



Année 2023 - 2024

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Activité technologique en analyse biochimique N°5



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

godin.lionel@orange.fr

TP n°5 : DOSAGE DE LA L-TYROSINE PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE

| | |
|--|----------|
| 1. BUT | 2 |
| 2. MATERIELS ET REACTIFS | 2 |
| 2.1. Casier de la manipulation | 2 |
| 2.2. Matériels et réactifs fournis | 2 |
| 2.3. La L-Tyrosine | 3 |
| 3. MODE OPÉRATOIRE | 3 |
| 3.1. Étude de l'absorption et de la fluorescence de la L-Tyrosine en milieu acide | 3 |
| 3.1.1. Préparation des solutions M et M ₀ de la L-Tyrosine | 3 |
| 3.1.2. Étude préliminaire de fluorescence, recherche des longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales | 4 |
| 3.1.3. Impression des spectres définitifs | 4 |
| 3.1.3.1. Spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide | 4 |
| 3.1.3.2. Spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide | 5 |
| 3.1.3.3. étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale | 5 |
| 3.1.3.4. Conclusions | 6 |
| 3.2. Les artéfacts : diffusion Rayleigh et Raman | 6 |
| 3.3. Dosage de la L-Tyrosine dans un alicament | 7 |
| 3.3.1. Liste des principaux composants de l'aliment | 7 |
| 3.3.2. Élaboration de la gamme d'étalonnage | 7 |
| 3.3.2.1. Spectre de fluorescence de la L-Tyrosine | 7 |
| 3.3.2.2. Gamme d'étalonnage | 7 |
| 3.3.3. Réalisation de l'étalon de contrôle | 8 |
| 3.3.4. Dosage de la L-Tyrosine dans l'aliment | 8 |
| 3.3.5. Résultats | 8 |
| 4. CONCLUSION GÉNÉRALE | 9 |

1. BUT

Il s'agit de se familiariser avec le phénomène de fluorescence et sa mesure. La manipulation comprend deux parties :

- Maniement d'un spectrofluorimètre : réalisation de spectres d'émission et d'excitation d'une substance fluorescente, la tyrosine. Détermination des longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission de cette substance fluorescente. Mise en évidence d'artéfacts.
- Dosage de la L-tyrosine par gamme d'étalonnage spectrofluorimétrique, dans un Alicament.

2. MATERIEL et REACTIFS

2.1. Casier de la manipulation

- Fioles jaugées de 20 et 100 mL ;
- 1 macrocuve en quartz à quatre faces optiques.



Remarque

Les cuves en quartz à quatre faces optiques sont extrêmement fragiles et coûtent très cher. Les manipuler avec le plus grand soin et ne les utiliser que pour le **spectrofluorimètre**.

2.2. Matériel et réactifs fournis

- Spectrofluorimètre **RF-1501 Shimadzu** à pilotage informatique ;
- Balance de précision à 0,1 g ;
- Un agitateur magnétique muni d'un système de chauffage ;
- L-Tyrosine en poudre pour biochimie cas n° 60-18-4 ;
- Acide chlorhydrique à 0,1 mol.L⁻¹ ;
- Gélules de 500 mg de l'alicament.
- Une micro-pipette P100

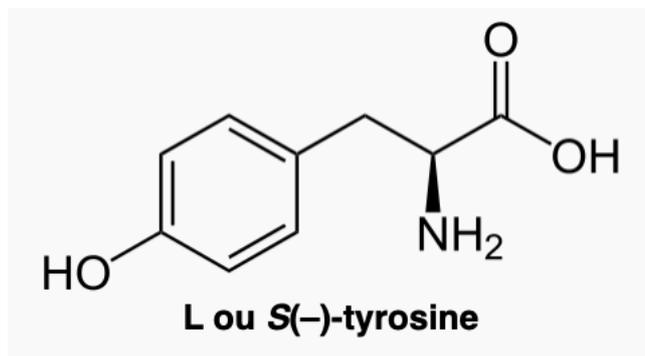
2.3. La L-Tyrosine

La **tyrosine** (abréviations IUPAC-IUBMB : Tyr et Y) est un acide α -aminé dont l'énantiomère L est l'un des 20 acides aminés protéinogènes standard, codé sur les ARN messagers par les codons UAU et UAC.

Sa chaîne latérale comporte un groupe phénol dont l'hydroxyle est légèrement acide ($pK_a = 9,76$).

La tyrosine participe à la synthèse des catécholamines : l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et la DOPA. Elle est aussi précurseur de la mélanine (pigment qui colore la peau, les poils, l'iris) et des hormones thyroïdiennes (formation de thyronine à partir de deux tyrosines).

Sa structure chimique est donnée ci-dessous :



La tyrosine intervient dans la synthèse de la mélanine, le pigment naturel de la peau et des cheveux, et dans celle de la thyroxine, l'hormone thyroïdienne.

Elle a une action sur la dépression ou l'anxiété et intervient dans la formation du neurotransmetteur épinéphrine dans la médullosurrénale.

Un athlète ou un bodybuilder qui s'entraîne intensivement peut tirer profit d'un complément de L-Tyrosine qui, en affectant directement les niveaux de dopamine, peut aider à combattre la fatigue et le stress associés à des séances d'entraînement lourdes et intensives. Certaines études semblent aussi indiquer que la L-Tyrosine pourrait être utile dans la perte de poids.

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Étude de l'absorption et de la fluorescence de la L-Tyrosine en milieu acide

3.1.1. Préparation des solutions M et M₀ de la L-Tyrosine

• **Préparer une solution mère M de L-Tyrosine** de concentration environ exactement $C_M = 0,7 \text{ g.L}^{-1}$. Pour cela, pesez une masse m_{tyrosine} , qui va permettre de réaliser une fiole de 100 mL.

• La masse pesée sera placée dans un bécher auquel vous ajouterez environ 80 mL d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sous agitation pendant environ 5 minutes jusqu'à dissolution complète ;
Transvaser l'ensemble dans une fiole jaugée et compléter à 100 mL avec de l'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

• À partir de la **solution M** de L-Tyrosine, préparer dans 100 mL une **solution M₀** diluée au $1/50^{\text{ème}}$.

3.1.2. Étude préliminaire de fluorescence : recherche des longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales

- Paramétrer le spectrofluorimètre pour déterminer les **longueurs d'onde d'émission** et **d'excitation maximale** de la tyrosine en milieu acide.
- Remplir une cuve à 4 faces optiques avec la solution M_0 puis effectuer une recherche de ces longueurs d'onde à l'aide de la fonction **search λ** .



Rapport

Noter les longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission dans le carnet de laboratoire.

3.1.3. Impression des spectres définitifs

3.1.3.1. Spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide

- Se fixer maintenant sur la **longueur d'onde d'émission maximale** λ_{emopt} déterminée précédemment.
- Faire le **spectre d'excitation**.

Q Quelles seront les valeurs limites théoriques des longueurs d'onde d'excitation balayées pour le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide ?

- Déterminer la **longueur d'onde d'excitation maximale** λ_{exopt} .



Rapport

- Dans quel sens les longueurs d'onde d'excitation défilent-elles et quelles sont les valeurs limites pour le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide ?
- Imprimer le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide avec les paramètres de la mesure (Attention à la mise à jour de ceux-ci).
- Observe-t-on plusieurs pics d'excitation sur le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide ?

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'excitation ?

3.1.3.2. Spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide

Q Quelles seront les valeurs limites théoriques des longueurs d'onde d'émission balayées pour le spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide ?

- Se placer sur la **longueur d'onde d'excitation maximale** λ_{exopt} de la L-Tyrosine en milieu acide et tracer son spectre d'émission.
- Déterminer la **longueur d'onde d'émission maximale** λ_{emopt} .



Rapport

- Imprimer le spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide avec les paramètres de la mesure.
- Imprimer les spectres d'excitation et d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide sur un même graphe (une même cellule). Analyser ces deux spectres. Déterminer le déplacement de Stokes.

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'émission ?

3.1.3.3. Étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale

On cherche à mesurer la fluorescence de la L-Tyrosine lorsque l'on excite la molécule à une longueur d'onde d'excitation différente de la longueur d'onde d'excitation maximale. On testera les écarts à cette valeur de -15, -10, -5, +5, +10 et +15 nm.

Q Quels résultats s'attend-on à observer lors de l'étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale ?

Q Quelle plage de longueurs d'onde de fluorescence faut-il balayer pour cette étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale ?

- Faire les spectres de fluorescence restreints à la région sélectionnée.



Rapport

Imprimer l'ensemble des spectres de fluorescence pour les différentes longueurs d'onde d'excitation sur un même graphe sans oublier d'y faire figurer le spectre de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation maximale.

3.1.3.4. Conclusions



Rapport

Les résultats observés pour l'étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale sont-ils en accord avec la théorie ?

3.2. Les artéfacts : diffusion Rayleigh et Raman

On cherche à évaluer l'influence du solvant sur les spectres de fluorescence de la L-Tyrosine.

Q Quel est l'intérêt de l'étude de l'influence du solvant ?

Q À quoi serviront les résultats de l'étude de l'influence du solvant ?

• Tracer les spectres de diffusion du solvant seul, aux longueurs d'onde d'excitation $\lambda_{exc} = 270$ nm et $\lambda_{exc} = 300$ nm. Vous balayerez tout le domaine UV-visible avec comme longueur d'onde limite basse 250 nm.

Q Quelle est la différence entre les diffusions Rayleigh et Raman ?



Rapport

- Imprimer les deux spectres de fluorescence du solvant seul avec les paramètres de la mesure.
- Analyser les séries de spectres obtenus : le choix de la longueur d'onde d'excitation est-il important ici ?
- Que dire de la diffusion Raman par rapport à la diffusion Rayleigh ?
- A-t-on la relation suivante : $\frac{1}{\lambda_{Rayleigh}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} = \langle \sigma_{OH} \rangle \approx 3380 \text{ cm}^{-1}$?

Q Peut-on s'affranchir de la diffusion ?

3.3. Dosage de la L-Tyrosine dans un alicament

Dans cette partie, nous allons doser la L-Tyrosine dans un alicament.

3.3.1. Liste des principaux composants de l'alicament

Rechercher les principaux composants que renferme le produit analysé.



Rapport

Est-ce qu'il contient d'autres substances absorbant la lumière, donc susceptibles de perturber le spectre d'absorption de la L-Tyrosine ?

3.3.2. Élaboration de la gamme d'étalonnage

3.3.2.1. Spectre d'émission de la L-Tyrosine dans l'alicament

- **Vider une gélule de l'alicament** dans un bécher et en faire la pesée. Dissoudre la poudre dans environ 80 mL d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, en chauffant pendant environ 15 min, sous agitation.
- Effectuer une filtration à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre plissé directement dans une fiole de 100 mL, puis compléter, toujours avec l'acide chlorhydrique jusqu'au trait de jauge.
- Utiliser une fiole de 20 mL, pour effectuer une dilution au $1/400^{\text{ème}}$ de la solution précédente obtenue, on appellera cette fiole, la **fiole inconnue**.
- Faire le spectre d'émission de la fiole inconnue à la longueur d'onde optimale λ_{exopt} .



Rapport

Comparer l'allure du spectre d'émission obtenu avec celui de la solution M_0 . Observe-t-on des différences ?

Indiquer concrètement, comment vous avez réalisé la fiole inconnue de 20 mL.

3.3.2.2. Gamme d'étalonnage

- **Préparer une gamme de solutions filles F_0, F_1, F_2, F_3, F_4 , et F_5** , en introduisant un volume V en mL de la solution M_0 dans des fioles jaugées de 20 mL et en complétant jusqu'au trait de jauge avec l'acide chlorhydrique concentré à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Remplir le tableau correspondant.

Bien homogénéiser avant de faire les mesures.

- Pour chaque solution fille, faites les mesures d'intensité de fluorescence en utilisant la **notice d'analyse quantitative** jointe avec le spectrofluorimètre. Relever en même temps l'intensité de fluorescence sur le CL.
- Répéter **3 fois** la mesure (cela veut dire, concrètement, qu'il faut vider et remplir à chaque fois la cuve 4 faces optiques). Donner les valeurs d'intensité moyenne pour chaque point de gamme (tableau à remplir dans le CR).



Rapport

Indiquer la longueur d'onde de mesure.

L'évolution des valeurs d'intensité de fluorescence sont-elles compatibles avec celles des concentrations des solutions filles ?

3.3.3. Réalisation de l'étalon de contrôle

- **Préparation de l'étalon de contrôle** : Préparer une fiole CQ de 20 mL, en utilisant $V(M_0) = 10$ mL.



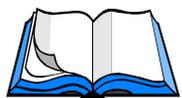
Rapport

Donner la concentration C_{ref} correspondante.

3.3.4. Dosage de la L-Tyrosine dans l'alicament

- Utiliser la **notice d'analyse quantitative** jointe avec le spectrofluorimètre, pour relever l'intensité de fluorescence de la fiole inconnue.

3.3.5. Résultats



Rapport

Imprimer la droite d'étalonnage sous PC150X en appliquant une modélisation linéaire.



Rapport

Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur mesurée (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10\%$.

Relever les concentrations massiques C_1 et C_2 , à l'aide de la droite d'étalonnage.

Vérifier la compatibilité métrologique dans le cas des deux essais précédemment effectués en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.



Rapport

En déduire la concentration massique réelle C_r en tenant compte du facteur de dilution. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.

Donner la quantité en masse de la L-Tyrosine et comparer-là avec la valeur indiquée sur la boîte de l'alicament. Donner l'écart relatif entre les deux valeurs.

4. CONCLUSION GÉNÉRALE



Rapport

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées.

Éléments de réponse aux questions de préparation

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Étude de l'absorption et de la fluorescence de la L-Tyrosine en milieu acide

3.1.3. Impression des spectres définitifs

3.1.3.1. Spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide

Q Quelles seront les valeurs limites théoriques des longueurs d'onde d'excitation balayées pour le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide ?

[220 nm ; $\lambda^{\max}_{\text{fluo}}$]

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'excitation ?

Le monochromateur d'émission est fixe et le monochromateur d'excitation balaye en longueur d'onde.

3.1.3.2. Spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide

Q Quelles seront les valeurs limites théoriques des longueurs d'onde d'émission balayées pour le spectre de fluorescence de la L-Tyrosine en milieu acide ?

[$\lambda^{\max}_{\text{exc}}$; 800 nm]

Q Comment fonctionnent les monochromateurs d'émission et d'excitation dans le cas de l'obtention d'un spectre d'émission ?

Dans cette opération, le monochromateur d'excitation est fixe et c'est le monochromateur d'émission qui balaye en longueur d'onde.

3.1.3.3. Étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale

Q Quels résultats s'attend-on à observer lors de l'étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale ?

Plus on s'écarte de la longueur d'onde d'absorption maximale, plus les intensités de fluorescence diminuent.

Q Quelle plage de longueurs d'onde de fluorescence faut-il balayer pour cette étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale ?

Il est possible de balayer qu'une petite plage de longueur d'onde autour de la longueur d'onde de fluorescence maximale car celle-ci ne varie pas lorsque la longueur d'onde d'excitation varie.

3.2. Les artéfacts : diffusion Rayleigh et Raman

Q Quel est l'intérêt de l'étude de l'influence du solvant ?

Cela permet de voir son incidence sur les mesures.

Q À quoi serviront les résultats de l'étude de l'influence du solvant ?

Ces résultats pourront servir à tenir compte de ces interférences pour les mesures et éventuellement à corriger les mesures.

Q Quelle est la différence entre les diffusions Rayleigh et Raman ?

L'excitation du solvant seul produit une émission de lumière, c'est la diffusion. On l'interprète de la manière suivante : lorsque le photon incident heurte une molécule d'eau, il est renvoyé dans toutes les directions, soit avec la même énergie (c'est la **diffusion Rayleigh** de même longueur d'onde que la lumière incidente), soit avec une énergie plus faible (c'est la **diffusion Raman** de longueur d'onde plus petite que la lumière incidente).

Dans ce dernier cas, la molécule d'eau a absorbé une partie de l'énergie du photon incident qui apparaît sous forme d'énergie vibrationnelle de la liaison OH.

Ceci conduit à la relation :

$$h\nu_{\text{Rayleigh}} - h\nu_{\text{Raman}} = h\nu_{\text{OH}}$$

Soit

$$\frac{1}{\lambda_{\text{Rayleigh}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{Raman}}} = \sigma_{\text{OH}}$$

Q Peut-on s'affranchir de la diffusion ?

On ne peut pas s'affranchir de la diffusion, et c'est elle qui limite la sensibilité de la méthode. En choisissant judicieusement la longueur d'onde d'excitation, on pourra déplacer la diffusion pour qu'elle perturbe le moins possible la fluorescence étudiée.

TP n°5 : Rapport

3. MODE OPÉRATOIRE

3.1. Étude de l'absorption et de la fluorescence de la L-Tyrosine en milieu acide

3.1.1. Préparation des solutions M et M₀ de la L-Tyrosine

- Indiquer la concentration massique exacte obtenue en L-Tyrosine dans M₀. Justifier.

3.1.3. Impression des spectres définitifs

3.1.3.1. Spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide

Dans quel sens les longueurs d'onde défilent-elles et quelles sont les valeurs limites pour le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide ?

Observe-t-on plusieurs pics d'excitation. Si oui, préciser les longueurs d'onde d'excitation et mettre en évidence le pic d'excitation maximale.

Rendre le spectre d'excitation de la L-Tyrosine en milieu acide avec les paramètres de mesure.

Spectres d'excitation de la L-Tyrosine à coller ici

3.1.3.2. Spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide

Dans quel sens les longueurs d'onde défilent-elles et quelles sont les valeurs limites pour le spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide ?

Rendre le spectre d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide avec les paramètres de mesure.

Spectres d'émission de la L-Tyrosine à coller ici

Observe-t-on plusieurs pics d'émission. Si oui, préciser les longueurs d'onde d'émission et mettre en évidence le pic d'émission maximale.

Rendre les spectres d'excitation et d'émission de la L-Tyrosine en milieu acide sur un même graphe (une seule cellule).

Spectres d'émission
et d'excitation
à coller ici

Analyser les deux spectres :

3.1.3.3. Étude de la déviation à la longueur d'onde d'excitation maximale

Imprimer l'ensemble des spectres de fluorescence pour les différentes longueurs d'onde d'excitation sur un même graphe avec le spectre à la longueur d'onde d'excitation maximale.

Ensemble des spectres de
fluorescence
à coller ici

3.1.1.3.3. Conclusions

Les résultats observés sont-ils en accord avec la théorie. Pourquoi ?

3.2. Les artéfacts : diffusion Rayleigh et Raman

Rendre les deux spectres de fluorescence du solvant seul avec les paramètres de la mesure, sur la même feuille et la coller ci-dessous :

Spectres à coller ici

Analyser les séries de spectres obtenus : le choix de la longueur d'onde d'excitation est-il important ici ?

Que dire de la diffusion Raman par rapport à la diffusion Rayleigh ?

A-t-on la relation suivante : $\frac{1}{\lambda_{Rayleigh}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} \approx 3380 \text{ cm}^{-1}$?

3.3. Dosage de la L-Tyrosine dans l'alicament

Dans cette partie, nous allons doser la L-Tyrosine dans un alicament.

3.3.1. Liste des principaux composants de l'alicament

Est-ce qu'il contient d'autres substances absorbant la lumière, donc susceptibles de perturber le spectre d'absorption de la L-Tyrosine ?

3.3.2. Élaboration de la gamme d'étalonnage

3.3.2.1. Spectre d'émission de la L-Tyrosine dans l'alicament

Rendre le spectre d'émission de la L-Tyrosine dans l'alicament, à coller ci-dessous :

Spectre à coller ici

Comparer l'allure du spectre d'émission obtenu avec celui de la solution M_0 . Observe-t-on des différences ?

Indiquer concrètement, comment vous avez réalisé la fiole inconnue de 20 mL.

3.3.2.2. Gamme d'étalonnage

Remplir le tableau suivant :

| Fioles | F_0 | F_1 | F_2 | F_3 | F_4 | F_5 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| V (mL) | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| C (mg/L) | | | | | | |

Valeurs d'intensité de fluorescence moyenne :

| Point de gamme | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| $\langle I_{\text{fluor}} \rangle$ | | | | | | |

Indiquer la longueur d'onde de mesure.

L'évolution des valeurs d'intensité de fluorescence sont-elles compatibles avec celles des concentrations des solutions filles ?

3.3.3. Résultats

Rendre la droite d'étalonnage avec un titre, sous PC150X en appliquant une modélisation linéaire, à coller ci-dessous :

Courbe d'étalonnage à coller ici

3.3.4. Dosage de la L-Tyrosine dans l'alicament

Donner la concentration C_{ref} correspondante

Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur mesurée (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10 \%$.

Relever les concentrations massiques C_1 et C_2 , à l'aide de la droite d'étalonnage.

Vérifier la compatibilité métrologique dans le cas des deux essais précédemment effectués en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.

Donner la valeur retenue C pour la concentration en L-Tyrosine dans la fiole inconnue.

En déduire la concentration réelle C_r en tenant compte du facteur de dilution. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.

En déduire la quantité en masse de L-Tyrosine et comparer-là avec la valeur indiquée sur la boîte de l'alicament. Donner l'écart relatif entre les deux valeurs.

4. CONCLUSION GENERALE

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées.