

2^{ème} année BTS Bioanalyses
en Laboratoire de Contrôle

Théorie en Spectrofluorimétrie



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

l.godin@etsl.fr

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

1. LA FLUORESCENCE	2
2. DÉFINITIONS	2
3. FACTEURS INFLUENÇANT LES MESURES	4

1. LA FLUORESCENCE

Les substances fluorescentes réémettent, sous forme de rayonnements électromagnétiques, une partie de l'énergie emmagasinée par absorption d'un rayonnement lumineux. La lumière réémise est le plus souvent une radiation ultraviolette ou visible dont la longueur d'onde est toujours supérieure à celle absorbée.

Les spectres de fluorescence sont caractéristiques de l'échantillon pour des conditions expérimentales données. De plus, l'intensité de l'émission est proportionnelle à la concentration du produit, sous réserve que celle-ci ne soit pas trop élevée. Les mesures de fluorescence permettent donc des analyses qualitatives et quantitatives. La sensibilité de cette technique est environ 1000 fois supérieure à celle des techniques d'absorption.

Le déplacement des spectres de fluorescence et leurs intensités permettent une analyse de la molécule et de ses interactions avec le milieu environnant.

2. DÉFINITIONS

Les phénomènes physiques observés en fluorimétrie sont décrits par des termes qui sont définis ci-après. La mise en œuvre des manipulations et l'interprétation des résultats obtenus ne sont possibles que si ces termes sont bien compris.

- **Photoluminescence** : Certaines substances émettent un rayonnement, sans production de chaleur, après absorption d'énergie. Ce phénomène s'appelle la luminescence. Lorsque la luminescence fait suite à l'absorption d'un rayonnement ultraviolet ou visible, on parle de photoluminescence.

- **Fluorophore** : un groupement fluorophore est un groupement chromophore qui peut fluorescer.

- **Fluorescence** : c'est le phénomène de retour vers un état énergétique moléculaire de plus basse énergie par émission d'un photon. Autrement dit, une molécule excitée par un rayonnement électromagnétique retourne à un état plus stable en libérant de l'énergie sous forme lumineuse. Le photon émis par fluorescence possède une énergie plus faible que le photon qui a induit l'excitation de la molécule. En effet, une partie de l'énergie absorbée est dissipée sous forme de vibration ou de chaleur. Il en résulte que la longueur d'onde du photon émis est plus grande que celle du photon incident.

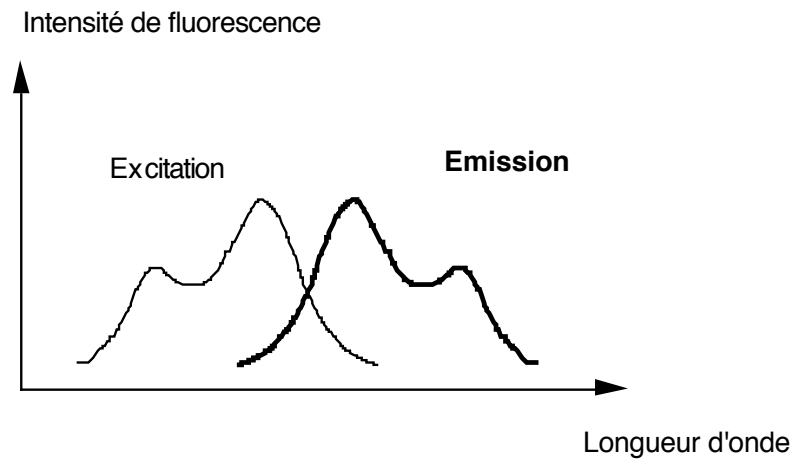
- **Excitation** : c'est le phénomène qui résulte de l'absorption. Une molécule interagit avec un rayonnement électromagnétique et absorbe l'énergie de ce rayonnement. Elle passe d'un état énergétique bas à un état énergétique élevé; la molécule est excitée. Par suite, un spectre d'excitation est obtenu en faisant varier la longueur d'onde du rayonnement électromagnétique, $\lambda_{\text{excitation}}$. Un spectre d'excitation correspond donc à un spectre d'absorption.

- **Émission** : c'est l'expression du phénomène de fluorescence. Les molécules excitées retournent à un état électronique de plus basse énergie en libérant de l'énergie par émission de photons. Par suite, un spectre d'émission s'enregistre en fixant la longueur d'onde d'excitation, $\lambda_{\text{excitation}}$, et en faisant varier la longueur d'onde d'émission, $\lambda_{\text{émission}}$. Un spectre d'émission est un spectre de fluorescence.

- **Mesure de fluorescence** : la fluorescence se mesure à l'aide d'un spectrofluorimètre. Une solution contenant des fluorophores est placée dans une cuve. La solution est excitée par un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde, $\lambda_{\text{excitation}}$. Les fluorophores émettent des photons de longueur d'onde, $\lambda_{\text{émission}}$, qui sont détectés par le fluorimètre et traduits en intensité. L'intensité de fluorescence, $I_{\text{fluorescence}}$, est proportionnelle à la concentration en fluorophore (pour des solutions de faibles concentrations) :

$$I_{\text{fluorescence}} = k.[\text{fluorophore}]$$

Lorsque l'on réalise un spectre de fluorescence, on mesure l'intensité de fluorescence pour différentes valeurs de longueurs d'onde d'émission. Lorsque qu'on réalise un spectre d'excitation, on fixe la valeur de la longueur d'onde d'émission et on balaye les longueurs d'onde d'excitation. Pour les raisons énergétiques énoncées précédemment (voir fluorescence), un spectre d'émission est toujours décalé vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'excitation :



Attention : il faut bien comprendre ce que l'on mesure. Le spectre d'émission est un spectre de fluorescence. Le spectre d'excitation correspond au spectre d'absorption mais ce qu'on mesure à l'aide du fluorimètre est la fluorescence. Le spectre d'excitation est donc un graphe de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

• **Rendement quantique Q** : le rendement quantique de fluorescence peut être exprimé comme le rapport de la fréquence des transitions produisant une émission, n_e , sur la somme des fréquences des événements possibles (fréquence des transitions produisant une émission, n_e , plus fréquence des transitions non radiatives, n_{nr} (qui ne produisent pas d'émission)) :

$$Q = \frac{n_e}{n_e + n_{nr}}$$

Le rendement quantique dépend du fluorophore et des conditions physico-chimiques dans lesquelles il se trouve. Au mieux, ce rapport vaut 1 : toute l'énergie absorbée est restituée sous forme d'émission. Plus ce rapport est grand, plus le fluorophore est susceptible de produire de la fluorescence.

• **Quenching** : les fluorophores excités ont d'autres moyens que la fluorescence pour restituer leur excédent d'énergie. Par exemple, une partie de cette énergie peut être relarguée au cours de collisions entre molécules, phénomène qui n'engendre pas d'émission de photons. On parle de quenching de fluorescence lorsque l'intensité de fluorescence est inférieure à celle que l'on devrait observer pour la quantité de fluorophores présents dans la solution.

Par exemple, on observera le phénomène de quenching dans une solution trop concentrée où les chocs intermoléculaires sont nombreux et consomment une partie de l'énergie restituée par les molécules excitées. On se rendra compte du phénomène lorsqu'après dilution de la solution on observera une augmentation de l'intensité de fluorescence (qui devrait diminuer puisqu'elle est proportionnelle à la concentration en fluorophores).

3. FACTEURS INFLUENÇANT LES MESURES

• **Température de l'échantillon** : d'une manière générale, on considère que la hausse de 1°C de la température de l'échantillon peut entraîner une baisse de 1 à 2 % de l'intensité de fluorescence. Ceci est variable en fonction de l'échantillon et peut atteindre 10 % de baisse de l'intensité de fluorescence avec certains composés biochimiques. Il est possible de s'affranchir de ce problème en travaillant avec une cuve thermostatée.

• **Réactions photochimiques** : l'exposition à la lumière d'excitation peut induire des réactions photochimiques conduisant à une modification de l'intensité de fluorescence. On peut minimiser ce problème en soumettant l'échantillon à la lumière d'excitation uniquement pendant la mesure. Un volet isole l'échantillon de ce faisceau entre les mesures. On peut également réaliser les mesures en augmentant la vitesse de balayage des longueurs d'onde.

• **Fluorescence liée aux impuretés** : des composés fluorescents peuvent être présents dans la cuve contenant le fluorophore étudié. Ces composés sont alors des impuretés. La fluorescence des impuretés est associée à la lumière diffusée et son rayonnement secondaire, la diffraction Raman du solvant et la fluorescence du solvant ou de la cuve. Il existe des solvants commerciaux spécifiques aux mesures spectrofluorométriques et non fluorescents. Les cuves en quartz produisent une fluorescence de faible intensité lorsqu'elles sont excitées à 260 nm en raison de la présence de trace d'aluminium. Des cuves non fluorescentes en quartz artificiel pourront être utilisées pour les mesures autour de 260 nm.

• **Diffusion de la lumière** : en fluorescence, il est possible d'observer des pics artéfacts provenant de la diffusion de la lumière et de la diffusion Raman. La lumière diffusée provient de la diffusion de la lumière d'excitation par les molécules de solvant (**diffusion de Rayleigh**), par des particules ou par des bulles d'air. Cette lumière diffusée parvient au monochromateur d'émission et génère des pics parasites. En fonction des caractéristiques du réseau dispersif du monochromateur, de la lumière diffusée peut également apparaître dans des régions de longueurs d'onde de l'ordre de deux et trois fois la longueur d'onde de la lumière d'excitation. Par exemple, avec une longueur d'onde d'excitation de 220 nm, on peut observer un pic à 440 nm et un pic à 660 nm. De même, si la lumière d'excitation appartient au domaine du visible, le monochromateur d'excitation est susceptible d'émettre de la lumière diffusée à la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Par exemple, si on excite à 450 nm, de la lumière à 225 nm sera également émise. Des filtres peuvent être ajoutés pour s'affranchir de ces rayonnements parasites lorsque ceux-ci sont une gêne pour la mesure.

• **Diffusion Raman** : des pics parasites peuvent apparaître sur le spectre lorsque le solvant présente une activité Raman. Il s'agit d'une diffusion de la lumière par les molécules de solvant, qui s'observe perpendiculairement au rayonnement monochromatique incident (ce qui correspond au positionnement de la lecture en spectrofluorimétrie). Les pics liés à la diffusion Raman se distinguent des pics de fluorescence car d'une part, leurs intensités ne varient quasiment pas avec la concentration en échantillon et d'autre part, la position de ces pics varient lorsque l'on change la longueur d'onde d'excitation contrairement aux pics de fluorescence.

		Longueurs d'onde du pic Raman (nm)			
Solvant		Eau	Ethanol	Cyclohexane	Chloroforme
Longueurs d'onde d'excitation (nm)	248	271	267	267	-
	313	350	344	344	346
	365	416	409	408	410
	405	469	459	458	461
	436	511	500	499	502

- **Concentration de l'échantillon** : un échantillon trop concentré peut être à l'origine d'erreurs. Un phénomène de quenching peut apparaître comme expliqué plus haut. Par ailleurs, le spectrofluorimètre est conçu pour détecter la fluorescence émise du centre de la cuve. Si l'échantillon est trop concentré, la lumière d'excitation peut être absorbée à proximité de la paroi de la cuve. La lumière d'excitation n'atteint plus entièrement le centre de la cuve et il en résulte une baisse apparente de l'intensité de fluorescence. En général, les échantillons dont l'absorbance dans l'ultraviolet (mesurée dans des cuves de 1 cm de trajet optique) n'excède pas 0,02 ne présentent pas ce phénomène.

- **Contamination de la cuve** : La moindre trace sur la cuve peut affecter la précision de la mesure. Ce problème peut être rencontré lorsqu'on laisse s'évaporer l'échantillon dans la cuve. On risque alors la formation de trace persistante. Le problème est le même pour des traces pouvant se former sur les parois externes de la cuve. Il faut donc essuyer immédiatement l'extérieur de la cuve avec du papier optique lorsque celle-ci est souillée par l'échantillon. Le problème de la propreté de la cuve de mesure sera d'autant plus important que l'on étudie des échantillons fortement dilués.

- **Oxygène dissous** : l'oxygène dissous dans les solvants induit une baisse de l'intensité de fluorescence de certains échantillons par quenching. Si ce phénomène est important, il est possible de le contourner en dégazant le solvant.