). Les échelles d'intensité sont en unité arbitraire et indépendantes pour chacun des spectres. Dans le spectre 2, le pic à 4,0 ppm intègre pour 2 tandis que le pic à 2,0 ppm intègre pour 1. Dans le spectre 1, la proportion en espèce A est de 75%. Elle est de 25% dans le spectre 2.

1. Montrer que $\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{\delta - \delta_A}{\delta_B - \delta}\right)$.
2. Établir la condition sur le déplacement chimique δ pour que $\text{pH} = \text{pK}_a$.

En 2008, l'équipe de SYKES détermine le pK_a de quelques molécules utilisées en RMN pour étudier des biomolécules (protéines et acides nucléiques par exemple). L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de déterminer de façon précise le pH d'une solution contenant des biomolécules sans avoir à utiliser de pH-mètre, pratique qui nécessite en général un trop grand volume de solution par rapport à ceux permettant l'étude de biomolécules. Les mesures de cette étude sont présentées sur la **Figure 3**.

On s'intéresse plus particulièrement à l'imidazole. Une numérotation des noyaux d'hydrogène est proposée dans la **Figure 2**.

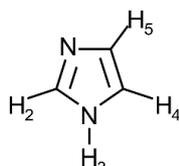


Figure 2 – Structure de l'imidazole.

3. Identifier le site basique de l'imidazole et représenter son acide conjugué.
4. Justifier notamment l'équivalence chimique des protons H4 et H5 en milieu acide.

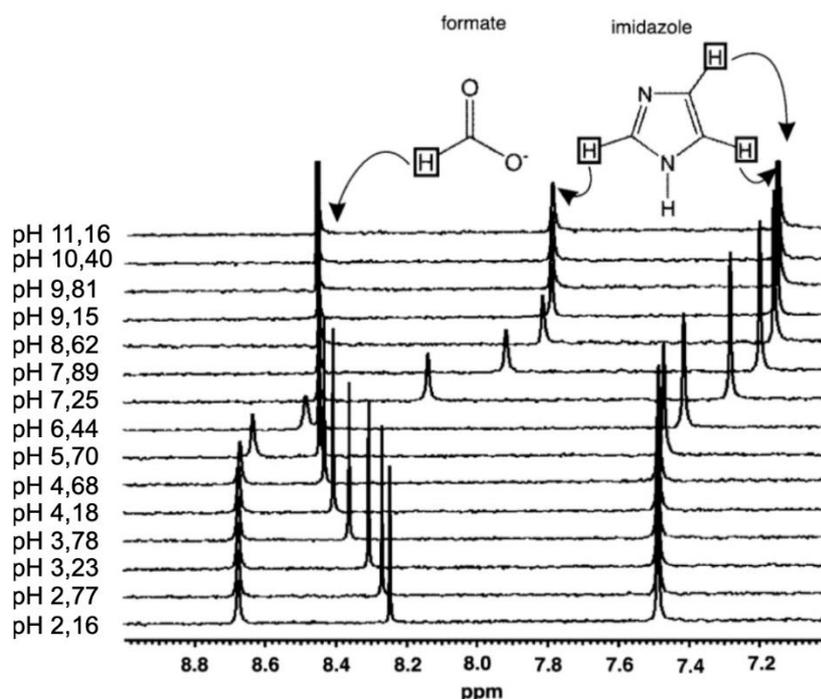


Figure 3 – Spectres de RMN ^1H enregistrés à 500 MHz à la température de 30 °C. Les espèces chimiques étudiées sont dissoutes à une concentration de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans une solution aqueuse de KCl à $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

5. Déterminer graphiquement la valeur du pK_a du couple imidazolium/imidazole en utilisant l'évolution du déplacement chimique des protons H4 et H5 d'une part, et l'évolution du déplacement chimique du proton H2 d'autre part. On prendra soin d'indiquer la méthode utilisée.
6. La valeur du pK_a reportée dans l'étude pour l'imidazole est de 7,08. Expliquer pourquoi l'incorporation d'imidazole dans une solution permet d'accéder facilement au pH du milieu dans le cadre de l'étude de biomolécules.

La méthode peut être exploitée pour déterminer la valeur du pK_a du couple acide-base impliquant un acide aminé particulier au sein d'une protéine. Dans une étude publiée en 2013, l'équipe de SYKES a étudié l'histidine (H162) au sein d'une protéine **Figure 4**.

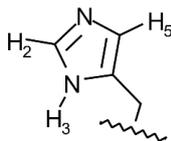


Figure 4 – Structure de la chaîne latérale de l'histidine (la protéine complète n'est pas représentée)

La protéine est alors diluée dans une solution tampon contenant l'imidazole comme indicateur pH-métrique. Les déplacements chimiques des noyaux hydrogène de l'imidazole vont servir à mesurer le pH de façon précise, ce qui permet par la suite d'obtenir une valeur précise du pK_a des acides aminés de la protéine.

La série de spectres présentée en **Figure 5** correspond au titrage pH-métrique de la protéine d'intérêt. Nous allons dans un premier temps déterminer le pH de la solution pour chacun des spectres enregistrés, puis la valeur du pK_a de l'histidine H162.

7. La solution tampon contient de l'imidazole en grande concentration ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) devant la protéine (concentration de $8 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau). Identifier les déplacements chimiques des protons de l'imidazole sur les spectres de pH le plus élevé et de pH le plus faible. Expliquer les différences éventuelles avec les valeurs des déplacements chimiques observés dans l'étude précédente qui ne faisait pas intervenir la protéine.
8. Remplir le tableau suivant indiquant le pH et le déplacement chimique du proton H_4 de l'imidazole pour chaque spectre, quand cela est possible. On déterminera le pH le plus précisément possible.

spectre	1	2	3	4	5	6	7	8	9
δ		8,68	8,66			8,18		7,80	
pH	<5,43	<5,43	5,43			7,18		8,72	>8,72

9. Déterminer à partir d'une construction graphique le pK_a du couple acide-base auquel appartient H162 en utilisant la feuille de papier millimétré fournie. On prendra soin de laisser une trace du travail effectué.

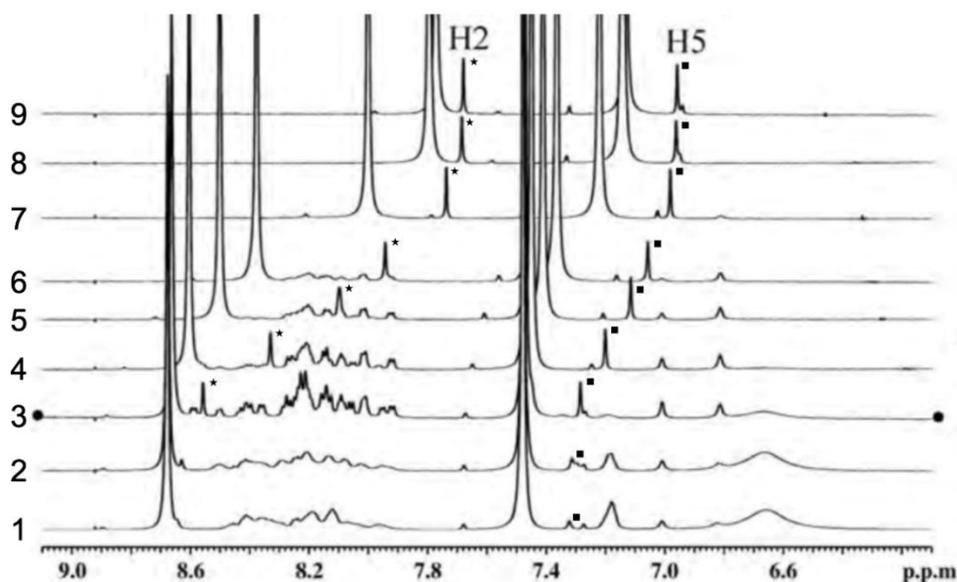


Figure 5 – Titrage pH-métrique de la protéine dans un tampon contenant de l'imidazole. Les signaux des protons H_2 et H_5 de l'histidine H162 sont identifiés, quand cela est possible, respectivement au moyen d'une étoile et d'un carré. Les spectres ont été enregistrés sur un appareil de fréquence 500 MHz à une température de 30°C . Les numéros 1 à 9 attribués aux spectres sont donnés dans l'ordre d'un pH croissant.

NOM :

